



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TEMPERAMENTO Y ADAPTACIÓN DE VACAS HOLANDO
EN UN SISTEMA DE ORDEÑO VOLUNTARIO:
COMPORTAMIENTO, METABOLISMO Y PRODUCCIÓN**

JÉSSICA TATIANA MORALES PIÑEYRÚA, DCV, MSc

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2022**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**TEMPERAMENTO Y ADAPTACIÓN DE VACAS HOLANDO
EN UN SISTEMA DE ORDEÑO VOLUNTARIO:
COMPORTAMIENTO, METABOLISMO Y PRODUCCIÓN**

JÉSSICA TATIANA MORALES PIÑEYRÚA, DCV, MSc

Aline Cristina Sant'Anna
Directora de Tesis

Juan Pablo Damián
Director de Tesis

Georget Banhero
Co-directora de Tesis

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Elize van Lier, DMTV, MSc, PhD
Facultad de Agronomía
Universidad de la República - Uruguay

Maria Camila Ceballos, BSc, MSc, PhD
Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad de Calgary - Canadá

Nicolas Andrés Lyons, Ing Agr, PhD
Facultad de Ciencia, Universidad de Sydney
NSW Department of Primary Industries - Australia



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Producción animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 28/09/2022

TRIBUNAL: Elize Van Lier, Camila Ceballos, Nicolas Lyons

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3245720-1	Jessica Tatiana Morales Piñeyrúa	Doce	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

El tribunal evaluó la tesis de Jessica Tatiana Morales Piñeyrúa y su presentación y defensa y llegó a la nota 12 por unanimidad. La presentación fue fluida y didáctica. Tatiana mostró una actitud abierta a las preguntas y críticas sobre el trabajo, respondió sin reservas y justificó muy bien las decisiones tomadas en la ejecución de cada uno de los experimentos. Durante el transcurso del doctorado ha mostrado un alto grado de autonomía y crecimiento académico.

Se acordó entre el tribunal y la estudiante que en el documento escrito quedan algunos detalles a modificar, para lo cual los integrantes del tribunal le harán llegar sus comentarios.

TRIBUNAL

FIRMA

Elize van Lier

Maria Camila Ceballos

Nicolas Lyons

DEDICATORIA

A mi cuerpo, mente y alma que crecieron y se fortalecieron en el camino del doctorado...

A las vaquitas con las que tuve el gusto de trabajar y aprender a amar...

AGRADECIMIENTOS

Siempre he creído que agradecer es parte fundamental de la vida. Si no tienes nada ni a nadie a quien agradecer significa que no valoraste lo que has aprendido y/o no tuviste una buena vida.

En estos largos años, pero que pasaron muy rápido, dude muchas veces si lo que estaba haciendo era correcto, si serviría para algo o ayudaría a mejorar un poco este mundo. Hoy, aunque sigo preguntándome algunas de estas cosas, siento algo diferente, que viene de la confianza en mí para salir a buscar respuestas. Esa confianza la obtuve de mi alma, pero también de las personas y hechos que me rodearon. Personas que confiaron en mí, que me apoyaron psicológica y físicamente, me defendieron y me dejaron ser. Entre ellas están mis guías, mi directora de tesis Aline Sant'Anna, mi director Juan Pablo Damián, mi mentora Georgett Banchemo, y mi jefe Santiago Fariña.

A Aline agradecerle su tiempo, dedicación, y enseñanzas. Aunque estábamos lejos, ella siempre estuvo cerca, haciendo el tiempo para corregir, discutir, comentar y darme para adelante. Una gran persona, amable y fuerte (transitó momentos jodidos y ¡se la banco!). A JP, mi amigo desde que elegí la investigación como forma de vida. También siempre amable, dedicado, con tiempo para mí y mis documentos... con él, junto a Geo (una gran amiga y mentora), transitamos el complicado comienzo, el cual tuvo muchos baches y palos en el camino, pero logramos enfrentarlos convencidos que lo que estábamos haciendo era lo correcto. A Santiago por creer y apoyar mis ideas.

Un proyecto de 4 años, con mucho trabajo de campo no pudo haberse realizado solo, por lo tanto, agradezco a mis compañeros de La Unidad de Lechería de INIA, La Estanzuela. A Marcelo Pla y Juan Negrín, los “protectores” de las vacas y de las instalaciones del tambo voluntario, con los cuales compartí muchas horas adentro y afuera del tambo. A Esteban, Tomás y María López, a quienes “molesté” varias veces adentro de la fosa del tambo convencional. También un gran agradecimiento a todas y todos los estudiantes y pasantes que compartieron conmigo estos trabajos: Álvaro Gómez, Cristian González, Gonzalo Viroga, Jacquelin Santa Cruz, Lucía Bentancor, Camila Etchevarria, Josefina Montini y Joaquín de Mattos que además de aguantar calor (mucho calor), lluvias, y madrugadas en el campo, también tuvieron que aguantarme a mí.

Este posgrado me permitió visitar a la Universidad Federal de Juiz de Fora (Brasil), donde trabaja Aline, y a donde me recibieron muy bien. Agradezco a las y los estudiantes que me apoyaron durante la pasantía en esa institución.

Agradezco a Marcia del Campo, compañera de INIA Tacuarembó, por prestarme muy amablemente el equipo infrarrojo con el cual realizamos la prueba de velocidad de fuga.

Además de recursos humanos, es necesario financiamiento para que los proyectos se realicen, así que también debo agradecer al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la financiación del proyecto y la beca de posgrado (POS_NAC_ _2018_1_151523), respectivamente.

También quisiera agradecer a la/os integrantes del tribunal de defensa de tesis: Elize Van Lier, Maria Camila Ceballos y Nicolas Lyons por aceptar leer, discutir y evaluar este trabajo.

Para terminar, agradecer a las personas que sin siquiera saber que es un doctorado, estuvieron a mi lado alentándome a seguir, mi madre, mis amigas y mi compañero de vida, Willi. Y muy especial agradecimiento a Priscila, mi masajista, sin ella no hubiera llegado entera a la defensa...

Y aunque le dije alguna vez a Willi, mientras estaba estresada terminando de escribir este documento: ... “me falta vida para el doctorado...”, SE LOGRO!! 😊

¡Muchas gracias!

Tatiana

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	6
2.1. <i>Sistema de ordeño voluntario</i>	6
2.2. <i>Temperamento animal</i>	7
2.3. <i>Temperamento animal, adaptación y estrés</i>	9
2.4. <i>Situaciones estresantes estudiadas en esta Tesis y su relación con el temperamento animal</i>	10
2.4.1. <i>Adaptación al sistema de ordeño voluntario</i>	10
2.4.2. <i>Adaptación de la vaca primípara al sistema de ordeño</i>	12
2.4.3. <i>Período de transición.....</i>	13
2.4.4. <i>Comportamiento en pastoreo</i>	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4.1. <i>Hipótesis general</i>	19
4.2. <i>Hipótesis específicas.....</i>	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. <i>Objetivo general</i>	20
5.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	20
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
7. METODOLOGÍA GENERAL.....	23
7.1. <i>Lugar de estudio y caracterización de los sistemas</i>	23
7.2. <i>Evaluación del temperamento</i>	26
7.3. <i>Análisis estadístico</i>	27
8. DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL.....	29
8.1. <i>Experimento I (Publicación I)</i>	29
8.2. <i>Experimento II</i>	36
8.3. <i>Experimento III (Publicación II)</i>	43
8.4. <i>Experimento IV (Publicación III)</i>	50
9. DISCUSIÓN GENERAL	58

<i>9.1. Respuesta al ingreso a un sistema de ordeño voluntario (Estudios I y II)</i>	<i>58</i>
<i>9.2. Adaptación al período de transición y comportamiento en pastoreo (Estudios III y IV).....</i>	<i>61</i>
10. CONCLUSIONES GENERALES	65
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de vacas Holando según tres pruebas de temperamento en corral: tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)	30
Tabla II. Comportamientos (media \pm EE) durante el ordeño según temperamento [clasificadas por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando multíparas durante los primeros cinco ordeños luego del cambio desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario.....	32
Tabla III. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando multíparas sobre los comportamientos y parámetros productivos durante el periodo de adaptación luego del cambio desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario.....	35
Tabla IV. Clasificación de vacas Holando según tres pruebas de temperamento en corral: tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).	37
Tabla V. Cantidad de pasos (media \pm EE) de vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según clasificación por las pruebas de temperamento velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).....	39
Tabla VI. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando primíparas sobre los comportamientos y parámetros productivos durante los primeros 7 días de ordeño en un sistema de ordeño voluntario.....	42
Tabla VII. Clasificación de vacas Holando según 4 pruebas de temperamento: reactividad en el ordeño (RO); tiempo de pasaje por el tubo (TP); velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).	44
Tabla VIII. Frecuencia de ordeño, producción de leche, leche corregida por 3,5% de grasa y componentes de la leche (medias \pm EE) de vacas Holando primíparas (PRIM) y multíparas (MULT) de diferentes temperamentos [clasificadas por las pruebas reactividad en ordeño (RO) y tiempo de pasaje por el tubo (TP)] durante 10 semanas de lactación en un sistema de ordeño voluntario.	45
Tabla IX. Metabolitos sanguíneos de vacas Holando (medias \pm EE) durante las primeras 10 semanas posparto según temperamento [clasificación por reactividad en ordeño (RO) y tiempo de pasaje por el tubo (TP)] en un sistema de ordeño voluntario.....	47

Tabla X. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF), distancia de fuga (DF) y reactividad en el ordeño (RO)] de vacas Holando multíparas sobre los parámetros productivos y metabólicos durante los primeros 70 días posparto en un sistema de ordeño voluntario.48

Tabla XI. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF), distancia de fuga (DF) y reactividad en el ordeño (RO)] de vacas Holando sobre el tiempo de cada comportamiento en pastoreo, así como el tiempo en cada ubicación, durante 10 días en un sistema de ordeño voluntario.56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Sistema de ordeño convencional y B) sistema de ordeño voluntario de la Unidad de lechería de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.....	24
Figura 2. Parcelas de pastoreo en el sistema de ordeño voluntario (SOV) de INIA La Estanzuela, separadas en tres sectores, A, B y C, los cuales presentan distintas horas de apertura diaria.	25
Figura 3. Cantidad de pasos promedio por ordeño de vacas Holando multíparas durante los primeros 5 ordeños luego del cambio de un sistema de ordeño convencional a uno voluntario (SOV).....	31
Figura 4. Cantidad de patadas promedio por ordeño de vacas Holando multíparas durante los primeros 5 ordeños luego del cambio de un sistema de ordeño convencional a uno voluntario (SOV) según la clasificación por la prueba distancia de fuga: calmas (blanco) o reactivas (negro).....	32
Figura 5. Producción de leche (media \pm EE) de los primeros 7 días en un sistema de ordeño voluntario (SOV), expresada como valores relativos a la producción de leche en el sistema de ordeño convencional (100%=media de la producción de los 7 días previos al cambio de sistema) de vacas Holando multíparas..	33
Figura 6. Flujo de leche (media \pm EE) de los primeros 7 días en un sistema de ordeño voluntario (SOV), expresado como valores relativos al flujo de leche en el sistema de ordeño convencional (100%=media del flujo de los 7 días previos al cambio de sistema) de vacas Holando multíparas según la clasificación por la prueba velocidad de fuga (calmas: línea discontinua, reactivas: línea continua).....	34
Figura 7. Tiempo de entrada al box de ordeño (mean \pm SE) de vacas Holando primíparas durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según la clasificación de temperamento por la prueba distancia de fuga (vacas calmas: línea discontinua; intermedias: línea punteada; reactivas: línea continua)..	38
Figura 8. Cantidad de pasos realizados por vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según clasificación de temperamento por la prueba velocidad de fuga (vacas calmas: línea discontinua; intermedias: línea punteada; reactivas: línea continua).....	40
Figura 9. Cantidad de patadas realizadas por vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario.....	40

ABREVIATURAS

AGNE: ácidos grasos no esterificados

AST: aspartato aminotransferasa

BEN: balance energético negativo

BHB: β -hidroxi-butirato

Ca: calcio

DF: distancia de fuga

GGT: gamma-glutamyl transferasa

ITH: índice de temperatura y humedad

Mg: magnesio

MULT: multíparas

P: fósforo

PRIM: primíparas

RO: reactividad en el ordeño

RTM: ración totalmente mezclada

SOC: sistema de ordeño convencional

SOV: Sistema de ordeño voluntario

TP: tiempo de pasaje por el tubo

VF: velocidad de fuga

RESUMEN

A través de las respuestas fisiológicas y comportamentales individuales al manejo (por ejemplo, el temperamento) es posible evaluar como los animales se adaptan a los sistemas de producción. El temperamento influye en la producción, reproducción, metabolismo, salud y respuestas de estrés de las vacas lecheras. Sin embargo, cómo el temperamento afecta la adaptación de vacas lecheras a los sistemas de producción no ha sido estudiado. Dado que los sistemas de ordeño voluntarios (SOV) se incrementan en Uruguay, es relevante conocer cómo se adaptan los animales a dichos sistemas, y qué factores afectan esta adaptación. El objetivo general de la tesis fue caracterizar el temperamento de vacas Holando primíparas y multíparas por diferentes pruebas, y evaluar las respuestas comportamentales, metabólicas y productivas de acuerdo con el temperamento animal en un SOV. El trabajo se desarrolló en cuatro grandes capítulos siguiendo los objetivos específicos: 1) evaluar la adaptación comportamental y productiva de vacas multíparas Holando al traslado desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario, y su relación con la reactividad a diferentes pruebas de temperamento (n=35), 2) determinar la influencia del temperamento de vacas primíparas Holando en los indicadores productivos y comportamentales de adaptación a los primeros ordeños en un SOV (n=34), 3) comparar la producción y composición de la leche, frecuencia de ordeño, y los perfiles metabólicos durante el período de transición (hasta 70 días posparto) de vacas Holando multíparas (n=57) y primíparas (n=34) de diferente reactividad a pruebas de temperamento en un SOV, 4) relacionar la reactividad a distintas pruebas de temperamento y la paridad (primíparas o multíparas) de vacas Holando con sus comportamientos en pastoreo bajo un SOV pastoril (n=69). Se evaluó el temperamento a los animales perteneciente al rodeo del SOV de INIA La Estanzuela, utilizando 4 pruebas: reactividad en el ordeño, tiempo de pasaje por el tubo, velocidad de fuga y distancia de fuga. Las vacas primíparas y multíparas fueron clasificadas según cada prueba en animales calmos, intermedios o reactivos, y esos grupos de temperamento fueron relacionados con diferentes variables productivas, comportamentales y fisiológicas, obtenidas en diferentes situaciones de manejo o estrés (traslado de un sistema de ordeño a otro, primeros ordeños y período de transición). En base a nuestros resultados podemos concluir que existió una relación entre el temperamento evaluado por pruebas realizadas en el corral y las respuestas comportamentales, productivas y metabólicas de vacas Holando cuando entran por primera vez al SOV y durante el posparto temprano. Los comportamientos de los animales mientras pastorean también fueron influenciados por la reactividad a diferentes pruebas de temperamento de los mismos. Todas estas respuestas fueron diferentes según la paridad y la prueba usada para evaluar el temperamento. En términos generales, las vacas calmas fueron más sensibles y/o tuvieron más dificultades para adaptarse al cambio de sistema que las reactivas, lo cual se evidenció en variables comportamentales (ej. más patadas), productivas (menor producción y flujo de leche) y metabólicas (mayor concentración de AGNE, colesterol, y haptoglobina, y menor BHB y proteínas totales), evidenciando un mayor compromiso de su bienestar.

PALABRAS CLAVES: bienestar animal, estrés, metabolismo, pastura, personalidad

SUMMARY

It is possible to assess how animals adapt to production systems by individual physiological and behavioural responses to handling. Individual differences in behavioural responses, consistent over time and/or different contexts, are defined as temperament. Temperament has been related to productive, reproductive, metabolic, health and stress responses in dairy cows. However, the effects of temperament on adaptive responses of dairy cows to production systems remain unknown. In Uruguay automatic milking systems (AMS) adoption is rising, so, studies about how animals adapt to these systems and which factors could affect their efficiency are relevant. Therefore, this thesis aimed to characterize primiparous and multiparous Holstein cows' temperament, using four temperament indicators, and to evaluate the behavioural and productivity responses in a pasture-based AMS. Four studies were performed in the *Unidad de Lechería* of *INIA La Estanzuela*, following these objectives: 1) to assess behavioural and productive responses to milking adaptation of multiparous Holstein cows during the changeover from a conventional milking system to an AMS, and to relate these responses with cows' temperament (n=35); 2) to determine the influence of temperament of primiparous cows (n=34) on productive and behavioural indicators of adaptation to first milking at AMS; 3) to evaluate the influence of temperament and parity on milk production and metabolic responses of Holstein cows in a pasture-based AMS (n=91); and 4) to relate the temperament and parity of Holstein cows with their grazing behaviours in an AMS (n=69). Cows were classified as 'calm', 'intermediate' or 'reactive' for each of the temperament tests conducted: milking reactivity (MR), race time (RT), flight speed, (FS) and flight distance (FD). Productive, behavioural and physiological variables were obtained in different handling situations (during the changeover from a conventional to automatic milking system, first milking, and postpartum period). Based on our results, we conclude that there was a relationship between the temperament evaluated by tests in the yard and behavioural, productive, and metabolic responses of Holstein cows during the period of adaptation in the AMS and the early postpartum period. Also, the grazing behaviour was influenced by cows' temperament. The effects of temperament varied according to the test used and parity, but in general, calmer cows were more sensitive and/or had more difficulty to adapt to system changeover than reactive cows, which was evidenced by behaviour (e.g., kicking), productive responses (less milk yield and milking frequency) and metabolism (greater NEFA, cholesterol and haptoglobin, and lower BHB and total protein concentrations), showing a possible welfare compromise.

KEYWORDS: animal welfare, metabolism, pasture, personality, stress

1. INTRODUCCIÓN

La lechería es el sector agropecuario de mayor ingreso de exportación por hectárea de Uruguay (INALE, 2022). Su principal atributo es la alta productividad, la cual ha aumentado 3,5 veces respecto a 1985 (año base = 100) según la Oficina de Estadística Agropecuarias (DIEA, 2016). Este fenómeno está dado por una mayor intensificación del sistema a través de la incorporación de nuevas tecnologías y conocimientos, que generan más litros de leche producidos por hectárea. Dentro de los 3600 productores de leche uruguayos se pueden encontrar una diversidad de tipo de producción. Conviven sistemas de producción con alto consumo de pasto (pastoreo directo todo el año) o con alto consumo de suplementos (estabulación durante todo el año) (Fetter y col., 2014; INALE 2019), siendo los sistemas de alimentación mixtos los preponderantes. Además, actualmente podemos encontrar también una diversidad de tipos de ordeñes. El sistema de ordeño convencional (SOC) sigue siendo el predominante, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la instalación de sistemas de ordeñes automatizados o robotizados.

El desarrollo tecnológico, la mejora del potencial productivo de las vacas lecheras y la búsqueda de una mejor calidad de vida para los trabajadores aumentó la necesidad de automatización en los establecimientos lecheros, lo que resultó en el desarrollo de los sistemas de ordeño automatizados. Este sistema se caracteriza por un ordeño sin intervención humana (lo realiza un robot), y por el movimiento de las vacas de forma voluntaria hacia y desde el tambo. Debido a esta última característica, los sistemas de ordeño automatizados son también llamados sistemas de ordeño voluntarios (SOV), y de esta manera se lo va a nombrar a lo largo de esta tesis.

La eficiencia de los SOV dependerá en gran medida del comportamiento de las vacas (Broucek y Tongel, 2015; John y col. 2016, 2019; Ketelaar-de Lauwere, Devir y Metz, 1999; Lyons, Kerrisk y García, 2014). Por ejemplo, a mayor frecuencia de ordeño mayor será la producción de leche (Lyons y col., 2004). Los comportamientos, así como la productividad y el metabolismo, son parte de la respuesta adaptativa del animal a las diferentes situaciones a las que se enfrentan. En un SOV, así como en los SOC, las vacas deberán enfrentarse a situaciones estresantes a lo largo de su vida, como por ejemplo el ingreso de las primíparas por primera vez al ordeño. Existen diferencias individuales en cómo se adaptan las vacas al SOV, incluso en animales previamente familiarizados al sistema (Kashiwamura y col., 2001; Weiss, Moestl y Bruckmaier, 2005). Estas diferentes respuestas entre individuos podrían estar determinadas por el temperamento animal. No obstante, los estudios acerca de los factores relacionados con el animal que pueden incidir en la adaptación de las vacas a los sistemas, como por ejemplo el comportamiento o el temperamento, son escasos (Jacobs y col., 2011; Jago y Kerrisk, 2011; Ketelaar-de Lauwere y col., 1996; Rousing y col., 2006).

La investigación del temperamento en el ganado bovino ha ido en aumento dado su relación con la eficiencia del manejo y con aspectos productivos, reproductivos y de

salud (Brandão y Cooke, 2021; Cooke, 2014; Munksgaard y col., 2001; Rousing, Bonde, Badsberg, y Sørensen, 2004; Sewalem, Miglior, y Kistemaker, 2010; Szentléleki, Nagy, Széplaki, Kékesi y Tozsér, 2015). Además, ha habido una tendencia mundial hacia la selección genética de animales dóciles y seguros de manejar (Daigle, Hubbard y Grandin, 2020; Valente y col., 2017). Sin embargo, en los SOV los estudios sobre el temperamento animal en diferentes situaciones o rutinas son limitados. Existe poca investigación sobre el temperamento del ganado lechero desde la perspectiva del sistema de ordeño (Estévez-Moreno y col., 2021). Por otro lado, la decisión de instalar un SOV implica una importante inversión de capital (Castro, Pereira, Amiama y Bueno, 2012; Engel y Hyde, 2003). Por lo tanto, toda información que mejore la eficiencia del mismo y minimice el estrés, tanto de las vacas como de los operarios, será de utilidad a los productores que quieran cambiarse a este tipo de sistema.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Sistema de ordeño voluntario

Los SOV comenzaron a comercializarse a partir de 1992, aumentando su popularidad hasta el día de hoy, particularmente en sistemas de producción intensivos. En el 2010 ya existían aproximadamente 8000 establecimientos con este sistema solo en el noroeste de Europa (De Koning, 2010), y es en esa zona donde ha habido las mayores tasas de adopción de esta tecnología (entre 20 a 30% de los establecimientos lecheros tienen un SOV) (Eastwood y Alan Renwick, 2020). En los últimos años ha crecido el interés de incorporar el SOV en sistemas de producción pastoriles, siendo Australia (Greenall y col., 2004), Nueva Zelanda (Woolford y col., 2004) e Irlanda (O'Brien, 2012) los principales países. Sin embargo, aún es muy bajo la adopción de esta tecnología en estos tipos de sistemas (menos de 1% de los establecimientos; Eastwood y Alan Renwick, 2020). Más recientemente, se comenzó a estudiar el SOV en sistemas de alimentación mixto (pasturas más concentrado), lo cuales son sistemas parecidos a los uruguayos; siendo la información sobre la adopción de esta tecnología en estos tipos de sistemas escasa (Simões Filho y col., 2020; Utsumi, 2011).

El primer SOV de Uruguay fue instalado en 2017 en la Unidad de lechería de INIA la Estanzuela, habiendo hasta la fecha 4 tambos más funcionando. A diferencia del SOV de INIA, los demás tambos mantienen sus vacas en encierros con una alimentación basada en concentrados. El SOV de INIA es el único con base pastoril, lo cual es importante dado el aumento del interés por este tipo de producción. El bajo costo de producción de los sistemas pastoriles (Fariña y Chilibroste, 2019) y la percepción por los consumidores de que estos sistemas son beneficiosos para el bienestar de los animales (Cardoso, von Keyserlingk, y Hötzel, 2019) los hacen cada vez más atractivos. A su vez, los SOV presentan características que también le dan aspecto de “amigable” con los animales. Entre las ventajas que se atribuyen a los SOV se encuentra la reducción del estrés animal (Jacobs y Siegford, 2012) y el incremento de la producción de leche por minuto (Szentléleki y col., 2015; Tse, Barkema, DeVries, Rushen, y Pajor, 2018a). Hay una disminución de la competencia de las vacas por el alimento, llevando también a una mayor eficiencia en la producción de leche (DeVries y von Keyserlingk, 2006). Dado que en los SOV las vacas tendrían más oportunidad de expresar sus comportamientos normales que en los SOC, y que el ordeño es voluntario, estos sistemas podrían presentar ventajas vinculadas al bienestar animal (Broucek y Tongel, 2015; Winter y Hillerton, 1995).

Básicamente un SOV consiste en puertas de entradas y salidas, un sistema de alimentación automático y un brazo robótico que coloca las pezoneras en la ubre de la vaca. Todo el sistema permite: la identificación de la vaca, la alimentación individualizada con suplementación, la localización de los cuartos, la colocación de la pezonera, el lavado de los pezones, el ordeño, y la remoción de la pezonera sin intervención humana. El proceso de ordeño y el arreo de los animales hacia el

equipo de ordeño y desde éste hacia los corrales de alimentación y/o descanso se caracteriza por una escasa presencia de personas. La vaca puede ordeñarse a cualquier hora del día, siendo un sistema de uso continuo en lugar de un proceso "por lotes" (dos o tres veces al día). Por lo tanto, la eficiencia en estos tipos de sistemas de ordeño está dada por el flujo de los animales y, por ende, por las visitas al robot (frecuencia de ordeño) (Broucek y Tongel, 2015; Lyons y col., 2014). Una frecuencia de ordeño ideal para cada vaca será el resultado de su potencial de producción (Lyons y col., 2014), pero también deben considerarse otros factores, como son el bienestar animal (Jacobs y Siegford, 2012) y el grado de motivación de la vaca (Prescott, Mottram, y Webster, 1997). La motivación de las vacas para moverse está dada principalmente por el alimento (Prescott, Mottram y Webster, 1998). Además, las interacciones entre las vacas y las condiciones climáticas o ambientales pueden ser factores determinantes de dichos movimientos (Morales-Piñeyrúa, Damián, Banchemo y Sant`Anna, 2022; Wildridge y col., 2018). Estas interacciones varían con el sistema de alimentación utilizado (confinados o pastoriles), con el diseño o infraestructura del tambo, el tráfico de vacas (libre vs. forzado), y aspectos sociales del grupo animal (por ejemplo, la jerarquía) (Jacobs y Siegford, 2012).

Los factores individuales no solo explican la variación en los comportamientos de los animales en el sistema (y con eso la frecuencia de ordeño, el intervalo entre ordeño y el tráfico de las vacas) sino también podrían determinar la capacidad de adaptación de las vacas al mismo. En un SOV, al igual que en los SOC, las vacas deben enfrentarse a lo largo de su vida productiva a diferentes situaciones estresantes o de cambios. Los primeros ordeños de vacas primíparas, el período de transición y los cambios en la alimentación, son algunos ejemplos de situaciones estresantes para las vacas lecheras. A esto le podemos sumar que la instalación de un SOV significa el traslado de las vacas desde el SOC al nuevo sistema. Se ha reportado una gran variabilidad individual en la facilidad con que las vacas se adaptan a un nuevo sistema (Jago y Kerrisk, 2011; Kashiwamura y col., 2001; Sutherland y Huddart, 2012). Estas variaciones individuales en las respuestas a las nuevas situaciones pueden estar relacionadas o influenciadas por el temperamento del animal.

2.2. Temperamento animal

Dentro de una población de animales es común observar diferencias individuales en los comportamientos de estos en distintos contextos (Sih, Bell, Johnson, 2004). Estas respuestas individuales a menudo son estables a lo largo de la vida de un animal, y se repiten en un amplio rango de situaciones. Por ejemplo, un animal que responde de una forma agresiva a una determinada situación, también lo hace en otra situación (Gibbons, Lawrence y Haskell, 2009a). El temperamento animal es el término que engloba esas diferencias individuales en las respuestas comportamentales a diferentes situaciones, consistentes en el tiempo y/o distintos contextos (Réale, Reader, Sol, McDougall, y Dingemanse, 2007). Esta expresión se

utiliza como equivalente al término personalidad (utilizada mayormente en humanos), aunque esta última expresión implica el temperamento y la experiencia (Finkemeier, Langbein y Puppe, 2018). El temperamento es una característica compleja, formada por diversas dimensiones como agresividad, sociabilidad, nivel general de actividad o reactividad (Sih y col., 2004), por lo tanto, no existe un solo indicador que nos evalúe todas estas dimensiones. Sin embargo, generalmente, el temperamento es definido como algo unidimensional: “calmo vs. reactivo”, “proactivo vs. reactivo”, “agresivo vs. no agresivo”, “audaz vs. tímido” (Finkemeier y col., 2018).

En la investigación animal, generalmente el temperamento es evaluado por medio de la caracterización de la reactividad de los animales frente a determinadas situaciones estandarizadas de manejo. Por lo tanto, el temperamento es medido a través de indicadores comportamentales (pruebas); siendo los más comunes los escores visuales, los cuales consideran la frecuencia e intensidad de movimientos y otros comportamientos frente a la manipulación humana (Breuer, Hemsworth, Barnett, Matthews, y Coleman, 2000; Burrow, 1997; Hedlund y Løvlie, 2015; Rousing y col., 2004; Wenzel, Schönreiter-Fischer, Unshelm, 2003). Se puede considerar para describir el temperamento pruebas realizadas varias veces durante el período juvenil y/o en la vida adulta de un animal. Algunas de estas pruebas comportamentales han sido más estudiadas en unas especies que en otras. Así, la reactividad en el ordeño es el indicador más utilizado para evaluación de temperamento en vacas lecheras (Hedlund y Løvlie, 2015). Esta prueba se basa en la descripción de ciertos comportamientos durante el ordeño (por ej. patear, mover los miembros posteriores) que son medidos en determinada escala (escores), los cuales varían ampliamente entre autores (Burrow, 1997). La velocidad de fuga del cepo (VF) es una prueba comúnmente usada en ganadería (Burrow y Dillon, 1997; Cafe y col., 2011; Curley, Paschal, Welsh y Randel, 2006; Müller y von Keyserlingk, 2006), ya que es un método objetivo, con alta repetibilidad, rápido y seguro de realizar a campo. Este indicador evalúa la velocidad con la que sale el animal a un espacio abierto luego de haber estado encerrado en el cepo, permitiendo observar la reacción a la manipulación humana (Burrow, 1997; Gibbons, Lawrence, y Haskell, 2011) y/o la necesidad de liberarse de un espacio restringido (Kilgour, Melville y Greenwood, 2006). A modo de ejemplo, los animales que salen más rápido son considerados más reactivos. La prueba de distancia de fuga (DF) evalúa el miedo hacia el humano, permitiendo obtener información sobre la relación humano-animal (Kilgour y col., 2006). Actualmente la VF, DF u otros tipos de pruebas ampliamente usadas en ganadería están siendo incorporadas en las evaluaciones de temperamento de vacas lecheras (Gibbons y col., 2011; Hedlund y Løvlie, 2015; Shahin, 2018; Sutherland, Rogers y Verkerk, 2012). Por otro lado, la prueba tiempo de pasaje por el tubo (TP), evaluada como técnica de aprendizaje aversivo en vacas (Pajor, Rushen y de Passilé, 2000) y como técnica para evaluación del miedo en vaquillonas (Arnold, Ng, Jongman, y Hemsworth, 2007), podría ser un buen método para determinar el temperamento bovino. Dicha prueba evalúa la predisposición que tiene una vaca de pasar por un corredor para llegar a un lugar específico (espacio cerrado). Hasta el

momento ha sido poco utilizada en ganado lechero, pero parecería ser una prueba consistente en el tiempo (Marçal-Pedroza, y col. 2020).

La creciente evidencia sugiere que el temperamento está asociado a diversos aspectos productivos del animal. Específicamente en lechería, algunas pruebas de temperamento han sido relacionadas con la producción de leche (Breuer y col., 2000; Sutherland y col, 2012), composición de la leche (Carvalho, Sant'Anna, Páscoa, Jung y Paranhos da Costa, 2017), rapidez de ordeño (Sewalem, Miglior y Kistemaker, 2011; Sutherland y Dowling, 2014) y longevidad (Sewalem y col., 2010). Sin embargo, existen resultados contradictorios al respecto, por ejemplo, algunos autores reportan menos producción de leche para vacas más reactivas o nerviosas (Hedlund y Løvlie, 2015; Marçal-Pedroza, y col. 2020), mientras que otros autores reportan mayores producciones para vacas de temperamento excitables (Gergovska, Miteva, Angelova, Yordanova y Mitev, 2012; Sawa, Bogucki, Neja y Krężel-Czopek, 2017). Los mecanismos que explican esas posibles relaciones han sido escasamente analizados. Por lo tanto, el estudio de la asociación entre el temperamento y las variables que afectan la producción como el consumo, metabolismo o comportamiento de alimentación podrían ayudar a entender dichas relaciones.

El temperamento ha sido estudiado también como factor de selección genética (Norris, Ngambi, Mabelebele, Alabi, y Benyi, 2014; Stephansen, Fogh y Norberg, 2018). Dado que los rasgos de temperamento son relativamente estables en el tiempo y en distintas situaciones, entonces se podría seleccionar animales según características medibles en la crianza, apuntando a ciertas aptitudes buscadas en la vida adulta (Koolhaas y van Reenen, 2016). En tal sentido, criar animales que fueron seleccionados por el temperamento, podría permitir que se adapten mejor a los cambios de sistema, sufrir en menor grado las respuestas de estrés, presentar mejor estado de bienestar y aumentar la producción.

2.3. Temperamento animal, adaptación y estrés

El bienestar animal es definido como “el estado de un animal en relación al intento de adaptarse a su ambiente” (Broom, 1986). El adaptarse a un ambiente implica que los animales deben enfrentarse a diversas situaciones, lo cual producirá cambios fisiológicos, bioquímicos, inmunológicos y comportamentales (Broom, 2010; Koolhaas, de Boer, Coppens y Buwalda, 2010), que resultarán en un “costo” energético por parte del animal, muchas veces conducido por la propia respuesta de estrés. Cuanto mayor sea la dificultad para adaptarse a una determinada situación mayor será el gasto, provocando un deterioro de otras actividades, ya sean productivas, reproductivas o de salud (Dhabhar, Miller, McEwen y Spencer, 1996; Dobson y Smith, 2000; Etim, Williams, Evans y Offiong, 2013).

Las vacas lecheras frecuentemente deben enfrentarse o adaptarse a diversas situaciones potencialmente estresantes durante su vida en un tambo (Gibbons y col.,

2009). Por lo tanto, entender como la respuesta de los animales a los diferentes estresores influye en el bienestar y productividad del animal resulta esencial en la lechería. Una manera útil de abordar estos problemas es el estudio de las respuestas fisiológicas y comportamentales individuales a los manejos realizados en un establecimiento; así como evaluar la asociación entre dichas respuestas y la producción y calidad de la leche (Hedlund y Løvlie, 2015; Uetake, Morita, Hoshiba y Tanaka, 2002).

Cada vaca tendría su propia respuesta a diferentes estresores, la cual podría ser distinta según su temperamento (Burdick, Randel, Carroll y Welsh, 2011). En situaciones de estrés, o adaptación, la vaca lechera responde disminuyendo el flujo y la producción de leche, aumentando la cantidad de pasos y/o patadas al ordeñador o a la máquina de ordeño, incrementando la frecuencia de defecación, orina o vocalización durante la preparación y/o el ordeño, y bajando el consumo de alimento entre otras cosas (Acharya, Hemsworth, Coleman y Kinder, 2022; Chebel, Silva, Endres, Ballou y Luchterhand, 2016; Damián y Ungerfeld, 2013; Rousing y col., 2004; Rushen, De Passillé y Munksgaard, 1999; Trevisi y Bertoni, 2009). Se ha reportado asociación entre estas respuestas y diferentes pruebas de temperamento, por ejemplo, vacas clasificadas como reactivas por VF despliegan más pasos durante el ordeño (Marçal-Pedroza y col., 2020), y producen menos leche (Rousing y col., 2004). Cuando las vacas lecheras fueron manipuladas trans-rectalmente, las concentraciones del cortisol fueron mayores en las vacas previamente clasificadas como más reactivas (nerviosas) que las vacas menos reactivas (Kovács y col., 2016). Estas diferencias en las concentraciones de cortisol encontradas como respuesta al estrés podrían explicarse por la diferencia en la concentración basal de cortisol (concentración que tienen antes de la situación de estrés) en los distintos perfiles de temperamento (Curley y col., 2006; Sutherland y col., 2012). Por lo tanto, el comportamiento relacionado al estrés, y sus manifestaciones fisiológicas y bioquímicas podrían estar influenciadas por el temperamento.

En los SOV, al igual que en los SOC, algunos ejemplos de situaciones comprobadamente estresantes para la vaca son el traslado de un sistema de ordeño a otro, el primer ordeño de las vaquillonas y/o el período de transición, pues implican estrés metabólico y estrés por la novedad, nuevas rutinas de manejo y nuevos estímulos ambientales. Estos cambios pueden generar respuestas de miedo y aumento de la reactividad de los animales durante el ordeño (Eicher y col., 2007; Jacobs y Siegford, 2012; Koolhaas y col., 2010; Van Reenen y col., 2002), las cuales podrían ser distintas según el temperamento del animal.

2.4. Situaciones estresantes estudiadas en esta Tesis y su relación con el temperamento animal

2.4.1. Adaptación al sistema de ordeño voluntario

La respuesta comportamental a un ambiente desconocido (por ejemplo, a un nuevo sistema de ordeño) depende de cómo los animales perciben la novedad. Si las vacas

son movidas a un ambiente confortable o mejor, comparado con el que ya estaban, podrían adaptarse rápidamente al cambio (Broom, 2010). El traslado del animal desde un sistema de ordeño a otro requiere un proceso de adaptación al nuevo sistema, siendo las respuestas al cambio de un SOC a un SOV no lo suficientemente estudiadas. En los SOV, no solo habrá una adaptación al ambiente nuevo sino también la vaca deberá “aprender” a circular por las infraestructuras que implica el SOV. Todo esto generaría cierto grado de estrés, pudiendo provocar que algunos animales, incluso, no se adapten al nuevo sistema.

El cambio de un sistema convencional a uno voluntario se ha descrito como una experiencia estresante, resultando en un aumento en la frecuencia cardiaca y de comportamientos indeseados, peores indicadores de salud de ubre, así como cambios negativos en la producción y calidad de la leche luego del cambio (Poelarends y col., 2004; Weiss y col, 2005). Weiss y col. (2005) sugieren que vacas sin experiencia al SOV deberían ser tratadas con “cuidado”, con la finalidad de minimizar las pérdidas de leche dadas por el cambio. Una manera de facilitar esa adaptación es a través del entrenamiento de los animales, lo cual resulta esencial en la transición de un sistema de ordeño a otro (Jago y Kerrisk, 2011; Kashiwamura y col., 2001). A partir de trabajos que evalúan diferentes tipos de entrenamiento y como este influye en la adaptación al SOV, se han detectado diferencias individuales en la facilidad con que las vacas se adaptan al sistema (Jacobs y Siegford, 2012; Wenzel y col., 2003). También se ha informado que la reacción de la vaca y la velocidad de aprendizaje son ampliamente variables (Jago y Kerrisk, 2011; Weiss, Helmreich, Möestl, Dzidic y Bruckmaier, 2004), por lo tanto, es posible pensar que el temperamento podría estar influenciando dichas respuestas. Por otro lado, se ha indicado que, en un SOV, vacas reactivas o con un comportamiento indeseable, como mantenerse paradas en la entrada del box, son motivos de descarte en estos sistemas de ordeño (Meskens, Vandermerch, y Mathijs, 2001; Brouček y Tonge, 2015). Es posible que las respuestas de evitación al box de ordeño estén relacionadas a la tendencia de ciertos animales a presentar más miedo, lo cual es un aspecto de su temperamento.

Algunos autores sugieren que vacas más reactivas se estresan más al pasar a un ambiente nuevo que vacas menos reactivas (Sutherland y Huddart, 2012). Las vacas más estresadas podrán tener mayor tiempo en el corral de espera, rechazarán entrar voluntariamente al box de ordeño, reaccionarán al robot, pateándolo, sacándose las pezoneras, y esto provocará un menor flujo de leche, repercutiendo en una menor producción de leche (Brouček y Tongel, 2015). Además del estrés, la producción de leche también puede verse afectada negativamente debido al cambio de frecuencia de ordeño, teniendo algunos animales intervalos entre ordeños irregulares (Lyons y col., 2041) en relación al SOC. A pesar de la información disponible, no se han evaluado las pruebas de temperamento en un SOV, ni cuales rasgos de temperamento son más deseables para este sistema, o cómo el temperamento influye en la adaptación al nuevo sistema. Por lo tanto, estudiar cómo se relaciona el temperamento de las vacas sobre la capacidad de enfrentarse y/o de aprendizaje de este nuevo sistema de ordeño ayudará a comprender los efectos del cambio o

introducción al sistema sobre la producción de leche, permitiendo seleccionar vacas que mejor se adapten al sistema.

2.4.2. Adaptación de la vaca primípara al sistema de ordeño

La introducción de vacas primíparas a un tambo implica diversas situaciones nuevas para el animal. El parto, el ambiente nuevo (sala de ordeño), el contacto con el humano, así como la introducción a un rodeo de vacas desconocidas generan estrés para la vaquillona (Hemsworth y Barnett, 1989; Neisen, Wechsler y Gygax, 2009). El estrés a los primeros ordeños puede ser medido a través de respuestas comportamentales y fisiológicas (Eicher y col., 2007; Hopster y col., 2002; Rushen y col., 1999; Waiblinger y col., 2006). Aumento de las interacciones agonísticas en el corral de espera (Wicks, Carson, McCoy y Mayne, 2004), agresiones hacia el ordeñador (Hemsworth y Coleman, 2011; Rushen y col., 1999), baja producción de leche y mayor incidencia de mastitis (Ivemeyer, Knierim y Waiblinger, 2011) son algunas respuestas observadas en las primíparas en sus primeras experiencias con el ordeño. Particularmente, los comportamientos de pasos y patadas durante el ordeño han sido utilizados como indicadores de estrés (Breuer y col., 2000; Metz-Stefanowska, Huijsmans, Hogewerf, Ipema y Keen, 1992). Animales estresados requieren no solo más tiempo y cuidados durante el ordeño (Rushen y col., 1999), sino que también pueden patear al ordeñador o arrancar las pezoneras durante el ordeño dando como resultado una bajada de la leche más lenta o retención de la misma (Munksgaard y col., 2001), pudiendo llevar esto al descarte de los animales.

Las respuestas comportamentales y fisiológicas a los primeros ordeños varían según la fase del ordeño y el individuo, por ejemplo, se ha reportado mayor cantidad de pasos y patadas por minuto durante la fase de preparación de la ubre que durante el ordeño por la máquina (Ivermever, Pisani y Knierim, 2015). Van Reenen y col. (2002) observaron una gran variación individual y una consistencia en el tiempo de ciertos comportamientos y de niveles de metabolitos relacionados al estrés en vacas primíparas en sus primeros ordeños. La reactividad de las vacas primíparas influye en la velocidad de ordeño y en la tasa de descarte de animales (Sawa y col., 2017). También, las respuestas comportamentales y fisiológicas al entrenamiento de vacas primíparas al ordeño varía según el temperamento, teniendo más reactividad en el ordeño las vaquillonas entrenadas comparadas con las no entrenadas, pero solo para los animales clasificados como calmos (para la prueba VF) (Sutherland y Huddart, 2012). Por lo tanto, la manera en cómo se enfrentan las vacas primíparas al ordeño podría estar mediada por su reactividad a las pruebas de temperamento en el corral.

El tiempo en el que las vacas se adaptan al primer ordeño oscila entre 7 y 14 días, pero ese tiempo también presenta una importante variación individual (Bremner 1997; Daniels, Donkin, Eicher, Pajor y Schutz, 2007; Eicher y col., 2007; Van Reenen y col. 2002). Trabajos realizados en SOV indican que las primíparas se adaptan o aprenden más rápido que las vacas multíparas al sistema, demorando entre 2 y 10 días, pero este también resulta en una amplia variación individual (Jacobs y

Siegford, 2012; Jago y Kerrisk, 2011; Melin, Wiktorsson y Norell, 2005; Spolders, Meyer, Flachowsky y Coenen, 2016; Weiss y col., 2004). Sin embargo, en esos primeros días las vacas primíparas son más reactivas que las multíparas, manifestando comportamientos que podrían comprometer la seguridad de las personas, la estructura del robot y el bienestar del animal (Bertenshaw, Rowlinson, Edge, Douglas y Shiel, 2008; Kasimanickam y col., 2018; Wiktorsson y Sørensen, 2004).

Por lo tanto, cómo la vaca se enfrenta a los primeros ordeñes y/o el tiempo que tarda en adaptarse a él podrían estar influenciados por el temperamento de las mismas. Hasta el momento no se han reportado trabajos que relacionen el temperamento de vacas primíparas, evaluado a través diferentes pruebas de corral, con variables productivas, comportamentales y fisiológicas durante los primeros ordeñes en un SOV. Podríamos hipotetizar que, según el temperamento del animal, algunas vacas primíparas necesitarán más días para adaptarse y demostrar su potencial productivo, por lo tanto, es necesario saber a cuáles vacas darles más tiempo antes de tomar una decisión de descarte.

2.4.3. Período de transición

Los procesos fisiológicos que suceden durante el período de transición (tres semanas antes y después del parto) en la vaca lechera son ampliamente conocidos. Estos son causados por un aumento de la demanda energética para la producción de calostro y leche y una disminución del consumo de materia seca. El principal resultado de lo expuesto anteriormente es el balance energético negativo (BEN) que resulta en pérdidas de condición corporal (Grummer, Mashek y Hayirli, 2004), cambios en los perfiles metabólicos-hormonales (Meikle y col., 2013), aumento de incidencias de enfermedades e infertilidad (Aleri y col., 2016; McArt, Nydam, Oetzel, Overton y Ospina, 2013), pudiendo comprometer el bienestar animal. Se estima que la incidencia de enfermedades y pérdidas económicas durante este período es aproximadamente del 75% (LeBlanc, Lissemore, Kelton, Duffield y Leslie 2006).

El principal cambio observable durante el período de transición debido al BEN es la pérdida de la condición corporal de los animales, lo cual se evidencia fisiológicamente, a través de perfiles metabólicos y endocrinos característicos. Este perfil se basa en una pronunciada elevación de ácidos grasos no esterificados (AGNE), siguiéndole un aumento de β -hidroxibutirato (BHB) (Adrien y col., 2012; Cavestany y col., 2009; Meikle y col., 2004; Rupprechter, Carriquiry, Ramos, Pereira y Meikle, 2011). También se produce una disminución de la concentración de leptina, hormonas tiroideas (T3, T4) (Meikle y col., 2004), insulina y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-I) (Adrien y col., 2012; Astessiano y col., 2012; Cavestany y col., 2009; Meikle y col., 2004), consistente con la reducción de la ingesta. La inmunodeficiencia observada en el período de transición se evidencia a través de la disminución de las globulinas, asociado esto a un incremento de las

patologías infecciosas reproductivas, mamarias, podales u otras (Blowey, 2005; de Torres, 2010).

La caracterización del periodo de transición en los SOC ha sido bien documentada tanto en sistemas pastoriles (Adrien y col., 2012) como en sistemas confinados (Rupprechter y col., 2018; Wathes y col., 2007;) o mixtos (Morales-Piñeyrúa, Fariña y Mendoza, 2018), sin embargo, en los SOV son escasos los trabajos al respecto (Lessire, Scohier y Dufrasne, 2017; Penry, Crump, Hernandez y Reinemann, 2018). Se ha reportado que en SOV confinados la prevalencia de cetosis es un 5% más que en SOC (Tatone, Duffield, Leblanc, Devries y Gordon, 2017). Esta diferencia podría deberse a la mayor frecuencia de ordeño y/o al manejo de la alimentación. Al tener mayor frecuencia de ordeño en los SOV, las vacas producen más leche (Lyons y col., 2014a) exacerbando la magnitud del BEN y la incidencia de cetosis. Sin embargo, no se ha encontrado diferencias en los metabolitos posparto y condición corporal entre vacas ordeñadas en un SOV o en un SOC, ambos en sistemas confinados (Abeni y col., 2005). Por otro lado, la combinación de pastura e irregular intervalo entre ordeños en un SOV podría implicar menos demanda metabólica durante el comienzo de la lactación, por lo tanto, menor grado de BEN que vacas en un SOC (Elischer, Sordillo, Siegford, y Karcher, 2015).

Durante el período de transición, la vaca se encuentra bajo estrés metabólico (debido al BEN), el cual se refleja en los cambios de las concentraciones de los niveles de cortisol (preparto y parto) (Hydbring y col., 1999), y de los metabolitos antes mencionados. El estrés metabólico ha sido definido por Knight, Beever, y Sorensen (1999) como “la cantidad de carga metabólica (impuesta por la síntesis y secreción de leche) que la vaca no puede mantener, por lo tanto, algunos procesos energéticos, incluidos aquellos que mantienen la salud general, deben regularse negativamente”. Hay una serie de factores que pueden modular el estrés metabólico sufrido por la vaca en ese período, siendo el manejo nutricional uno de los más investigados (Esposito, Irons, Webb y Chapwanya, 2014; McGrath y col., 2018; Roche y col., 2013). Es sabido que el comportamiento y el temperamento animal son factores que influyen en el acceso a recursos alimenticios y también en la susceptibilidad al estrés, con impactos en la función inmune, el estado metabólico, la salud y la producción. Por ejemplo, una situación de estrés social resulta en cambios del comportamiento de alimentación, reduciendo la ingesta de materia seca, exacerbando el BEN y predisponiendo a las vacas a desordenes metabólicos más marcados (Chebel y col., 2016; Proudfoot, Weary, LeBlanc, Mamedova y von Keyserlingk, 2018). Así, si una vaca más reactiva se dedica menos tiempo a comer (Cafe y col., 2011) es posible suponer que tendrá menor consumo de materia seca (Llonch y col., 2018) y los efectos negativos del BEN serán más acentuados que en las más calmas, pero hasta el momento no existen trabajos que hayan evaluado la relación entre temperamento de vacas lecheras y perfiles metabólicos durante el período de transición.

2.4.4. Comportamiento en pastoreo

El comportamiento de alimentación en los rumiantes incluye la expresión de distintos patrones de alimentación, los cuales son consistentes dentro de cada individuo (Melin y col., 2005), siendo ampliamente variables entre animales (Leiber y col., 2016; Neave, Weary y von Keyserlingk, 2018). Estos patrones, desarrollados desde edades muy tempranas, son influenciados por diferentes factores de manejo, por ejemplo, la disponibilidad de una pastura (Launchbaugh y Howery, 2005). Los individuos dentro de un mismo grupo pueden enfrentarse diferente a los cambios en el manejo de alimentación, algunos individuos pueden necesitar más tiempo en aprender qué, cómo o donde comer, afectando su potencial productivo y generando estados emocionales negativos que, en última instancia, afectarán el bienestar de los animales. La variabilidad individual en los comportamientos de alimentación y en las respuestas hacia cambios en el ambiente podría estar explicada, entre otras cosas, por la reactividad del animal (Neave y col., 2018; Searle, Hunt y Gordon, 2010), y, por lo tanto, en parte por el temperamento.

Existen pocos trabajos donde se evalúa la variabilidad individual en los comportamientos de alimentación en bovinos lecheros, y aún menos los que relacionan el comportamiento en pastoreo con el temperamento animal. En relación con lo primero, existe una alta variación en el comportamiento de masticación entre vacas lecheras (Leiber y col., 2016), lo que por último se refleja en el consumo de materia seca. En lo que respecta al temperamento, trabajos en ganadería y en sistemas confinados, han observado que los animales más reactivos (medidos en diferentes pruebas) presentaron menor consumo de alimento (Llonch y col., 2018) y menor tiempo de alimentación (Cafe y col., 2011). Sin embargo, otros estudios no han encontrado relación ente reactividad de los animales y consumo (Francisco y col., 2015), tiempo de alimentación (Nkrumah y col., 2007) o uso del espacio en pasturas (Goodman y col., 2016; Wesley y col., 2012). Aguilar (2016) en bovinos para carne en pastoreo reporta que animales clasificados como “rápidos” en la prueba de VF utilizaron mayor proporción del tiempo en realizar comportamientos distintos al pastorear que animales clasificados como “lentos”. Incluso, el comportamiento de descanso presenta una amplia variación entre vacas que no es explicada por problemas podales o la condición corporal (Westin y col. 2016). En conjunto, la literatura sugiere que los rumiantes más reactivos pueden ser propensos a cambios en el comportamiento de alimentación que aquellos menos reactivos. Neave y col. (2022) han sido hasta ahora los únicos que han estudiado a vacas lecheras adultas en pastoreo bajo un SOC, relacionando diferentes pruebas de temperamento con sus comportamientos. Los autores observaron que las vacas más miedosas (DF) presentan menos tiempo de descanso; y vacas más calmas en el cepo gastan más tiempo pastoreando, presentando mayor producción de leche.

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de los SOV depende del comportamiento de las vacas, siendo los comportamientos diarios de alimentación y de descanso los principales. A pesar de que en este tipo de sistemas las vacas

podrían presentar sus comportamientos normales, se ha reportado una desincronización entre los animales de los comportamientos diarios de alimentación y descanso en un SOV confinado (Winter y Hillerton, 1995). También existe una gran variación entre vacas en el tiempo invertido en diferentes partes del sistema (Winter y Hillerton, 1995). Esas diferencias podrían estar dadas por la dinámica social o el temperamento de los animales (Jacobs, Ananyeva, y Siegford, 2012). En el caso de SOV en pastoreo la utilización del robot está determinado por los patrones de alimentación, ya que estos determinan la frecuencia de ordeño y, por ende, la producción de leche y la eficiencia del tambo (Hermans, Ipema, Stefanowska y Metz, 2003; John, Freeman, Kerrisk, Garcia y Clark, 2019). Por lo tanto, los estudios de los comportamientos normales en los SOV, considerando aspectos de temperamento y tendencias sociales de las vacas, ayudarán al diseño y estrategias de alimentación (Hurnik, 1992), facilitado también la adaptación a estos sistemas. El comportamiento de alimentación en un SOV, el acceso al alimento y/o acumulo o partición de nutrientes podrían estar siendo influenciados por el temperamento del animal; no existiendo, hasta la fecha de esta revisión, trabajos sobre este tema en vacas lecheras.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El temperamento animal es un aspecto del bovino que recobra cada vez más importancia a nivel mundial (Haskell, Simm, y Turner, 2014). Esto no solo se debe a que el comportamiento agresivo o poco dócil significa situaciones peligrosas para el ser humano que maneja a los animales, sino que también porque el temperamento está relacionado con aspectos económicos (producción, reproducción, salud) de un establecimiento (Norris y col., 2014). Sumado a esto, el valor del bienestar animal en los animales de producción es cada vez más importante debido a las exigencias de los consumidores (Lagerkvist y Hess, 2011; Verbeke, 2009). Animales de temperamento más reactivo presentan una respuesta al estrés mayor que animales menos reactivos (Curley y col., 2008), repercutiendo en una mayor probabilidad de enfermar (Burdick y col., 2011). También existe una relación entre temperamento y tasa de descarte, siendo reportado que en tambos convencionales hay una mayor proporción de animales reactivos descartados que de animales calmos (Haile-Mariam, Bowman y Goddard, 2004; Sewalem y col., 2010). En una encuesta a productores de Canadá que instalaron un SOV, por lo tanto, relocalizaron vacas desde el SOC al nuevo sistema, se observó que el 27% de los entrevistados respondieron que el temperamento o comportamiento animal es una razón de descarte (Tse, Barkema, DeVries, Rushen y Pajor, 2017). Sin embargo, no está claro cuál temperamento es el más adecuado (en término de bienestar y productividad) para estos tipos de sistemas.

Los animales podrían percibir el manejo que se realiza en un establecimiento como estresante (Brouček y col., 2008). Por lo tanto, para mejorar el bienestar animal se podría modificar las prácticas de manejo buscando disminuir el estrés provocado, y/o mejorar el comportamiento de los animales para reducir el estrés experimentado durante las rutinas de manejo. Esto último puede realizarse a través de la genética (seleccionar animales con el temperamento deseado) (Brouček, Uhrinčat', Šoch y Kišac, 2008; Norris y col., 2014); o a través de la modificación del comportamiento animal por medio del entrenamiento de estos (Jago y Kerrisk, 2011; Tse y col., 2018b; Wredle, Munksgaard y Spörndly, 2006). Con respecto a lo primero, la selección de animales por su temperamento se utiliza en programas de mejoramiento genético a nivel mundial (Interbull, 2022) (Schutz y Pajor, 2001). Es sabido que el temperamento presenta una heredabilidad moderada (Sant'Anna, Paranhos da Costa, Baldi y Albuquerque, 2013), y que se desarrolla en edades tempranas siendo estable a lo largo de la vida del animal (Haskell y col., 2014). Pero para determinar el temperamento es necesario contar con medidas prácticas y fiables. La prueba más utilizada en ganado lechero es la reactividad en el ordeño, haciéndose necesario estudiar el temperamento en vacas lecheras en otros contextos objetivos y prácticos, como pueden ser las pruebas en el corral. Hay algunos trabajos en ganado lechero que han asociado algunas de las pruebas utilizadas en ganadería, por ejemplo, la DF y el comportamiento en el cepo con la reactividad de las vacas en ordeño (Gibbons y col., 2011; Sutherland y col., 2012; Waiblinger, Menke y Fölsch, 2003), sin

embargo, aún son pocos los trabajos publicados que asocien otros tipos de pruebas, como VF y TP con la reactividad en el ordeño.

La relación entre temperamento, productividad y estrés han sido estudiados fundamentalmente en sistemas de producción lechera intensivos, con sistemas de ordeños convencionales. Pero cada vez son más los productores que están eligiendo la incorporación de tecnologías que aumenten el automatismo de los procesos del tambo, siendo la adopción de los SOV cada vez más frecuente. No se han realizado estudios sobre cómo puede impactar el temperamento de los animales en las variables medibles en dicho sistema. Registros del proceso de ordeño o el tráfico de las vacas podrían ser indicadores comportamentales y rasgos de eficiencia de ordeño novedosos (Vosman, De Jong y Eding, 2014), los cuales son obtenidos de manera automática y objetiva, y podrían relacionarse con el temperamento evaluado en el corral.

Por lo tanto, el tema principal de esta tesis fue la adaptación de las vacas a un nuevo sistema de ordeño, el SOV. Dentro de este sistema evaluamos diferentes situaciones estresantes para las vacas, y nos focalizamos en un factor que puede ayudar a explicar las diferencias entre animales en las respuestas de adaptación: el temperamento. La finalidad de la tesis no solo fue incrementar el conocimiento acerca de los factores individuales que influyen en las respuestas a situaciones estresantes, las cuales determinarán la eficiencia de un sistema de ordeño y el bienestar de los animales, sino también tratar de obtener perfiles de temperamento que mejor se adapten a este tipo de sistema. Determinar las pruebas más prácticas que nos definan de forma precisa el temperamento de una vaca permitirá tener herramientas para realizar, si es que el productor desea, la selección de animales por esta característica. Entender el fenotipo de un animal requiere integrar diferentes componentes de este, los cuales a menudo son estudiados de forma aislada y en contextos particulares (por ejemplo, determinado sistema de alimentación), pero la existencia de temperamentos necesita una aproximación integrada. Por lo tanto, esta tesis trata el estudio del temperamento de vacas lecheras desde una visión integral, intentando analizar su relación con las respuestas de adaptación: producción, comportamientos y fisiología.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

La hipótesis general de la tesis fue que la reactividad de las vacas Holando a distintas pruebas de temperamento tiene relación con las respuestas comportamentales, metabólicas y productivas en la adaptación de las mismas a un SOV.

4.2. Hipótesis específicas

- a) Las vacas Holando multíparas clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento presentan menor respuesta comportamental y mayor producción de leche que las vacas reactivas luego de ser trasladadas desde un sistema convencional de ordeño a uno voluntario.
- b) Los comportamientos frente a los primeros ordeños en un SOV son menos frecuentes en vacas primíparas Holando clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento que en vacas reactivas, resultando en mayores producciones de leche.
- c) Durante el período posparto, en un SOV, las vacas Holando clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento presentan mayor respuesta productiva y un menor estrés metabólico que vacas clasificadas como intermedias o reactivas.
- d) El temperamento y la paridad (primíparas o multíparas) de las vacas Holando en un SOV influye en los comportamientos realizados durante el pastoreo, habiendo una mayor frecuencia de comportamientos de alimentación en animales clasificados como calmos que en reactivos o intermedios.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Caracterizar el temperamento de vacas Holando primíparas y multíparas a través de diferentes pruebas, y evaluar las respuestas comportamentales, metabólicas y productivas de acuerdo al temperamento animal en la adaptación a un SOV.

5.2. *Objetivos específicos*

- a) Evaluar la adaptación comportamental y productiva de vacas multíparas Holando al traslado desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario, y su relación con la reactividad a diferentes pruebas de temperamento;
- b) Determinar la influencia del temperamento de vacas primíparas Holando en los indicadores productivos y comportamentales de adaptación a los primeros ordeños en un SOV;
- c) Comparar la producción y composición de la leche, frecuencia de ordeño, y los perfiles metabólicos durante el período de transición (hasta 70 días posparto) de vacas Holando primíparas y multíparas de diferente reactividad a pruebas de temperamento en un SOV;
- d) Relacionar la reactividad a distintas pruebas de temperamento y la paridad (primíparas y multíparas) de vacas Holando con sus comportamientos en pastoreo en un SOV pastoril.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Esta tesis reúne información generada en 4 experimentos que corresponden a los objetivos específicos planteados, y que fueron realizados en dos años consecutivos. Las mediciones del temperamento con las distintas pruebas se realizaron durante todos los trabajos de campo de manera periódica para los distintos experimentos. En el primer año se trabajó con las vacas que pasaron del tambo convencional al SOV respondiendo al objetivo específico a), en el segundo año se realizaron tres experimentos con las vacas del SOV, uno posparto para responder los objetivos específicos b) y c), y otro con las vacas en lactación media durante el pastoreo para responder al objetivo d).

Hasta el momento se publicaron 3 artículos en revistas científicas internacionales indexadas. En la tesis se presentan los aspectos más destacados de cada artículo, y la información más detallada de lo obtenido que no ha sido publicado aún. Los artículos completos se anexan al final y aparecen citados en el texto con números romanos.

Estudio I (Publicación I, Anexo I): Relación entre temperamento y adaptación de vacas en la transición desde un sistema de ordeño convencional a uno robotizado. Se realizó el trabajo con las vacas que se trasladaron al SOV desde el tambo convencional, a las cuales se les registró el temperamento a partir de 3 pruebas: TP, VF y DF, antes del traslado al SOV. Se relacionaron los comportamientos durante los primeros ordeños en el SOV y la producción y flujo de leche con los datos de las pruebas de temperamento.

Estudio II: Relación entre adaptación al primer ordeño y temperamento en vacas primíparas mantenidas en un SOV. Se realizó el trabajo con las vacas primíparas que ingresan por primera vez al ordeño voluntario. Luego de parir los animales fueron incorporados al tambo, y se evaluó su temperamento a lo largo de la lactancia, a través de las tres pruebas descritas en el Estudio I. Los comportamientos en el ordeño realizados durante los primeros 7 días posparto y la producción de leche fueron asociados con los datos de temperamento.

Estudio III (Publicación II, Anexo II): Relación del temperamento con las variables productivas y metabólicas durante el período de transición. Este trabajo se superpone con el anterior, ya que estudiamos no solo a las vacas multíparas sino también a las primíparas durante el periodo de transición. Los animales ya pertenecían al rodeo del SOV. Los datos de temperamento obtenidos en el Estudio II se utilizaron en esta etapa, sumado a la evaluación de las mismas pruebas para las vacas multíparas. Además de las tres pruebas mencionadas anteriormente se evaluó la reactividad en el ordeño en el SOV. Los datos de condición corporal, los metabolitos relacionados al BEN y los datos de producción y composición de leche y frecuencia de ordeño se relacionaron con las pruebas de temperamento.

Estudio IV (Publicación III, Anexo III): Temperamento y comportamiento de descanso y alimentación en pastoreo. Para este trabajo se utilizaron los datos de las pruebas de temperamento realizadas en los estudios anteriores, en diferentes momentos a lo largo de la lactancia. Se registraron los comportamientos de pastoreo y descanso durante el día, por medio de observación visual de los animales en las pasturas, en el período del año donde los animales estaban bajo una dieta compuesta principalmente por pasturas. Se asociaron los comportamientos observados con el temperamento de los animales. Dado que en el período de realización de este estudio los datos meteorológicos fueron atípicos (largo período de olas de calor, estrés calórico de moderado a severo), surgió la publicación III como un artículo corto describiendo los efectos del ambiente climático en las variables comportamentales y productivas estudiadas.

7. METODOLOGÍA GENERAL

7.1. Lugar de estudio y caracterización de los sistemas

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (CEUA INIA, número de archivo: 2018.7). Los trabajos se realizaron en la Unidad de lechería de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, donde se encuentran un SOC y un SOV separados por 300 metros. En el SOC las vacas son ordeñadas juntas en una espina de pescado de 11 puestos, dos veces al día (AM, PM) simultáneamente por dos ordeñadores (Figura 1A). El SOV se compone de un anillo de distribución donde se encuentran las puertas de acceso y salida a la infraestructura del tambo. En dicha estructura se encuentran un corral de espera, dos boxes de ordeñes individuales (cada monobox con una capacidad de ordeño aproximada de 70 vacas), y un corral post ordeño donde se ubican dos boxes de alimentación (GEA Farm Technologies, Bönen, Alemania) (Figura 1B). En el box de ordeño se encuentra el brazo robótico que es el encargado de la rutina de ordeño (estimulación de los cuartos, desinfección de los pezones antes del ordeño, secado de los mismo, “despunte”, ordeño y por último sellado); estando a disposición las 24 horas, excepto en los momentos del día donde se realizan los servicios de limpieza de las unidades. El sistema de tráfico aplicado en este SOV es el de flujo forzado (Wiktorsson y Sørensen, 2004) en el cual las vacas deben pasar por los boxes de ordeño para entrar a una nueva área de alimentación. Las vacas que se acercan a la puerta de entrada al tambo con menos de 6 horas de su último ordeño, son rechazadas por la puerta y vuelven al área donde estaban. Las vacas que tienen más de 6 horas de ordeñadas entran al área de los boxes de ordeño, son ordeñadas y enviadas a una nueva área de alimentación. Las vacas que no se acercan al tambo por más de 12 horas de su último ordeño, son acarreadas por una persona hasta el tambo. Los dos sistemas de ordeño tienen el mismo sector parto, pero las plataformas de pastoreo y patios de alimentación posparto son diferentes y separados entre sí, estos últimos contenían comederos de hormigón prensado donde se ofrecía el alimento. La plataforma de pastoreo del SOV constaba de tres sectores de pastoreo (sectores A; B y C). Cada sector de pastoreo está dividido en potreros de 1 o 2 ha de superficie para producción de pasturas y reservas (Figura 2).

A)



B)



Figura 1. A) Sistema de ordeño convencional y B) sistema de ordeño voluntario de la Unidad de lechería de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Fuente: Jéssica Morales.



Figura 2. Parcelas de pastoreo en el sistema de ordeño voluntario (SOV) de INIA La Estanzuela, separadas en tres sectores, A, B y C, los cuales presentan distintas horas de apertura diaria. Fuente: Google Earth modificado.

Los animales utilizados fueron vacas primíparas y multíparas (según experimento) de la raza Holando, nacidas y criadas en la estación experimental, sin patologías en el momento de las evaluaciones (mastitis fue la principal patología observada). El manejo del parto fue similar en los dos años evaluados. Todas las vacas se mantuvieron en un solo grupo con una dieta basada en ración totalmente mezclada (RTM), agua *ad libitum* y sombra (descripción más detallada en Publicación II, Anexo II). Luego del parto todas las vacas fueron separadas inmediatamente de sus terneros y llevadas a los corrales posparto para ser ordeñadas en el ordeño más próximo. La alimentación posparto fue la que varió según el experimento, y son descritas en la sección correspondiente a cada uno.

Los animales que entraban por primera vez al SOV fueron entrenados para facilitar su manejo y disminuir el estrés generado por el cambio de ambiente. Los protocolos de entrenamiento de vacas y vaquillonas presentaron algunas diferencias ya que las vacas debían ser ordeñadas inmediatamente; en cuanto a las vaquillonas fueron entrenadas durante el parto (15 días antes del parto):

- Vacas en ordeño: Los animales fueron mantenidos un par de horas en el patio de alimentación enfrente a los boxes de ordeño para que observaran a las demás vacas como se mueven por las infraestructuras del sistema. Luego se las hizo caminar por el anillo de distribución, pasar por las diferentes puertas, y entrar en el box de ordeño tres veces consecutivas. Después de esto, los animales fueron llevados a un corral cercano donde se les ofreció RTM. En la tarde se repitió el mismo

procedimiento que en la mañana, pero en la tercera pasada por el box de ordeño, este se cerró y las vacas se ordeñaron mientras comían una ración comercial ofrecida en el box.

- Vaquillonas parto: Los animales fueron mantenidos un par de horas en el patio de alimentación enfrente a los boxes de ordeño para que observaran a las demás vacas como se movían por las infraestructuras del sistema. Luego se las hizo caminar por el anillo de distribución, pasar por las puertas, y entrar en el box de ordeño tres veces consecutivas. Después de esto fueron llevados a un corral cercano donde se les ofreció silo. En la tarde se los volvió a traer y se repitió el mismo procedimiento que en la mañana. Esta secuencia se repitió por 3 días, con la diferencia que en el último día, en la última pasada, se les cerró el box de ordeño y se les ofreció silo en el comedero del box. Al finalizar el período de entrenamiento las vaquillonas fueron llevadas a su corral parto donde se les ofreció RTM. Luego del parto se realizó el mismo procedimiento que para vacas en ordeño, pero en vez de ración comercial se les ofreció silo en el box de ordeño.

En ambos sistemas las vacas llevan puesto un collar de identificación con el cual los datos generados en el ordeño son guardados en el software de los equipos. Por lo tanto, la producción de leche (L), frecuencia (cantidad de ordeños) y duración de ordeño (minutos de ordeño), y el flujo de leche (L/min) son obtenidas de forma automática diariamente desde el equipo de ordeño.

7.2. Evaluación del temperamento

Para los experimentos I y II se utilizaron las mismas tres pruebas de temperamento en el corral (TP, VF y DF); para los experimentos III y IV se usaron las mismas tres pruebas en el corral más una prueba en el ordeño. Las pruebas se describen a continuación:

- Tiempo de pasaje por el tubo (TP), método modificado de Pajor y col. (2000). Una observadora registró el tiempo (en segundos) requerido para que la vaca atravesara las mangas (estructura de madera alargada con 5,95 m de largo, 0,80 m de ancho y 1,26 m de alto) hasta entrar completamente en el cepo. Si el animal permanecía inmóvil por más de 30 segundos, entonces se le aplicaba un estímulo para que caminara, el cual aumentaba en intensidad cada 30 segundos hasta que el animal entrara al cepo. Según la intensidad del estímulo necesario se le dio un puntaje a cada vaca: (0) no se hacía nada, el animal entraba solo al cepo dentro de los 30 segundos; (1) la observadora se aproximaba de forma lenta y hablaba con voz suave; (2) la observadora golpea suavemente la grupa de la vaca con la mano abierta; y (3) la observadora empujaba y forzaba al animal a avanzar desde atrás.

- Velocidad de fuga (VF), método modificado de Gibbons y col. (2011). El tiempo requerido por una vaca para salir del cepo y recorrer una distancia lineal de 2,7 m fue registrado utilizando un equipo, el cual cuenta con dos luces infrarrojas y sus respectivos receptores, y una unidad de lectura de tiempo. Cuando la vaca pasa por

la primera luz comienza a funcionar un cronómetro en el interior de la unidad que es detenido cuando la vaca pasa por el segundo haz de luz, registrando los milisegundos en la pantalla del equipo. Este tiempo fue transformado en segundos y con él se calculó la velocidad de fuga (m/s). La observadora se mantenía al costado del cepo a una distancia de 1 m aproximadamente.

- Distancia de fuga (DF), método modificado de Waiblinger y col. (2006). La distancia (m) requerida para que una vaca se moviera cuando una observadora no familiar se le aproximaba fue registrada. La prueba fue realizada de forma individual en un corral de 131 m² luego de que la vaca saliera del cepo. La observadora se mantenía parada quieta a una distancia aproximada de 8 m de la vaca, esperando que el animal se mantuviera sin moverse, haciendo contacto visual con ella para comenzar con la prueba. Luego, la persona se aproximaba lentamente (un paso por segundo), con sus manos hacia abajo, los brazos pegados al cuerpo, y la mirada hacia el cuerpo del animal. Cuando la vaca expresaba algún movimiento de retirada (el animal movía ambas extremidades anteriores) la observadora se detenía midiendo la distancia desde donde se detuvo hasta donde estaba la vaca antes del movimiento (ubicación del miembro anterior más cerca) con un odómetro (MW40M, Stanley).

- Reactividad en el ordeño (RO), método modificado de Sutherland y Huddart, (2012). Cada vaca fue observada durante la preparación de la ubre (salida del brazo robot del equipo de ordeño, búsqueda de pezones, colocación de pezoneras, lavado, predipping y despunte) hasta el final del ordeño (retiro de todas las pezoneras) por una observadora a 5 metros de distancia desde donde se visualizaba con claridad los miembros posteriores. A partir de la observación de los pasos y patadas y la reacción del animal se le dio un puntaje a cada una de las vacas según la siguiente escala de 7 puntos: (1) no hay movimiento de los miembros posteriores, (2) la vaca da 1 o 2 pasos con los miembros posteriores de forma lenta y tranquila (la pezuña es elevada menos de 15 cm del suelo) (3) el animal demuestra 3 o más movimientos de los miembros posteriores de forma lenta y tranquila con un ritmo inconstante (no se mueve durante todo el ordeño) (4) la vaca da 3 o más movimientos de los miembros posteriores de forma lenta y tranquila de forma constante (durante todo el ordeño), (5) el animal realiza movimientos vigorosos de los miembros posteriores elevando las pezuñas por encima de 15 cm del suelo, (6) la vaca hace movimientos vigorosos y constantes de los miembros posteriores, zapateo (7) el animal patea el brazo robótico elevando sus miembros posteriores por encima de la línea del corvejón.

7.3. Análisis estadístico

Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SAS (versión 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Un análisis univariado se realizó en todas las variables para identificar outliers y verificar la normalidad de los residuos. La homogeneidad de la varianza fue verificado a través de la prueba de Levene. Las

medidas registradas al inicio (ya sean parto o al comienzo del estudio según el caso), y los días en lactación (DEL) fueron utilizadas como covariables.

Los datos con distribución normal (producción de leche, leche corregida por grasa, componentes de la leche, frecuencia de ordeño y concentración de metabolitos y hormonas) y con repetición en el tiempo fueron analizados con un modelo general mixto para medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED). Las variables que no presentaron distribución normal (por ejemplo, comportamientos) y se midieron en el tiempo se analizaron con modelos generalizados mixtos para medidas repetidas en el cual se le asignó una distribución determinada (PROC GLIMMIX). En ambos casos, el efecto aleatorio del animal fue considerado dentro del tiempo de evaluación como una medida repetida, con una estructura de covarianza determinada por el mejor modelo.

Los datos de las pruebas de temperamento fueron promediados con todos los periodos evaluados en cada estudio, obteniendo una distribución de los datos para cada prueba. Se clasificaron las vacas según los terciles de la distribución de cada prueba, considerando los animales en el primer tercil como “calmos”, en el segundo tercil como “intermedios” y en el tercer tercil como “reactivos”, excepto para la prueba TP donde las vacas en el primer tercil son las “reactivas”, y las del tercer tercil las “calmas”. Estas categorías se utilizaron como efecto fijo en los modelos, y variaron según año y vacas estudiadas.

Las diferencias entre medias se analizaron en algunos casos con la prueba de Fisher y en otros con la prueba de Tukey. Para todos los análisis la significancia estadística se consideró cuyo $\alpha \leq 0,05$ y una tendencia cuyo $\alpha \leq 0,10$.

8. DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL

8.1. Experimento I (Publicación I)

Dado que este trabajo esta descripto en un manuscrito a publicar (Anexo I), aquí solo describiré brevemente la hipótesis, el objetivo, materiales y métodos, los principales resultados con una discusión general y la conclusión.

Hipótesis: las vacas Holando multíparas clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento presentan menor respuesta comportamental y mayor producción de leche que las vacas reactivas, luego de ser trasladadas desde un sistema convencional de ordeño a uno voluntario.

Objetivo: evaluar la adaptación comportamental y productiva de vacas multíparas Holando al traslado desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario, y su relación con la reactividad a diferentes pruebas de temperamento.

Materiales y Métodos

Treinta y cinco vacas Holando multíparas fueron movidas desde el SOC al SOV con $52,2 \pm 3,9$ DEL. Antes del traslado, en el SOC, las vacas fueron sometidas a 3 pruebas de temperamento en el corral descriptas en la metodología general: TP, VF y DF. Las 3 pruebas fueron realizadas el mismo día luego del ordeño de la tarde, en tres periodos durante el posparto (media \pm DE) $7,3 \pm 3,2$; $25,4 \pm 3,4$; y $44,9 \pm 11,0$ DEL. Todas las pruebas fueron realizadas por la misma observadora. El día del cambio de sistema, las vacas fueron ordeñadas a las 6:00 en el SOC y luego llevadas al SOV para ser entrenadas con el protocolo descripto en la metodología general (vacas en ordeño). La alimentación posparto está descripta en Publicación I (Anexo I).

Luego del cambio de sistemas, por los primeros 5 ordeños en el SOV se registró el tiempo de entrada al box de ordeño (en segundos, s) y los comportamientos realizados por las vacas desde la entrada al box hasta la finalización del ordeño. Para el tiempo de entrada al box se midió con un cronómetro el tiempo en que demoraba cada vaca en pasar del corral de espera al box de ordeño. Si el animal no se movía entonces la observadora aplicaba un estímulo que aumentaba de intensidad a medida que pasaba el tiempo (30 segundos de tiempo de espera) categorizando un score de: (0) el animal se movía por su voluntad, dentro del tiempo de espera, sin intervención de la observadora, (1) la observadora se acercaba y hablaba con voz suave y gentil para mover al animal, (2) la observadora apoyaba su mano abierta en la grupa del animal dando un golpe suave con la finalidad de mover al animal, (3) la observadora empuja y obliga al animal a entrar en el box.

Los comportamientos registrados durante la colocación de las pezoneras y el ordeño fueron: cantidad de pasos (recuento de las veces que el animal levantaba los miembros posteriores por debajo de 15 cm del suelo) y la cantidad de patadas

(recuento de las veces que el animal levantaba los miembros posteriores por encima de 15 cm del suelo con movimientos rápidos y vigorosos hacia atrás o lateral). Una sola observadora realizó todas las mediciones a una distancia de aproximadamente 3-5 m del box de ordeño.

El *tiempo de ocupación* por cada vaca del box de ordeño (en segundos) fue definido como el tiempo desde que la vaca entra hasta que ella sale del box (información de las puertas del box de ordeño) y es obtenido de forma automática por el equipo de ordeño del sistema. El *tiempo de manejo en el box* es el tiempo en segundos que resulta de la diferencia entre el tiempo de ocupación y el tiempo de ordeño (*duración del ordeño*). Por lo tanto, este incluye el tiempo desde que entra la vaca al box hasta que el ordeño comienza, incluyendo la búsqueda de los pezones, la colocación de la pezonera, predipping, lavado, despunte estimulación, y el tiempo en que el ordeño finaliza se saca las pezoneras, se abren las puertas y la vaca sale. La producción de leche y el flujo también fueron obtenidos por 7 días antes (en el SOC) y después del cambio de sistema de forma automática por el equipo de ordeño.

Para el análisis estadístico se utilizaron los extremos de los terciles, vacas calmas o reactivas (Tabla I). El tiempo de entrada al box de ordeño, el tiempo de ocupación del box, la duración del ordeño, el tiempo de manejo en el box, y la cantidad de pasos y patadas se analizaron con PROC GLIMMIX, con una distribución de Gamma y Poisson (según variable) y una función de link log. La cantidad de patadas fue transformada con una escala log ($\log x+2$). Los efectos fijos de los modelos fueron la clasificación del temperamento (uno por prueba), el tiempo de evaluación (ordeño o día según variable) y sus interacciones. Las variables de producción y flujo de leche se analizaron a través de PROC MIXED con los mismos efectos que los modelos anteriores, se obtuvieron los datos del SOV durante los 7 días luego del cambio, y se los analizó como valores relativos a la producción o flujo medio en el SOC de 7 días antes del cambio (%).

Tabla I. Clasificación de vacas Holando según tres pruebas de temperamento en corral: tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)

Temperamento	TP (s)	VF (m/s)	DF (m)
Calmas	$\geq 30,1$ (n=11)	$\leq 0,9$ (n=12)	$\leq 2,7$ (n=12)
Reactivas	$\leq 14,6$ (n=11)	$\geq 1,2$ (n=8)	$\geq 3,5$ (n=11)

También se realizó una correlación parcial entre los comportamientos y los datos de leche a través de un análisis multivariado de varianza (PROC MANOVA). Se usaron todas las observaciones, y se ajustó las correlaciones parciales por DEL y producción de leche anterior.

Resultados y discusión

Respuesta comportamental

El comportamiento de pasos fue el único que varió significativamente al largo del tiempo de evaluación (ordeñes) ($P=0,002$). La cantidad de pasos disminuyó desde el primer hasta el tercer ordeño, luego aumentó, llegando a los valores iniciales al quinto ordeño (Figura 3). Por otro lado, la cantidad de patadas no se relacionó con la cantidad de ordeñes (tiempo de evaluación). Cuando las vacas son movidas desde un sistema a otro estas pueden realizar comportamientos relacionados al estrés (pasos, patadas, defecación, vocalización), los cuales van disminuyendo con el tiempo a medida que el animal se adapta al sistema (Jacobs y Siegford, 2012). En nuestro trabajo no se observó un claro patrón de variación de los comportamientos, con reducción al largo del tiempo como se espera a partir de la literatura, pero esto pudo deberse a la duración de la evaluación y/o al bajo número de observaciones.

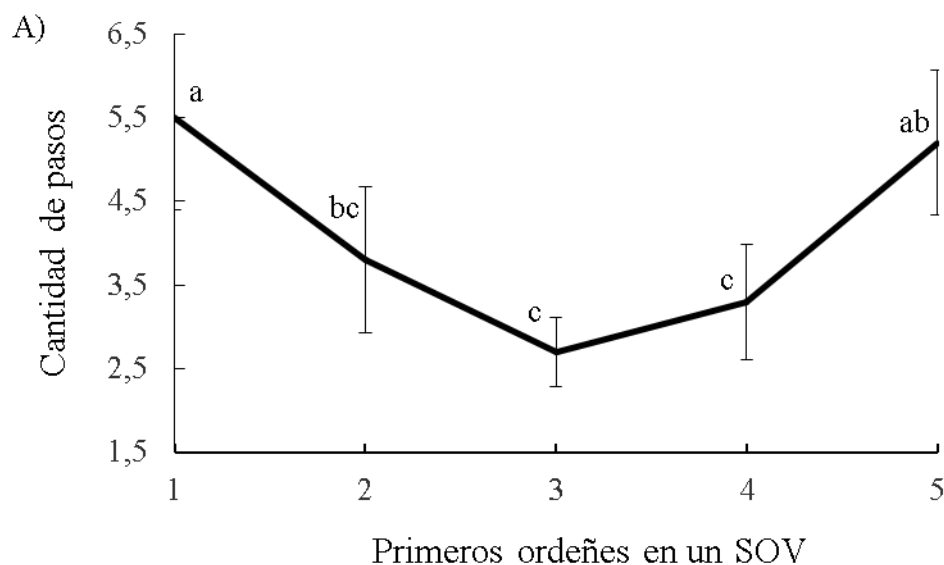


Figura 3. Cantidad de pasos promedio por ordeño de vacas Holando multíparas durante los primeros 5 ordeños luego del cambio de un sistema de ordeño convencional a uno voluntario (SOV). Diferencias entre ordeños son indicadas con diferentes letras ($P\leq 0,05$).

La cantidad de patadas tuvo relación con el temperamento cuando utilizamos las pruebas DF y VF. La interacción entre DF y tiempo ($P=0,001$), y la clasificación por VF ($P<0,01$) influenciaron en la cantidad de patadas realizadas durante el ordeño. Para DF, la cantidad de patadas de los animales calmos no difirió en el tiempo; pero para las vacas reactivas el mayor número de patadas fue más alto en el primer ordeño, disminuyendo y manteniéndose bajo hasta el final de la evaluación (Figura 4). Esto pudo deberse a que el cambio de sistema generó una nueva rutina para las vacas, lo cual pudo hacer que los animales más reactivos (más miedosos al contacto con humanos) reaccionarán más al comienzo. Luego, al ser la DF una prueba relacionada con la interacción humano-animal (Kilgour y col., 2006) y las vacas tener poco contacto con el ser humano, esta reacción disminuye con los ordeños sucesivos.

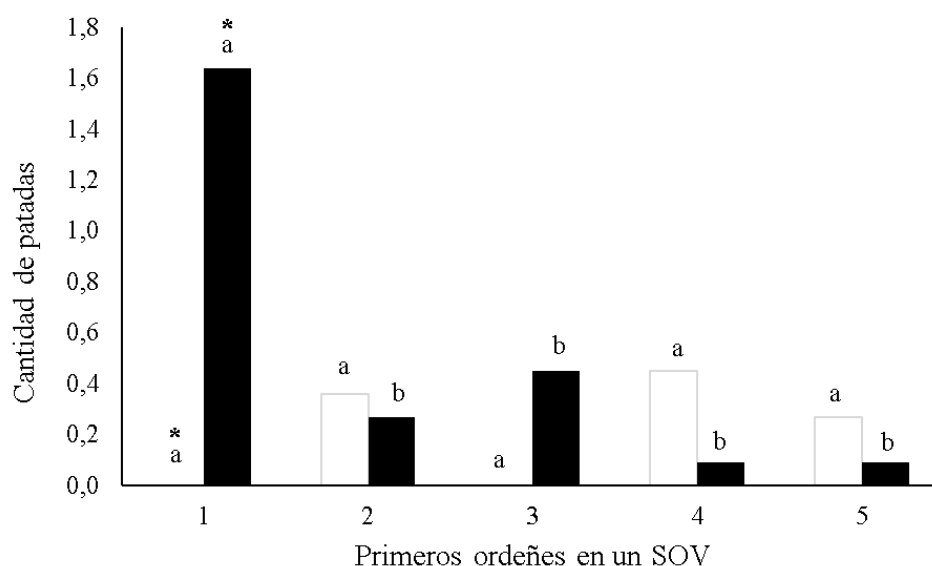


Figura 4. Cantidad de patadas promedio por ordeño de vacas Holando múltiparas durante los primeros 5 ordeños luego del cambio de un sistema de ordeño convencional a uno voluntario (SOV) según la clasificación por la prueba distancia de fuga: calmas (blanco) o reactivas (negro). Diferencias estadísticas entre ordeños en una misma clasificación son indicadas con letras, y diferencias entre clasificación en un mismo ordeño con * ($P \leq 0,05$).

Para la clasificación por VF, las vacas calmas patearon más que los animales reactivos durante los 5 primeros ordeños en el SOV (Tabla II). Esto ha sido reportado por Sutherland y Dowling (2014) quienes, trabajando con primíparas en un SOC, observaron que animales con menor velocidad de fuga patearon más que animales más rápidos. Por lo tanto, parece ser que no hay un patrón claro y directo de asociación entre la reactividad en el corral con la reactividad en el ordeño, ya que animales calmos en corral de manejo pueden tener mayor reactividad en el ordeño. Esto podría demostrar que las diferentes pruebas pueden darnos diferente dimensión del temperamento.

Tabla II. Comportamientos (media \pm EE) durante el ordeño según temperamento [clasificadas por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando múltiparas durante los primeros cinco ordeños luego del cambio desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario.

Temperamento		Pasos (cantidad)	Patadas (cantidad)
TP	Calmas	3,9 \pm 0,9	0,42 \pm 0,16
	Reactivas	4,6 \pm 0,9	0,18 \pm 0,07
VF	Calmas	3,3 \pm 0,6	0,45 \pm 0,14 a
	Reactivas	2,9 \pm 0,8	0,05 \pm 0,03 b
DF	Calmas	2,3 \pm 0,7	0,22 \pm 0,08
	Reactivas	4,3 \pm 0,6	0,51 \pm 0,17

Diferentes letras en la misma columna y dentro de cada prueba de temperamento indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$).

Respuesta productiva:

Encontramos una correlación negativa entre la cantidad de pasos y la producción de leche ($r=-0,18$; $P=0,04$). También, hubo una correlación positiva entre flujo y producción de leche ($r=0,38$; $P<0,0001$). Durante los primeros 7 días en el SOV, la producción de leche fue $93,0 \pm 3,7\%$ en relación a la producción en el SOC, indicando que hubo pérdida de leche por el cambio de sistema. Las vacas no lograron en esos 7 días alcanzar las producciones anteriores al cambio ($P=0,02$) (Figura 5). Weiss et al. (2004) reportaron que los valores de producción de leche luego del cambio de sistema de ordeño vuelven a valores iniciales recién luego de pasado 10 días en el SOV. Esta pérdida en producción puede estar dada no solo por el estrés generado durante el período de adaptación al nuevo sistema que afecta el flujo de leche (Weiss et al., 2004), sino también por aspectos propios del sistema nuevo, por ejemplo, menores consumo de materia seca causado por menores ordeños (menor frecuencia de ordeño que en el SOC) (Jacobs y Siegford, 2012).

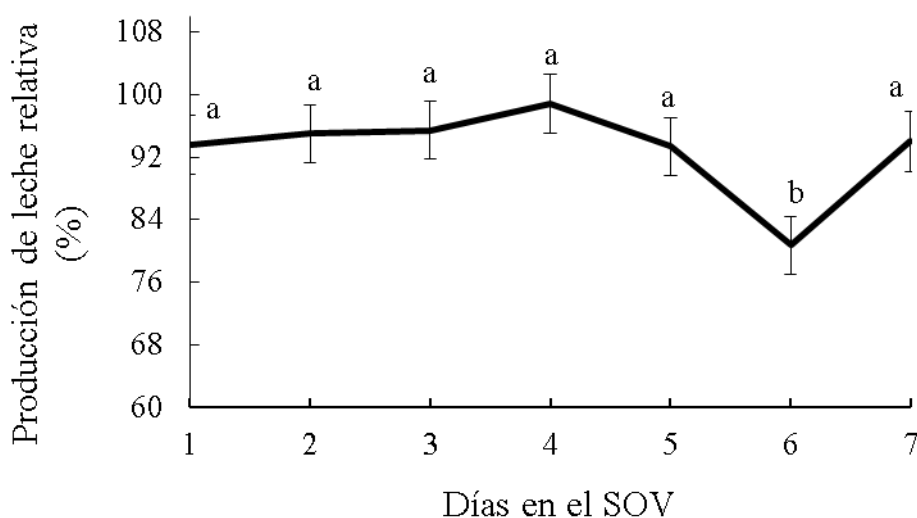


Figura 5. Producción de leche (media \pm EE) de los primeros 7 días en un sistema de ordeño voluntario (SOV), expresada como valores relativos a la producción de leche en el sistema de ordeño convencional (100%=media de la producción de los 7 días previos al cambio de sistema) de vacas Holando multíparas. Diferencias estadísticas entre días son indicadas con diferentes letras ($P\leq 0,05$).

La variación en producción individual estuvo en el rango de 72,0 a 112,3%, esa variación pudo estar relacionada a aspectos individuales de las vacas, como ser el temperamento. De hecho, la clasificación por VF se asoció a la producción de leche relativa ($P=0,05$). Animales clasificados como reactivos produjeron $99,6 \pm 3,4\%$ y calmos $91,4 \pm 3,0\%$ en relación a la producción en el SOC. El hecho de que vacas clasificadas como calmas para VF pierdan más leche que las reactivas está en concordancia con el resultado que obtuvimos de que vacas calmas produjeron menos que las reactivas durante los primeros 7 días en el SOV ($33,2 \pm 1,6$ L vs. $36,5 \pm 1,8$ L, respectivamente). Esto podría estar relacionado con nuestros resultados

comportamentales, donde vacas calmas patearon más en los primeros ordeñes que las reactivas. La mayor cantidad de patadas nos podría estar indicando incomodidad en el ordeño, lo cual provocaría menor flujo y producción de leche (Brouček y Tonge, 2015). Wethal y Heringstad (2019) describen una correlación negativa entre cantidad de patadas al robot y flujo de leche ($r=0,40$). Por el contrario, en la literatura encontramos que en SOC las vacas que son clasificadas como calmas presentan menor cantidad de patadas con un desempeño productivo mejor que las reactivas (Sutherland y col., 2012). Por lo tanto, parecería que la relación entre temperamento y productividad no es igual en vacas en SOC que en SOV.

El flujo de leche promedio durante los primeros 7 días fue de $83,3 \pm 3,4\%$ comparado con el flujo en el SOC, antes del cambio de sistema. El flujo de leche individual varió entre 58,7 y 105,1% en relación al flujo en el SOC; estando afectado por la interacción VF y días de evaluación ($P=0,02$). Las vacas reactivas para VF tuvieron diferente evolución del flujo de leche en el SOV que calmas, demostrando mayor variación (Figura 6). Los disturbios en el flujo de leche en las vacas clasificadas como reactivas podrían haberse dado por diferencias con las vacas calmas en la percepción de estos animales de factores externos, por ejemplo, disturbios por presencia humana, que pueden influir en la bajada de la leche.

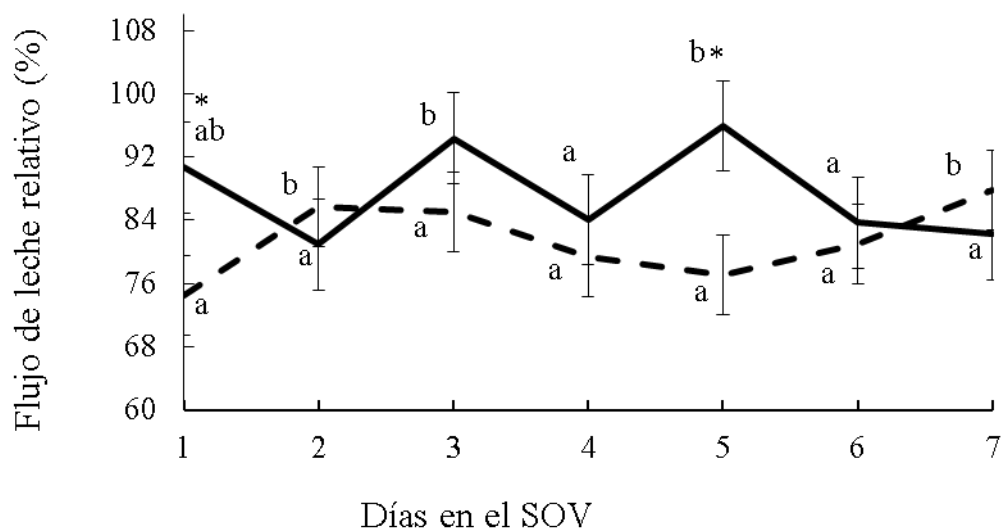


Figura 6. Flujo de leche (media \pm EE) de los primeros 7 días en un sistema de ordeño voluntario (SOV), expresado como valores relativos al flujo de leche en el sistema de ordeño convencional (100%=media del flujo de los 7 días previos al cambio de sistema) de vacas Holando múltiparas según la clasificación por la prueba velocidad de fuga (calmas: línea discontinua, reactivas: línea continua). Diferencias estadísticas entre días para una misma clasificación son indicadas con diferentes letras, y diferencias entre clasificación en un mismo día con * ($P \leq 0,05$).

En el siguiente cuadro (Tabla III) se presenta un resumen de los principales resultados del trabajo.

Tabla III. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando multíparas sobre los comportamientos y parámetros productivos durante el periodo de adaptación luego del cambio desde un sistema de ordeño convencional a uno voluntario.

	TP	VF	DF
Producción de leche	N/S	Calmas<reactivas	N/S
Producción de leche relativa*	N/S	Calmas<reactivas	N/S
Flujo de leche	N/S	Calmas<reactivas al día 5	N/S
Flujo de leche relativa*	N/S	Calmas<reactivas al día 1	N/S
Pasos en ordeño	N/S	N/S	N/S
Patadas en ordeño	N/S	Calmas>reactivas	Calmas no variaron, reactivas>al día 1

*valores relativos a los obtenidos de los animales en el sistema de ordeño convencional (100%=media de la producción o del flujo de los 7 días previos al cambio de sistema).

N/S: no significancia estadística (P>0,05).

Conclusiones: La reactividad de las vacas fue relacionada con el comportamiento y los parámetros productivos durante el cambio de sistema, pero esta relación dependió del tipo de prueba usada para evaluar el temperamento. La prueba VF fue la medida de temperamento que más estuvo relacionada con las variables indicativas de adaptación. Vacas clasificadas como calmas para dicha prueba patearon más y produjeron menos leche que las vacas reactivas. Al contrario de lo que hipotetizamos, las vacas reactivas parecen adaptarse más fácil al SOV, dado que reaccionaron menos al ordeño y tuvieron mejores parámetros productivos.

8.2. Experimento II

Dado que este estudio aún no forma parte de un manuscrito a publicar, aquí describiré exhaustivamente la hipótesis, el objetivo, los materiales y métodos, los resultados con una discusión completa y la conclusión del trabajo. La introducción y justificación del estudio están mencionados en los antecedentes de la tesis.

Hipótesis: Los comportamientos frente a los primeros ordeñes en un SOV son menos frecuentes en vacas primíparas Holando clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento que en vacas reactivas, resultando en mayores producciones de leche.

Objetivo: determinar la influencia del temperamento de vacas primíparas Holando en los indicadores productivos y comportamentales de adaptación a los primeros ordeñes en un SOV.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron 34 vaquillonas Holando preñadas del rodeo de cría de la Unidad de Lechería de INIA La Estanzuela. Previo al parto (aproximadamente 15 días) los animales fueron entrenados a toda la infraestructura del SOV (ver metodología general). Los partos se distribuyeron de manera homogénea durante 7 meses, desde marzo a setiembre. La descripción más completa y las características de los animales se encuentran descritas en Publicación II (Anexo II).

Luego del parto, para facilitar el manejo, se aplicó un protocolo de introducción de las primíparas. Este consistió en mantenerlas separadas del resto del rodeo durante los primeros tres días posparto, en un corral de alimentación cercano al tambo donde se les ofrecía RTM (17 Kg de materia seca/vaca/día, misma dieta que la descrita para posparto en Publicación II) y agua a voluntad. El corral tenía una superficie de 1,5 ha, con una sombra de 30 m de largo por 4 m de ancho. Por lo tanto, los animales eran llevados a los ordeñes (AM, PM) por el personal del SOV (movimiento forzado). En el cuarto día, luego del ordeño PM, los animales eran liberados con el resto del rodeo ofreciéndoles la pastura como alimento. Cuando los animales volvían al tambo en la mañana (movimiento voluntario), luego del ordeño AM se separaban automáticamente (por el sistema de puertas) del rodeo para que quedaran en el corral de alimentación hasta la tarde. A la tarde eran llevadas al ordeño por el observador para realizar las mediciones de comportamiento, y luego liberadas con el rodeo general. Por lo tanto, solos para el ordeño PM los animales fueron dirigidos por una observadora al corral de espera del tambo para ser ordeñadas (movimiento forzado). A partir del cuarto día en el sistema, la alimentación se basó en ración comercial en el ordeño (4 kg de materia seca/vaca/día), RTM ofrecida a razón de 12,7 kg de materia seca/vaca/día en el corral de alimentación, y pastoreo directo (5,5 kg de materia seca/vaca/día). La descripción de la alimentación está más detallada en la Publicación II (Anexo II). También durante los dos primeros ordeñes se le inyectaba oxitocina (10 UI/vaca,

Hipofamina, Laboratorio Dispert, Uruguay) a todos los animales para facilitar el ordeño.

Todas las vacas fueron sometidas a tres pruebas de temperamento en corral (TP, VF y DF; descritas en sección metodología general) realizadas el mismo día luego del ordeño PM, durante cuatro períodos posparto (media \pm DE; 9.8 ± 3.1 , 40.7 ± 3.2 , 70.7 ± 3.8 , y 195.4 ± 45.5 días posparto). Las pruebas se realizaron por la misma observadora luego de finalizado el periodo de evaluación de comportamiento (7 días posparto).

El día 1 de ingresada la vaca al ordeño hasta el día 7 posparto, se registraron una vez al día, durante el ordeño PM, por 2 observadoras ($r=0,70-0,91$, $p<0,02$) el tiempo para entrar al box de ordeño (metodología descrita en Estudio I), y el número de pasos y patadas durante colocación de pezoneras y ordeño (descrito en Estudio I). Durante el mismo periodo se registró diariamente la producción de leche total de forma automática.

Con el promedio de los resultados de las cuatro evaluaciones para las tres pruebas, el temperamento fue clasificado a partir de los terciles de la distribución de datos de cada prueba (Tabla IV).

Tabla IV. Clasificación de vacas Holando según tres pruebas de temperamento en corral: tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).

Temperamento	TP (s)	VF (m/s)	DF (m)
Calmas	$\geq 21,88$ (n=11)	$\leq 0,70$ (n=13)	$\leq 2,78$ (n=12)
Intermedias	10,95 a 20,37 (n=11)	0,71 a 0,92 (n=10)	2,83 a 3,88 (n=11)
Reactivas	$\leq 10,63$ (n=12)	$\geq 0,94$ (n=11)	$\geq 3,90$ (n=11)

Los efectos del temperamento (TP, VF y DF en clases) en el tiempo para entrar al box de ordeño, y la cantidad de pasos y patadas se analizaron con PROC GLIMMIX, con una distribución de Gamma y Poisson (según variable) y una función de link log. La cantidad de patadas fue transformada con una escala log ($\log x+2$). Los efectos fijos de los modelos fueron la clasificación del temperamento (una prueba por vez), el tiempo de evaluación (día posparto) y sus interacciones. Para la variable producción de leche se obtuvieron los datos del SOV durante los primeros 7 días posparto, y se los analizó como medias repetidas en el tiempo. Se utilizó el modelo PROC MIXED con los mismos efectos que los modelos anteriores, utilizando el padre del animal como covariable.

Resultados y discusión

Respuesta comportamental:

El tiempo que demoraron las vacas para entrar al box de ordeño no varió con el tiempo de evaluación ($P=0,95$). Hubo una relación entre el tiempo de entrada al box y la clasificación por la prueba VF ($P=0,01$). Las vacas intermedias para VF entraron más rápido al box de ordeño ($44,0 \pm 5,5$ s) que las calmas ($68,6 \pm 7,5$ s) o reactivas ($71,7 \pm 8,5$ s). También hubo una interacción entre la clasificación por DF y el día de evaluación para este tiempo ($P=0,05$), donde podemos observar que en los días 2 y 7 posparto las vacas reactivas para DF tuvieron mayores tiempos que calmas (Figura 7). La clasificación por TP no tuvo efectos en esta variable ($P=0,13$).

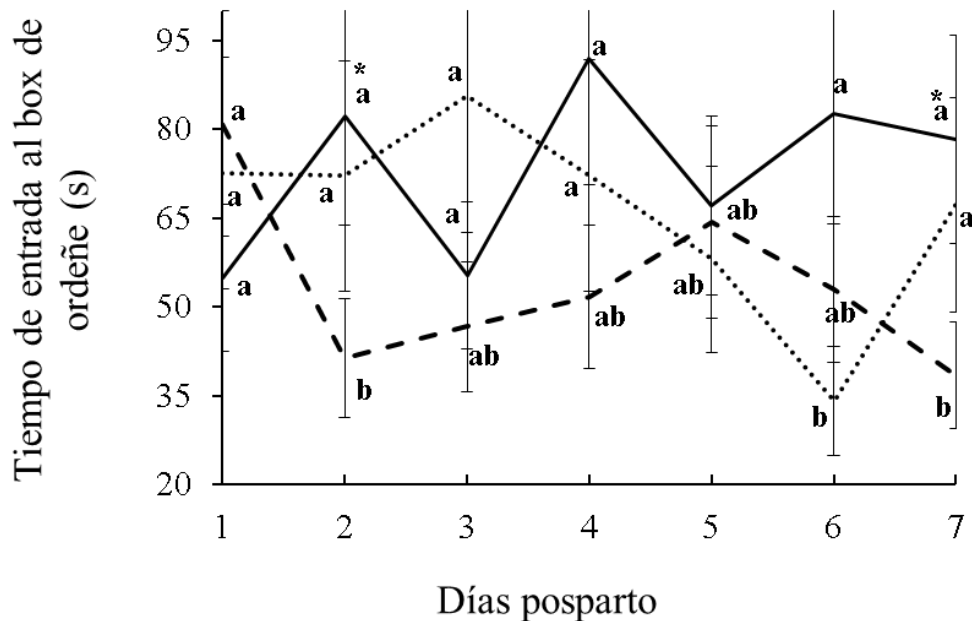


Figura 7. Tiempo de entrada al box de ordeño (mean \pm SE) de vacas Holando primíparas durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según la clasificación de temperamento por la prueba distancia de fuga (vacas calmas: línea discontinua; intermedias: línea punteada; reactivas: línea continua). Diferencias entre días son indicadas con diferentes letras, y diferencias entre temperamento calma y reactiva dentro del mismo día con * ($P \leq 0,05$).

Existen muy pocos estudios sobre los factores que afectan el tiempo en que demora una vaca en entrar al box de ordeño en un SOV, no existiendo trabajos que relacionen temperamento con esta variable. Cuando se comparan vacas primíparas entrenadas y no entrenadas al SOV (Jago y Kerrisk, 2011), o vacas múltiparas experimentadas vs. no experimentadas (Weiss y col., 2005) se encontró que este comportamiento podría ser usado como medida de adaptación al sistema ya que las vacas no entrenadas/no experimentadas tardaron más días en entrar solas al box de ordeño que las entrenadas/experimentadas. Sin embargo, en nuestro trabajo el tiempo no varió en los 7 días evaluados. Quizás sea necesario más días para que haya cambio significativo en esta variable.

Se ha reportado que el tiempo de entrada al box presenta una alta variación individual (Jago y Kerrisk, 2011, Kashiwamura et al., 2001). Por lo tanto, podemos

pensar que esa variabilidad podría deberse al temperamento de los animales. Se ha sugerido que la evitación a la máquina de ordeño en un SOV podría estar relacionado con miedo (Brouček y Tongel, 2015). En adición, se ha propuesto que el box de ordeño es un factor que genera miedo, siendo este un elemento que afectaría más al tiempo de entrada al box que la presencia de un ser humano (Jago y Kerrisk, 2011). Sin embargo, en nuestro trabajo las vacas más reactivas o miedosas a la prueba DF fueron las que tuvieron en algunos momentos mayor tiempo para entrar al box, sugiriendo que la prueba DF que evalúa miedo al humano también podría indicar miedo al box de ordeño en vacas primíparas.

Los pasos observados durante la colocación y el ordeño variaron según el temperamento evaluado a través de las pruebas VF ($P=0,0004$) y tendieron a variar según DF ($P=0,08$). También hubo una interacción de la clasificación por VF con el tiempo ($P=0,01$). Las vacas calmas para VF y DF presentaron mayor cantidad de pasos que vacas reactivas o intermedias (Tabla V). Los pasos variaron diferentes a lo largo de los días posparto según si las vacas eran calmas o reactivas para VF, teniendo las vacas calmas más cantidad de pasos a partir del día 4 comparadas con las reactivas en los mismos días (Figura 8). La clasificación por TP no tuvo efectos en la frecuencia de pasos totales.

Por el contrario, la cantidad de patadas totales no fue diferente según temperamento evaluado por VF o DF, o a lo largo de los días de evaluación; pero si variaron según TP ($P=0,02$). Las vacas calmas ($0,50 \pm 0,03$) e intermedias ($0,46 \pm 0,04$) en la prueba de TP demostraron mayor cantidad de patadas durante la colocación y ordeño que las reactivas ($0,35 \pm 0,03$). La cantidad de patadas también varió con el tiempo ($P<0,0001$), disminuyendo hasta el día 5, y luego manteniendo los valores hasta el final de la evaluación (Figura 9).

Tabla V. Cantidad de pasos (media \pm EE) de vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según clasificación por las pruebas de temperamento velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).

Temperamento		Pasos (cantidad)
VF	Calmas	$10,8 \pm 0,7$ a
	Intermedias	$4,5 \pm 1,0$ b
	Reactivas	$4,8 \pm 1,0$ b
DF	Calmas	$9,4 \pm 1,6$
	Intermedias	$6,4 \pm 1,6$
	Reactivas	$4,6 \pm 1,2$

Diferentes letras en la misma columna y dentro de cada prueba de temperamento indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$).

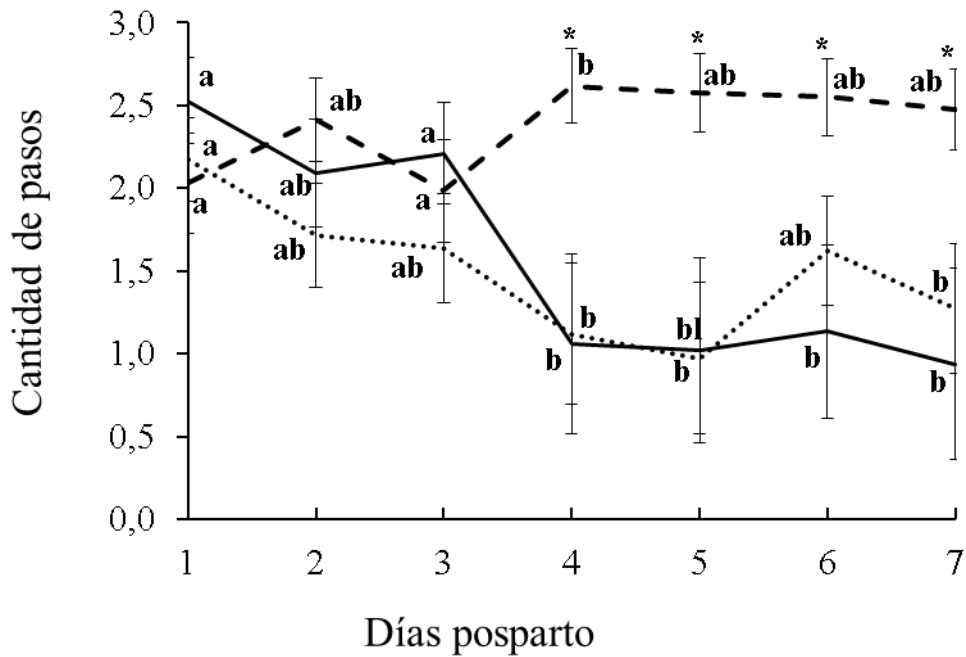


Figura 8. Cantidad de pasos realizados por vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario según clasificación de temperamento por la prueba velocidad de fuga (vacas calmas: línea discontinua; intermedias: línea punteada; reactivas: línea continua). Diferencias entre días son indicadas con diferentes letras, y diferencias entre temperamento calma y reactiva dentro del mismo día con * ($P \leq 0,05$).

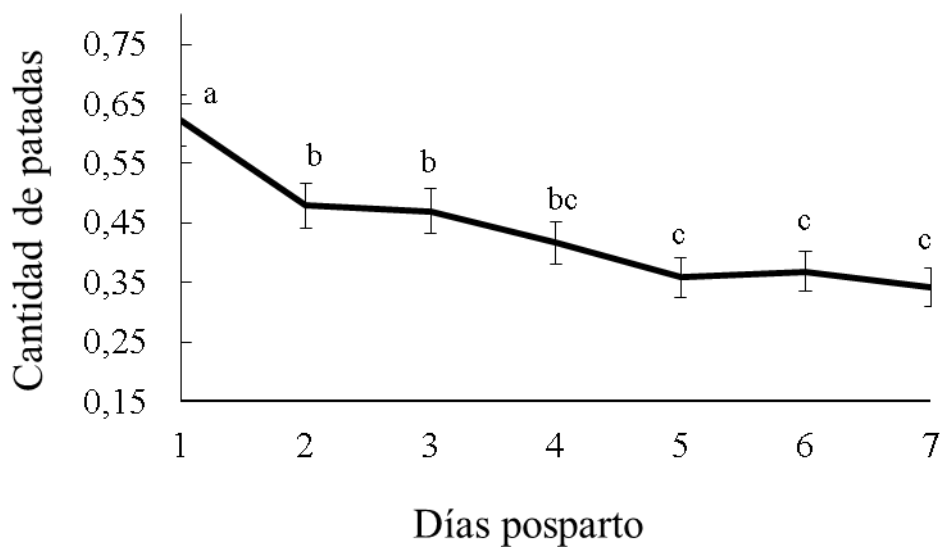


Figura 9. Cantidad de patadas realizadas por vacas primíparas Holando durante los primeros 7 días posparto en un sistema de ordeño voluntario. Diferencias entre días son indicadas con diferentes letras ($P \leq 0,05$).

Cuando las vacas primíparas son introducidas por primera vez a un sistema de ordeño responden exhibiendo un alto número de comportamientos relacionados a agitación (pasos, patadas, vocalización, defecación, micción), lo cual disminuirían

en frecuencia con el tiempo, a medida que el animal se adapta al sistema (Jacobs y Siegford, 2012). En menos de 24 horas de entrar al SOV los pasos y patadas disminuyen, manteniéndose constante luego, tanto en vacas primíparas como en multíparas (Jacobs y Siegford, 2012). En el presente estudio, parecería que las vacas reactivas se habitúan al ordeño de manera más rápida que las calmas en un SOV, bajando su cantidad de pasos a partir del día 4 posparto. Cuando analizamos las patadas, estas no variaron en el tiempo evaluado según temperamento, pero si disminuyeron para todas las vacas a lo largo de los días en el SOV. Al igual que lo reportado en la literatura, luego del primer día las vacas ya patean menos en el box de ordeño (Jacobs y Siegford, 2012).

Nuestros resultados en cuanto a pasos y patadas según temperamento fue lo contrario a lo publicado en la literatura para SOC. Vacas primíparas cruzas con mayores valores de VF y DF presentan más cantidad de pasos en el ordeño (Marçal-Pedroza y col., 2020). El sistema de ordeño convencional (que implica en la presencia del ordeñador) y/o las distintas razas (cruzas con Zebu vs. ganado Holando puro) estudiadas pudieron haber influido en esas diferencias entre trabajos. Sutherland y Dowling (2014) trabajando con vacas Holando primíparas en un SOC, no observaron relación entre cantidad de pasos y patadas y VF en la primera semana de lactación. La diferencia de ese trabajo con el nuestro, además del sistema de ordeño, fue que ellos realizaron las pruebas de temperamento durante preparto, lo cual podría arrojar diferentes resultados a las pruebas realizadas posparto, ya que vacas preparto presentan distinto nivel hormonal que vacas posparto. Vacas con niveles de hormonas relacionadas a la preñez diferente presentan distintas respuestas a las pruebas de temperamento (Freitas de Melo et al. 2019). La mayor reactividad en ordeño (más pasos) de vacas clasificadas como calmas por VF en las pruebas de corral podría reflejar que no hay un patrón directo y claro entre las pruebas de corral y la reactividad en ordeño, siendo ambas situaciones distintas, por lo tanto, demostrando diferentes componentes o dimensiones del temperamento.

Respuesta productiva:

La producción de leche promedia diaria en la primera semana posparto tendió a ser mayor en animales clasificados como intermedios ($23,3 \pm 1,6$ L) para la prueba TP, comparados con animales calmos ($19,1 \pm 1,3$ L) o reactivos ($21,2 \pm 1,5$ L) ($P=0,06$). No hubo efectos de la reactividad a otras pruebas de temperamento, ni del tiempo ni sus interacciones en la producción diaria de leche.

A pesar de la mayor reactividad en ordeño de vacas calmas (para las pruebas TP y VF), estas no tuvieron menores producciones que las vacas reactivas. Los animales calmos se estresaron más que los reactivos frente al robot de ordeño (más cantidad de pasos y patadas), pero esto no repercutió en su producción. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura las cuales sugieren que, en vacas primíparas en SOC, el comportamiento de estas durante el ordeño no se relacionaría con la producción de leche (Szentléleki y col., 2015; Van Reenen y col., 2002). Un argumento para explicar esto puede ser el sugerido por Van Reenen y col. (2022),

quienes indican que vacas primíparas frente a una situación estresante podrían tener una misma respuesta fisiológica (por ejemplo, concentraciones de oxitocina similares) pero niveles de respuestas comportamentales diferentes (por ejemplo, mayor cantidad de patadas). También ha sido propuesto que las vacas con un mismo estado emocional (por ejemplo, miedo) podrían tener diferentes patrones de comportamientos, pero con respuestas fisiológicas similares (Boissy, 1995; Knierim y Waran, 1993).

En el siguiente cuadro (Tabla VI) se presenta un resumen de los principales resultados del trabajo:

Tabla VI. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF)] de vacas Holando primíparas sobre los comportamientos y parámetros productivos durante los primeros 7 días de ordeño en un sistema de ordeño voluntario.

	TP	VF	DF
Producción de leche	N/S	N/S	N/S
Pasos en ordeño	N/S	Calmas>reactivas a partir del día 4	N/S
Patadas en ordeño	Calmas e intermedias>reactivas	N/S	N/S
Tiempo de entrada al box de ordeño	N/S	Intermedias<calmas y reactivas	Calmas<reactivas los días 2 y 7 posparto

N/S: no significancia estadística ($P>0,05$).

Conclusiones: La reactividad de las vacas primíparas Holando a pruebas de temperamento en el corral fue relacionada con la reactividad en el ordeño durante los primeros ordeños en un SOV, esta relación dependió del tipo de prueba usada para evaluar el temperamento. Vacas reactivas dieron menos pasos (cuando se las clasifico por VF) y patadas (cuando se las clasifico por TP) que vacas calmas, pero sin diferencias en la producción de leche. Por lo tanto, las vacas calmas tuvieron mayor dificultad en adaptarse al sistema por su respuesta comportamental, pero sin afectar la productividad.

8.3. Experimento III (Publicación II)

Dado que este estudio está descrito en un artículo publicado (Anexo II), aquí solo describiré brevemente la hipótesis, objetivo, materiales y métodos, los principales resultados con una discusión general y la conclusión.

Hipótesis: Durante el período posparto, en un SOV, las vacas Holando clasificadas como calmas para diferentes pruebas de temperamento presentan mayor respuesta productiva y un menor estrés metabólico que vacas clasificadas como intermedias o reactivas.

Objetivo: comparar la producción y composición de la leche, frecuencia de ordeño, y los perfiles metabólicos durante el período de transición (hasta 70 días posparto) de vacas Holando multíparas y primíparas de diferente reactividad a pruebas de temperamento bajo un SOV.

Materiales y Métodos

Treinta y cuatro vacas Holando primíparas (promedio de edad de $31,3 \pm 3,8$ meses, y condición corporal de $3,6 \pm 0,2$) y 57 multíparas (promedio de lactación de $3,4 \pm 1,1$ y condición corporal de $3,4 \pm 0,2$) fueron seleccionadas por fecha esperada de parto (otoño). El estudio comenzó a partir de la semana 4 preparto del animal, finalizando a la semana 10 posparto (marzo-octubre). Las vacas pertenecían al rodeo del SOV. Quince días antes del parto las vacas primíparas fueron entrenadas al sistema de ordeño (metodología general). Después del parto todos los animales estuvieron en un mismo grupo, y la dieta consistió en acceso a pastura y suplementación con ración comercial, ofreciéndose concentrado en patio de alimentación durante el invierno. La dieta posparto se encuentra descrita en Publicación II (Anexo II).

Durante el posparto en el SOV, los animales fueron expuestos a 4 pruebas de temperamento, RO, TP, VF y DF en el orden que fueron descritas en la metodología general de la tesis. La reactividad (RO) fue evaluada durante el ordeño PM. Inmediatamente luego de la salida del ordeño las vacas fueron llevadas a las mangas para evaluar las pruebas de corral. Las pruebas fueron realizadas en las semanas 1, 6, 10 y 20 posparto por la misma observadora.

Durante las primeras 10 semanas posparto se registraron la producción de leche (L/día) y frecuencia de ordeño (ordeños/día). Se calculó la producción de leche corregida por 3,5% de grasa (leche corregida en kg/día) a partir de la fórmula de Tyrrell y Reid (1965): $0,4324 \times \text{kg de leche} + 16,218 \times \text{kg de grasa}$. Semanalmente en el ordeño AM, se obtuvieron muestras de leche individual para análisis de las concentraciones de grasa, proteína, lactosa y urea-N en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA). La condición corporal fue obtenida por un solo observador a la semana 4 preparto y las semanas 1, 2, 3, 6, y 10 posparto, con la escala de 5 puntos de Edmonson, Lean, Weaver, Farver y Webster (1989).

Muestras de sangre fueron colectadas a la semana 4 preparto (08:00) y 1, 2, 3, 6 y 10 semanas posparto (06:00) de la vena coccígea, con tubos Vacuette® (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria), estas fueron centrifugadas inmediatamente (3000×g por 15 minutos a 20 °C; centrifuga KN-70, Kubota, Tokyo, Japón), y el plasma almacenado a -20°C hasta ser enviadas al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal y al Laboratorio de Bioquímica (Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay). Se determinó de las concentraciones de AGNE, BHB, colesterol, calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), urea, albumina, proteínas totales, haptoglobina, aspartato aminotransferasa (AST) y gamma-glutamyl transferasa (GGT). La concentración de globulinas fue estimada por la diferencia entre la concentración de proteínas totales y la albumina (Damián y col., 2020). Las características de cada uno de los análisis están descriptas en la Publicación II (Anexo II).

Para el análisis estadístico se utilizó el promedio de las 4 evaluaciones para cada una de las pruebas de temperamento, categorizando a las vacas, según la descripción en metodología general, en calmas, intermedias y reactivas (Tabla VII). Las medidas de condición corporal y metabolitos/hormonas del preparto fueron utilizadas como covariables en los modelos analizados. El padre de la vaca fue utilizado como efecto aleatorio para las variables producción de leche y componentes de la leche. Para evaluar los efectos de la paridad (primíparas o multíparas), temperamento (una prueba por modelo), la semana de evaluación y sus interacciones se utilizaron PROC MIXED. Para la condición corporal, al no tener distribución normal se utilizó PROC GLIMMIX. También se analizó la ocurrencia de cetosis subclínica (concentraciones de BHB $\geq 1,2$ mmol/L; Duffield, Lissemore, McBride y Leslie 2009) con un modelo lineal generalizado (PROC GENMOD) considerando una distribución binomial y una función link logit.

Tabla VII. Clasificación de vacas Holando según 4 pruebas de temperamento: reactividad en el ordeño (RO); tiempo de pasaje por el tubo (TP); velocidad de fuga (VF) y distancia de fuga (DF).

	RO (score)	TP (s)	VF (m/s)	DF (m)
Calmas	$\leq 2,63$ (n=32)	$\geq 28,64$ (n=30)	$\leq 0,69$ (n=29)	$\leq 2,78$ (n=33)
Intermedias	2,64 - 3,27 (n=27)	13,16 - 28,63 (n=30)	0,70 - 0,97 (n=33)	2,79 - 3,87 (n=28)
Reactivas	$\geq 3,28$ (n=32)	$\leq 13,15$ (n=31)	$\geq 0,98$ (n=29)	$\geq 3,88$ (n=30)

Resultados y discusión

Dado que en esta tesis nos enfocaremos en los efectos del temperamento y sus interacciones, los resultados y discusión en relación con las diferencias exclusivas entre primíparas y multíparas no serán incluidos aquí, y podrán leerse en la Publicación II (Anexo II).

La producción de leche, tanto en litros como corregida por 3,5% de grasa fueron afectadas significativamente por la paridad ($P < 0,0001$), semana posparto ($P < 0,005$) y temperamento ($P \leq 0,04$). Hubo una interacción entre paridad y temperamento evaluado por RO y TP. Las vacas primíparas calmas y reactivas tuvieron similar producción de leche. Sin embargo, cuando las vacas eran múltiparas, aquellas clasificadas como reactivas para RO y TP presentaron mayor producción de leche corregida por 3,5% de grasa que vacas clasificadas como calmas (Tabla VIII). Esto estuvo dado por el mayor contenido de grasa en la leche de las vacas múltiparas reactivas comparadas con las calmas (Tabla VIII). También la producción de proteína y en leche fue mayor en vacas reactivas que en calmas (Tabla VIII). La frecuencia de ordeño también fue relacionada con el temperamento ($P \leq 0,05$). La frecuencia de ordeño difirió si las vacas eran clasificadas como calmas o reactivas por la prueba TP, pero hubo una interacción del temperamento con la paridad ($P = 0,01$). Las vacas múltiparas reactivas para TP se ordeñaron más frecuentemente que las clasificadas como calmas; mientras que para las vacas primíparas no hubo efecto del temperamento (Tabla VIII).

Tabla VIII. Frecuencia de ordeño, producción de leche, leche corregida por 3,5% de grasa y componentes de la leche (medias \pm EE) de vacas Holando primíparas (PRIM) y múltiparas (MULT) de diferentes temperamentos [clasificadas por las pruebas reactividad en ordeño (RO) y tiempo de pasaje por el tubo (TP)] durante 10 semanas de lactación en un sistema de ordeño voluntario.

		RO			TP		
		Calmas	Intermedias	Reactivas	Calmas	Intermedias	Reactivas
Frecuencia de ordeño (ordeños/día)	PRIM	1,96 \pm 0,06ab	1,85 \pm 0,05b	2,00 \pm 0,06a	1,93 \pm 0,05	1,88 \pm 0,06	1,99 \pm 0,05
	MULT	2,39 \pm 0,04	2,44 \pm 0,05	2,40 \pm 0,04	2,35 \pm 0,04b	2,39 \pm 0,04ab	2,50 \pm 0,05a
Producción de leche (L/día)	PRIM	24,6 \pm 1,2	23,3 \pm 1,1	25,1 \pm 1,1	25,1 \pm 1,2	24,5 \pm 1,3	23,2 \pm 1,0
	MULT	32,4 \pm 1,0b	35,8 \pm 1,0a	34,9 \pm 1,0a	33,3 \pm 0,8	33,9 \pm 0,8	35,4 \pm 1,0
LCG ¹ (Kg/día)	PRIM	28,2 \pm 1,2	25,7 \pm 1,2	28,2 \pm 1,2	27,9 \pm 1,4	27,9 \pm 1,5	26,3 \pm 1,1
	MULT	35,1 \pm 0,88b	38,9 \pm 1,0a	38,4 \pm 1,0a	35,8 \pm 1,0b	36,6 \pm 1,0b	39,4 \pm 1,1a
Grasa en leche (Kg/día)	PRIM	1,18 \pm 0,04	1,14 \pm 0,04	1,18 \pm 0,04	1,19 \pm 0,05	1,22 \pm 0,05	1,14 \pm 0,04
	MULT	1,27 \pm 0,03b	1,46 \pm 0,04a	1,44 \pm 0,04a	1,31 \pm 0,04b	1,34 \pm 0,04b	1,49 \pm 0,04a
Proteína en leche (Kg/día)	PRIM	0,90 \pm 0,03	0,87 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03	0,91 \pm 0,04	0,84 \pm 0,03
	MULT	1,08 \pm 0,02b	1,21 \pm 0,03a	1,18 \pm 0,03a	1,13 \pm 0,02	1,14 \pm 0,03	1,17 \pm 0,03
Lactosa en leche (Kg/día)	PRIM	1,37 \pm 0,06	1,35 \pm 0,05	1,36 \pm 0,05	1,39 \pm 0,06	1,41 \pm 0,06	1,34 \pm 0,05
	MULT	1,61 \pm 0,04b	1,78 \pm 0,05a	1,75 \pm 0,04a	1,69 \pm 0,04ab	1,65 \pm 0,04b	1,76 \pm 0,04a

¹ Leche corregida por 3,5% de grasa, calculada como: 0,4324 \times kg de leche+16,218 \times kg de grasa (kg), Diferentes letras en la misma fila y dentro de la misma prueba de temperamento son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Cuando clasificamos a las vacas en reactivas por las pruebas de temperamento evaluadas (RO o TP), obtuvimos que estas produjeron más leche, con mayor contenido de grasa y proteína, y mayor frecuencia de ordeño que vacas calmas; pero esto solo se observó en las multíparas. La mayor producción de leche en vacas reactivas coincide con algunos trabajos realizados en SOC (Gergovska y col., 2012; Sawa y col. 2017), pero no con otros que reportan lo contrario (Hedlund y Løvlie, 2015; Marçal-Pedroza y col., 2020). Esto podría tener varias explicaciones. Primero, la correlación negativa entre producción de leche y temperamento estaría dada por el relacionamiento entre la persona que ordeña y la vaca. Las vacas reactivas se estresarían más que las calmas en el ordeño, provocando disminución del flujo de leche, por ende, de la producción (Rushen et al., 1999; Szentléleki y col., 2015). En los SOV, esta relación humano-animal es menor que en un SOC (Wildridge y col., 2020), por lo tanto, no estaría influyendo en la productividad de los animales. Segundo, las vacas reactivas podrían tener diferentes comportamientos durante la alimentación que vacas calmas (Neave y col., 2018; Searle y col., 2010), pudiendo resultar en diferente consumo de materia seca y finalmente diferente nivel de producción. De hecho, se ha reportado que vacas más reactivas durante el ordeño demuestran mayor frecuencia de comportamientos agonísticos, teniendo mayor consumo de alimentos (Sullivan y Burnside, 1988). Si los comportamientos agonísticos durante la alimentación son parte del temperamento (Gibbons, Lawrence y Haskell, 2009b), tal vez las vacas más reactivas para RO o TP consumieron más materia seca durante el pastoreo, en el box de ordeño y/o RTM, produciendo más leche que las vacas calmas. Lamentablemente, no evaluamos comportamiento de alimentación ni consumos en el presente estudio. Finalmente, la mayor frecuencia de ordeño de vacas reactivas podría haber llevado a mayor producción de leche de estas, ya que cuanto más ordeños diarios, mayor es la producción (Lyons y col., 2014).

El hecho de que no se observaran diferencias productivas entre las distintas clases de temperamento en vacas primíparas, podría deberse a un mayor nivel de estrés en estos animales comparados con vacas multíparas, enmascarando posibles efectos del temperamento en la producción de leche. Por un lado, las vacas primíparas son más estresables y reactivas que vacas multíparas (Dechow, Sondericker, Enab y Hardie, 2020). Por otro lado, se ha reportaron que las vacas primíparas demuestran mayor tiempo de espera en el corral antes de ser ordeñadas en los SOV (Donohue, Kerrisk, Garcia, Dickeson y Thomson, 2010), pudiendo esto provocar una situación de estrés. Además, la frecuencia de ordeño no difirió entre primíparas de distinto temperamento, por lo tanto, no se esperan diferencias en la producción de leche debido a este factor, como pudo pasar en vacas multíparas.

En cuanto a los perfiles metabólicos, algunos metabolitos y hormonas fueron afectados significativamente por el temperamento ($P \leq 0,05$). La relación entre temperamento y los metabolitos y las hormonas fue diferencial según la prueba utilizada. Cuando clasificamos a las vacas por RO, se observó que las vacas calmas

tuvieron mayor concentración de AGNE ($P=0,04$), y menores valores de Ca ($P=0,05$) y proteínas totales sanguíneas ($P=0,05$) que las vacas reactivas (Tabla IX).

Cuando utilizamos la prueba TP, las concentraciones de BHB fueron mayores para las vacas reactivas que las calmas ($P=0,04$) (Tabla IX). La interacción entre temperamento evaluado por TP y la paridad estuvo relacionada con la incidencia de cetosis subclínica ($P=0,01$). En primíparas las diferencias entre calmas y reactivas no fueron detectadas (reactivas: $7/17=41,2\%$, calmas: $5/10=50,0\%$), mientras que, en múltiparas, las vacas reactivas tuvieron mayor incidencia de cetosis subclínica ($11/14=78,5\%$) que las vacas calmas ($7/21=33,3\%$). La interacción entre temperamento evaluado por TP y la paridad también influyó las concentraciones sanguíneas de AST ($P=0,03$). Las vacas múltiparas clasificadas como reactivas tuvieron mayores valores de AST ($118,8 \pm 4,7$ UI) que las clasificadas como calmas ($102,9 \pm 3,9$ UI), mientras que en las primíparas no se observaron diferencias entre clasificación.

Tabla IX. Metabolitos sanguíneos de vacas Holando (medias \pm EE) durante las primeras 10 semanas posparto según temperamento [clasificación por reactividad en ordeño (RO) y tiempo de pasaje por el tubo (TP)] en un sistema de ordeño voluntario.

	RO			TP		
	Calmas	Intermedias	Reactivas	Calmas	Intermedias	Reactivas
AGNE ¹ (mmol/L)	$0,58 \pm 0,03a$	$0,58 \pm 0,03a$	$0,49 \pm 0,03b$	$0,52 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,03$
BHB ² (mmol/L)	$1,06 \pm 0,10$	$1,21 \pm 0,10$	$1,09 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,10b$	$1,13 \pm 0,10ab$	$1,28 \pm 0,09a$
Calcio (mmol/L)	$2,15 \pm 0,04b$	$2,17 \pm 0,04b$	$2,28 \pm 0,04a$	$2,18 \pm 0,04$	$2,22 \pm 0,05$	$2,21 \pm 0,04$
Proteínas totales (g/L)	$72,4 \pm 1,1b$	$75,8 \pm 1,1a$	$75,6 \pm 1,0a$	$73,6 \pm 1,1$	$75,6 \pm 1,1$	$74,8 \pm 1,1$

¹ ácidos grasos no esterificados, ² beta-hidroxi-butyrate

Diferentes letras en la misma fila y dentro de la misma prueba de temperamento son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

La prueba VF se relacionó con los niveles sanguíneos de GGT ($P=0,05$) y haptoglobina ($P=0,03$). Las vacas clasificadas como calmas presentaron mayores valores de GGT ($30,6 \pm 1,4$ UI) y haptoglobina ($0,82 \pm 0,07$ mg/dL) que las reactivas (GGT: $26,2 \pm 1,4$ UI; haptoglobina: $0,61 \pm 0,07$ mg/dL). Lo cual podría indicar diferente metabolismo hepático entre las diferentes clases de temperamento y/o que las vacas calmas estuvieran cursando algún estado inflamatorio.

Al igual que con las variables productivas, la relación entre el temperamento y los perfiles metabólicos fue influenciada por la paridad. Diferencias metabólicas entre vacas calmas o reactivas (evaluada por VF) ya fue reportada por Burdick Sánchez y col. (2016) para las concentraciones de AGNE en ganadería. Sin embargo, estos

autores describen que animales reactivos presentaron mayores niveles de AGNE que calmos. Hay que tener en cuenta que en nuestro trabajo solo la prueba de RO fue relacionada con los AGNE. Elevados valores de AGNE pueden provocar resistencia a la insulina (Hayirli, 2006), resultando en diferente utilización de los recursos energéticos por parte del animal según el temperamento (Burdick Sánchez y col., 2016). Los requerimientos de glucosa para la formación de lactosa de la leche son mayores en el posparto temprano, por lo tanto, la menor producción de leche de vacas RO calmas comparadas con las reactivas podría estar explicada por el incremento de los AGNE con efectos en la partición de energía. Las concentraciones de Ca y proteínas totales fueron menores en los animales calmos para RO, lo que está en concordancia con la especulación de que animales calmos produjeron menos porque comieron menos.

Por otro lado, la mayor lipomovilización (evidenciado por valores de BHB) en vacas reactivas para TP fue esperado dada la alta producción de leche de estas vacas, los cual está en línea con los porcentajes de cetosis subclínica encontrados. Mayor valor de AST en multíparas reactivas para TP podría deberse a mayores porcentajes de cetosis en esas vacas, ya que esta enfermedad aumenta los niveles de esta enzima en sangre (Couperus y col., 2021).

Es importante aclarar que las concentraciones de los metabolitos, minerales, y proteínas, y sus evoluciones posparto, independiente de la paridad o del temperamento, fueron las reportadas como normales para vacas lecheras durante el período posparto (Abeni y col., 2005; Loor, Bertoni, Hosseini, Roche y Trevisi, 2013).

En el siguiente cuadro (Tabla X) se presenta un resumen de los principales resultados del trabajo.

Tabla X. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF), distancia de fuga (DF) y reactividad en el ordeño (RO)] de vacas Holando multíparas sobre los parámetros productivos y metabólicos durante los primeros 70 días posparto en un sistema de ordeño voluntario.

	TP	VF	DF	RO
Producción de leche*	Calmas e intermedias < reactivas	N/S	N/S	Calmas < reactivas e intermedias
% grasa en leche	Calmas e intermedias < reactivas	N/S	N/S	Calmas < reactivas e intermedias
% proteína en leche	N/S	N/S	N/S	Calmas < reactivas e intermedias
% lactosa en leche	Calmas < reactivas	N/S	N/S	Calmas < reactivas e intermedias
Frecuencia de ordeño	Calmas < reactivas	N/S	N/S	N/S

AGNE	N/S	N/S	N/S	Calmas e intermedias >reactivas
BHB	Calmas<reactivas	N/S	N/S	N/S
Calcio	N/S	N/S	N/S	Calmas e intermedias<reactivas
Proteínas totales	N/S	N/S	N/S	Calmas<reactivas e intermedias
AST	Calmas<reactivas e intermedias	N/S	N/S	N/S
GGT	N/S	Calmas>reactivas e intermedias	N/S	N/S
Haptoglobina	N/S	Calmas>reactivas	N/S	N/S

* Leche corregida por 3,5% de grasa, calculada como: $0,4324 \times \text{kg de leche} + 16,218 \times \text{kg de grasa (kg)}$.
N/S: no significancia estadística ($P > 0,05$).

Conclusiones: La producción de leche y algunos metabolitos de vacas Holando en un SOV durante el posparto temprano fueron diferentes según el temperamento, la paridad y su interacción. La relación entre temperamento y producción dependió de si la vaca era primípara o múltipara, y de la prueba de temperamento usada, evidenciando mayor producción en vacas múltiparas clasificadas como reactivas que en calmas, pero esto no ocurrió en primíparas. Estas relaciones fueron evidentes para las pruebas RO y TP. Sin importar la paridad, el temperamento se asoció con algunos perfiles metabólicos, en general, animales reactivos para la prueba TP tuvieron mayor lipomovilización que animales calmos.

8.4. Experimento IV (Publicación III)

El objetivo principal o central de este trabajo aún no forma parte de un artículo, por lo tanto, aquí describiré exhaustivamente la hipótesis, el objetivo, los materiales y métodos, los resultados con una discusión y la conclusión del trabajo. La introducción y justificación del estudio están mencionados en los antecedentes de la tesis.

De este estudio surgió un objetivo secundario (evaluar la productividad y comportamientos en pastoreo de vacas primíparas y multíparas Holando en un SOV pastoril bajo estrés calórico) el cual dio como producto un artículo publicado. En este se describe los efectos de las condiciones ambientales (estrés calórico) sobre las variables estudiadas. Los resultados de esta publicación serán brevemente descriptos aquí, los detalles podrán revisarse en el Anexo III.

Hipótesis: El temperamento y la paridad (primíparas o multíparas) de las vacas Holando en un SOV influye en los comportamientos realizados durante el pastoreo, habiendo una mayor frecuencia de comportamientos de alimentación en animales clasificados como calmos que en reactivos o intermedios.

Objetivo: relacionar la reactividad a distintas pruebas de temperamento y la paridad (primíparas y multíparas) de vacas Holando con sus comportamientos realizados durante el pastoreo en un SOV pastoril.

Materiales y Métodos

El estudio fue realizado en la Unidad experimental de INIA La Estanzuela, donde 25 vacas Holando primíparas (promedio de producción de leche $19,9 \pm 4,5$ kg, y 191 ± 50 DEL) y 44 multíparas (promedio de producción de leche $27,2 \pm 4,6$ kg, número de partos $3,3 \pm 1,0$, y 180 ± 39 DEL) fueron seleccionadas por DEL (más de 150 días). Durante el período experimental (noviembre 2019), la dieta de las vacas consistió en el acceso a pasturas templadas (mezcla de *Medicago sativa*, *Dactylis glomerata*, y *Lolium perenne*) y ración comercial (ofrecida en el box de ordeño y box de alimentación del SOV), la cual se encuentra descrita en la Publicación III (Anexo III). Todas las vacas se mantuvieron en un solo grupo, pero tenían acceso a 3 parcelas de pastura diarias distintas (sectores A, B y C), la cuales presentaban diferentes horarios de apertura (Figura 2), por lo tanto, según la hora que la vaca salía del ordeño e iba a la pastura era donde le tocaba pastorear. El tamaño de las parcelas era ajustado semanalmente según disponibilidad de materia seca, totalizando en las tres parcelas un promedio de 21,9 kg de materia seca/vaca/día. Las parcelas y los callejones/caminos no tenían sombra, la cual solo estaba disponible en la infraestructura del tambo. El agua se encontraba disponible *ad libitum* en bebederos automáticos en las parcelas.

El temperamento de todas las vacas fue evaluado a través de las pruebas TP, VF, DF y RO a la semana 1, 6, 10 y 20 posparto, por la misma observadora, como fue descrito anteriormente en Estudio III (se utilizaron los mismos datos).

Evaluación de los comportamientos en pastoreo

Nueve observadores entrenados (la confiabilidad inter observador para todos los comportamientos fue $> 0,89$ basado en coeficiente Kappa) registraron los comportamientos en pastoreo usando el método de muestreo scan cada 10 min (DeVries y col., 2003; Hämäläinen y col., 2016; Grille y col., 2019) durante 12 horas diarias (desde 06:00 a 18:00 h), por 10 días [5 días entre semana (lunes-viernes), seguido por un intervalo sin registrar de 2 días (fin de semana) y luego 5 días más (lunes-viernes)]. Los comportamientos registrados fueron:

De posición corporal:

- Parada: la vaca se encontraba apoyada en sus 4 miembros, los cuales estaban en posición perpendicular al suelo.
- Echada: el animal se encontraba con el cuerpo tocando el suelo, los miembros no soportaban el peso del cuerpo. La vaca podía estar recostada de forma esternal o lateral, pudiendo estar con al menos un miembro doblado y apoyado contra el suelo, o con los miembros estirados.

De actividades:

- Locomoción: el animal caminaba o corría sin otra actividad aparente.
- Pastorear: la vaca tenía su cabeza hacia abajo realizando movimientos de búsqueda, selección, prensión o masticación del forraje.
- Rumiar: el animal regurgitaba el bolo de alimento y lo masticaba de forma rítmica moviendo su mandíbula lateralmente.
- Sin actividad: la vaca presentaba su cabeza y orejas en posición normal no realizando ninguna actividad aparente.
- Alerta: la vaca tenía su cabeza erguida, con las orejas en posición horizontal, o direccionadas para atrás, mirada fija y direccionada a determinado lugar o estímulo.
- Otros: el animal realizaba una actividad no descrita anteriormente, ya sea de pie o echada.

En cada periodo de observación, había una persona en cada una de las entradas de las parcelas registrando los animales que entraban y salían de la misma. Durante un mismo período de observación, una vaca podía estar en cualquiera de los tres sectores de pastoreo (A, B, o C; según la hora del día), en los caminos, en el box de ordeño o en la infraestructura del tambo (excepto en box de ordeño). Por lo tanto, la ubicación de un animal podía ser: pastura, ordeño u “otros lugares” (incluyendo infraestructura del tambo o caminos). Las vacas estaban identificadas por sus caravanas y por un número pintado en su tórax con pintura al agua.

A partir de la temperatura del aire (t_a en °C) y la humedad relativa promedio (HR en %) se calculó el ITH diario [THI: $1,8t_a + 32 \times (0,55 - 0,55 \times HR) \times (1,8t_a - 26)$] (NRC, 1971). La temperatura, humedad e ITH promedio (\pm DE) para los primeros 5 días evaluados, fueron $21,6 \pm 1,7^\circ\text{C}$, $70,6 \pm 5,6\%$, $77 \pm 4,6$, respectivamente; y para los últimos 5 días de evaluación de $24,5 \pm 3,1^\circ\text{C}$, $67,4 \pm 9,2\%$, $84 \pm 7,7$. El ITH obtenido indicó que los animales estuvieron bajo estrés calórico (Román y col., 2019), siendo las condiciones de estrés térmico de leve a moderado en los primeros 5 días (80% del día con ITH entre 75 y 81), y de moderado a severo en los últimos días (80% del día con ITH entre 83 y 90) (García, Angeli, Machado, de Cardoso y Gonzalez, 2015). Más detalle de los datos meteorológicos del período de evaluación se encuentran descriptos en Publicación III (Anexo III).

Análisis estadístico

Las vacas fueron clasificadas para cada una de las pruebas de temperamento evaluadas como se describió anteriormente en el Estudio III. Para este análisis se utilizaron los animales clasificados como extremos (calmas o reactivas) (Tabla VII). Los comportamientos fueron combinados quedando las siguientes categorías para análisis: parada sin actividad, parada rumiando, pastoreando, echada sin actividad y echada rumiando. Cada categoría de comportamiento y la ubicación de los animales (pasturas u “otros lugares”) fueron expresadas como el porcentaje diario del tiempo total de observación. Los comportamientos alerta, locomoción y otros tuvieron muy bajas ocurrencias, con altas frecuencias de ceros en las distribuciones (porcentaje del tiempo promedio para alerta: $0,39 \pm 0,73\%$, locomoción: $0,85 \pm 1,18\%$; y otros: $0,80 \pm 1,33\%$) por lo tanto no fue posible su análisis estadístico de la misma forma que para las demás variables. Modelos lineales generalizados mixtos fueron realizados para explorar la asociación entre el temperamento clasificado por TP, VF, DF y RO con el porcentaje del tiempo de observación en cada comportamiento y en cada ubicación. Los efectos fijos utilizados fueron temperamento (calmas o reactivas), paridad (primíparas o multíparas) y su interacción. Las covariables incluidas en los modelos fueron: los DEL, el porcentaje del tiempo en pasturas (excepto para el análisis de la ubicación de los animales), y el índice de temperatura y humedad (ITH) en el caso de las variables que se vieron afectadas por el ITH del día de la observación (todas excepto parada rumiando según resultados de Publicación III). El animal repetido dentro del día de la evaluación fue agregado como efecto aleatorio en todos los modelos. Se realizó las comparaciones múltiples de medias a través de la prueba de Tukey, considerando significancia estadística un valor $\alpha \leq 0,05$.

Resultados

Las condiciones de estrés calórico (ITH > 68) bajo la que estuvieron los animales durante el periodo experimental no fue la que esperábamos. Los efectos de ambiente climático sobre las variables estudiadas se encuentran en la Publicación III (Anexo III). En resumen, el ITH del día en que hicimos las observaciones afectó significativamente los comportamientos en pastoreo excepto el comportamiento de

parada rumiando. Por cada aumento de unidad de ITH hubo incremento del porcentaje del tiempo parada sin actividad (0,14%), y disminución de los comportamientos pastoreando (0,30%), echada sin actividad (0,04%) y echada rumiando (0,70%). También observamos que el tiempo en las parcelas de pasturas y en “otros lugares” (camino y tambo) se relacionó con el ITH, disminuyendo el porcentaje del tiempo en que los animales estaban en las pasturas un 1.0% y aumentando el tiempo en “otros lugares” en la misma magnitud, por cada unidad de ITH que aumentaba. Por lo tanto, los resultados obtenidos para este estudio son relativos a las condiciones ambientales del período de evaluación.

El comportamiento parada sin actividad fue relacionado con la clasificación por las pruebas TP ($P=0,04$) y VF ($P=0,005$). Vacas calmas estuvieron mayor proporción del tiempo de observación en el comportamiento paradas sin actividad aparente (TP: $2,95 \pm 0,20\%$; VF: $2,95 \pm 0,18\%$) que vacas reactivas (TP: $2,50 \pm 0,20\%$; VF: $2,15 \pm 0,20\%$). También las vacas calmas clasificadas por VF presentaron una mayor proporción del tiempo paradas rumiando ($4,30 \pm 0,25\%$) que las reactivas ($3,00 \pm 0,27\%$) ($P=0,0008$). Por el contrario, vacas calmas ($3,05 \pm 0,27\%$) por la prueba RO ($P=0,002$) pasaron menos tiempo parada rumiando que reactivas ($3,77 \pm 0,25\%$). El porcentaje del tiempo pastoreando no varió en función de ninguna de las tres pruebas de temperamento en corral, pero si fue diferente según la clasificación por RO ($P=0,02$). Vacas calmas invirtieron más tiempo pastoreando ($40,5 \pm 0,5\%$) que las vacas reactivas ($38,7 \pm 0,5\%$).

En relación al comportamiento echada sin actividad, hubo una interacción entre la clasificación por TP y paridad ($P=0,03$). Las diferencias entre calmas y reactivas solo se observaron en vacas primíparas, las cuales cuando fueron calmas para TP se mantuvieron menos % del tiempo en ese comportamiento ($3,69 \pm 0,34\%$) que las reactivas ($4,78 \pm 0,32\%$). En el caso de las multíparas no hubo diferencias entre clasificación (calmas: $4,60 \pm 0,25\%$, reactivas: $4,20 \pm 0,32\%$). Este comportamiento también fue relacionado con la clasificación por la prueba VF ($P=0,01$), sin importar la paridad de los animales. Animales calmos presentaron una menor proporción del tiempo en esta actividad ($4,03 \pm 0,23\%$) que los reactivos ($4,73 \pm 0,25\%$). Vacas calmas para VF ($P=0,0049$) demostraron menor porcentaje del tiempo en el comportamiento echada rumiando que vacas reactivas ($11,1 \pm 0,4\%$ vs. $12,5 \pm 0,4\%$). Ni la prueba DF ni RO se relacionaron con estos comportamientos.

También la ubicación de los animales fue influenciada por la clasificación por las pruebas de temperamento TP y DF. Vacas clasificadas como calmas para TP ($P=0,05$) pasaron menos tiempo en ubicación “otros lugares” que reactivas ($30,2 \pm 0,9\%$ vs. $32,4 \pm 0,9\%$). Por el contrario, cuando la clasificación del temperamento fue realizada con la prueba DF ($P=0,003$), vacas calmas estuvieron más tiempo en “otros lugares” que reactivas ($32,8 \pm 0,9\%$ vs. $29,2 \pm 0,9\%$). Esto provocó que las vacas reactivas para DF ($P=0,003$) estén más tiempo en las pasturas que las calmas ($69,2 \pm 0,9\%$ vs. $65,3 \pm 0,9\%$). Con respecto a la prueba RO, hubo una interacción entre la clasificación y la paridad para la ubicación de las vacas ($P<0,05$). Entre

vacas clasificadas como calmas, la diferencia del porcentaje del tiempo en “otros lugares” o pasturas fue observada entre primíparas y multíparas. Vacas calmas primíparas estuvieron más tiempo en “otros lugares” ($36,1 \pm 1,6\%$) y menos tiempo en pasturas ($62,5 \pm 1,6\%$) que vacas calmas multíparas (“otros lugares”: $27,9 \pm 1,0\%$; pasturas: $70,3 \pm 1,0\%$). Para las vacas reactivas no hubo esas diferencias entre paridad. Entre calmas y reactivas para RO no se encontraron diferencias en el porcentaje del tiempo en cada ubicación.

También, la paridad afectó los comportamientos parada sin actividad, pastoreando y parada rumiando, sin efecto en los comportamientos de echadas. Las vacas primíparas estuvieron menos tiempo paradas sin actividad ($2,35 \pm 0,18\%$ vs. $2,97 \pm 0,13\%$; $P=0,005$) y paradas rumiando ($3,26 \pm 0,22\%$ vs. $4,06 \pm 0,17\%$; $P=0,01$), invirtiendo mayor porcentaje del tiempo en pastorear que las vacas multíparas ($40,4 \pm 0,5\%$ vs. $38,5 \pm 0,3\%$; $P=0,002$). También la ubicación de las vacas durante las horas de observación fue diferente según la paridad de las vacas. Las vacas primíparas estuvieron en mayor frecuencia en “otros lugares” que las multíparas ($33,6 \pm 0,8\%$ vs. $29,8 \pm 0,6\%$; $P=0,0002$, respectivamente), estando las primeras menos tiempo en las pasturas que las multíparas ($64,8 \pm 0,9\%$ vs. $68,3 \pm 0,6\%$; $P=0,004$, respectivamente).

Discusión

Hasta la fecha este es el primer reporte sobre la variación de los comportamientos en pastoreo según temperamento de vacas Holando en un SOV. La principal prueba de temperamento que tuvo influencia sobre la mayoría de los comportamientos fue VF. Las diferencias entre animales calmos y reactivos se observaron en los comportamientos de posición corporal, ya que vacas clasificadas como calmas presentaron una mayor proporción del tiempo en la postura parada y menos en echada que las reactivas. Dado esto, las vacas calmas rumiaron más paradas, y las reactivas lo hicieron más en posición echadas. No hubo diferencias en el tiempo de alimentación (pastoreo), salvo para la prueba RO.

Trabajos previos con vacas lecheras en SOC, reportan que existe una amplia variación individual en los comportamientos de descanso, rumia y alimentación en pastoreo (Beauchemin, 2018; Beggs, Jongman, Hemsworth y Fisher, 2018; Hendriks y col., 2019; Neave y col., 2018; Thompson y col., 2019; Tucker, Jensen, de Passillé, Hänninen y Rushen, 2021). También en SOV se ha observado una amplia variación individual en el uso de los espacios (Hermans y col., 2003), lo cual puede estar influenciando por el temperamento de los animales. El único trabajo donde se estudió la relación entre diferentes pruebas de temperamento en el ordeño y los comportamientos en pastoreo de vacas lecheras adultas en un SOC fue el realizado por Neave y col. (2022). Estos autores observaron que las vacas más miedosas (evaluado por pruebas con humanos, por ejemplo, DF) presentaron menos tiempo de descanso, pero sin afectar el tiempo de pastoreo, rumia ni producción de leche. Los autores lo explican por la relación humano-animal, sugiriendo que cuando el

personal del tambo entra a los potreros o están cerca de los mismos generan disturbios y esas vacas más temerosas echadas se levantan, por lo tanto, la cantidad de veces que se echan en la pastura es menor. En nuestro trabajo la prueba DF no afectó el porcentaje del tiempo en los distintos comportamientos. Quizás, este resultado puede ser explicado por el hecho de que en SOV el humano esta menos presente que en un SOC, y por lo tanto este no sería un factor de disturbio. Además, en un SOV la DF se ha visto que disminuye en relación a los SOC (Wildridge y col., 2020). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que las vacas calmas para DF estuvieron más tiempo fuera de las pasturas que las reactivas, lo cual puede estar relacionado con las condiciones en que se realizó el trabajo. Las vacas estuvieron bajo un estrés calórico de moderado a severo, provocando que ellas estuvieran más tiempo fuera de las pasturas en nuestro tipo de SOV (Morales-Piñeyrúa y col., 2022). Se puede especular que las vacas calmas para la prueba DF enfrentan al estrés calórico de manera diferente a las reactivas, buscando permanecer más cerca de la sombra (la cual se encontraba solo en la infraestructura del tambo) y/o los callejones esperando para entrar al tambo; dado que en los SOV ellas tienen esa posibilidad de moverse libremente.

Al igual que en el presente trabajo, Neave y col. (2022) observaron que no todas las pruebas se asocian igual con los comportamientos en pastoreo, indicando algunas como mejores predictoras para el tiempo pastoreando (la prueba de reactividad en el cepo y al humano desconocido) y otras para el tiempo de descanso (prueba DF), sin encontrar prueba que prediga con precisión el tiempo de rumia. Estos autores no evaluaron la prueba VF. Los trabajos en ganadería, en sistemas confinados, que han evaluado la prueba VF, reportan resultados contradictorios en relación al temperamento y comportamientos de alimentación. Algunos autores han reportado que bovinos más reactivos cuando se encuentran en sistemas confinados presentan menor tiempo, pero mayor frecuencia de alimentación con menores consumo (Cafe y col., 2011; Llonch y col., 2018) que animales calmos. Sin embargo, otros estudios no han encontrado relación ente reactividad de los animales en feedlot y tiempo de alimentación (Nkrumah y col., 2007) o uso del espacio en pasturas (Wesley y col., 2012; Goodman y col., 2016). Aguilar (2016) en su tesis de doctorado estudió el temperamento de novillos Nelore y sus comportamientos en pastoreo, reportando que animales clasificados como “rápidos” en la prueba de VF (serían los reactivos en el presente trabajo) utilizaron mayor proporción del tiempo en realizar comportamientos distintos al pastorear (por ejemplo, posiciones de alerta) que animales clasificados como “lentos” (o calmos). Dado que el comportamiento de vigilancia puede ser definido cuando el animal está parado con la cabeza levantada, no acostado, ni alimentándose o moviéndose (Kluever y col., 2009), esperábamos que las vacas reactivas a VF presentaran mayor porcentaje del tiempo de observación en posición parada y menos pastoreando, sin embargo, encontramos lo contrario. Las diferencias de nuestros resultados con los trabajos reportados, puede deberse por un lado a que son vacas lecheras en un SOV, por lo tanto, los factores (principalmente humanos) que podrían influir en que las vacas estuvieran más alertas, en nuestro sistema no estarían. Por otro lado, el hecho de que las vacas

estuvieran bajo estrés calórico durante la evaluación podría ser un factor adicional a tener en cuenta en nuestros resultados. Es conocido que las vacas que se encuentran en condiciones de estrés calórico modifican su comportamiento en un SOV, por ejemplo, se mantienen más tiempo paradas que echadas en las pasturas (Bava y col., 2012; Morales-Piñeyrúa y col., 2022). Podemos especular que vacas de distinta reactividad a las pruebas de temperamento se enfrentan al estrés calórico cuando están en pastoreo de manera distinta, usando diferentes estrategias para disipar calor, por ejemplo, las vacas calmas podrían necesitar disipar más calor manteniéndose más tiempo paradas que las vacas reactivas. Por lo tanto, cuando se analizan los efectos del temperamento sobre los comportamientos en pastoreo, es importante considerar el ambiente climático, ya que puede alterar dichos resultados (Hendriks y col., 2020; Thompson y col., 2019). También, la paridad puede afectar cómo se comportan las vacas bajo estrés calórico. Se ha reportado que vacas más viejas son más sensibles al estrés calórico que vacas de primer parto (Benni, Pastell, Bonora, Tassinari y Torreggiani, 2019). En nuestro trabajo, las vacas primíparas destinaron más tiempo en estar afuera de las pasturas, pero cuando estaban en las parcelas de pastoreo estuvieron más tiempo pastoreando, teniendo un comportamiento diferente a las multíparas.

De forma adicional, se ha sugerido que las diferencias del pastoreo entre animales dóciles vs. más temperamentales o agresivos dependerá del espacio que tengan estos para pastorear y del manejo por parte de humanos (Goodman y col., 2016). Además, si la asignación de espacio por vaca no es limitante, y el contacto con humanos es poco frecuente, entonces sería más difícil de encontrar diferencias entre temperamento. Un buen manejo del rodeo causa tranquilidad y reduce las respuestas de estrés en las vacas, facilitando su manejo y normalizando su conducta (Moran y Doyle, 2015). Por lo tanto, en los SOV al tener las vacas mayor libertad de movimiento y menos contacto con humanos, tal vez las diferencias entre calmas y reactivas en el comportamiento pastorear no sean tan pronunciadas.

En el siguiente cuadro (Tabla XI) se presenta un resumen de los principales resultados del trabajo.

Tabla XI. Resumen de los efectos encontrados del temperamento [evaluado por las pruebas tiempo de pasaje por el tubo (TP), velocidad de fuga (VF), distancia de fuga (DF) y reactividad en el ordeño (RO)] de vacas Holando sobre el tiempo de cada comportamiento en pastoreo, así como el tiempo en cada ubicación, durante 10 días en un sistema de ordeño voluntario.

	TP	VF	DF	RO
Pastoreo	N/S	N/S	N/S	Calmas>reactivas
Parada sin actividad	Calmas>reactivas	Calmas>reactivas	N/S	N/S
Parada rumiando	N/S	Calmas>reactivas	N/S	Calmas<reactivas
Echada sin	Calmas<reactivas	Calmas<reactivas	N/S	N/S

actividad				
Echada rumiando	N/S	Calmas<reactivas	N/S	N/S
Ubicación fuera de parcelas	Calmas<reactivas	N/S	Calmas>reactivas	N/S
Ubicación en las parcelas	N/S	N/S	Calmas<reactivas	N/S

N/S: no significancia estadística (P>0,05).

Conclusiones: La reactividad de vacas Holando a la prueba de VF se asoció con los comportamientos de postura durante el pastoreo en un SOV, sin relación con el comportamiento de pastorear. La reactividad a esta prueba de temperamento afectó la estrategia de comportamiento de las vacas en condiciones de estrés calórico, lo cual se evidenció porque las vacas calmas destinaron mayor porcentaje del tiempo a estar paradas que las vacas reactivas, y estas últimas en mantenerse echadas. El tiempo pastoreando varió solo con la paridad, vacas primíparas pastorearon con mayor frecuencia que las multíparas. La ubicación donde permanecieron las vacas durante le día también varió según la reactividad a las pruebas de temperamento y la paridad, pero fue diferente según la prueba evaluada.

9. DISCUSIÓN GENERAL

La eficiencia de los SOV depende en gran medida del comportamiento de las vacas, y su motivación por moverse por el sistema, lo cual estaría relacionado con el temperamento animal (Broucek y Tongel, 2017; Jacobs y col., 2012). Las respuestas comportamentales, fisiológicas y productivas al cambio de un sistema de ordeño a otro (Weiss y col., 2005; Wenzel y col., 2003), a la adaptación a un nuevo ambiente (Jago y Kerrisk, 2011; Sutherland y Huddart, 2012; Van Reenen y col., 2002), y los comportamientos de los animales en un SOV y en pastoreo (Hermans y col., 2003; Jacobs y Siegford, 2012; Leiber y col., 2016; Lyons y col., 2014; Neave y col., 2018), presentan una alta variabilidad individual, por lo tanto el temperamento jugaría un rol importante en estas situaciones.

Este es el primer estudio que investiga la relación entre la reactividad de vacas Holando a distintas pruebas de temperamento y la producción, el metabolismo y los comportamientos en un SOV, durante y luego de la adaptación al sistema. A lo largo de los estudios realizados en la tesis hemos observado que existen diferencias individuales en cómo las vacas se enfrentaron a diferentes situaciones en un SOV, lo cual estuvo relacionado con sus respuestas a las distintas pruebas de temperamento (clasificación) y con su paridad. La influencia del temperamento en las distintas variables estudiadas dependió de la prueba utilizada, encontrando que VF estuvo mayormente relacionada con indicadores productivos y comportamentales evaluados en el momento de adaptación al nuevo sistema. Por otro lado, las pruebas TP y RO se relacionaron mayormente con las variables productivas y metabólicas durante el periodo de transición; siendo la prueba DF más asociada con indicadores comportamentales que productivos. En relación con la paridad, las diferencias entre primíparas y multíparas en la adaptación y uso del SOV ya ha sido sugerida en la revisión realizada por Jacobs y Siegford (2012), pero su interacción con el temperamento en las diferentes situaciones evaluadas no ha sido determinada anteriormente. En tal sentido, en la presente tesis se evidenció que durante la adaptación a un nuevo sistema de ordeño, en el transcurso del posparto temprano y durante el pastoreo bajo condiciones de estrés calórico, las vacas primíparas y multíparas presentaron diferentes respuestas comportamentales y productivas, existiendo interacciones entre la paridad y el temperamento.

9.1. Respuesta al ingreso a un sistema de ordeño voluntario (Estudios I y II)

El conocimiento sobre cómo las vacas responden al cambio de sistema de ordeño, desde un convencional a uno voluntario, ha aumentado en los últimos años, pero aún hay factores individuales de los animales que no se han estudiado en profundidad. De manera general, las vacas disminuyen su producción y flujo de leche, realizan comportamientos indeseables como demorar en ingresar al box de ordeño, y aumentan la frecuencia cardíaca (Brouček y Tonge, 2015; Meskens y col., 2001; Weiss y col., 2005), lo cual refleja el estrés al cambio de sistema. Sin embargo, algunas vacas podrían tener más dificultad que otras para adaptarse a un nuevo sistema de ordeño y esas diferencias individuales pueden estar relacionadas con el

temperamento animal (Deming y col., 2013; Jacobs y Siegford, 2012; Jago y Kerrisk, 2011; Weiss y col., 2004; Wenzel y col. 2003). En este trabajo, la clasificación por algunas pruebas de temperamento influyó en los comportamientos, producción y flujo de leche durante los primeros días en el nuevo sistema, pero de manera diferencial entre primíparas y multíparas.

Cuando las vacas multíparas fueron movidas de un SOC a un SOV, la principal prueba de temperamento que tuvo relación con los comportamientos y con la producción fue VF. Las vacas calmas tendieron a entrar más rápido al box de ordeño, pero realizaron más patadas durante la colocación de las pezoneras y el ordeño que las vacas reactivas, lo cual pudo haber provocado que las vacas calmas tuvieran menor flujo y producción de leche. También, las vacas calmas perdieron más leche luego del cambio de sistema que las reactivas. Estos resultados permiten especular que el temperamento influyó el grado de adaptación al cambio de sistema, siendo las vacas calmas (según la prueba usada en este trabajo) las más sensibles al cambio. Considerando el conjunto de variables, posiblemente las calmas se estresaron más frente al cambio de sistema, lo cual se vio reflejado además de las variables comportamentales, en una menor producción de leche. Diferencias individuales en la disminución de la producción de leche luego del cambio de sistema ya han sido reportadas (Weiss y col., 2005), la cual podría ser debido al temperamento de los animales. Nuestros resultados son contrarios a lo observado en otro estudio realizado en un SOC, donde las vacas reactivas se comportan productivamente peor que las calmas en un nuevo ambiente (Sutherland y col., 2012). Una posible explicación es que las pruebas de temperamento utilizadas en este trabajo reflejan aspectos más vinculados a la interacción humano-animal (pruebas en el manejo de los animales), lo cual se relaciona fuertemente con lo productivo en los SOC, donde el humano es un factor relevante en el comportamiento de las vacas. Eso significa que animales que son observados como calmos en algunas pruebas, por ejemplo, la VF, durante el ordeño en un SOC también se manifiestan como calmos frente al ordeñador. Sin embargo, animales calmos para VF en un SOV, podrían comportarse de manera miedosa o reactiva frente al brazo robótico o al encierro del box de ordeño. Es decir, en un SOV y en ausencia del factor humano, las vacas reactivas tal vez reflejen un comportamiento más osado o curioso frente al nuevo ambiente. Posiblemente pruebas de temperamento que evalúan miedo u osadía frente a nuevos objetos, más que al factor humano, puedan resultar mejores para determinar perfiles de temperamento acorde a la adaptación para un SOV. En tal sentido, este trabajo evidencia la importancia de validar los indicadores de temperamento acorde a cada sistema de producción lechero.

En el caso de las vacas primíparas que ingresaban por primera vez al sistema, las vacas calmas para VF solo demostraron más pasos que las reactivas, siendo la prueba TP la relacionada con la cantidad de patadas, las vacas calmas e intermedias tuvieron más patadas que las reactivas. Sin embargo, la producción de leche no varió entre calmas o reactivas para ninguna de las pruebas, sino que tendió a ser mayor en

las vacas intermedias para TP. Estos hallazgos concuerdan con Marçal-Pedroza, y col. (2020) quienes encontraron que el temperamento (evaluado con pruebas de corral) de las vacas primíparas no afecta la producción de leche. Sería interesante explorar en el futuro con mayor profundidad las respuestas del grupo de temperamento intermedias, dado que en muchas ocasiones se utilizan los extremos (calmos vs reactivos) considerando menos los intermedios.

Por lo tanto, por un lado, cuando clasificamos vacas multíparas en el SOC podemos predecir de algún modo qué comportamientos tendrán en el SOV, siendo las vacas clasificadas para VF como calmas, más reactivas al robot, y sufriendo más efecto del cambio en la producción de leche. Entonces ¿se debería seleccionar los animales más reactivos para este tipo de sistema? La respuesta podría ser sí, si pensamos en los efectos del cambio en los animales, los cuales fueron peores para los animales calmos. Pero si se tiene en cuenta que animales reactivos en las pruebas también podrían ser reactivos a otros tipos de manejos rutinarios en los tambos, como ejemplos las vacunaciones, los tratamientos, o manejos reproductivos, entonces quizás vacas reactivas pueden resultar en un problema. Son cuestiones para estudiar con mayor profundidad. Por otro lado, en el caso de las primíparas, la producción en los primeros ordeñes en un SOV no varió entre los temperamentos extremos. Esto podría deberse en parte al menor nivel de producción de las primíparas en comparación con las multíparas (Morales-Piñeyrúa y col., 2021) y/o porque ellas se adaptan más rápido al SOV que multíparas (Jago y Kerrisk, 2011; Kashiwamura y col., 2001). Los efectos en la producción de leche como respuesta a la novedad han sido basados en respuestas al SOC, relacionadas con la relación humano-animal. Las diferencias en esta relación entre sistemas discutido anteriormente, sumado a que vacas primíparas no han tenido experiencias previas de ordeñes (con el contacto con humanos que esto implica), podría causar que en esta paridad la producción de leche no refleje una respuesta al ambiente nuevo confiable. Por lo tanto, la selección por temperamento, evaluado en las condiciones de este trabajo, en esta categoría no permitió predecir mejores perfiles en función de la producción de leche. Sería interesante investigar con mayor profundidad otros indicadores de adaptación a los SOV de vacas primíparas y su relación con el temperamento de estas.

A pesar de no ser un objetivo de esta tesis, con nuestros resultados podemos especular que algunos comportamientos podrían ser más indicativos de adaptación al sistema que otros, e incluso estos ser más relevantes en una paridad que en otra. Por ejemplo, el comportamiento de patear tuvo una disminución con el tiempo a partir del primer día ordeño en vacas primíparas, pero no varió en el tiempo evaluado en multíparas. En el caso de las vacas multíparas, 5 ordeñes tal vez no alcanzaron para ver cambios en el tiempo en la reacción al robot. Por lo tanto, este comportamiento podría indicar el grado adaptación en vacas primíparas, pero no en multíparas. En el caso del tiempo de entrada al ordeño, no varió con el tiempo para ninguna de las dos categorías, no siendo quizás un buen indicador de adaptación.

9.2. Adaptación al período de transición y comportamiento en pastoreo (Estudios III y IV)

Las respuestas al periodo de transición (posparto temprano) también varió según el temperamento, pero de manera diferencial según la prueba utilizada y la paridad de los animales. La prueba de temperamento con mayor influencia en las variables productivas y metabólicas fueron TP y RO, siendo sus efectos observados sólo en las vacas multíparas. Esto último pudo deberse a los mayores niveles de producción en multíparas que en primíparas, y/o a que las vacas multíparas ya estaban adaptadas al sistema y al grupo de animales, pudiendo demostrar más fácilmente la influencia de su temperamento. Al ser la primera vez que las vacas primíparas se enfrentaban al sistema y al grupo de animales del rodeo, esto pudo provocar mayor estrés enmascarando posibles influencias del temperamento en las variables estudiadas. Por otro lado, como se comentó anteriormente, tal vez en vacas primíparas los aspectos productivos y/o metabólicos no sean buenos indicadores de adaptación (ya sea al sistema o en este caso al periodo de posparto temprano), como pueden serlo para vacas multíparas.

Nos centraremos entonces en las diferencias productivas entre temperamento en las vacas multíparas, donde al contrario a lo reportado en la literatura para animales en SOC (Breuer y col., 2000; Hedlund y Løvlie, 2015; Marçal-Pedroza y col., 2020), animales calmos (para pruebas RO y TP) produjeron menos que los reactivos. Sin embargo, nuestros resultados están en concordancia con lo reportado en la literatura donde se ha observado que las vacas reactivas en el ordeño producen más que las calmas (Gergovska y col, 2012; Sawa y col, 2017). Quizás en los SOV, donde la frecuencia de ordeño es determinante de la producción de leche, estas vacas calmas producen menos debido a su menor frecuencia de ordeño. La causa de que las vacas calmas visiten menos el box de ordeño que las reactivas es una cuestión en la que se debería profundizar. Otra posible razón de las menores producciones de las vacas calmas podría ser el consumo de alimentos. Las vacas reactivas tal vez sean más agresivas durante la alimentación, resultando en mayores consumos de materia seca y, por lo tanto, mayor producción de leche que las vacas calmas (Sullivan y Burnside, 1988). En este estudio posparto, no fue posible analizar si las vacas de diferente temperamento presentan diferentes patrones de alimentación. Sin embargo, con el Estudio IV evaluamos los patrones de comportamiento en pastoreo de vacas de diferentes temperamentos, alimentadas juntas pero que tenían la posibilidad de cambiar de ubicación (lo que permite el SOV).

Bajo una alimentación pastoril y con vacas de lactación media, el temperamento evaluado por las pruebas de corral no influyó en los comportamientos de alimentación (tiempo de pastoreo y rumia), pero si en las posturas, es decir el tiempo en que los animales están parados o echados. Las vacas clasificadas como calmas por VF invirtieron más tiempo paradas que echadas en comparación con las reactivas. Estas diferencias entre calmas y reactivas en el tiempo de descanso (echadas) podría afectar el bienestar y la producción de leche de los animales (Tucker y col., 2020). Para los SOC la única información que existe sugiere que

vacas más reactivas o miedosas pasan menos tiempo del día descansando, sin diferencias en el tiempo pastoreando o rumiando (Neave et al., 2022). Sin embargo, nosotros observamos lo contrario. Una posible explicación podría ser que en SOV los animales estarían más tranquilos, sin “necesidad” de estar en vigilancia (posición parada) ya que factores como el ser humano son escasos o incluso positivos y, por lo tanto, podrían realizar comportamientos de descanso. Debemos aclarar que los resultados son de observaciones realizadas solo en las pasturas, por lo tanto, las vacas calmas tal vez compensan los menores tiempo de descanso en pastura con mayores tiempos de descanso fuera de la pastura y/o en la noche; o los animales reactivos podrían haber pastoreado más durante los horarios donde no realizamos observaciones que las vacas calmas. Resultados contrarios obtuvimos cuando analizamos las vacas clasificadas por RO, donde las vacas calmas pastorearon más que las reactivas, y estuvieron menos porcentaje del tiempo paradas rumiando. Este resultado no concuerda con los trabajos de Neave et al., (2021) donde se observa que las vacas calmas para RO no se diferencian de las reactivas en tiempo pastoreando, rumiando o descansando. La ubicación de los animales dependió si las vacas eran primíparas o multíparas más que si eran calmas o reactivas. Nuevamente, las relaciones entre el temperamento y variables en este caso, comportamentales, dependen del tipo de prueba de temperamento utilizada, y de la paridad de los animales.

Una posible explicación para nuestros resultados es que las vacas de distinto temperamento (distinta reactividad para la prueba VF) utilizan diferentes estrategias para afrontar el estrés calórico. Hay que recordar que este estudio se realizó bajo un estrés calórico moderado a severo, y las vacas bajo este tipo de estrés en un SOV cambian su comportamiento en las pasturas, manteniéndose más tiempo paradas que echadas (Bava y col., 2012; Morales-Piñeyrúa y col., 2022). Sumando a esto, las vacas clasificadas como calmas para DF fueron observadas menos tiempo en pasturas que en “otros lugares” en comparación con vacas reactivas, lo que pudo significar que buscaron más la sombra de las instalaciones del SOV que las reactivas. Estos animales en condiciones de estrés calórico tuvieron que afrontar diferentes estrategias para poder sobrellevar la termorregulación y control de la energía, sumado al proceso de la lactación. Podríamos especular que las vacas calmas tal vez buscaron perder o no generar más calor que vacas reactivas, por eso se mantuvieron más tiempo en posición de pie mientras estaban en la pastura, y buscaron sitios con sombra afuera de las mismas (callejones, tambo). El ambiente meteorológico debe tenerse en cuenta cuando analizamos los efectos del temperamento sobre los comportamientos en pastoreo, ya que podría alterar los resultados.

Otro aspecto para considerar, y que necesita mayor investigación, es si existen diferencias en los mecanismos fisiológicos y metabólicos entre animales calmos y reactivos. Dado que los animales calmos fueron más sensibles al cambio de sistema que los reactivos, produjeron menos leche y se comportaron diferente en las pasturas (estando con mayor frecuencia paradas que echadas), entonces es posible que

cuenten con diferentes mecanismos metabólicos de adaptación. A su vez, el metabolismo puede verse influenciado diferencialmente por la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y el simpático-adreno-medular, con sus posibles diferentes respuestas hormonales, sean cortisol o catecolaminas, respectivamente (Sammad y col., 2020; Sapolsky, Romero y Munck, 2000). Esto se evidenció en los diferentes niveles de AGNE, BHB, colesterol, haptoglobina y proteínas totales en animales de diferentes temperamentos, los cuales variaron según las pruebas usadas para clasificar el temperamento. Por ejemplo, las vacas calmas tuvieron mayor concentración de AGNE, colesterol y haptoglobina que las reactivas, así como también menores concentraciones de proteínas totales. Es decir, que tanto el metabolismo lipídico como de proteínas fue influenciado por el temperamento de las vacas. En base al conjunto de variables y sus respuestas, es posible especular entonces que las vacas calmas hayan presentado una mayor respuesta de estrés al cambio de sistema, más dificultades en la adaptación al mismo, y por tanto más compromiso en su bienestar. Sin embargo, en nuestro estudio no evaluamos las hormonas del estrés, principalmente por la frecuencia de las tomas de sangre, y así evitar interferir con otras variables como fueron principalmente las de comportamiento.

Finalmente, con esta tesis también ampliamos la información con respecto a las pruebas de corral que evalúan temperamento para vacas lecheras, ya que han sido pruebas validadas principalmente para ganadería. No se tiene mucha información sobre los efectos de la prueba TP o VF en la producción de leche, metabolismo y comportamientos de alimentación y descanso, siendo estos resultados novedosos.

Toda la información parece indicar que vacas calmas sufrirían más el estrés del nuevo sistema de ordeño, metabólico y/o por calor, pero también podemos observar que las relaciones entre temperamento y estas variables son dependientes de la prueba utilizada y la categoría animal (primíparas o multíparas). Quizás las distintas pruebas evalúan diferentes aspectos o dimensiones del temperamento según si las vacas son primíparas o multíparas. También, dadas las diferencias con la literatura, podríamos especular que la interpretación de las pruebas de temperamento estaría condicionada por el sistema de ordeño y/o la paridad de los animales. Estas observaciones deberían ser estudiadas más en profundidad, dado que en este trabajo hubo varias limitaciones que no nos permiten concluir sobre todos estos aspectos. Por un lado, si la respuesta al estrés fue diferencial entre temperamentos podría haberse evaluado más precisamente exponiendo a las vacas a desafíos concretos y variados con un seguimiento en el tiempo de las variables fisiológicas y metabólicas relacionados al estrés (por ejemplo, concentraciones de cortisol sanguíneos frente al desafío de aislamiento social). Por otro lado, la evaluación de otras pruebas, más relacionadas con la reactividad a algo nuevo o extraño, por ejemplo, prueba del objeto extraño, podrían reflejar mejor como se comportarán los animales en un SOV. Tal vez, para cualquier paridad el temperamento evaluado con las pruebas de corral seleccionadas no es una herramienta útil para seleccionarlos. Sería necesario comprobar si el temperamento determinado por otros tipos de pruebas sería más

adecuado para utilizar como herramienta de selección para este tipo de sistema de ordeño.

Otra limitación de este trabajo fue el tiempo de evaluación, quizás 5 ordeños o 7 días de evaluación no es suficiente para ver diferencias o cambios en las variables estudiadas. Seguramente, los comportamientos en pastoreo tendrían otras dinámicas si el trabajo hubiese sido realizado en un momento del año donde las vacas no estuviesen bajo estrés calórico. También sumar la observación de comportamientos en otros lugares del sistema diferentes a las pasturas, podría ayudar a explicar las diferencias en los comportamientos encontradas. Las diferencias productivas, podría haberse dado por cuestiones de jerarquía que pueden afectar el consumo de concentrado y/o el tiempo de espera de los animales en los corrales pre-ordeño, estos comportamientos no fueron evaluados. Otro aspecto a tener en cuenta en relación al grupo es la facilitación social, no sería lo mismo que vacas primíparas se mantengan en un grupo social aparte de múltiparas, que mantener todas juntas, como hicimos. Este tipo de manejo diferencial no es común y no ha sido estudiado en SOV. Por último, sería interesante analizar la evolución de las pruebas en el tiempo y en los diferentes sistemas de ordeño; es posible que el cambio de sistemas haya afectado la reactividad a las pruebas disminuyendo o aumentando esta cuando los animales pasaron al SOV.

10. CONCLUSIONES GENERALES

En nuestras condiciones de estudio, y en términos generales el cambio desde un sistema convencional a un nuevo sistema voluntario no provocó una reacción prolongada a la nueva situación. A pesar de que la producción y flujo de leche fueron menores luego del cambio de sistema, sin volver a valores del SOC, las respuestas comportamentales al estrés o miedo (pasos, patadas, entrada al box de ordeño, tiempo en box de ordeño o manejo en el box de ordeño) disminuyeron o se mantuvieron en el tiempo.

La reactividad de las vacas a las pruebas de temperamento en corral fue relacionada con el comportamiento y los parámetros productivos durante el cambio de sistema, el periodo de transición y el pastoreo, pero esta relación dependió del tipo de prueba usada y la paridad de los animales. Vacas calmas para VF, primíparas y multíparas, en el nuevo sistema patearon más que las vacas reactivas, pero solo en las multíparas detectamos menores producciones de leche para las vacas calmas. También, vacas calmas para la misma prueba (VF) permanecen menos tiempo en posición de descanso que reactivas durante el pastoreo. Por lo tanto, este estudio sugiere que las vacas menos reactivas para VF tuvieron mayor dificultad para adaptarse al sistema, y sumado a las condiciones de estrés calórico, también presentaron mayor compromiso de su bienestar.

Solamente en las vacas multíparas, la producción de leche y la frecuencia de ordeño fueron influenciadas por la prueba de temperamento TP y RO, evidenciando mayor producción en vacas multíparas clasificadas como reactivas que en calmas. Sin importar la paridad, el temperamento se asoció con algunos perfiles metabólicos, en general, animales calmos tuvieron mayor concentración de AGNE, colesterol, haptoglobina y menores concentraciones de BHB y proteínas totales que los reactivos, lo que puede estar relacionado con su menor producción de leche.

Bajo estrés calórico, las vacas calmas para VF destinaron mayor porcentaje del tiempo al estar paradas que las vacas reactivas, y estas últimas en mantenerse echadas. El tiempo pastoreando varió entre calmas y reactivas cuando son clasificadas por RO, y por la paridad de los animales, las vacas calmas y primíparas pasan mayor proporción del tiempo pastoreando que las vacas reactivas y multíparas. La ubicación donde permanecieron las vacas durante el día también varió según el temperamento, ya que las vacas calmas gastaron más tiempo en lugares distintos a las parcelas de pasturas, los cuales podrían ser caminos o instalaciones del tambo (corrales pre o post ordeño, anillos de distribución, puertas).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abeni, F., Calamari, L., Calza, F., Speroni, M., Bertoni, G., y Pirlo, G. (2005). Welfare assessment based on metabolic and endocrine aspects in primiparous cows milked in a parlor or with an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 88:3542–3552. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73039-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73039-3).
2. Acharya, R.Y., Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., y Kinder, J.E. (2022) The animal-human interface in farm animal production: animal fear, stress, reproduction and welfare. *Animals*, 12, 487. <https://doi.org/10.3390/ani12040487>.
3. Adrien, M.L., Mattiauda, D.A., Artegoitia, V., Carriquiry, M., Motta, G., Bentancur, O., Meikle, A. (2012). Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: Milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*, 6, 292-299.
4. Aguilar, N. (2016). *Avaliação dos comportamentos de pastejo e suas relações com caracteres individuais dos bovinos de corte* (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, UNESP, San Pablo.
5. Aleri, J.W., Hine, B.C., Pyman, M.F., Mansell, P.D., Wales, W.J., Mallard, B., y Fisher, A.D. (2016). Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research in Veterinary Science*, 108, 8-17.
6. Arnold, N.A., Ng, K.T., Jongman, E.C., y Hemsworth, P.H., (2007). The behavioural and physiological responses of dairy heifers to tape-recorded milking facility noise with and without a pre-treatment adaptation phase. *Applied Animal Behaviour Science*, 106, 13-25.
7. Astessiano, A.L., Chilibroste, P., Fajardo, M., Laporta, J., Gil, J., Mattiauda, D., Meikle, A., y Carriquiry, M. (2012). Hepatic expression of GH-IGF axis genes in Holstein cows with different nutritional managements during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 95(E-Suppl 2), 348.
8. Bava, L., Tamburini, A., Penati, C., Riva, E., Mattachini, G., Provolo, G., y Sandrucci, A. (2012). Effects of feeding frequency and environmental conditions on dry matter intake, milk yield and behaviour of dairy cows milked in conventional or automatic milking systems. *Italian Journal of Animal Science*, 11(3), e42.
9. Beauchemin, K.A. (2018). Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 4762-4784. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>.
10. Beggs, D.S., Jongman, E.C., Hemsworth, P.E., y Fisher, A.D. (2018). Implications of prolonged milking time on time budgets and lying behavior of cows in large pasture-based dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 101, 10391-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15049>.

11. Benni, S., Pastell, M., Bonora, F., Tassinari, P., y Torreggiani, D. (2020). A generalised additive model to characterise dairy cows' responses to heat stress. *Animal*, 14(2), 418-424
12. Bertenshaw, C.E., Rowlinson, P.R., Edge, H. L., Douglas, S., y Shiel, R. (2008). The effect of different degrees of 'positive' human–animal interaction during rearing on welfare and subsequent production of commercial dairy heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, 114, 65-75.
13. Blowey, R.W. (2005). Factors associated with lameness in dairy cattle. *Farm Animal Practice*, 27, 159 -160.
14. Boissy, A. (1995). Fear and fearfulness in animals. *The Quarterly Review of Biology*, 70, 165-191.
15. Brandão, A.P., Cooke, R.F. (2021). Effects of temperament on the reproduction of beef cattle. *Animals*, 11, 3325. <https://doi.org/10.3390/ani11113325>.
16. Bremmer, K.J. (1997). Behaviour of dairy heifers during adaptation to milking. *New Zealand Journal of Animal Science and Production*, 57, 105.
17. Breuer, K., Hemsforth, P.H., Barnett, J.L., Matthews, L.R., y Coleman, G.J. (2000). Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 66, 273-288.
18. Broom, D.M. (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, 142, 524.
19. Broom, D.M. (2010). Cognitive ability and awareness in domestic animals and decisions about obligations to animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 126, 1-11.
20. Brouček, J., Tongel, P. (2015). Adaptability of dairy cows to robotic milking: A review Slovak. *Journal of Animal Science*, 48, 86-95.
21. Brouček, J., Uhrinčat', M., Šoch, M., y Kišac, P. (2008). Genetics of behaviour in cattle. *Slovak Journal of Animal Science*, 166-172.
22. Burdick Sanchez, N.C., Carroll, J.A., Broadway, P.R., Hughes, H.D., Roberts, S.L., Richeson, J.T., Schmidt, T.B., y Vann, R.C. (2016). Cattle temperament influences metabolism: metabolic response to glucose tolerance and insulin sensitivity tests in beef steers. *Domestic Animal Endocrinology*, 56, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.02.009>.
23. Burdick, N.C., Randel, R.D., Carroll, J.A., y Welsh Jr., TH. (2011). Interactions between temperament, stress, and immune function in cattle. *International Journal of Zoology*, 1- 9.
24. Burrow, H.M. (1997). Measurements of temperament and their relationships with performance traits of beef cattle. *Animal Breeding Abstracts*, 65, 477-495.
25. Burrow, H.M., y Dillon, R.D. (1997). Relationships between temperament and growth in a feedlot and commercial carcass traits of *Bos indicus* crossbreds. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37, 407-411.
26. Cafe, L.M., Robinson, D.L., Ferguson, D.M., McIntyre, B.L., Geesink, G.H., y Greenwood, P.L. (2011). Cattle temperament: Persistence of assessments

- and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 89, 1452-1465.
27. Cardoso, C.S., von Keyserlingk, M.A.G, y Hötzel, M.J. (2019). Views of dairy farmers agricultural advisors and lay citizens on the ideal dairy farm. *Journal of Dairy Science*, 102, 1811-1821.
 28. Carvalhal, M.V. de L., Sant'Anna, A.C., Páscoa, A.G., Jung, J., y Paranhos da Costa, M.J.R. (2017). The relationship between water buffalo cow temperament and milk yield and quality traits. *Livestock Science*, 198, 109-114.
 29. Castro, A., Pereira, J.M., Amiama, C., y Bueno, J. (2012). Estimating efficiency in automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, 95, 929-936. doi: 10.3168/jds.2010-3912.
 30. Cavestany, D., Kulcsár, M., Crespi, D., Chilliard, Y., Manna, A.L., Balogh, O., Keresztes, M., Delavaud, C., Huszenicza, G., y Meikle, A. (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. *Reproduction in Domestic Animal*, 44, 663-671.
 31. Chebel, R.C., Silva, P.R.B., Endres, M.I., Ballou, M.A., y Luchterhand, K.L. (2016). Social stressors and their effects on immunity and health of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99, 3217-3228.
 32. Cooke, R.F. (2014). Temperament and acclimation to human handling influence growth, health, and reproductive responses in *Bos taurus* and *B. indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 92, 5325-5333.
 33. Couperus, A.M., Schroeder, F., Hettegger, P., Huber, J., Wittek, T., y Peham, J.R. (2021). Longitudinal metabolic biomarker profile of hyperketonemic cows from dry-off to peak lactation and identification of prognostic classifiers. *Animals*, 11, 1353. <https://doi.org/10.3390/ani11051353>.
 34. Curley, K.O., Neuendorff, D.A., Lewis, A.W., Cleere, J.J., Welsh, T.H., y Randel, R.D., (2008). Functional characteristics of the bovine hypothalamic-pituitary-adrenal axis vary with temperament. *Hormones and Behavior*, 53, 20-27.
 35. Curley, K.O., Paschal, J.C., Welsh, T.H., y Randel, R.D. (2006). Technical note: Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bulls. *Journal of Animal Science*, 84, 3100–3103.
 36. Daigle, C.L., Hubbard, A.J., y Grandin, T. (2020). The use of traditional fear tests to evaluate different emotional circuits in cattle. *Journal of Visualized Experiments*, 158, e60641, doi:10.3791/60641.
 37. Damián, J.P., Terrazas, A., Cabrera, E., Simonetti, S., Aragunde, R., y Fila, D. (2020). Growth of foetal bones and metabolic profile during gestation in primiparous ewes and multiparous ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 55, 1180-1189. <https://doi.org/10.1111/rda.13760>.
 38. Damián, J.P., y Ungerfeld, R. (2013). Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 21, 103-113.

39. Daniels, K.J., Donkin, S.S., Eicher, S.D., Pajor, E.A., y Schutz, M.M. (2007). Parturition Milking of Heifers Influences Future Production and Health. *Journal of Dairy Science*, 90, 2293-2301.
40. de Koning, C.J.A.M. (2010). Automatic milking-Common practice on dairy farms. En Proceedings First North American Conference of Precision Dairy Management (pp. 52-67). Toronto: Wageningen Academic Publishers.
41. de Torres E. (2010). *Estudio de la evolución del recuento celular y el aislamiento bacteriano durante la lactancia en vacas lecheras* (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
42. Dechow, C.D., Sondericker, K.S., Enab, A.A., y Hardie, L.C. (2020). Genetic, farm, and lactation effects on behavior and performance of US Holsteins in automated milking systems. *Journal of Dairy Science*, 103, 11503-11514. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18786>.
43. DeVries, T.J., y von Keyserlingk, M.A.G. (2006). Feed stalls affect the social and feeding behavior of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89,3522-3531.
44. Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., y Spencer, R.L. (1996). Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *Journal of Immunology*, 157, 1638-44.
45. Dobson, H., y Smith, R.F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60-61, 743-752.
46. Donohue, R.H., Kerrisk, K.L., Garcia, S.C., Dickeson, D.A., y Thomson, P.C. (2010). Evaluation of two training programs aimed to improve early lactation performance of heifers in a pasture-based automated milking system. *Animal Production Science*, 50, 939-945. <https://doi.org/10.1071/AN10061>.
47. Duffield, T.F., Lissemore, K.D., McBride, B.W., y Leslie, K.E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92, 571-580. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>.
48. Eastwood, C.R., Renwick, A., 2020. Innovation uncertainty impacts the adoption of smarter farming approaches. *Frontiers in Sustainable Food System*, 4:24 <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00024>.
49. Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., y Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72, 68-78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0).
50. Eicher, S.D., Schutz, M., Kearney, F., Willard, S., Bowers, S., Gandy, S., y Graves, K. (2007). Parturition milking effects on parlour behaviour, endocrine and immune responses in Holstein heifers. *Journal of Dairy Research*, 74, 417-424.
51. Elischer, M.F., Sordillo, L.M., Siegford, J.M., y Karcher, E.L. (2015). Short communication: Characterizing metabolic and oxidant status of pastured dairy cows postpartum in an automatic milking system. *Journal of Dairy*

- Science*, 98,7083-7089.
52. Engel, P.D., y Hyde, J. (2003). A real options analysis of automatic milking systems. *Agricultural and Resource Economics Review*, 32(2), 282-294.
 53. Esposito, G., Irons, P.C., Webb, E.C., y Chapwanya, A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144, 60-97.
 54. Estévez-Moreno, L.X., Miranda-de la Lama, G C., Villarroel, M., García, L., Abecia, J.A., Santolaria, P., y María, G.A. (2021). Revisiting cattle temperament in beef cow-calf systems: Insights from farmers' perceptions about an autochthonous breed. *Animals*, 11(1), 82.
 55. Etim, N.N., Williams, M.E., Evans, E.I., y Offiong, E.E.A., (2013). Physiological and behavioural responses of farm animals to stress: implications to animal productivity. *International Journal of Advance Agricultural Research*,1, 53-61
 56. Fariña, S.R., y Chilibroste, P. (2019) Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176,102631. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.00>
 57. Fetter Bove, M., Filippini Irazun, D., Queirolo Derio, I., Secco Armas, J. y Vera Young, S. (2014). *Intensificación en la lechería uruguaya : análisis físico, económico y ambiental de diferentes sistemas productivos* (Tesis de grado). Facultad de Agronomía, UDELAR, Montevideo.
 58. Finkemeier, M.A., Langbein, J., y Puppe, B. (2018). Personality research in mammalian farm animals: concepts, measures, and relationship to welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 1-15. doi:10.3389/fvets.2018.00131.
 59. Francisco, C.L., Resende, F.D., Benatti, J.M.B., Castilhos, A.M., Cooke, R.F., y Jorge, A.M., (2015). Impacts of temperament on Nellore cattle: Physiological responses, feedlot performance, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, 93, 5419-5429.
 60. Freitas-de-Melo, A., Orihuela, A., Magri, G., Cruz, B.D., Rubio, I., Corro, M., Alonsod, M.A., Ungerfeld R. (2019). Physiological reproductive status and progesterone concentration affect the results of tests to measure temperament traits in female beef cattle. *Livestock Science*, 221,39-43.
 61. García, A.B., Angeli, N., Machado, L., de Cardoso, F.C., y Gonzalez, F. (2015). Relationships between heat stress and metabolic and milk parameters in dairy cows in southern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 47, 889-894. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250015-0804-9>
 62. Gergovska, Z., Miteva, T., Angelova, T., Yordanova, D., y Mitev, J. (2012). Relation of milking temperament and milk yield in Holstein and Brown Swiss cows. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18, 771-777.
 63. Gibbons, J., Lawrence, A., y Haskell, M. (2009a). Responsiveness of dairy cows to human approach and novel stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 163-173.
 64. Gibbons, J.M., Lawrence, A.B., y Haskell, M.J. (2011). Consistency of flight

- speed and response to restraint in a crush in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 131, 15-20.
65. Gibbons, J.M., Lawrence, A.B., y Haskell. M.J. (2009b). Consistency of aggressive feeding behaviour in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 121, 1-7.
 66. Goodman, L.E., Cibils, A.F, Wesley, R.L, Travis Mulliniks, J., Petersen, M.K., Scholljegerdes, E.J., y Cox S.H. (2016). Temperament affects rangeland use patterns and reproductive performance of beef cows. *Rangelands*, 38, 292-296.
 67. Greenall, R.K., Warren, E., y Warren, M. (2004). Integrating automatic milking installations (AMIs) into grazing systems-lessons from Australia. En: A. Meijering, H Hogeveen, y C.J.A.M. de Koning (Ed.). *Proceedings of automatic milking: a better understanding lelystad* (pp. 273-279). Wageningen: Wageningen academic publishers.
 68. Grummer, R.R., Mashek, D.G., y Hayirli, A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20, 447-470.
 69. Haile-Mariam, M., Bowman, P.J., y Goddard, M.E. (2004). Genetic parameters of fertility traits and their correlation with production, type, workability, liveweight, survival index, and cell count. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55, 77-87.
 70. Haskell, M.J., Simm, G., y Turner, S.P. (2014). Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Frontiers in Genetics*, 5, 1-18.
 71. Hayirli, A. (2006). The role of exogenous insulin in the complex of hepat-ic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenom-enon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research Communications*, 30, 749-774. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3320-6>.
 72. Hedlund, L., y Løvlie, H. (2015). Personality and production: Nervous cows produce less milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 5819-5828.
 73. Hemsworth, P., y Coleman, G. (2011). *Human-livestock interactions: the stockperson and the productivity of intensively farmed animals* (2° ed.). Wallingford: CABI.
 74. Hemsworth, P.H., y Barnett, J.L. (1989). Relationships between fear of humans, productivity and cage position of laying hens. *British Poultry Science*, 30, 505-518.
 75. Hendriks, S.J., Phyn, C.V.C., Turner, S.A., Mueller, K.M., Kuhn- Sherlock, B., Donaghy, D.J., Huzzey, J.M., y Roche, J.R. (2019). Lying behavior and activity during the transition period of clinically healthy grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 7371-7384. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16045>.
 76. Hermans, G.G.N., Ipema, A.H., Stefanowska, J., y Metz, J.H.M. (2003). The effect of two traffic situations on the behavior and performance of cows in an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 86,1997-2000.
 77. Hopster, H., Bruckmaier, R.M., Van der Werf, J.T.N., Korte, S.M., Macuhova, J., Korte-Bouws, G., y van Reenen, C.G. (2002). Stress

- responses during milking; comparing conventional and automatic milking in primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 3206-3216.
78. <http://cgil.uoguelph.ca/pub/articles/temp.html>.
 79. Hurnik, J.F. (1992). Ethology and technology: the role of ethology in automation of animal production processes. En: A.H. Ipema, A.C. Lippus, J.H.M. Metz y W. Rossing (Eds.), Chapter 1: Prospects for automatic milking, Proceedings of the International Symposium (pp. 401-408). Wageningen: Pudoc Scientific Publishers.
 80. Hydbring, E., Madej, A., MacDonald, E., Drugge-Boholm, G., Berglund, B., y Olsson, K., (1999). Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to the phases and severity of labour. *Journal of Endocrinology*, 160, 75-85.
 81. INALE, Instituto Nacional de la Leche (2019). *Encuesta lechera 2019 – Resultados preliminares. Información y Estudios Económicos*. Disponible en: <https://www.inale.org/estadisticas/encuesta-lechera-2019-resultados-preliminares/>
 82. INALE, Instituto Nacional de la Leche, consultado el 1 de julio de 2022. <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>
 83. Interbull, consultado el 1 de julio de 2022. www.interbull.org/ib/geforms
 84. Ivemeyer, S., Knierim, U., y Waiblinger, S. (2011). Effect of human-animal relationship and management on udder health in Swiss dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 94, 5890-5902.
 85. Ivemeyer, S., Pisani, M., y Knierim, U. (2015). Short-term ante-calving handling of dairy heifers in relation to heifers' behaviour and udder health after parturition. *Applied Animal Behaviour Science*, 171, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.022>.
 86. Jacobs, J.A. (2011). *Dairy cow adaption to and interaction with an automatic milking system*. (MS Thesis). Animal science, Michigan State University, East Lansing.
 87. Jacobs, J.A., Ananyeva, K., y Siegford, J.M. (2012). Dairy cow behavior affects the availability of an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 95, 2186-2194. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4749>.
 88. Jacobs, J.A., y Siegford, J.M. (2012). Lactating dairy cows adapt quickly to being milked by an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 95, 1575-1584.
 89. Jago, J., y Kerrisk, K. (2011). Training methods for introducing cows to a pasture-based automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science*, 131, 79-85. doi: 10.1016/j.applanim.2011.02.002.
 90. John, A.J., Clark, C.E.F., Freeman, M.J., Kerrisk, K.L., Garcia, S.C., y Halachmi, I. (2016). Review: Milking robot utilization, a successful precision livestock farming evolution. *Animal*, 10, 1484-1492. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000495>.
 91. John, A.J., Cullen, B.R., Oluboyede, K., Freeman, M.J., Kerrisk, K.L., García, S.C., y Clark, C.E.F. (2019). The effect of pasture quantity temporal variation on milking robot utilization. *Journal of Dairy Science*, 102, 2551-

- 2559.
92. John, A.J., Freeman, M.J., Kerrisk, K.F., Garcia, S.C., y Clark, C.E.F. (2019). Robot utilisation of pasture-based dairy cows with varying levels of milking frequency. *Animal*, 13, 1529-1535. doi:10.1017/S1751731118003117.
 93. Kashiwamura, F., Suda, J., Furumura, K., Hidaka, S., Seo, T., y Iketaki, T. (2001). Habituation training for dairy cattle to milking boxes of new installed automatic milking system. *Animal Science Journal*, 72 (8), J266-J273.
 94. Kasimanickam, V.R., Staker, C., Williams, H.M., Kastelic, J.P., y Kasimanickam, R.K. (2018). Aggressive attempted escape behavior during head-lock restraint reduced reproductive performances in Holstein heifers. *Theriogenology*, 121, 147-152.
 95. Ketelaar-de Lauwere, C.C., Devir, S., y Metz, J.H.M. (1996). The influence of social hierarchy on the time budget of cows and their visits to an automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science*, 49, 199-211.
 96. Kilgour, R.J., Melville, G.J., y Greenwood, P.L. (2006). Individual differences in the reaction of beef cattle to situations involving social isolation, close proximity of humans, restraint and novelty. *Applied Animal Behaviour Science*, 99, 21-40.
 97. Kluever, B.M., Howery, L.D., Breck, S.W., Bergman, D.L. (2009). Predator and heterospecific stimuli alter behaviour in cattle. *Behavioural Processes*, 81,85-91
 98. Knierim, U., y Waran, N.K. (1993). The influence of the human-animal interaction in the milking parlour on the behaviour, heartrate, and milk yield of dairy cows. En: Proc. 27th International Congress on Applied Ethology (pp.169-173). Berlin: ISAE.
 99. Knight, C.H., Beever, D.E., y Sorensen, A. (1999). Metabolic loads to be expected from different genotypes under different systems. En: J.D. Oldham, G. Simm, A.F. Groen, B.L. Nielsen, J.E. Pryce, T.L.J. Lawrence (Eds.). *Metabolic stress in dairy cows* (Vol. 24. pp. 27-36). Cambridge: Cambridge University Press.
 100. Koolhaas, J.M., de Boer, S.F., Coppens, C.M., y Buwalda, B.(2010). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*,1, 307-321.
 101. Koolhaas, J.M., y van Reenen, C.G. (2016). Animal Behavior and Well-Being Symposium: interaction between coping style/personality, stress, and welfare: relevance for domestic farm animals. *Journal of Anim Science*, 94, 2284-96. doi: 10.2527/jas.2015-0125.
 102. Kovács, L., Kézér, F.L., Kulcsár-Huszenicza, M., Ruff, F., Szenci, O., y Jurkovich, V. (2016). Hypothalamic-pituitary-adrenal and cardiac autonomic responses to transrectal examination differ with behavioral reactivity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7444-7457.
 103. Lagerkvist, C.J., y Hess, S. (2011). A meta-analysis of consumer willingness to pay for farm animal welfare. *European Agricultural and Applied*

- Economics*, 38, 55-78.
104. Launchbaugh, K.L., y Howery, L.D. (2005). Understanding landscape use patterns of livestock as a consequence of foraging behavior. *Rangeland Ecology & Management*, 58, 99-108.
 105. LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Duffield, T.F., y Leslie, K.E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, 1267-1279.
 106. Leiber, F., Holinger, M., Zehner, N., Dorn, K., Probst, J.K., Spengler Neff, A. (2016). Intake estimation in dairy cows fed roughage-based diets: An approach based on chewing behaviour measurements. *Applied Animal Behaviour Science*, 185, 9-14.
 107. Lessire, F., Scohier, C., y Dufrasne, I.(2017). Impact of grazing practices on farm self-sucieny, milk and economic performances of three automatized farms. En Proceedings of the grassland resources for extensive farming systems in marginal lands: major drivers and future scenarios (pp. 182-184). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
 108. Llonch, P., Somarriba, M., Duthie, C.A., Troy, S., Roehe, R., Rooke, J., Haskell, M.J., y Turner, S.P. (2018). Temperament and dominance relate to feeding behaviour and activity in beef cattle: implications for performance and methane emissions. *Animal*, 1-10.
 109. Loor, J.J., Bertoni, G., Hosseini, A., Roche, J.R., y Trevisi, E. (2013). Functional welfare—using biochemical and molecular technologies to understand better the welfare state of peripartur dairy cattle. *Animal Production Science*, 53, 931-953. <https://doi.org/10.1071/AN12344>.
 110. Lyons, N.A., Kerrisk, K.L., y Garcia, S.C. (2014). Milking frequency management in pasture-based automatic milking systems: A review. *Livestock Science*, 159,102-116.
 111. Marçal-Pedroza, M.G., Machado, F.S., Tomich, T.R., Campos, M.M., Pereira, L.G.R., Paranhos da Costa, M.J.R., y Sant'Anna, A.C. (2020). Consistency of temperament traits and their relationships with milk yield in lactating primiparous F1 Holstein - Gyr cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 222, 10488.
 112. McArt, J.A.A., Nydam, D. V., Oetzel, G.R., Overton, T.R., y Ospina, P.A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, 198, 560-570.
 113. McGrath, J., Duval, S.M., Tamassia, L.F.M., Kindermann, M., Stemmler, R.T., de Gouvea, V.N., Acedo, T.S., Immig, I., Williams, S.N., y Celi, P. (2018). Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Research in Veterinary Science*, 116, 28-39.
 114. Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M.L., Artegoitia, V., Pereira, I., Rupprechter, G., Pessina, P., Rama, G., Fernández, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, J.M., de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., Astessiano, A.L., Olazábal, L., Mattiauda, D., Chilibroste, P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera

- durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia*, 17, 141-152.
115. Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D., Chilibruste, P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction*, 127, 727-737.
 116. Melin, M., Wiktorsson, H., y Norell, L. (2005). Analysis of Feeding and Drinking Patterns of Dairy Cows in Two Cow Traffic Situations in Automatic Milking Systems. *Journal of Dairy Science*, 88, 71-85.
 117. Meskens, L., Vandermersch, M., y Mathijs, E. (2001). Implication of the introduction of automatic milking on dairy farms. En Deliverable D1 from EU project 'Implications of the introduction of automatic milking on dairy farms' (QLK5 2000–31006).
 118. Metz -Stefanowska, J., Huijsmans, P.J.M., Hogewerf, P.H., Ipema, A.H., y Keen, A. (1992). Behaviour of cows before, during and after milking with an automatic milking system. En: R.J. Esslemont (Ed.). Proceedings of the international symposium on prospects for automatic milking (65 p). Wageningen: EAAP Publication.
 119. Morales Piñeyrúa, J.T., Fariña, S.R., y Mendoza, A. (2018). Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 191, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.017>.
 120. Morales-Piñeyrúa, J.T., Damián, J.P., Banchero, G., y Sant`Anna, A.C. (2022). Short Communication: The effects of heat stress on milk production and the grazing behavior of dairy Holstein cows milked by an automatic milking system. *Journal of Animal Science*, skac225, <https://doi.org/10.1093/jas/skac225>.
 121. Müller, R., y von Keyserlingk, M.A.G. (2006). Consistency of flight speed and its correlation to productivity and to personality in *Bos taurus* beef cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 99, 193–204.
 122. Munksgaard, L., DePassillé, A.M., Rushen, J., Herskin, M.S., y Kristensen, A.M. (2001). Dairy cows' fear of people: Social learning, milk yield and behaviour at milking. *Applied Animal Behaviour Science*, 73, 15-26.
 123. Neave, H.W., Weary, D.M., y von Keyserlingk, M.A.G. (2018). Review: Individual variability in feeding behaviour of domesticated ruminants. *Animal*, 1-12.
 124. Neave, H.W., Zobel, G., Thoday, H., Saunders, K., Edwards, J.P., y Webster, J. (2022). Toward on-farm measurement of personality traits and their relationships to behavior and productivity of grazing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 105, 6055-6069.
 125. Neisen, G., Wechsler, B., y Gygax, L. (2009). Choice of scan-sampling intervals - An example with quantifying neighbours in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 134-140.
 126. Nkrumah, J.D., Crews, D.H., Basarab, J.A., Price, M.A., Okine, E.K., Wang, Z., Li, C., y Moore, S.S. (2007). Genetic and phenotypic relationships of

- feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 85, 2382-2390.
127. Norris, D., Ngambi, J.W., Mabelebele, M., Alabi, O.J., y Benyi, K. (2014). Genetic selection for docility: A review. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24 (1), 13-18.
 128. O'Brien, B. (2012). Innovative and sustainable systems combining automatic milking and precision grazing. En: *Proceedings of innovations in grazing report 644* (2nd meeting, 13 p.). Lublin: EGF Working Group Grazing.
 129. Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2016). *Anuario Estadístico Agropecuario*. Consultado el 19 de agosto 2022. [En línea]. Montevideo: MGAP. 22p. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-opypa/2016>.
 130. Pajor, E.A., Rushen, J., AM, y de Passilé, A.M.B. (2000). Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Applied Animal Behaviour Science*, 69, 89-102.
 131. Penry, J.F., Crump, P.M., Hernandez, L.L., y Reinemann D.J. (2018). Association of milking interval and milk production rate in an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 101, 1616-1625. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12196>.
 132. Poelarends, J.J., Sampimon, O.C., Neijenhuis, F., Miltenburg, J.D.H.M., Hillerton, J., Dearing, J., y Fossing C. (2004). Cow factors related to the increase of somatic cell count after introduction of automatic milking. En Meijering, A., Hogeveen, H., de Koning, C.J.A.M. (Eds.). *Automatic milking-a better understanding* (pp. 148-155). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
 133. Prescott, N.B., Mottram, T.T., y Webster, A.J.F. (1998). Relative motivations of dairy cows to be milked or fed in a Y-maze and an automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science*, 57,23-33.
 134. Prescott, N.B., Mottram, T.T.F., y Webster, A.J.F. (1997). Relative motivations by dairy cows to attend a voluntary automatic milking system. En: *Animal Choices Occas* (publicación n°20, pp. 80-83). Edinburgh: Brazilian Society of Animal Science.
 135. Proudfoot, K.L., Weary, D.M., LeBlanc, S.J., Mamedova, L.K., y von Keyserlingk, M.A.G. (2018). Exposure to an unpredictable and competitive social environment affects behavior and health of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1-12.
 136. Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., y Dingemanse, N.J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82, 291-318.
 137. Roche, J.R., Macdonald, K.A., Schütz, K.E., Matthews, L.R., Verkerk, G.A., Meier, S., Looor, J.J., Rogers, A.R., McGowan, J., Morgan, S.R., Taukiri, S., y Webster, J.R. (2013). Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 5811-5825.

138. Rousing, T., Badsberg, J.H., Klaas, I.C., Hindhede, J., y Sørensen, J.T. (2006). The association between fetching for milking and dairy cows' behavior at milking, and avoidance of human approach—An on-farm study in herds with automatic milking systems. *Livestock Science*, 101, 219-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.11.013>.
139. Rousing, T., Bonde, M., Badsberg, J.H., y Sørensen, J.T. (2004). Stepping and kicking behavior during milking in relation to response in human–animal interaction test and clinical health in loose housed dairy cows. *Livestock Science*, 88, 1-8.
140. Ruprechter, G., Adrien, M.L., Larriestra, A., Meotti, O., Batista, C., Meikle, A., y Noro M. (2018). Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 118, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.02.005>.
141. Ruprechter, G., Carriquiry, M., Ramos, J.M., Pereira, I., y Meikle A. (2011). Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 35.
142. Rushen, J., De Passillé, A.M., y Munksgaard, L. (1999). Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior and heart rate at milking. *Journal of Dairy Science*, 82, 720-727.
143. Rushen, J., Munksgaard, L., Marnet, P.G., y de Passille, A.M. (2001). Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Applied Animal Behaviour Science*, 73, 1–14.
144. Sammad, A., Wang, Y.J., Umer, S., Lirong, H., Khan, I., Khan A., Ahmad, B., y Wang, Y. (2020). Nutritional physiology and biochemistry of dairy cattle under the influence of heat stress: Consequences and opportunities. *Animals*, 10, 793.
145. Sant'Anna, A.C., Paranhos da Costa, M.J.R., Baldi, F., y Albuquerque, L.G. (2013). Genetic variability for temperament indicators of Nellore cattle. *Journal of Animal Science*, 91, 3532-3537.
146. Sapolsky, R.M., Romero, L.M., y Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, 21(1), 55-89.
147. Sawa, A., Bogucki, M., Neja, W., y Kręzel-Czopek, S. (2017). Effect of temperament on performance of primiparous dairy cows. *Annals of Animal Science*, 17, 863-872.
148. Schutz, M.M., y Pajor, E.A. (2001). Genetic control of dairy cattle behavior. *Journal of Dairy Science*, 84 (E. Suppl.), E31–E38.
149. Searle, K.R., Hunt, L.P., y Gordon, I.J. (2010). Individualistic herds: Individual variation in herbivore foraging behavior and application to rangeland management. *Applied Animal Behaviour Science*, 122, 1-12.
150. Sewalem, A., Miglior, F., y Kistemaker, G.J. (2010). Analysis of the relationship between workability traits and functional longevity in Canadian dairy breeds. *Journal of Dairy Science*, 93, 4359-4365. doi:

10.3168/jds.2009-2969.

151. Sewalem, A., Miglior, F., y Kistemaker, G.J. (2011). Short communication: Genetic parameters of milking temperament and milking speed in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 94, 512-516.
152. Shahin, M. (2018). The effects of positive human contact by tactile stimulation on dairy cows with different personalities. *Applied Animal Behaviour Science*, 204, 23-28.
153. Sih, A., Bell, A., y Johnson, J.C. (2004). Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 372-378.
154. Simões Filho, L.M., Lopes, M.A., Corrêa Brito, S., Rossi, G., Conti, L., y Barbari, M. (2021). Robotic milking of dairy cows: a review. *Zootecnia*, 41 (6), 2833-2850. DOI: 10.5433/1679-0359.2020v41n6p2833.
155. Spolders, M., Meyer, U., Flachowsky, G., y Coenen, M. (2004). Differences between primiparous and multiparous cows in voluntary milking frequency in an automatic milking system. *Italian Journal of Animal Science*, 3, 167-175.
156. Stephansen, R.S., Fogh, A., y Norberg, E. (2018). Genetic parameters for handling and milking temperament in Danish first-parity Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 101:11033-11039.
157. Sullivan, B.P., y Burnside, E.B. (1988). Can we Change the Temperament in the Dairy Cow?
158. Sutherland, M.A., Huddart, F.J. (2012). The effect of training first-lactation heifers to the milking parlor on the behavioral reactivity to humans and the physiological and behavioral responses to milking and productivity. *Journal of Dairy Science*, 95, 6983-6993.
159. Sutherland, M.A., Rogers, A.R., y Verkerk, G.A. (2012). The effect of temperament and responsiveness towards humans on the behavior, physiology and milk production of multi-parous dairy cows in a familiar and novel milking environment. *Physiology & Behavior*, 107, 329-337.
160. Sutherland, M.A., y Dowling, S.K. (2014). The relationship between responsiveness of first-lactation heifers to humans and the behavioral response to milking and milk production measures. *Journal of Veterinary Behavior Clinical Applications and Research*, 9, 30-33.
161. Szentléleki, A., Nagy, K., Széplaki, K., Kékesi, K., y Tozsér, J. (2015). Behavioural responses of primiparous and multiparous dairy cows to the milking process over an entire lactation. *Ann Animal Science*, 15, 185-195. DOI: 10.2478/aoas-2014-0064.
162. Tatone, E.H., Duffield, T.F., Leblanc, S.J., Devries, T.J., y Gordon, J.L. (2017). Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *Journal of Dairy Science*, 100, 1308-1318. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11453>.
163. Thompson, A.J., Weary, D.M., Bran, J.A., Daros, R.R., Hötzel, M.J., y von Keyserlingk, M.A.G. (2019). Lameness and lying behavior in grazing dairy

- cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 6373-6382. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15717>.
164. Trevisi E., y Bertoni G. (2009). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 8(1), 265-286. doi: 10.4081/ijas.2009.s1.265.
 165. Tse, C., Barkema, H.W., DeVries, T.J., Rushen, J., Vasseur, E., y Pajor, E.A. (2018b). Producer experience with transitioning to automatic milking: Cow training, challenges, and effect on quality of life. *Journal of Dairy Science*, 1-9.
 166. Tse, C., Barkema, H.W., DeVries, T.J., Rushen, J., y Pajor, E.A. (2017). Effect of transitioning to automatic milking systems on producers' perceptions of farm management and cow health in the Canadian dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2404-2414. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11521>.
 167. Tse, C., Barkema, H.W., DeVries, T.J., Rushen, J., y Pajor, E.A. (2018a). Impact of automatic milking systems on dairy cattle producers' reports of milking labour management milk production and milk quality. *Animal*, 1-8.
 168. Tucker, C.B., Jensen, M.B., de Passillé, A.M., Hänninen, L., y Rushen, J. (2021). Invited review: Lying time and the welfare of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 20-46. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18074>.
 169. Tyrrell, H.F., y Reid, J.T. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 48, 1215-1223.
 170. Uetake, K., Morita, S., Hoshiba, S., y Tanaka, T. (2002). Flight distance of dairy cows and its relationship to daily routine management procedures and productivity. *Animal Science Journal*, 73, 279-285.
 171. Utsumi, S. (2011). Strategies to increase the efficiency of automatic milking and milk production from high producing dairy cows. En: *Proceedings of dairy research foundation symposium* (pp. 32-43). Sydney: The University of Sydney Camden.
 172. Valente, T.S., Albito, O.D., Sant'Anna, A.C., Carvalheiro, R., Baldi, F., Albuquerque, L.G., y da Costa, M.J.R.P. (2017). Genetic parameter estimates for temperament, heifer rebreeding, and stayability in Nellore cattle. *Livestock Science*, 206, 45-50.
 173. Van Reenen, C.G., Van der Werf, J.T.N., Bruckmaier, R.M., Hopster, H., Engel, B., Noordhuizen, J.P.T.M., y Blokhuis, H.J. (2002). Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. *Journal of Dairy Science*, 85, 2551-2561.
 174. Verbeke, W. (2009). Stakeholder, citizen and consumer interests in farm animal welfare. *Animal Welfare*, 18, 325-333.
 175. Vosman, J.J., De Jong, G., y Eding, H. (2014). Breeding of Cows Suitable for an Automatic Milking System. *Interbull bulletin* 48, 32-36.
 176. Waiblinger, S., Boivin, X., Pedersen, V., Tosi, M.V., Janczak, A.M., Visser, E.K., y Jones, R.B. (2006). Assessing the human-animal relationship in farmed species: a critical review. *Applied Animal Behaviour Science*, 101, 185-242.

177. Waiblinger, S., Menke, C., y Fölsch, D.W. (2003). Influences on the avoidance and approach behaviour of dairy cows towards humans on 35 farms. *Applied Animal Behaviour Science*, 84, 23-39.
178. Wathes, D.C., Bourne, N., Cheng, Z., Taylor, V.J., Mann, G.E., y Coffey, M.P. (2007). Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 90,1310-25.
179. Weiss, D., Helmreich, S., Möestl, E., Dzidic, A., y Bruckmaier, R.M. (2004). Coping capacity of dairy cows during the change from conventional to automatic milking. *Journal of Animal Science*, 82, 563-570.
180. Weiss, D., Moestl, E., y Bruckmaier R.M. (2005). Physiological and behavioural effects of changeover from conventional to automatic milking in dairy cows with and without previous experience. *Veterinary Medicine Czech*, 50, 253-261.
181. Wenzel, C., Schönreiter-Fischer, S., Unshelm, J. (2003). Studies on step-kick behavior and stress of cows during milking in an automatic milking system. *Livestock Production Science*, 83, 237-246.
182. Wesley, R.L., Cibils, A.F., Travis Mulliniks; J., Pollak, E.R., Petersen, M.K., y Fredrickson, Ed.L. (2012). An assessment of behavioural syndromes in rangeland-raised beef cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 139, 183-194.
183. Westin, R., Vaughan, A., de Passillé, A.M., DeVries, T.J., Pajor, E.A., Pellerin, D., Siegford, J.M., Vasseur, E., y Rushen J. (2016). Lying times of lactating cows on dairy farms with automatic milking systems and the relation to lameness, leg lesions, and body condition score. *Journal of Dairy Science*, 99:551-56.
184. Wethal, K.B., y Heringstad, B. (2019). Genetic analyses of novel temperament and milkability traits in Norwegian Red cattle based on data from automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, 102, 8221-8233. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16625>.
185. Wicks, H., Carson, A., McCoy, M., y Mayne, C. (2004). Effects of habituation to the milking parlour on the milk production and reproductive performance of first calving Holstein-Friesian and Norwegian dairy herd replacements. *Animal Science*, 78(2), 345-354. doi:10.1017/S1357729800054126.
186. Wiktorsson, H., Sørensen, J.T. (2004). Implications of automatic milking on animal welfare. En: Meijering, A., Hogeveen, H., de Koning, C.J.A.M. (Eds.). *Automatic milking-a better understanding* (pp. 371-381). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
187. Wildridge, A.M., Thomson, P.C., Garcia, S.C., John, A.J., Jongman, E.C., Clark, C.E.F., y Kerrisk, K.L. (2018). Short communication: The effect of temperature-humidity index on milk yield and milking frequency of dairy cows in pasture-based automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, 101,4479-4482. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13867>.

188. Winter, A., y Hillerton, J.E. (1995). Behaviour associated with feeding and milking of early lactation cows housed in an experimental automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science*, 46,1-15.
189. Woolford, M.W., Claycomb, R.W., Jago, J., Davis, K., Ohnstad, I., Wieliczko, R., Copeman, P.J.A., y Bright, K. (2004). Automatic dairy farming in New Zealand using extensive grazing systems. En: A. Meijering, H Hogeveen, y C.J.A.M. de Koning (Ed.). *Proceedings of automatic milking: a better understanding lelystad* (pp. 280-285). Wageningen: Wageningen academic publishers.
190. Wredle, E., Munksgaard, L., y Spörndly, E. (2006). Training cows to approach the milking unit in response to acoustic signals in an automatic milking system during the grazing season. *Applied Animal Behaviour Science*, 101, 27-39.

ANEXOS

Anexo I: Publicación I

Article

Dairy Cows' Temperament and Milking Performance during the Adaptation to an Automatic Milking System

Jéssica Tatiana Morales-Piñeyrúa ^{1,*}, Aline Cristina Sant'Anna ², Georget Banchemo ³
and Juan Pablo Damián ⁴

- ¹ Programa Nacional de Producción de Leche, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia 70000, Uruguay
- ² Departamento de Zoología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil
- ³ Programa Nacional de Producción de Carne y Lana, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia 70000, Uruguay
- ⁴ Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8 km 18, Montevideo 13000, Uruguay
- * Correspondence: jmorales@inia.org.uy

Simple Summary: Dairy cows undergo an adaptative period during changes to a new milking system, such as automatic milking. During this period, cows could experience stress, affecting their health and productive performance. How cows cope with this period would depend on their individual characteristics, such as their temperament. In the present study, the relationships between temperament (measured by different handling yard tests), productive traits, and milking behaviours were evaluated. Cows classified as calm by the flight speed test exhibited more kicks and produced less milk during their first milkings with the automatic milking system than cows classified as reactive. Therefore, when the temperament was classified based on the flight speed test, calm animals presented greater difficulty in adapting to an automatic milking system than reactive ones. Understanding how cows adapt to new milking systems allows for the development of management strategies designed to improve animal welfare and the productive efficiency of the herds.



Citation: Morales-Piñeyrúa, J.T.; Sant'Anna, A.C.; Banchemo, G.; Damián, J.P. Dairy Cows' Temperament and Milking Performance during the Adaptation to an Automatic Milking System. *Animals* **2023**, *13*, 562. <https://doi.org/10.3390/ani13040562>

Academic Editor: Umberto Bernabucci

Received: 29 December 2022
Revised: 23 January 2023
Accepted: 28 January 2023
Published: 5 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Adaptative responses of cows to an automatic milking system (AMS) could depend on their temperament, i.e., cows with certain temperament profiles could be able to cope more successfully with the AMS. The relationships between dairy cows' temperament, behaviour, and productive parameters during the changeover from a conventional milking system (CMS) to an AMS were investigated. Thirty-three multiparous cows were classified as 'calm' or 'reactive' based on each of the temperament tests conducted: race time, flight speed (FS), and flight distance, at 5, 25, and 45 days in milk at CMS, then the cows were moved from the CMS to the AMS. During the first five milkings in AMS, the number of steps and kicks during each milking were recorded. The daily milk yield was automatically recorded. The number of steps did not vary by temperament classification, but the number of kicks per milking was greater for calm (0.45 ± 0.14) than for reactive cows (0.05 ± 0.03) when they were classified by FS ($p < 0.01$). During the first seven days in the AMS, reactive cows for the FS test produced more milk than calm cows (36.5 ± 1.8 vs. 33.2 ± 1.6 L/day; $p = 0.05$). In conclusion, behavioural and productive parameters were influenced by cows' temperament during the milking system changeover since the calm cows kicked more and produced less than the reactive ones.

Keywords: animal welfare; parlour; personality; robot; stress

1. Introduction

Depending on how animals adapt to new environments, they may experience physiological, biochemical, and behavioural changes [1,2]. The milking system changeover

implies a new situation, where cows should learn and adapt to new handling. The behavioural responses to an unknown environment or situation (e.g., a new milking system) depend on how positively or negatively the animals perceive the novelty. To our knowledge, behavioural responses of cows during the changeover from conventional (CMS) to automatic milking systems (AMS) have been insufficiently investigated. This situation of a change of milking systems was previously associated with a stressful experience for dairy cows, which negatively affected the milk yield and quality [3], milking behaviours, heart rate [3], and udder health [4]. Furthermore, Weiss et al. [3] demonstrated that inexperienced cows need careful adaptation to the AMS to minimise production losses.

Cows' ability to adapt to novel milking conditions could be dependent on individual behavioural differences [5,6], which could be related to cows' temperament. Sutherland and Huddart [7] reported that the response of heifers to the first week of lactation depends on their temperament and training to milking, i.e., trained heifers had higher reactivity to milking compared to untrained ones, but only when they were calm animals based on the flight speed test (FS). Specifically, in AMS, interindividual differences in cows' adaptation have been reported [8,9] since cows' reactions and speed of learning in the AMS are widely variable. Nervous cows that frequently display undesirable behaviours (e.g., stopping in front of the gate box) might have to be culled in this system [10,11]. Despite that temperament has been previously related to cows' productivity and behaviours during the early postpartum period of cows experienced with an AMS [12], the adaptation responses of cows that entered into an AMS for the first time after being milked in a conventional system remain unknown. In addition, how temperament affects this adaptation process and the most desirable temperament traits for cows using an AMS have not yet been investigated.

In Uruguay, installation of the AMS has been increasing in recent years. The first AMS in Uruguay was installed in the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Colonia, based mainly on a mixed-feeding system (pasture and supplementation). The challenges arising from a transition from CMS to an AMS in mixed-feeding systems has been poorly studied, despite the AMS gaining more attention from producers. Investigating the factors related to the productive losses and stress responses due to the change of system is critical to the development of handling strategies to reduce these losses and improve animal welfare. Thus, we hypothesise that the temperament tests in the yard would predict the difficulties of cows to adapt to the AMS, related to behavioural responses and milking performance. Therefore, the objective of the present study was to assess the relationship between the reactivity to different tests of temperament of dairy cows and their behaviour and productivity during the changeover from a CMS to an AMS.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Husbandry Conditions

The study was conducted using thirty-three multiparous Holstein cows (3.0 ± 1.2 lactations) at the dairy research station of INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay, $34^{\circ}35' S$, $57^{\circ}70' W$), which comprises two milking systems, CMS and AMS, 300 m apart. The CMS is an 11-aside herringbone parlour where cows were milked twice a day (04:00 and 15:00) simultaneously by two stockpersons. The AMS has two monoboxes and two feed supply boxes from GEA (GEA Farm Technologies, Bönen, Germany). In both systems, cows wore a collar with a transponder for individual identification. During the prepartum period, all sampled cows were housed in a single group, being fed a total mixed ration (TMR) (Table 1) and provided with water ad libitum. The cows had access to a concrete feed pad (1 m in front/cow), a resting area, and shade ($4.5 \text{ m}^2/\text{cow}$ in each area) in a compacted earthen surface area. In both systems, all cows had the same feeding regimen in the postpartum period (Table 1). The diet consisted of concentrate (around 7.6 kg of DM/cows/d) offered at the milking box (in CMS and AMS) and at the feed supply boxes (only in AMS), access to pasture after afternoon milking (around 12.0 kg of DM/cows/d), and TMR (around 3.0 kg of DM/cow/d) after morning milking. The feed boxes were always accessible during the

trial and all animals could access them equally. The pasture was a mix of *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, and *Bromus catharticus*. In the CMS, the TMR was delivered on wooden mobile feed pads (1 m in front/cow) in a feeding paddock of compacted earthen surface with a total area (feeding and rest area) of 5 ha, with a shade area of 4.5 m²/cow. In the AMS, the same TMR was offered in a feeding paddock of 1.2 ha of compacted earthen floor, with a concrete feed pad (1 m in front/cow), and the cows could voluntarily leave at any time. In both systems, water was available ad libitum, from automatic water troughs.

Table 1. Ingredients (mean of kg DM/cow/d), chemical composition (% of total kg DM), and metabolizable energy (ME) of the total mixed ration (TMR), pasture, and concentrate offered during prepartum and postpartum periods to Holstein cows in an automatic milking system.

Ingredients	Prepartum	Postpartum
TMR		
Corn silage	6.20	0.98
Barley straw	2.20	-
Pasture haylage	-	1.08
Corn grain	-	0.64
High-moisture corn grain	0.88	-
Soybean meal	1.40	0.58
Soybean hulls	0.60	0.41
Urea	0.08	0.02
Calcium carbonate	0.04	-
Sodium bicarbonate	-	0.02
Dicalcium phosphate	-	-
Magnesium oxide	-	0.005
Prepartum vitamin–mineral mix ¹	0.30	-
Postpartum vitamin–mineral mix ²	-	0.01
Pasture	-	12.0
Commercial concentrate	-	7.6
Total DM	11.7	23.3
Chemical composition		
Crude protein, %	14.6	20.2
NDF, %	37.4	36.9
ADF, %	23.6	21.1
ME ³ provided from TMR (MJ/kg DM)	29.3	10.9
ME provided from pasture (MJ/kg DM)	-	9.9
ME provided from commercial concentrate (MJ/kg DM)	-	11.9

¹ Provided (per kg of DM of mix): 230 g of Ca, 20 g of P, 100 g of Mg, 130 g of Cl, 30 g of S, 0.8 g of Cu, 2.4 g of Zn, 12 mg of Se, 1.4 g of Mn, 5 mg of Co, 89,000 IU of vitamin A, 17,000 IU of vitamin D, and 3500 IU of vitamin E. ² Provided (per kg of DM of mix): 140 g of Ca, 14 g of P, 30 g of Mg, 150 g of Na, 110 g of Cl, 597 ppm of inorganic Cu, 277 ppm of organic Cu, 1815 ppm of inorganic Zn, 853 ppm of organic Zn, 6 ppm of inorganic Se, 3 ppm of organic Se, 1090 ppm of Mn, 65,707 IU of vitamin A, 13,141 IU of vitamin D, and 298 IU of vitamin E. ³ Metabolizable energy was calculated by chemical composition of foods [13].

Cows were moved from the CMS to the AMS at 52.2 ± 3.9 days in milk (DIM) and trained on their first day in the AMS. Briefly, on the day of changeover, cows were milked at 06:00 at the CMS and then moved to the AMS and fed silage on a feed pad, while cows that were already being milked in the AMS herd had been milked nearby. Before noon, all untrained cows were induced to walk at their own pace through the smart gates and the milking robot three times. This procedure was repeated in the afternoon by the same handlers (who have been previously trained in good livestock management practices), but in the third passage across the robot, the gate of the milking station was closed, and the cows were milked.

2.2. Temperament Assessment

Cows' temperament (evaluated while cows were at the CMS) was assessed in the handling yard using race time (RT), FS, and flight distance (FD) tests (details are provided below). The tests were performed on the same day between 15:00 and 17:00, in the order described above. All tests were conducted three times (mean \pm SD) at the 7.3 ± 3.2 , 25.4 ± 3.4 , and 44.9 ± 11.0 DIM at the CMS. All behavioural tests were conducted by the same trained observer.

Race time was measured using a method modified from Pajor et al. [14]. One observer registered the time (in seconds) required to move each cow through the single-file race and enter the squeeze chute and the stimulus required to move the cow. Briefly, one cow at a time was moved from the holding pen to the entrance of the single-file race, which measured 5.95 m long, 0.80 m wide, and 1.26 m high, with walls made from solid wood. Cows were allowed 30 s to move through the race without any stimulus. If the cow did not move through the race, one handler applied increasing levels of stimulus until it entered the squeeze chute. The scale resulted in: (0) no need of stimulus application, animal moves through the race within 30 s on its own, (1) operator approach and speaks in a gentle voice, (2) hit rump with the open hand, and (3) push and force the animal to advance.

Flight speed was measured using a method modified from Gibbons et al. [15]. The time taken for each cow to exit the squeeze chute and cover a distance of 2.7 m was recorded using a purpose-built device that measured the exit speed. The unit comprised two light beams and reflectors and one readout unit. Once the cow passed through both light beams, the exit time was recorded in seconds and converted into speed (m/s). The handler stood approximately 1 m away from the side of the crush and behind the shoulder of the animal during the test.

Flight distance was measured using a method modified from Waiblinger et al. [16]. The distance (in m) that cows allowed a nonfamiliar person to approach before expressing the first withdrawal response was recorded. The test was performed with each cow individually kept in a corral pen of 131 m². After the cow exited the squeeze chute, the observer remained stationary on the opposite side of the pen entrance 8 m away from the cow, waiting for the cow to stand still before starting the test. Then, the person approached the animal slowly (one step per s), with their hands down and arms held close to the body. When the cow expressed any withdrawal reaction (i.e., the animal moved both forelimbs), the observer stopped and measured the distance to the cow's nearest front hoof using an odometer (MW40M, Stanley, Stanley Black & Decker, Inc., New Britain, Ct, EE.UU.).

2.3. Behavioural and Productive Responses

After changeover from CMS to AMS, during the first five milkings in AMS, the time each cow took to enter the milking box (in seconds, s) was registered. One handler applied increasing levels of stimulus until the cow entered the box, defining a score of willingness: (0) nothing, animal moves into milking box within 30 s on its own, (1) approach and speak in a gentle voice, (2) hit rump with open hand, and (3) push and force animal to advance.

Additionally, the following milking behaviours were registered during milking cluster attachment and the milking procedure: number of steps (counting the hind leg elevations lower than 15 cm off the ground) and number of kicks (counting the hind leg elevations higher than 15 cm off the ground with fast movements towards the milker). Cows' behaviours were recorded by a single trained observer who remained still at a 3 to 5 m distance from the milking machine in a place that was not visible to the cows.

The occupation time per cow in the milking unit (box time, in seconds) was defined as the time from when the cow entered the milking box until she left the box, which was obtained by the automatic system of the milking machine of the AMS. Handling time (in seconds) was calculated as the difference between box time and milking time (duration of the milking), so it included the time from the cow entering the milking box until the milking starts, including the time for teat detection, washing, stimulation, and pre-milking, and the time after the milking stops until the entrance gate is open to allow the next cow

to enter (same definition as in [17,18]). Additionally, the daily milk yield (L/day) and milk flow (L/min) were automatically registered by sensors of the milking machine (CMS and AMS), during seven days before the changeover and during the first seven days in the AMS.

2.4. Statistical Analyses

All statistical analyses were carried out with SAS Systems programs (SAS version 9.4, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Univariate analyses were performed to identify outliers and verify the normality of residuals.

Cows were categorised using the terciles of distribution for each temperament test within days in the CMS (7.3 ± 3.2 , 25.4 ± 3.4 , and 44.9 ± 11.0 DIM). The consistency of the categories of each test was analysed by chi-square tests in contingency tables (temperament classes vs. days), and we did not obtain differences in the temperament categories across the days of assessment ($p > 0.90$). Therefore, the means of temperament traits of three days of assessment were obtained, and then cows were classified using the first and thirds terciles of distribution, where the extreme classes represented the least and most reactive animals as follows: for RT: calm (mean time ≥ 30.1 s; $n = 11$) or reactive (mean time ≤ 14.6 s; $n = 11$), for FS: calm (mean velocity ≤ 0.9 m/s; $n = 12$) or reactive (mean velocity ≥ 1.2 m/s; $n = 8$), and for FD: calm (mean distance ≤ 2.7 m; $n = 12$) or reactive (mean distance ≥ 3.5 m; $n = 11$). The classes were included as fixed effects in the models described below.

The relationships between temperament with behavioural responses and milking performances of cows during their adaptation to the AMS were assessed. To evaluate the effects of the temperament classes on time to enter the milking box, milking time, handling time, box time, and the numbers of steps and kicks, generalised linear mixed models for longitudinal data were fitted, via PROC GLIMMIX. The number of kicks was transformed to log-scale ($\log x + 2$). Fixed effects of temperament traits in classes (one trait per model), time of assessment (milking in AMS, from the first to the fifth milking), and their interactions were included. The random effect of animal was considered as a repeated measure within the time of assessment.

To investigate the possible effects of the system changeover and the temperament classes on milk yield and milk flow, the daily milk yields and flows of the first seven days in the AMS were expressed as relative values (%) of the mean CMS yields and flows of the seven days before the changeover. Linear mixed models for longitudinal data were fitted using PROC MIXED of SAS. Temperament classes, time of assessment (days in AMS, from the first to the seventh day), and their interaction were included as fixed effects. The animal was considered as a repeated measure within the time of assessment, and in addition the sire and DIM were considered as random effects. Previous milk yield and flow (seven days before system change) were included as covariates with a linear effect.

Additionally, partial correlations between milking behaviours (steps, kicks, time to enter the milking box, handling time, milking time, and box time) and milking performance (milk yield and milk flow) were analysed by a multivariate ANOVA (MANOVA) procedure. These correlations were calculated using all observations, and the partial correlations were adjusted for DIM and MY. Post hoc analysis was performed using Tukey's test. The α values were considered significant when ≤ 0.05 , and as a trend when ≤ 0.10 .

3. Results

3.1. Temperament and Behavioural Responses to AMS

Regarding the reactivity to temperament test, only the number of kicks was influenced by reactivity classes. There was a significant interaction between FD and time of assessment (from the first to the fifth milking in the AMS) ($p = 0.001$). For calm cows, the number of kicks did not differ over time, while for reactive cows the number of kicks was greater at the first milking, then decreased from the second milking onwards (Figure 1). The difference between calm and reactive cows was observed at the first milking (Figure 1). Additionally, FS classes influenced the number of kicks ($p < 0.01$), and cows classified as calm had a

greater number of kicks than reactive ones (Table 2). The RT was not related to the number of kicks ($p > 0.10$).

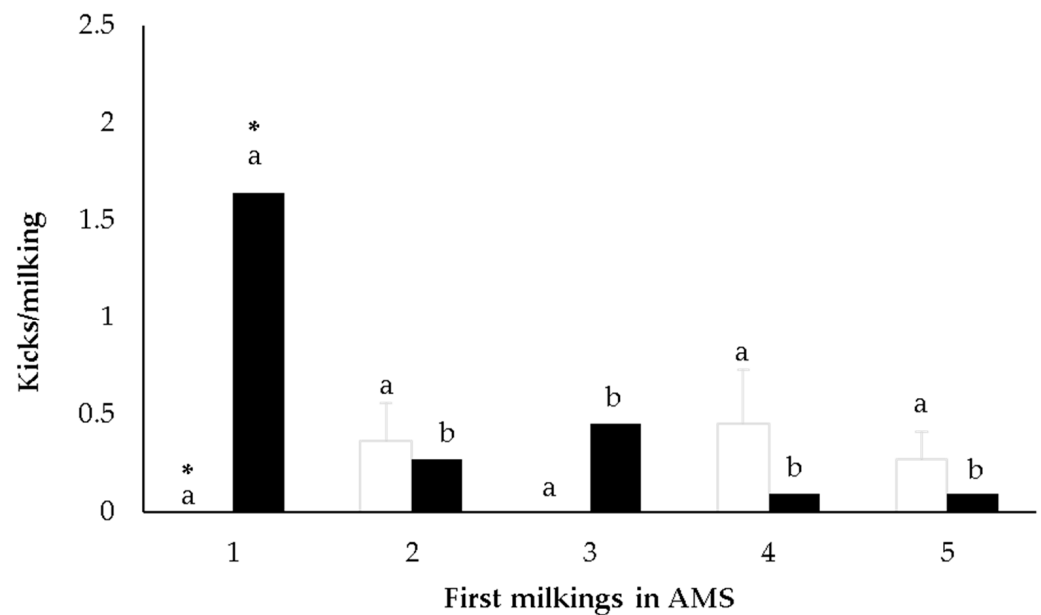


Figure 1. Number of kicks of multiparous Holstein cows during the first five milkings in the automatic milking system (AMS) according to flight distance test classes: calm cows (white) or reactive cows (black). Differences between milkings within each temperament class are indicated with different letters, and differences between temperament classes within the same milkings are indicated with * ($p \leq 0.05$).

Table 2. Mean \pm SEM for different milking behaviours by temperament (classified by race time (RT), flight speed (FS), and flight distance (FD)) of multiparous Holstein cows during the first five milkings in an automatic milking system, after changeover from a conventional milking system.

Temperament Traits		Time to Enter Milking Box (s)	Steps (Number)	Kicks (Number)
RT	Calm	49.3 \pm 4.9	3.9 \pm 0.9	0.42 \pm 0.16
	Reactive	42.2 \pm 4.3	4.6 \pm 0.9	0.18 \pm 0.07
FS	Calm	52.9 \pm 4.5 b	3.3 \pm 0.6	0.45 \pm 0.14 A
	Reactive	68.1 \pm 7.2 a	2.9 \pm 0.8	0.05 \pm 0.03 B
FD	Calm	53.8 \pm 5.5	2.3 \pm 0.7	0.22 \pm 0.08
	Reactive	55.3 \pm 5.6	4.3 \pm 0.6	0.51 \pm 0.17

Difference between temperament classes within each temperament trait is indicated with different capital letters ($p \leq 0.05$), and the tendency is indicated with lowercase letters ($p \leq 0.10$).

The time of assessment (from the first to the fifth milking in the AMS) only affected the number of steps ($p < 0.05$). The steps decreased from the first to the third milking, then increased until reaching the initial values at the fifth milking (Figure 2). Kicks and the time to enter the milking box were not different over time. None of the temperament tests were significantly related to the number of steps (Table 2). There was only a tendency for FS on the time to enter the milking box ($p = 0.08$), with calm cows displaying lower values than the reactive ones (Table 2).

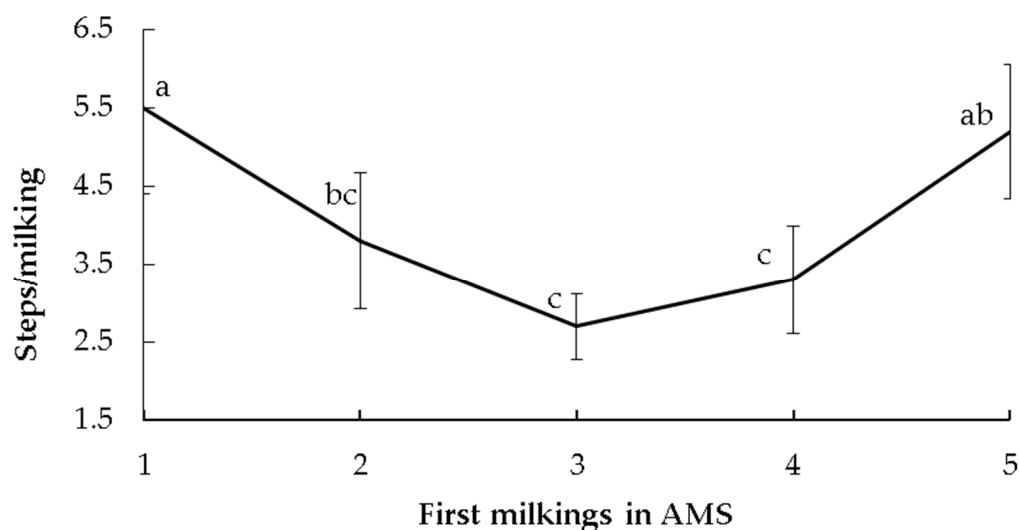


Figure 2. Number of steps of multiparous Holstein cows during the first five milkings after changeover from a conventional milking system to an automatic milking system (AMS). Differences between milkings are indicated with different letters ($p \leq 0.05$).

Handling time was not different between temperament classes, time of assessment (from the first to the seventh day in AMS), or their interaction. The interaction between FS classes and time of assessment tended to affect the milking time ($p = 0.09$). The differences between calm and reactive cows were observed on day 5, when calm cows had a greater milking time than reactive cows. Additionally, FD classes tended to influence the milking time, with calm cows spending more time in milking (563.3 ± 75.2 s) than the reactive ones (400.2 ± 46.3 s) ($p = 0.07$). Box time was different according to FD classes, where calm cows had a greater time in the milking box (703.2 ± 74.7 s) than the reactive ones (516.6 ± 47.5 s) ($p = 0.05$).

3.2. Temperament Traits and Productive Responses

During the first seven days in the AMS, daily milk yield varied over time ($p = 0.04$) (Figure 3a). For FS, reactive cows produced more milk than calm cows (36.5 ± 1.8 L vs. 33.2 ± 1.6 L, $p = 0.05$). The RT and FD were not related to daily milk yield. When the relative milk yield in the AMS was analysed, cows produced less milk after the system changeover. The average milk yield during the first seven days in the AMS was $93.0\% \pm 3.7\%$ of the CMS milk yield. The magnitude of the loss differed across the seven days in the AMS ($p = 0.02$), but the cows never reached the productivity they had in the CMS (Figure 3b). Relative individual yield ranged from 72.0% to 112.3% of the CMS yield. For FS, reactive cows had more relative milk yield than calm cows ($99.6\% \pm 3.4\%$ vs. $91.4\% \pm 3.0\%$, respectively, $p = 0.05$). The RT, FD, and the interaction between temperament and the time of assessment (days in the AMS) did not affect the relative milk yield.

There was a significant interaction between RT and the time of assessment ($p = 0.03$) and an interaction between FS and the time of assessment ($p = 0.03$) on milk flow during the first seven days in AMS. During the first days in AMS, reactive cows (by RT and FS tests) had different flow evolution over time than calm cows, indicating more variation over time for reactive cows (Figure 4a,b). Differences between calm and reactive cows were observed for the RT test (Figure 4a) only on day 7 in the AMS. For the FS test, calm and reactive cows had different milk flows only on day 5 in the AMS (Figure 4b). The FD did not affect milk flow ($p > 0.10$).

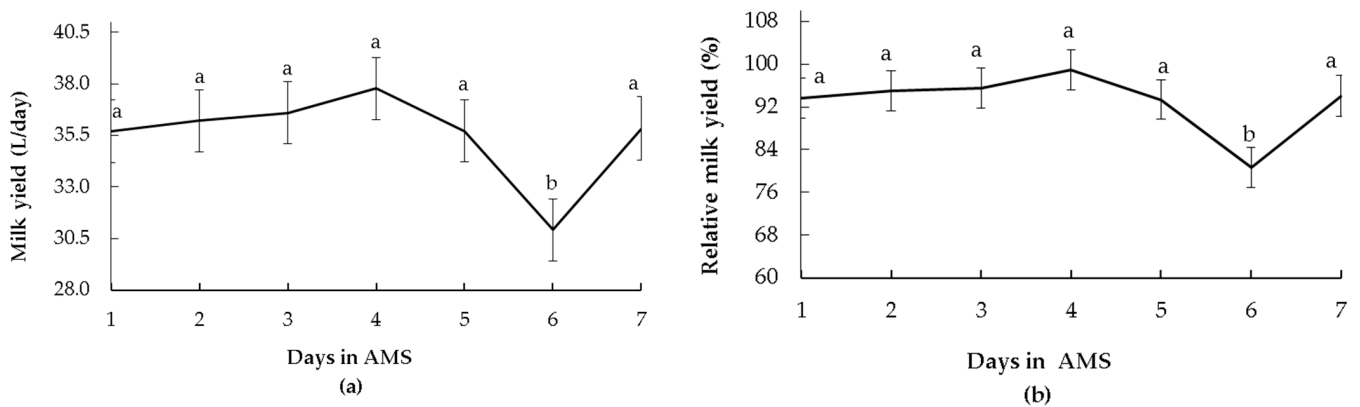


Figure 3. (a) Total milk yield (mean \pm SE) and (b) milk yield (mean \pm SE) expressed as relative values of conventional milking system (CMS) results (100% = mean CMS yields of seven days prior to the system changeover) of multiparous Holstein cows during seven days after the changeover from the CMS to the automatic milking system (AMS). Differences between days are indicated with different letters ($p \leq 0.05$).

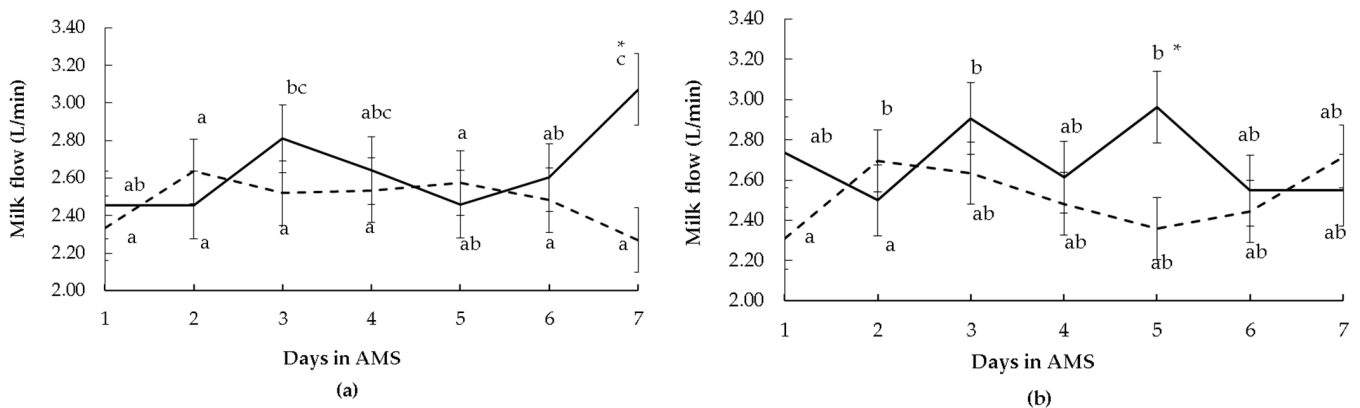


Figure 4. Milk flow (mean \pm SE) of multiparous Holstein cows during seven days after the changeover from the conventional milking system (CMS) to the automatic milking system (AMS) according to (a) race time and (b) flight speed test in the CMS (calm: curt line, reactive: solid line). Differences between days are indicated with different letters, and differences between temperament classes within the same days are indicated with * ($p \leq 0.05$).

The relative milk flow did not vary as a function of the time of assessment (days in the AMS) ($p = 0.60$), being on average $83.3\% \pm 3.4\%$ of the flow obtained in the CMS before the changeover procedure. Relative individual milk flow ranged from 58.7% to 105.1% of the previous CMS flows. There was a tendency for the interaction between RT and time of assessment ($p = 0.08$) and a significant interaction between FS and time of assessment ($p = 0.02$) in milk flow during the first days in the AMS. For RT classes, calm cows never reached CMS milk flow values, but reactive cows did so on day 7 (Figure 5a). When cows were classified by FS, reactive cows had different relative milk flow evolution over time than calm cows, demonstrating more variation over time (Figure 5b), but none of the two temperament classes reached the pre-changeover milk flow level.

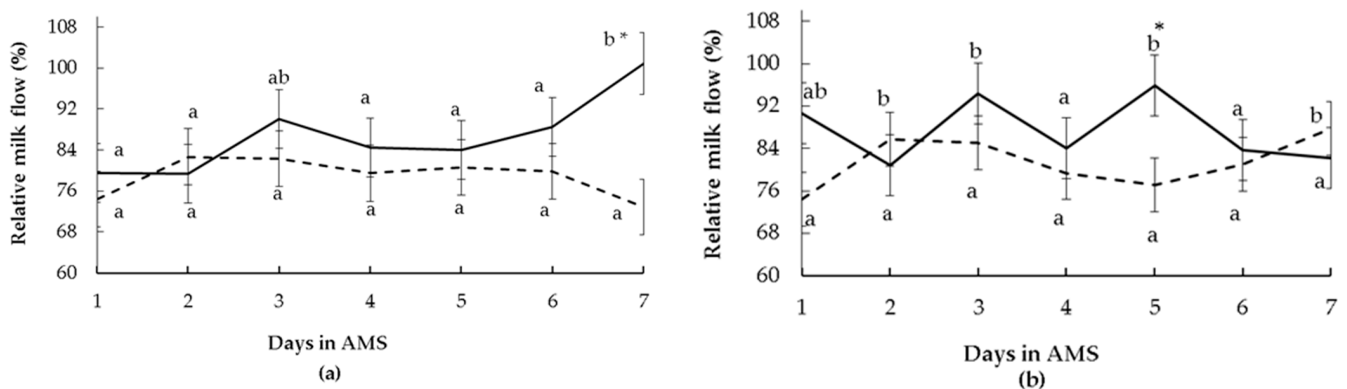


Figure 5. Milk flow (mean \pm SE) expressed as relative values of the conventional milking system (CMS) results (100% = mean CMS yields of seven days prior to the system changeover) of multiparous Holstein cows during seven days after changeover from the CMS to the automatic milking system (AMS) according to (a) race time and (b) flight speed test at CMS (calm: curt line, reactive: solid line). Differences between days are indicated with different letters, and differences between temperament classes within the same days are indicated with * ($p \leq 0.05$).

3.3. Relationships between the Behavioural and Productive Measures of Adaptation

Low and negative partial correlations were found between the number of steps and milk flow ($r = -0.18$; $p = 0.04$), and there was a negative tendency between the number of kicks and milk flow ($r = -0.16$; $p = 0.06$), i.e., higher numbers of steps and kicks were weakly related to reduced milk flow in the AMS. Additionally, milk flow was positively correlated with milk yield ($r = 0.38$; $p < 0.0001$).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study evaluating the relationship between temperament tests, behaviour, and productive responses of Holstein cows when relocated from a CMS to an AMS, both mixed-feeding systems. Cows need a few days to adapt to an AMS [3,6], but the adaptation to a new system could be more difficult for some cows than for others [5,19]. These individual differences could be determined by the cows' temperament. In the present study, it was evidenced that temperament (calm vs. reactive) influenced some adaptative responses, such as kicking in the milking box, milk yield, and flow.

When cows are moved from a CMS to an AMS, they exhibit high levels of stress-related behaviours (stepping, kicking, urination, defecation), which decrease over time as the cows habituate to the AMS [6]. It is reported that in less than 24 h after the system changeover, stepping and kicking decrease, and then remain constant [6]. In the present study, the number of steps and kicks did not have a clear change over the successive milkings in the AMS, possibly due to the short duration of the evaluation (five milking days) and/or the low frequencies of these behaviours. The temperament classes influenced the milking reactivity in the AMS, since the number of kicks varied according to some temperament tests. For FD, reactive cows kicked more than calm cows, but only on the first milking day, then decreased their reactivity. The higher reactivity at the first milking in the AMS may be expected because the milking system represented a novel routine, and therefore, reactive cows would react more to the novelty. However, their reactivity decreased over the next days, maybe because the AMS implies little contact with humans and FD is a test that evaluates the fear of humans. The system conditions could have favoured the decrease in reactivity more in reactive cows than in calm ones. Regardless of the time of assessment (i.e., milkings in AMS), cows classified as calm by FS presented more kicks than reactive ones. A similar result was reported by Sutherland and Dowling [20], working in a CMS, who suggested that heifers with a lower exit speed kicked more during milking than the faster animals. However, another study in a CMS with multiparous cows reported that FS

was not related to kicks [21]. Therefore, there was no clear and direct pattern of association between handling temperament in the yard with reactivity during milking. Less reactive animals during handling tests (e.g., FS) would be more reactive during milking due to different handling situations, expressing different temperament dimensions.

In our study, the time to enter the milking box did not decrease over the evaluated milkings. Weiss et al. [3] reported in cows under similar conditions of traffic, but with cows in confinement, that after the third day in the AMS, cows were able to enter the milking box without physical forces. In the present study, the five milkings (i.e., three days) could have been not enough to observe differences in this behaviour. However, we observed that reactive cows classified by FS took more time to enter the milking box than calm cows. The FS has been associated with a fear of restraint situations but could also be related to the motivation of the cows to enter the milking box in an AMS. Perhaps the cows had similar perceptions about both places. Conversely, the FD classification was not associated with time to enter the milking box, which could be related to the fact that the test probably indicates a fear of humans and not of the milking box. Considering that the AMS usually implies scarce human contact, the FD would not be a good indicator of temperament, or it does not have the same interpretation of cows in this system as cows in a CMS. Although Brouček and Tongel [11] suggested that avoidance of the milking box in the AMS can be related to unfavourable temperament, there are no studies linking the reactivity to the test of temperament in yards of cows with their behaviour of entrance into the milking box in AMS.

The milk yield and flow were affected by system changeover, being lower in AMS than in CMS, which had already been reported in previous studies [3,6]. During the first seven days in AMS, the cows failed to reach the CMS milk production and flow level. Unlike primiparous cows, who have better adaptation success in an AMS than in a CMS, as evidenced by higher milking frequency [22] and milk production [23], the multiparous cows have negative effects on milk production during the adaptation period in an AMS [8]. In the study of Jacobs and Siegford [6], cows had milk values similar to the CMS at four days post-change. In our results, similarly to Weiss et al. [8], cows did not return to CMS milk values before the first 10 days in the AMS. The milk production level could be an explanation for the differences among the study of Jacobs and Siegford [6] and ours since their cows had a lower milk yield level than the cows in our study. It is possible to infer that their cows could reach CMS milk values faster than ours.

In our study, we had a wide range of relative individual yields, which could be related to cows' temperament. In fact, cows classified as calm by FS lost more milk and produced less than reactive ones. Individual differences in milk and flow losses have also been reported by Weiss et al. [3]. Different than our results, the milk performance in a novel environment (in their case a CMS) was worse for reactive than for calm cows [21]. The temperament tests may not have the same relationship with productivity in an AMS as in a CMS, as suggested by Morales-Piñeyrúa et al. [12]. In this sense, this study highlights the need to evaluate the reactivity of the animals using other indicators that do not imply contact with humans in the adaptation to novel management systems, such as the AMS.

Conversely, calm cows kicked more than reactive animals; therefore, greater reactivity to milking could have resulted in incomplete milking and consequently less milk yield [24], as well as longer milking times (calm cows had the greatest time in the milking box compared to the reactive ones). This would agree with the results that kicking cows tended to exhibit a lower milk flow (correlations results), and less milk flow is reflected in less milk yield. Kicking is an indicator of discomfort caused by low milk flow [11]. On the other hand, reactive cows had peaks of milk flow higher than calm cows, which could have provoked, on average, a greater milk yield. The milk flow has been reported as a promising trait for describing milking ability in the AMS [18], such as a measure of adaptation to milking [25]. However, in the present study, the milk flow decreased and continued to be low in the AMS. It is possible that more days would be necessary to restore the milk flow after system changeover.

In our study conditions, of the three temperament tests used, we suggest that flight speed is the most practical to perform on-farm, being able to predict behaviour and productive patterns at milking during the adaptation period at an AMS in mixed-feeding systems. Calmer cows, as seen by FS, were more sensitive to system change than reactive cows (more milking reactivity and worst productivity). Therefore, FS tests could be used on commercial farms to characterise individual animals, helping to select cows that better fit to the system, and/or to tailor cow management according to their individual needs. However, we caution that this test may be more linked to the human–animal relationship, and in the AMS this factor could be non-important. Future research should determine temperament related to the fear of novel objects or situations (such as arena tests or novel object tests), and how these could affect the adaptive responses to the AMS. We also caution that our milking behaviour results may not be strictly extrapolated to all situations because of the low sample size used in the experimental farm conditions. All these topics require further analyses, including a wider range of adaptability parameters, such as milk quality indicators.

5. Conclusions

Cows' temperament influenced their milking reactivity and productivity during the changeover from a CMS to an AMS. Calmer cows kicked more and produced less milk than reactive ones. Therefore, calm cows could have more difficulties adapting to the AMS. Additionally, in our study conditions, relocation of cows from the CMS to the AMS did not generate a prolonged behavioural reaction, since responses of fear or stress (steps, kicks, the time to enter the milking box, box time, handling time) did not increase over time. However, the milk flow and production did not reach the CMS values in seven days post-system change.

Author Contributions: Conceptualisation, J.T.M.-P., A.C.S., G.B. and J.P.D.; methodology, J.T.M.-P., A.C.S., G.B. and J.P.D.; formal analysis, J.T.M.-P., A.C.S. and J.P.D.; investigation, J.T.M.-P.; resources, J.T.M.-P.; data curation, J.T.M.-P. and A.C.S.; writing—original draft preparation, J.T.M.-P.; writing—review and editing, A.C.S., G.B. and J.P.D.; supervision, A.C.S., G.B. and J.P.D.; project administration, J.T.M.-P.; funding acquisition, J.T.M.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Route 50, km 11, Colonia, Uruguay (Grant No. N-23765 PL_25_0_00)) and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Av. Italia 6201, Montevideo, Uruguay (Grant No. POS_NAC_2018_1_151523)).

Institutional Review Board Statement: All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), file number INIA.2018.7.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the privacy statute of INIA.

Acknowledgments: The authors thank Marcelo Pla and Juan Negrin (AMS workers) and Jacquelin Santa Cruz (student assistant) for their help with data collection during the project, and Maria Camila Ceballos for improve of the manuscript and language revision.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Broom, D.M. Cognitive ability and awareness in domestic animals and decisions about obligations to animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2010**, *126*, 1–11. [[CrossRef](#)]
2. Koolhaas, J.M.; de Boer, S.F.; Coppens, C.M.; Buwalda, B. Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Front. Neuroendocrinol.* **2010**, *31*, 307–321. [[CrossRef](#)]

3. Weiss, D.; Moestl, E.; Bruckmaier, R.M. Physiological and behavioural effects of changeover from conventional to automatic milking in dairy cows with and without previous experience. *Vet. Med. Czech.* **2005**, *50*, 253–261. [CrossRef]
4. Poelarends, J.J.; Sampimon, O.C.; Neijenhuis, F.; Miltenburg, J.D.H.M.; Hillerton, J.E.; Dearing, J.; Fossing, C. Cow factors related to the increase of somatic cell count after introduction of automatic milking. In *Automatic Milking—A Better Understanding*; Meijering, A., Hogeveen, H., de Koning, C.J.A.M., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2004; pp. 148–154.
5. Wenzel, C.; Schönreiter-Fischer, S.; Unshelm, J. Studies on step-kick behavior and stress of cows during milking in an automatic milking system. *Livest. Prod. Sci.* **2003**, *83*, 237–246. [CrossRef]
6. Jacobs, J.A.; Siegford, J.M. Lactating dairy cows adapt quickly to being milked by an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1575–1584. [CrossRef] [PubMed]
7. Sutherland, M.A.; Huddart, F.J. The effect of training first-lactation heifers to the milking parlor on the behavioral reactivity to humans and the physiological and behavioral responses to milking and productivity. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 6983–6993. [CrossRef] [PubMed]
8. Weiss, D.; Helmreich, S.; Möstl, E.; Dzidic, A.; Bruckmaier, R.M. Coping capacity of dairy cows during the change from conventional to automatic milking. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 563–570. [CrossRef]
9. Jago, J.; Kerrisk, K. Training methods for introducing cows to a pasture-based automatic milking system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2011**, *131*, 79–85. [CrossRef]
10. Meskens, L.; Vandermersch, M.; Mathijs, E. Implication of the introduction of automatic milking on dairy farms. Deliverable D1 from EU project ‘Implications of the introduction of automatic milking on dairy farms’ (QLK5 2000–31006). 2001. Available online: <https://cordis.europa.eu/project/id/QLK5-CT-2000-01006/results> (accessed on 1 July 2022).
11. Brouček, J.; Tongel, P. Adaptability of dairy cows to robotic milking: A review Slovak. *J. Animal Sci.* **2015**, *48*, 86–95.
12. Morales-Piñeyrua, J.T.; Damián, J.P.; Banchemo, G.; Blache, D.; Sant’Anna, A.C. Metabolic profile and productivity of dairy Holstein cows milked by a pasture-based automatic milking system during early lactation: Effects of cow temperament and parity. *Res. Vet. Sci.* **2022**, *147*, 50–59. [CrossRef]
13. Menke, K.H.; Steingass, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* **1988**, *28*, 209–221.
14. Pajor, E.A.; Rushen, J.; de Passillé, A.M.B. Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2000**, *69*, 8–102. [CrossRef] [PubMed]
15. Gibbons, J.M.; Lawrence, A.B.; Haskell, M.J. Consistency of flight speed and response to restraint in a crush in dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2011**, *131*, 15–20. [CrossRef]
16. Waiblinger, S.; Boivin, X.; Pedersen, V.; Tosi, M.V.; Janczak, A.M.; Visser, E.K.; Jones, R.B. Assessing the human–animal relationship in farmed species: A critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2006**, *101*, 185–242. [CrossRef]
17. Carlström, C.; Strandberg, E.; Pettersson, G.; Johansson, K.; Stålhammar, H.; Philipsson, J. Genetic associations of teat cup attachment failures, incomplete milkings, and handling time in automatic milking systems with milkability, temperament, and udder conformation. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* **2016**, *66*, 75–83. [CrossRef]
18. Wethal, K.B.; Heringstad, B. Genetic analyses of novel temperament and milkability traits in Norwegian Red cattle based on data from automatic milking systems. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 8221–8233. [CrossRef]
19. Deming, J.A.; Bergeron, R.; Leslie, K.E.; DeVries, T.J. Associations of housing, management, milking activity, and standing and lying behavior of dairy cows milked in automatic systems. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 344–351. [CrossRef]
20. Sutherland, M.A.; Dowling, S.K. The relationship between responsiveness of first-lactation heifers to humans and the behavioral response to milking and milk production measures. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* **2014**, *9*, 30–33. [CrossRef]
21. Sutherland, M.A.; Rogers, A.R.; Verkerk, G.A. The effect of temperament and responsiveness towards humans on the behavior, physiology and milk production of multi-parous dairy cows in a familiar and novel milking environment. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 329–337. [CrossRef]
22. Speroni, M.; Pirlo, G.; Lolli, S. Effect of automatic milking systems on milk yield in a hot environment. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 4687–4693. [CrossRef]
23. Sannino, M.; Faugno, S.; Crimaldi, M.; Di Francia, A.; Ardito, L.; Serrapica, F.; Masucci, F. Effects of an automatic milking system on milk yield and quality of Mediterranean buffaloes. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 8308–8312. [CrossRef] [PubMed]
24. Bruckmaier, R.M.; Blum, J.W. Simultaneous recording of oxytocin release, milk ejection and milk flow during milking of dairy cows with and without prestimulation. *J. Dairy Sci.* **1996**, *63*, 201–208. [CrossRef] [PubMed]
25. Van Reenen, C.G.; Van der Werf, J.T.N.; Bruckmaier, R.M.; Hopster, H.; Engel, B.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Blokhuis, H.J. Individual Differences in Behavioral and Physiological Responsiveness of Primiparous Dairy Cows to Machine Milking. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 2551–2561. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo II: Publicación II



Metabolic profile and productivity of dairy Holstein cows milked by a pasture-based automatic milking system during early lactation: Effects of cow temperament and parity

Jéssica T. Morales-Piñeyrúa^{a,*}, Juan P. Damián^b, Georgget Banchemo^c, Dominique Blache^d, Aline C. Sant'Anna^e

^a Programa Nacional de Producción de Leche, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay

^b Departamento de Biociencias Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8 km 18, Montevideo, Uruguay

^c Programa Nacional de Producción de Carne y Lana, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay

^d School of Agriculture and Environment, The University of Western Australia, 35 Stirling Highway, Perth, Australia

^e Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. CNPq Researcher

ARTICLE INFO

Keywords:

Behaviour
Dairy cows
Pasture
Personality
Transition period

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of temperament and parity on milk production and metabolic responses of Holstein cows in a pasture-based automatic milking system. Thirty-five primiparous and 58 multiparous cows were classified as 'calm', 'intermediate' or 'reactive' in each of the temperament tests conducted: milking reactivity (MR), race time (RT), flight speed, and flight distance. The milk yield and milk composition, as well as the blood biochemistry, were measured during the first 10 weeks of lactation. Primiparous cows produced less milk than multiparous cows (24.0 ± 0.8 vs. 34.2 ± 0.6 L/d, respectively, $P < 0.0001$), while the serum beta-hydroxybutyrate concentration differences according to parity were not detected. Multiparous cows that were classified as 'reactive' on MR and RT tests produced 3 kg/d more milk and had greater concentrations of milk components than 'calm' cows ($P \leq 0.05$). There was no such relation in primiparous cows. Also, cows scored 'reactive' on RT showed greater milking frequency (2.50 ± 0.05 vs. 2.35 ± 0.04 milking/d; $P = 0.01$) and blood beta-hydroxybutyrate concentrations (1.28 ± 0.09 vs. 0.92 ± 0.10 mmol/L; $P = 0.04$) than RT 'calm' cows. In conclusion, the cows' temperament was associated with milk production and metabolism, which depended on parity and the temperament tests used. Although productive performance was different between parities, lipomobilization was not.

1. Introduction

The physiological events during early postpartum in dairy cows are well known (Kay et al., 2015), characterized by a high energy requirement for milk production and insufficient dry matter intake (DMI), producing a negative energy balance (NEB) (Grummer et al., 2004). The NEB can, in turn, result in a loss of body condition (Grummer et al., 2004) and changes in the circulating concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA) and beta-hydroxy-butyrate (BHB) (Wankhade et al., 2017), as well as insulin-like growth factor-1, leptin, thyroid, and insulin hormones (Meikle et al., 2004; Wankhade et al., 2017). These metabolic changes can cause an increase in the incidence of metabolic diseases

(Aleri et al., 2016), affecting the welfare of cows.

The productive and metabolic traits of grazing dairy cows have rarely been studied when using automatic milking systems (AMS). Tatone et al. (2017) found that herds milked in a confined-based AMS had a 5% higher prevalence of ketosis compared with herds milked in a conventional milking system (CMS). These differences might be due to the milking frequency and/or to feeding management at the AMS. In an AMS, cows would have more frequent milkings than in a CMS, contributing to an enhanced milk yield (Lyons et al., 2014); which may increase the magnitude of the NEB and the ketosis incidence. Also, the cows in the AMS could have fewer opportunities to feed when the traffic is guided or forced than in a CMS (Wagner-Storch and Palmer, 2003;

* Corresponding author.

E-mail address: jmorales@inia.org.uy (J.T. Morales-Piñeyrúa).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.001>

Received 30 November 2021; Received in revised form 2 March 2022; Accepted 8 April 2022

Available online 12 April 2022

0034-5288/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Wiktorsson and Sørensen, 2004), increasing NEB level. However, Abeni et al. (2005) did not find differences in postpartum metabolites and body condition score (BCS) between cows milked in an AMS or in a CMS. On the other hand, the combination of a pasture-based diet and the irregular milking intervals would result in less milk yield of cows in an AMS, implying a lower metabolic demand during early lactation, therefore a lesser degree of the NEB, than for cows in a CMS (Elischer et al., 2015).

Productivity and metabolic profile during NEB are affected by several factors, with parity or animal temperament accentuating or attenuating these effects. In CMS and AMS, previous studies have reported that primiparous (PRIM) produced less (Lessire et al., 2017; Morales Piñeyrúa et al., 2018) and showed a more pronounced NEB than multiparous (MULT) cows, due to a greater mobilization of body reserves and more unbalanced metabolic profiles than in MULT cows (Meikle et al., 2004; Cavestany et al., 2005). If so, being PRIM would accentuate the development of NEB. However, there are studies in a CMS, reporting contrary effects of parity on metabolic profiles (Wathes et al., 2007; Morales Piñeyrúa et al., 2018). These contradictions may be related to differences in the feeding systems (pasture vs. confinement), which might also be related to the milking system. In Uruguay, the postpartum coincides with a low pasture growth and quality (winter) (Fariña and Chilbroste, 2019), which could intensify the cow's NEB. On contrary, in confined systems, the quality of diet and TMR intake use to be more uniform over the year. Therefore, in pasture-based systems, the NEB differences between PRIM and MULT could be more evident due to feeding competition, which leads to lower energy and protein intakes in primiparous cows.

Normally, PRIM cows are more susceptible to stress (e.g. due to machine milking, regrouping, postpartum period) (Van Reenen et al., 2002; Huzzey et al., 2011; Mazer et al., 2020) and more reactive to milking than MULT cows (Szentléleki et al., 2015). The interindividual differences in behavioural responses that are consistent over time and across situations can be characterized as animal temperament (Réale et al., 2007). Therefore, temperament could influence the responses to novelty in PRIM (Sutherland and Huddart, 2012); for example, nervous cows could react more negatively to new situation. Because AMS exposes cows to novel situations, the physiological and productive responses to NEB in the AMS might differ according to a cow's parity and temperament. In addition, temperament could also affect the metabolism of cows. Burdick Sanchez et al. (2016) found a greater concentration of NEFA at high flight speeds than at low flight speeds in beef steers. The greater susceptibility to stress of excitable cows could decrease the DMI, exacerbating the NEB and predisposing the cows to more metabolic diseases (Chebel et al., 2016; Proudfoot et al., 2018). That scenario could help to explain the negative correlation between cows' temperament and milk yield (i.e. the lower production for more reactive cows) found in animals kept in a CMS (Sutherland and Dowling, 2014; Marçal-Pedroza et al., 2020), though the effects of temperament on milk yield remain undetermined. There are reports of a positive relationship between temperament and milk yield (with lower production for the calmer ones) (Sawa et al., 2017) or no relation at all (Van Reenen et al. (2002)). Despite the functional links between temperament and energy metabolism proposed by several authors (Careau et al., 2008; Houston, 2010), limited research has studied the effect of temperament on cows' metabolic parameters.

In summary, to our knowledge, the impacts of parity and temperament on cows' metabolic status at early lactation in cattle milked in AMS are still unknown. Thus, the objective of this study was to characterize the metabolic profile and milk production of grazing postpartum cows in an AMS according to temperament, parity, and their interaction. Our hypothesis is that the PRIM and/or more reactive cows might have lower productive performance and different metabolic profiles compared to MULT and/or calmer cows during early lactation.

2. Materials and methods

2.1. Animals and husbandry conditions

Thirty-four PRIM [average 31.3 ± 3.8 months of age, and BCS of 3.6 ± 0.2 ; (BCS as defined by Edmonson et al., 1989)] and 57 MULT Holstein cows (3.4 ± 1.1 lactations and BCS of 3.4 ± 0.2) with expected calving in autumn were selected from the dairy research station of INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay, $34^{\circ}35'S$, $57^{\circ}70'W$). The sample size was evaluated and approved by the Ethical Committee of Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. From 8 to 18 was the minimum sample size for most of the productive and metabolic variables according to the Power Analyses (0.80 power value) (Kaps and Lamberson, 2004), but 91 cows were recruited in order to have at least 20 animals per temperament category.

The INIA has two monobox AMS and two feed supply boxes from GEA (GEA Farm Technologies, Bönen, Germany). The monoboxes were available for milking 24 h/d except for a total of 90 min/AMS per day when the units were closed for cleaning and repairs when necessary. All cows had equal access to both monoboxes, and selectively forced cow traffic was applied (as defined by Wiktorsson and Sørensen, 2004). Each cow wore a transponder around its neck that was sensed by the AMS and used to identify each individual and to trigger the appropriate routing. The cows were obliged to pass the AMS area before entering the pasture area. Cows that had been milked within the past six hours (with the exception of cows that had an incomplete milking at their last entry) were returned directly to the feeding area, whereas the others were admitted to the milking monobox. Twice a day (07:00 AM and 02:00 PM), the cows that had not been milked during the last 12 h were fetched to the AMS unit.

The cows were selected from 4 weeks before the expected parturition date to 10 weeks postpartum (March to October). During the prepartum period, cows and heifers were housed in a single group (maximum of 35 animals at any time) in an outdoor pen of 2.02 ha with access to shade (135 m^2) and group-feeding troughs. The animals were fed a total mixed ration (TMR) (Table 1) offered once a day in the morning period, and water was given ad libitum. Fifteen days before calving, the PRIM cows were trained for milking for five sessions (three days) in the morning. Briefly, the cows were encouraged to walk at their own pace through the smart gates and the monobox three times per session. On the last day, the gate of the monobox was closed, and the cow was fed concentrate for a few minutes. After calving, cows were kept together on pasture. The postpartum diet consisted of access to pasture and supplementation with commercial concentrate (Table 1). Half of the concentrate was offered at milking in the monobox, and the rest was offered in the feed supply boxes, totalling 7.3 kg/cow/d, on average, of supplementation at both sites for all cows, regardless of the milk yield. Rotational grazing in 43 paddocks (of 1 ha each) was used, allowing daily access to a strip of pasture (mixture of *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, and *Bromus catharticus*) with a forage mass mean of 900 kg DM/ha (cut at 5 cm from ground level). A maximum of 12.7 kg of DM/cow/d was offered, and the daily grazing strip size was adjusted weekly to attain this allowance. During the study, all cows were kept in a single group, and they had access to three paddocks per day. The distance walked from the paddocks to the milking parlour ranged from 10 m to 1020 m, and all of the cows were exposed to the same distances on each experimental day. During winter, the animals were supplemented with 5.5 kg/cow/d of a TMR diet (Table 1) delivered on troughs located in a feeding paddock for a total of 100 days (May–July). Water was available ad libitum from automatic water troughs. The cows' health was monitored daily during the experimental period. Clinical signs of the most common diseases were observed by the dairy farm workers and cows with mastitis alert (by the milking machine) were removed from the study. The diagnostics were confirmed by the veterinarians of the dairy farm according to their protocols. Four PRIM and five MULT were excluded from the initial sample, being clinical mastitis the most

Table 1

Ingredients (mean of kg DM/cow/d), chemical composition (% of total kg DM) and metabolizable energy (ME) of TMR (total mixed ration offered during May–July), pasture and concentrate offered during prepartum and postpartum to Holstein cow in an automatic milking system.

Ingredients	Prepartum	Postpartum
TMR		
Corn silage	6.20	1.20
Barley straw	2.20	–
Pasture haylage	–	2.10
Corn grain	–	0.75
High moisture corn grain	0.88	–
Soybean meal	1.40	0.69
Soybean hulls	0.60	0.52
Urea	0.08	0.03
Calcium carbonate	0.04	–
Sodium bicarbonate	–	0.04
Dicalcium phosphate	–	0.01
Magnesium oxide	–	–
Prepartum vitamin-mineral mix ¹	0.30	–
Postpartum vitamin-mineral mix ²	–	0.02
Pasture	–	11.50
Commercial concentrate	–	7.30
Total DM	11.7	24.3
Chemical composition		
Crude protein, %	14.6	20.5
NDF, %	37.4	39.1
ADF, %	23.6	22.1
Ash, %	5.8	9.5
ME ³ provided of TMR (Mcal)	29.3	14.5
ME provided of Pasture (Mcal)	–	27.9
ME provided of commercial concentrate (Mcal)	–	23.7

¹ Provided (per kg of DM of mix): 230 g Ca, 20 g of P, 100 g of Mg, 130 g of Cl, 30 g of S, 0.8 g of Cu, 2.4 g of Zn, 12 mg of Se, 1.4 g of Mn, 5 mg of Co, 89,000 IU of vitamin A, 17,000 IU of vitamin D, and 3500 IU of vitamin E.

² Provided (per kg of DM of mix): 140 g Ca, 14 g of P, 30 g of Mg, 150 g of Na, 110 g of Cl, 597 ppm of inorganic Cu, 277 ppm of organic Cu, 1815 ppm of inorganic Zn, 853 ppm of organic Zn, 6 ppm of inorganic Se, 3 ppm of organic Se, 1090 ppm of Mn, 65,707 IU of vitamin A, 13,141 IU of vitamin D, and 298 IU of vitamin E.

³ Metabolizable energy calculated by chemical composition of foods (Menke and Steingass, 1988).

common cause (67% of the excluded cows).

2.2. Temperament assessment

Cow temperament was assessed in the milking parlour using a milking reactivity score (MR) and in the handling corral using race time, flight speed, and flight distance tests (details given below). The tests in the milking and handling corral were performed on the same day. First, the MR was assessed at the afternoon milking, and then the cows were transferred to the handling corral where the other tests were performed. All tests were conducted four times at the 1st (± 0.35), 6th (± 0.46), 10th (± 0.71), and 20th (± 3.17) weeks postpartum (\pm SD) by the same observer. For the data analyses, the averages of the four assessments per cow were used.

Milking reactivity was measured using a method modified from Sutherland and Huddart (2012). Each cow was scored based on the stepping and kicking behaviours using a 7-point scale: (1) no hind foot movement, (2) one or two slow and gentle (hoof elevated at less than 15 cm above the ground) hind limb movements (3) three or more slow and gentle hind limb movements in inconstant rhythm (not moving during the whole procedure), (4) three or more slow and gentle hind limb constant movements (during the whole procedure), (5) vigorous hind limb movements (elevating hooves 15 cm above the ground), (6) vigorous and constant hind limb movements, (7) kicking the robot, elevating the hind hoof above hock line and directing it laterally. The observation started when the robotic arm began to move (beginning of the preparation phase of robotic milking) and lasted over the whole

milking and was made by one observer positioned on the cows' side at a 5-m distance, being able to observe both hindlegs.

Race time (RT) was measured using a method modified from Pajor et al. (2000). One observer registered the time (in seconds) required to move each cow through the single-file race and enter the squeeze chute and the stimulus required to move the cow. Briefly, one cow at a time was moved from the holding pen to the entrance of the single-file race, which measured 5.95 m long, 0.80 m wide, and 1.26 m high with walls made from solid wood. Cows were allowed 30 s to move through the race without any stimulus. If the cow did not move through the race, one handler (the same for all of the cows over the study period) applied increasing levels of stimulus until it entered the squeeze chute: (0) nothing, animal moves through race within 30 s on its own; (1) approach and speak in a gentle voice; (2) hit rump with open hand; and (3) push and force animal to advance.

Flight speed (FS) was measured using a method modified from Gibbons et al. (2011). The time taken for each cow to exit the squeeze chute and cover a distance of 2.7 m was recorded using a purpose-built device that measured exit speed. The unit comprised two light beams and reflectors and one readout unit. Once the cow passed through both light beams, the exit time was recorded in seconds and converted into speed, in m/s. The handler stood approximately 1 m away from the side of the crush and behind the shoulder of the animal during the test.

Flight distance (FD) was measured using a method modified from Waiblinger et al. (2006). The distance (in m) that cows allowed a non-familiar person to approach before expressing the first withdrawal response was recorded. The test was performed with each cow individually kept in a corral pen of 131 m². After the cow exited the squeeze chute, the observer remained stationary on the opposite side of the pen entrance, approximately 8 m away from the cow, waiting for the cow to stand still before starting the test. Then, the person approached the animal slowly (one step per s), with her hands down and arms held close to the body. When the cow expressed any withdrawal reaction (i.e., the animal moved both forelimbs), the observer stopped and measured the distance to the cow's nearest front hoof using an odometer (MW40M, Stanley).

2.3. Productive performance

During the first 10 weeks of lactation, the daily milking frequency (the number of successful voluntary visits to milking machine) and the daily milk production (L/day) per cow were automatically recorded by the milking machine system. The yield of 3.5% fat-corrected milk (FCM in kg/day) was calculated as follows: $0.4324 \times \text{milk yield (kg)} + 16.218 \times \text{fat yield (kg)}$ (Tyrrell and Reid, 1965). Weekly samples of milk from each individual were obtained automatically, at a morning milking, and utilised to measure milk fat, protein, lactose, and urea-N concentration using a mid-infrared method with a Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA). The BCS was assessed by a single observer at 4 weeks prepartum and 1, 2, 3, 6, and 10 weeks postpartum (on average), according to a scale of 1–5, using 0.25-unit increments (Edmonson et al., 1989).

2.4. Blood biochemistry

Blood samples were obtained in the morning from 4 weeks prepartum (08:00 AM) and 1, 2, 3, 6 and 10 weeks postpartum (06:00 AM) by coccygeal venipuncture using a Vacuette® (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria). Samples were centrifuged immediately ($3000 \times g$ for 15 min at 20 °C; centrifuge KN-70, Kubota, Tokyo, Japan), and the plasma samples were stored at -20 °C until assayed by the Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal and Laboratorio de Bioquímica (Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay) to determine NEFA, BHB, cholesterol, calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), urea, albumin, total protein, haptoglobin, aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transferase

(GGT). The concentration of plasmatic globulins was estimated by the difference between total proteins and albumin (Damián et al., 2020).

Metabolite concentrations in plasma were measured by spectrophotometry using an BA200 Analyzer (Biosystems S.A., Barcelona, Spain) and commercial kits (Biosystems S.A.; cholesterol: Oxidase/Peroxidase; Ca: Arsenazo III; P: Fosfomolibdato/UV; Mg: Xilidilo blue; urea: urea/BUN-UV urease/glutamate dehydrogenase; total protein: Biuret reaction; albumin: Bromocresol green). Concentrations of NEFA were determined by the ACS-ACOD method with NEFA-HR2 from Wako Chemicals (Richmond, VA, USA) and BHB using a D-3-hydroxybutyrate kit (Biosystems S.A.). The AST and GGT were analysed by the IFCC method (Biosystems S.A.). Haptoglobin concentrations were determined by a commercial ELISA kit (Tridelta Development LTD, Dublin, Ireland). The assay sensitivities for cholesterol, Ca, P, Mg, urea, total protein, albumin, NEFA, BHB, AST, GGT, and haptoglobin were 0.11 mmol/L, 0.10 mmol/L, 0.08 mmol/L, 0.08 mmol/L, 0.61 mmol/L, 4.6 g/L, 1.1 g/L, 0.01 mmol/L, 0.02 mmol/L, 7.15 U/L, 3.07 U/L, and 0.005 mg/mL, respectively. The intra-assay and inter-assay CVs for all controls were below 10%.

2.5. Statistical analyses

All statistical analyses were carried out with SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Univariate analyses were performed on all quantitative variables to identify outliers and to verify the normality of residuals. Homogeneity of variances was verified with Levene's test. Measures of BCS and metabolites at week 4 prepartum were used as covariate in their respective data analysis to control and adjust for animal differences. The sire of the cows was used as a random effect on the models to analyse milk yield and composition according to parity or temperament.

To evaluate the effects of parity, weeks of assessment and the interaction of parity and weeks on milk yield, FCM, milk composition, milking frequency, and metabolite concentrations, linear mixed models for repeated measures (MIXED procedure) were fitted, and for BCS, a generalized linear mixed model for repeated measures (GLIMMIX procedure) was used. The fixed effects of parity (PRIM and MULT), weeks postpartum, and their interaction were included. The cow within parity was used as random effects with a first-order autoregressive variance-covariance structure.

Temperament traits were categorized using the terciles of the distributions of the average for each cow of the four times that they were assessed, MR: 'calm' (reactivity ≤ 2.63 ; $n = 32$), 'intermediate' (reactivity = 2.64 to 3.27; $n = 27$), or 'reactive' (reactivity ≥ 3.28 ; $n = 32$); RT: 'calm' (time ≥ 28.64 s; $n = 30$), 'intermediate' (time = 13.16 to 28.63 s; $n = 30$), or 'reactive' (time ≤ 13.15 s; $n = 31$); FS: 'calm' (velocity ≤ 0.69 m/s; $n = 29$), 'intermediate' (velocity = 0.70 to 0.97 m/s; $n = 33$) or 'reactive' (velocity ≥ 0.98 m/s; $n = 29$); and FD: 'calm' (distance ≤ 2.78 m; $n = 33$), 'intermediate' (distance = 2.83 to 3.87 m; $n = 28$), or 'reactive' (distance ≥ 3.88 m; $n = 30$).

Linear mixed models for repeated measures (MIXED procedure) were used to analyse the productive and metabolic variables according to temperament and parity. Models included the temperament traits (one trait per model), parity (PRIM and MULT), weeks postpartum, and all two-factor interactions as fixed effects. The cow within temperament was used as random effects with a first-order autoregressive variance-covariance structure. Nonsignificant interactions ($P > 0.05$) were excluded from the final models.

A generalized linear model (GENMOD procedure) was used to evaluate the influence of parity and temperament on the occurrence of subclinical ketosis (serum BHB values ≥ 1.2 mmol/L; Duffield et al., 2009), considering the binomial distribution of the response variable and logit link function. Post hoc analysis was performed using Fisher's protected least-significant difference. The P values were assumed to be significant when ≤ 0.05 and as a trend when ≤ 0.10 .

3. Results

3.1. Characterization of the productive performance and metabolic profiles

The milking frequency was different between parities and varied with postpartum week, with no significant interaction between parity and week (Table 2). The PRIM cows had a lower milking frequency than MULT cows (Table 2), and the milking frequency increased from week 1 to week 6 and then remained stable over time (Fig. 1A). Milk yield and FCM also differed between parities and postpartum week, with no significant interaction (Table 2). The PRIM cows had lower milk yield and FCM than MULT cows (Table 2), and both increased from week 1 to week 6 postpartum, after which it remained stable until week 9, and

Table 2

Productive traits and blood metabolic profiles by parity (PRIM = primiparous, MULT = multiparous) of Holstein cows keep in an automatic milking system during first 10 weeks postpartum.

Productive and metabolic variables	Parity (mean \pm SEM)		P-values ¹		
	PRIM	MULT	Parity	Week	Parity*week
Milking frequency (milking/day)	1.94 \pm 0.03	2.41 \pm 0.02	<0.0001	0.02	NS
Milk yield (L/day)	24.0 \pm 0.8	34.2 \pm 0.6	<0.0001	<0.0001	NS
FCM ² (kg/day)	27.2 \pm 0.8	37.0 \pm 0.6	0.01	<0.0001	NS
Body condition score (1–5)	3.11 \pm 0.02	2.90 \pm 0.02	0.005	<0.0001	NS
Milk Fat (kg/day)	1.16 \pm 0.03	1.37 \pm 0.02	<0.0001	<0.0001	0.08
Milk Protein (kg/day)	0.86 \pm 0.02	1.15 \pm 0.02	<0.0001	0.003	0.008
Milk Lactose (kg/day)	1.35 \pm 0.03	1.71 \pm 0.03	<0.0001	<0.0001	0.0002
MUN ³ (mg/dL)	20.0 \pm 0.8	17.9 \pm 0.7	0.02	0.01	0.02
NEFA ⁴ (mmol/L)	0.57 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	NS	<0.0001	NS
BHB ⁵ (mmol/L)	1.07 \pm 0.09	1.14 \pm 0.07	NS	<0.0001	NS
Cholesterol (mmol/L)	3.55 \pm 0.09	3.55 \pm 0.08	NS	<0.0001	0.0002
Calcium (mmol/L)	2.22 \pm 0.03	2.19 \pm 0.03	NS	NS	NS
Magnesium (mmol/L)	0.83 \pm 0.03	0.83 \pm 0.03	NS	NS	NS
Phosphorus (mmol/L)	1.98 \pm 0.04	1.86 \pm 0.04	0.04	NS	NS
Urea (mmol/L)	4.46 \pm 0.17	5.34 \pm 0.14	0.0002	NS	NS
GGT (IU) ⁶	25.99 \pm 1.27	29.40 \pm 1.02	0.04	0.07	0.0007
AST (IU) ⁷	97.47 \pm 3.04	111.00 \pm 2.44	0.0008	0.0003	NS
Haptoglobin (mg/dL)	0.67 \pm 0.06	0.72 \pm 0.05	NS	0.0003	NS
Albumin (g/L)	33.62 \pm 0.70	34.92 \pm 0.56	NS	NS	NS
Globulin (g/L)	41.73 \pm 1.30	42.05 \pm 1.05	NS	NS	NS
Total Protein (g/L)	73.66 \pm 0.99	75.50 \pm 0.79	NS	0.04	NS

¹ Probability of independent effects, NS = non-significant.

² FCM = 3.5% Fat-Corrected Milk, calculated as: $0.4324 \times \text{milk yield (kg)} + 16.218 \times \text{fat yield (kg)}$.

³ MUN = Milk urea nitrogen.

⁴ Non-esterified fatty acid.

⁵ Beta-hydroxybutyrate.

⁶ Gamma-glutamyl transferase.

⁷ Aspartate aminotransferase.

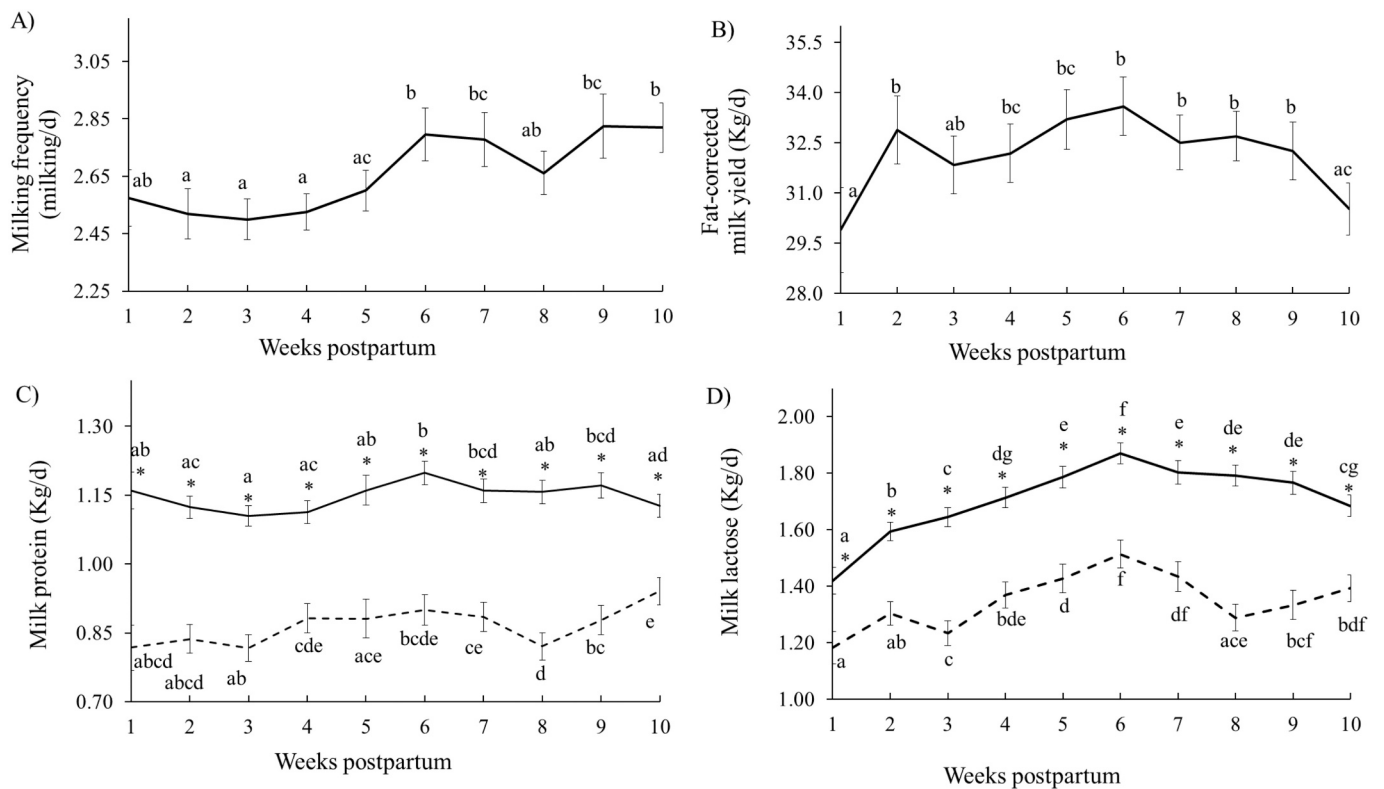


Fig. 1. A) Milking frequency (milking/d), B) 3.5% fat-corrected milk yield (Kg/d), C) milk protein (Kg/d), and D) milk lactose (Kg/d) (mean ± SEM) for Holstein cows 10 weeks after calving and using in an automatic milking system. Primiparous (dashed line) and multiparous (solid line) cows are shown separated for Figures C and D due to the significant parity-week interaction. Differences between weeks are indicated with different letters in the same line, and differences between parities are indicated with * ($P \leq 0.05$).

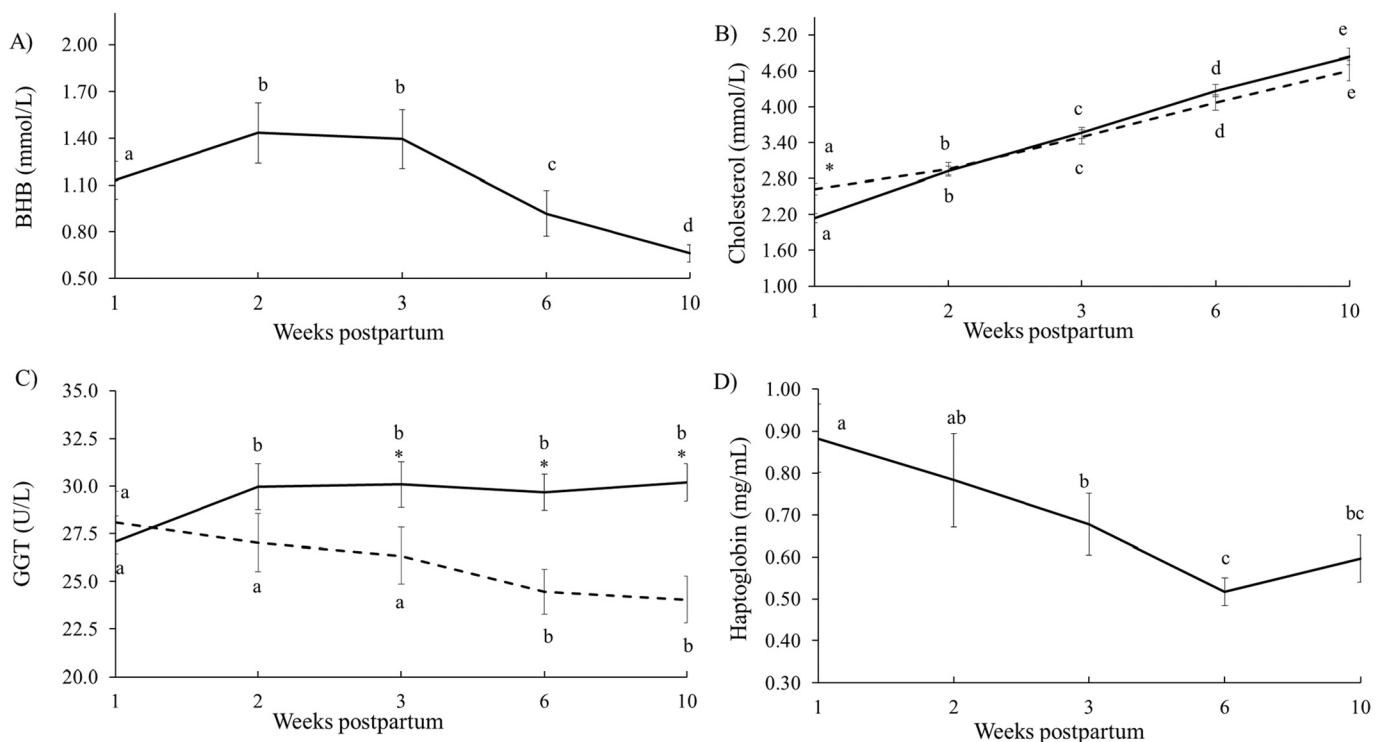


Fig. 2. Blood concentrations of A) beta-hydroxybutyrate (BHB; mmol/L), B) cholesterol (mmol/L), C) gamma-glutamyl transferase (GGT; U/L), and D) haptoglobin (mg/mL) over 10 postpartum weeks in Holstein cows milked in an automatic milking system. Primiparous (dashed line) and multiparous (solid line) cows are separated for Figures B and C due to the significant parity-week interaction. Differences between weeks are indicated with different letters in the same line, and differences between parities are indicated with * ($P \leq 0.05$).

then decreased from week 9 to week 10 (Fig. 1B). The BCS differed between parities and postpartum week, without a significant interaction (Table 2). The PRIM cows had greater BCS than MULT cows, decreasing over time for both parities.

There was a significant interaction between parity and week for all of the milk components, except for fat content (Table 2). The milk fat, milk protein, and milk lactose production (kg/day) were all greater in MULT than PRIM (Table 2). Fat production had a slight decrease over time. The milk protein showed an increase from week 1 to 6 for MULT cows, whereas for PRIM cows, it was stable from week 1 to week 8, showing an increase at week 10 (Fig. 1C). In turn, milk lactose production increased generally from week 1 to week 6 for both parities, decreasing over postpartum weeks, but PRIM cows had a drop at week 3, while MULT cows did not (Fig. 1D). For milk urea, PRIM cows had greater values at weeks 2 (23.7 ± 1.3 mg/dL) and 9 (21.0 ± 1.3 mg/dL) than MULT cows (week 2 = 18.9 ± 1.0 ; week 9 = 15.8 ± 1.1 mg/dL). The PRIM cows had the greatest urea values at week 2; the urea values then decreased and remained stable over time. For MULT cows, urea values showed a slight variation over time.

The concentration of NEFA and BHB were not different between parities (Table 2), but both increased initially and then showed a gradual decrease until week 10 (BHB, Fig. 2A). The proportion of cows with subclinical ketosis was 68.6% (24/35) for PRIM cows and 57.9% (33/57) for MULT cows and there was no relation with parity. Cholesterol had a significant interaction between parity and week, with PRIM cows having a greater concentration than MULT cows in the first week postpartum (Table 2), after which it increased in both parities (Fig. 2B).

We did not detect differences on the concentration of Ca and Mg in the blood as a function of parity or week, and there was no interaction (Table 2). In turn, the concentration of P and urea were influenced by parity, with PRIM cows showing greater P and lower urea concentrations than MULT cows (Table 2). There was an interaction between parity and week for GGT concentration, with PRIM cows showing lower GGT on weeks 3, 6, and 10 than MULT cows. In general, the GGT concentration decreased over weeks in PRIM while it remained stable after week 1 in MULT (Fig. 2C). The AST was influenced by parity and week, with PRIM cows having a lower concentration than MULT cows (Table 2). The AST values were maintained from week 1 to week 3 and then decreased. Albumin and globulin concentrations differences were not detected between parities or week, and there was no interaction (Table 2). Haptoglobin and total protein only varied as a function of week (Table 2). Haptoglobin concentrations decreased from week 1 to week 6 and then remained stable (Fig. 2D), while total protein remained stable until week 3, increased at week 6, and then decreased until week 10.

Table 3

Milking frequency, milk yield, 3.5% fat-corrected milk yield, and milk composition (mean \pm SEM) during 10 weeks of lactation for primiparous (PRIM) and multiparous (MULT) Holsteins cows of different temperaments [classified by milk reactivity (MR), and racetime (RT)] in an automatic milking system.

Temperament traits	Milking frequency (milking/d)		Milk yield (L/d)		FCM ¹ (kg/d)		Milk Fat (kg/d)		Milk Protein (kg/d)		Milk Lactose (kg/d)		
	PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT	
MR	Calm	1.96 \pm 0.06ab	2.39 \pm 0.04	24.6 \pm 1.2	32.4 \pm 1.0b	28.2 \pm 1.2	35.1 \pm 0.88b	1.18 \pm 0.04	1.27 \pm 0.03b	0.90 \pm 0.03	1.08 \pm 0.02b	1.37 \pm 0.06	1.61 \pm 0.04b
		1.85 \pm 0.05b	2.44 \pm 1.1	23.3 \pm 1.1	35.8 \pm 1.0a	25.7 \pm 1.2	38.9 \pm 1.0a	1.14 \pm 0.04	1.46 \pm 0.04a	0.87 \pm 0.03	1.21 \pm 0.03a	1.35 \pm 0.05	1.78 \pm 0.05a
	Reactive	2.00 \pm 0.06a	2.40 \pm 0.04	25.1 \pm 1.1	34.9 \pm 1.0a	28.2 \pm 1.2	38.4 \pm 1.0a	1.18 \pm 0.04	1.44 \pm 0.04a	0.89 \pm 0.03	1.18 \pm 0.03a	1.36 \pm 0.05	1.75 \pm 0.04a
RT	Calm	1.93 \pm 0.05	2.35 \pm 0.04b	25.1 \pm 1.2	33.3 \pm 0.8	27.9 \pm 1.4	35.8 \pm 1.0b	1.19 \pm 0.05	1.31 \pm 0.04b	0.89 \pm 0.03	1.13 \pm 0.02	1.39 \pm 0.06	1.69 \pm 0.04ab
		1.88 \pm 0.06	2.39 \pm 0.04ab	24.5 \pm 1.3	33.9 \pm 0.8	27.9 \pm 1.5	36.6 \pm 1.0b	1.22 \pm 0.05	1.34 \pm 0.04b	0.91 \pm 0.04	1.14 \pm 0.03	1.41 \pm 0.06	1.65 \pm 0.04b
	Reactive	1.99 \pm 0.05	2.50 \pm 0.05a	23.2 \pm 1.0	35.4 \pm 1.0	26.3 \pm 1.1	39.4 \pm 1.1a	1.14 \pm 0.04	1.49 \pm 0.04a	0.84 \pm 0.03	1.17 \pm 0.03	1.34 \pm 0.05	1.76 \pm 0.04a

Different letters on the same column and within each temperament traits are statistically different ($P \leq 0.05$).

¹ 3.5% Fat-Corrected Milk, calculated as: $0.4324 \times \text{milk yield (kg)} + 16.218 \times \text{fat yield (kg)}$.

3.2. Relationships between temperament, parity, and productive traits

The milking frequency ($P \leq 0.05$), milk production ($P \leq 0.10$), and milk composition ($P \leq 0.05$) only were related to MR and RT temperament tests, but the impact was different for PRIM and MULT cows (effects of the interaction) (Table 3). For PRIM, the cows rated as ‘reactive’ on the MR test milked more frequently than those classified as ‘intermediate’, while the MULT cows showed no relationship between milking frequency and temperament as assessed by MR (Table 3). In contrast, when temperament was assessed by RT, the milking frequency was greater in the ‘reactive’ than ‘calm’ only in MULT cows (Table 3). The milk yield and FCM were not associated with temperament classes in the PRIM cows, while MULT cows classified as ‘calm’ by either MR or RT had lower production than those classified as ‘intermediate’ and ‘reactive’ (Table 3). For the fat content of the milk, there was no relationship with temperament as assessed by MR or RT in the PRIM cows, but in the MULT cows, those classified as ‘calm’ on the MR or RT test had lower milk fat than those classified as ‘intermediate’ and ‘reactive’ (Table 3). Protein and lactose content of the milk were not associated with temperament in the PRIM cows scored by MR. While in the MULT cows, those classified as ‘calm’ by MR test had lower values than those classified as ‘intermediate’ and ‘reactive’ cows for both components (Table 3). Additionally, classification by RT had no impact on protein, but there were interactions between RT and parity on milk lactose production ($P = 0.04$). For PRIM cows classified by RT, there was no significant relationship of temperament with milk lactose (Table 3), while for MULT cows, those classified as ‘reactive’ had greater lactose content than ‘intermediate’ (Table 3). Milk urea nitrogen was not associated with temperament classes nor their interaction with parity.

For BCS, there was an interaction between FD score and parity ($P = 0.02$). The PRIM cows classified as ‘intermediate’ on the FD test (2.92 ± 0.07) had lower BCS than ‘calm’ (3.25 ± 0.06) and ‘reactive’ (3.1 ± 0.05) cows. In the MULT cows, differences were not detected between the FD classes (‘calm’ = 2.83 ± 0.04 , ‘intermediate’ = 2.98 ± 0.05 , and ‘reactive’ = 2.92 ± 0.05). The BCS did not vary as a function of other temperament tests or their interaction with parity.

3.3. Relationships between temperament, parity, and metabolic profiles

The NEFA was associated only with MR classification ($P = 0.04$), cows classified as ‘calm’ and ‘intermediate’ had greater NEFA concentration than those classified as ‘reactive’ (Table 4). For BHB the cows classified as ‘reactive’ by RT had greater BHB than those classified as ‘calm’, but differences between temperament on BHB when it was scored by MR, FS, or FD were not detected (Table 4). For blood cholesterol, those cows classified as ‘calm’ by FD had greater levels than

Table 4

Mean ± SEM for different blood metabolites and enzymes by temperament [classified by milk reactivity (MR), racetime (RT), flight speed (FS) and flight distance (FD)] of Holstein cows keep in an automatic milking system during first 10 weeks postpartum.

Temperament traits		NEFA ¹ (mmol/L)	BHB ² (mmol/L)	Cholesterol (mmol/L)	Calcium (mmol/L)	GGT ³ (IU)	Haptoglobin (mg/dL)	Total protein (g/L)
MR	Calm	0.58 ± 0.03a	1.06 ± 0.10	3.40 ± 0.10	2.15 ± 0.04b	28.2 ± 1.4	0.76 ± 0.06	72.4 ± 1.1b
	Intermediate	0.58 ± 0.03a	1.21 ± 0.10	3.69 ± 0.011	2.17 ± 0.04b	26.6 ± 1.5	0.63 ± 0.07	75.8 ± 1.1a
	Reactive	0.49 ± 0.03b	1.09 ± 0.10	3.54 ± 0.19	2.28 ± 0.04a	28.6 ± 1.4	0.69 ± 0.06	75.6 ± 1.0a
RT	Calm	0.52 ± 0.03	0.92 ± 0.10b	3.55 ± 0.11	2.18 ± 0.04	27.5 ± 1.4	0.74 ± 0.07	73.6 ± 1.1
	Intermediate	0.55 ± 0.03	1.13 ± 0.10ab	3.62 ± 0.11	2.22 ± 0.05	28.1 ± 1.5	0.62 ± 0.07	75.6 ± 1.1
	Reactive	0.58 ± 0.03	1.28 ± 0.09a	3.40 ± 0.10	2.21 ± 0.04	27.9 ± 1.4	0.72 ± 0.06	74.8 ± 1.1
FS	Calm	0.57 ± 0.03	1.18 ± 0.10	3.54 ± 0.11	2.17 ± 0.04	30.6 ± 1.4a	0.82 ± 0.07a	75.5 ± 1.1
	Intermediate	0.51 ± 0.03	1.03 ± 0.09	3.44 ± 0.10	2.23 ± 0.04	26.8 ± 1.4b	0.66 ± 0.06ab	73.3 ± 1.1
	Reactive	0.56 ± 0.03	1.21 ± 0.10	3.66 ± 0.11	2.21 ± 0.04	26.2 ± 1.4b	0.61 ± 0.07b	75.3 ± 1.2
FD	Calm	0.56 ± 0.03	1.18 ± 0.09	3.67 ± 0.10a	2.17 ± 0.04	27.9 ± 1.4	0.76 ± 0.06	74.7 ± 1.1
	Intermediate	0.57 ± 0.03	1.10 ± 0.11	3.55 ± 0.11ab	2.24 ± 0.04	28.6 ± 1.5	0.68 ± 0.07	74.9 ± 1.2
	Reactive	0.52 ± 0.03	1.03 ± 0.10	3.39 ± 0.11b	2.20 ± 0.04	27.1 ± 1.4	0.64 ± 0.07	74.3 ± 1.1

Different letters on the same column and within each temperament traits are statistically different ($P \leq 0.05$).

¹ non-esterified fatty acid, ² beta-hydroxybutyrate, ³ gamma-glutamyl transferase.

those classified as ‘reactive’, while there was no relationship with classification by MR, RT, or FS (Table 4). The incidence of subclinical ketosis was associated with temperament groups when temperament was classified by MR ($P = 0.04$), and a tendency when it was classified by FS ($P = 0.09$). Also, there was an interaction between temperament classification by RT and parity for subclinical ketosis incidence ($P = 0.01$). For MR, ‘intermediate’ cows (16/26 = 61.5%) had a greater percentage of subclinical ketosis than ‘reactive’ (13/32 = 40.6%) and ‘calm’ (15/32 = 46.9%), and there was no interaction with parity. In contrast, ‘intermediate’ cows (14/33 = 42.4%) classified by FS test had a lower percentage than ‘calm’ (15/28 = 53.6%) and ‘reactive’ cows (15/29 = 51.7%), and parity did not show an interaction. For RT, the difference on percentage of subclinical ketosis as a function of temperament classes was not detected for PRIM cows (‘reactive’: 7/17 = 41.2%, ‘intermediate’: 4/8 = 50.0%; ‘calm’: 5/10 = 50.0%), while for MULT cows, ‘reactive’ had greater occurrence of subclinical ketosis (11/14 = 78.5%) than ‘intermediate’ (10/20 = 50%) and ‘calm’ (7/21 = 33.3%).

For blood Ca, only classification by MR had any relationship ($P = 0.05$), with those classified as ‘calm’ and ‘intermediate’ having lower values than ‘reactive’ (Table 4). Differences on blood levels of GGT and haptoglobin were not detected between groups when temperament was classified by MR, RT, or FD, but when it was classified by FS ($P \leq 0.05$). The cows classified by FS as ‘calm’ had greater GGT than did those classified as ‘intermediate’ or ‘reactive’ (Table 4). For haptoglobin, FS ‘calm’ cows had greater levels than ‘reactive’ cows (Table 4). Blood total protein was associated with temperament groups when temperament was classified by MR ($P = 0.05$), with ‘calm’ cows having lower total protein concentrations than ‘intermediate’ and ‘reactive’ cows (Table 4). When temperament was classified by RT, FS, or FD, the total blood protein differences between groups were not detected.

Table 5

Mean ± SEM for blood phosphorus (P), magnesium (Mg), Urea and aspartate aminotransferase (AST) by temperament [classified by milk reactivity (MR), racetime (RT), flight speed (FS) and flight distance (FD)] of Holstein cows keep in an automatic milking system during first 10 weeks postpartum.

Temperament traits		P (mmol/L)		Mg (mmol/L)		Urea (mmol/L)		AST (IU)	
		PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT	PRIM	MULT
MR	Calm	1.92 ± 0.09	1.80 ± 0.06	0.86 ± 0.07	0.78 ± 0.05	3.95 ± 0.32	5.21 ± 0.27	91.6 ± 5.6	106.1 ± 3.9
	Intermediate	1.98 ± 0.08	1.89 ± 0.07	0.77 ± 0.06	0.93 ± 0.05	4.55 ± 0.36	5.48 ± 0.23	104.8 ± 5.2	121.3 ± 4.6
	Reactive	2.01 ± 0.07	1.90 ± 0.07	0.87 ± 0.05	0.84 ± 0.05	4.94 ± 0.32	5.29 ± 0.23	95.0 ± 4.9	108.7 ± 4.2
RT	Calm	1.93 ± 0.09	1.91 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.79 ± 0.05	4.60 ± 0.28	5.41 ± 0.24	101.7 ± 5.6	102.9 ± 3.9b
	Intermediate	1.86 ± 0.09	1.84 ± 0.06	0.94 ± 0.07	0.87 ± 0.04	4.66 ± 0.29	5.69 ± 0.26	102.7 ± 6.2	114.9 ± 3.9a
	Reactive	2.07 ± 0.07	1.78 ± 0.07	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.05	4.02 ± 0.25	5.00 ± 0.22	92.0 ± 4.3	118.8 ± 4.7a
FS	Calm	1.91 ± 0.08	1.96 ± 0.06a	0.82 ± 0.06	0.82 ± 0.04	4.47 ± 0.30ab	5.13 ± 0.24	102.1 ± 5.4	116.6 ± 4.3
	Intermediate	2.05 ± 0.06	1.67 ± 0.07b	0.86 ± 0.05	0.89 ± 0.05	4.72 ± 0.26a	5.34 ± 0.25	96.0 ± 4.6	102.9 ± 4.5
	Reactive	1.92 ± 0.09	1.93 ± 0.06a	0.87 ± 0.06	0.78 ± 0.05	3.85 ± 0.34b	5.50 ± 0.23	93.6 ± 6.4	113.1 ± 4.1
FD	Calm	2.01 ± 0.08	1.90 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.84 ± 0.04	4.11 ± 0.28b	5.69 ± 0.23	95.7 ± 5.0	112.4 ± 4.1
	Intermediate	1.96 ± 0.09	1.89 ± 0.06	0.86 ± 0.07	0.80 ± 0.05	4.92 ± 0.33a	5.12 ± 0.24	102.8 ± 6.0	116.1 ± 4.3
	Reactive	1.95 ± 0.07	1.78 ± 0.07	0.90 ± 0.06	0.84 ± 0.05	4.37 ± 0.28ab	5.15 ± 0.25	94.7 ± 5.0	105.1 ± 4.5

Different letters on the same column and within each temperament traits are statistically different ($P \leq 0.05$).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to describe the metabolic profile, milk production, and composition of PRIM and MULT Holstein cows during the postpartum period milked in a pasture-based AMS. In addition, this is the first time that cow temperament has been related to these variables when using an AMS. Parity, temperament, and their interaction were related to some of the production traits and metabolic profiles during the first ten weeks of postpartum dairy cows.

In the present study, the relationship between temperament and productive and metabolic responses was conditioned by cows' parity, since these relations were evident only in MULT cows. 'Reactive' MULT cows (based on MR and RT) yielded more milk and its components than 'calm' cows, which was related to the greater milking frequency and lipomobilization found in the former animals. These results did not confirm our hypothesis that reactive cows would produce less milk than the calm ones, as previously reported by Marçal-Pedroza et al. (2020) and Hedlund and Løvlie (2015). However, our results agree with some reports, in which the reactive cows produced more milk (Gergovska et al., 2012; Sawa et al., 2017).

The different patterns of relationships between cattle temperament and productivity can be explained in the first instance by the fact that the different milking systems imply different degrees of human presence, with lower human contact during milking in AMS than in CMS. Nervous/reactive animals are usually more susceptible to stress during milking, which should lead to slow milk let down, reducing their production (Rushen et al., 1999; Szentléleki et al., 2015). However, the higher behavioural reactivity (more flinch/step/kick responses during milking) in cows is commonly related to human presence and/or negative stockperson behaviours (Waiblinger et al., 2002). For example, kicking cows had slower milk let down in CMSs only when a human being was present (Bertenshaw et al., 2008). In AMS, the least human contact could lead to the MULT reactive cows producing more than the calm ones in the present study.

A second explanation could be given by relationships between cattle temperament, feeding behaviour and DMI (Searle et al., 2010; Neave et al., 2018). Cows with different temperaments could behave differently during feeding, resulting in a differential DMI and lower milk yield. In fact, Sullivan and Burnside (1988) reported that more reactive cows displayed more agonistic behaviours, had greater milking reactivity and consumed more food. If agonistic interactions during feeding were part of cows' temperament (Gibbons et al., 2009), the relationship between MR or RT temperament classes and feeding behaviour could help to explain the higher milk yield for reactive cows in the present study. The 'reactive' cows might have had different feeding patterns, with more agonistic behaviour during grazing and/or eating more in the feeding box than the 'calm' cows, which could explain their higher milk yield. However, we might just speculate it, since the previous studies were conducted in confined systems, not yet being this investigated in grazing dairy cattle. Thus, it appears that the association of temperament with production in an AMS is not as simple as considering reactivity as a measure of fear during milking. It should consider the effects of other possible interactions, such as social dominance, agonistic and feeding behaviours. Additional research will be necessary to elucidate the nature of these relationships.

Finally, there was a relation between cows' temperament and milking frequency. Indeed, RT 'reactive' cows had a higher milking frequency, which could lead to a greater milk yield (Lyons et al., 2014). An increased number of AMS visits has been related to an increase in kicks (Santos et al., 2018), which indirectly might lead to associated milking reactivity and higher milk yield. Therefore, the influence on the milking interval or milking frequency of the temperament deserves to be confirmed by future studies. The milk component results should be considered with precaution since milk samples were collected once per milking, and the results may not be strictly extrapolated to all milkings.

The association of temperament with productive traits in PRIM cows

was not significant in this study, which is similar to that reported by Van Reenen et al. (2002) and Szentléleki et al. (2015) in a CMS. First, PRIM cows usually have higher kicking in the AMS than MULT cows, particularly in early lactation (Dechow et al., 2020). In addition, Donohue et al. (2010) reported that PRIM cows show long waiting times in the pre-milking area, which could induce stress. Thus, the responses to these stressors (during pre-milking and milking) might lead to a direct reduction in milk yield (Etim et al., 2013) masking the temperament effects on milk yield. Second, PRIM cows might display a lower frequency of agonistic behaviours than MULT cows (Gibbons et al., 2009), and the effect of temperament on productive or metabolic traits caused by feeding agonistic behaviour is less evident. Last, the milking frequency was not different between temperament classes for PRIM cows; therefore, the possible effect of milking frequency on milk yield might not have occurred.

An additional topic that deserves attention is the differences among the temperament tests that measure different behavioural aspects: the tests may not have the same relevance in an AMS as reported in a CMS. For example, the FD test was used to evaluate fear of humans, and this measure has been negatively associated with milk yield (Hemsworth et al., 2002) in CMS. It is possible that these factors did not influence the production traits in an AMS due to factor differences between milking systems, since in AMS, there is little human presence. In the CMS, the dimensions of temperament related to the response to humans are very relevant. In an AMS, dimensions related to sociability and aggressiveness should receive greater attention, since productivity differences could be due to hierarchical social or agonistic behaviour during feeding and/or premilking (waiting area). Therefore, the tests traditionally used in the evaluation of temperament may not have the same meaning when working with AMSs, and it is necessary to standardize the temperament measurements according to the milking system.

In the present study, the relationship between temperament and metabolic profiles was also influenced by parity since these were more evident for MULT than for PRIM cows. Greater blood NEFA concentrations found in temperamental beef cattle (measured by FS) suggest that they were metabolically different compared to calmer cattle (Burdick Sanchez et al., 2016). However, in our study, the MR 'calm' cows had greater NEFA than 'reactive' cows. Elevated serum NEFA causes insulin resistance (Hayirli, 2006), and this may result in different utilization of energy resources depending on the cow's temperament (Burdick Sanchez et al., 2016). Glucose requirements for lactose production in dairy cows are higher in the early postpartum period; therefore, the low milk yield for MR 'calm' cows might be explained by NEFA increasing with an effect on energy partitioning. On the other hand, greater lipomobilization (evidenced by BHB values) in RT 'reactive' cows than in 'calm' cows was expected due to high milk yield, which is in line with the increase in subclinical ketosis for RT 'reactive' cows. It is possible to speculate that the high milk yield and BHB in RT 'reactive' cows were related to the greater milking frequency, which was evidenced by our results, RT 'reactive' cows visited the AMS more frequently. For MR temperament classes, the high milk yield of 'reactive' cows mobilizing the same body fat as 'calm' cows could be explained by greater DMI and more energy efficiency, but it is also speculation since we did not measure feed intake and energy expenditure. Also, blood Ca, Mg and total protein concentrations were greater for MR 'reactive' cows than for 'calm' cows, which was expected after the speculation that MR 'reactive' cows ate more than 'calm' cows. In turn, the FS or FD tests were only related to a few of the minerals and enzymes. The higher GGT and haptoglobin results for FS 'calm' cows might indicate differences in liver metabolism between temperament classes. Greater AST values for MULT RT 'reactive' cows than for 'calm' cows might be related to the high percentage of subclinical ketosis observed in these cows since this disease has been related to plasma AST concentration (Couperus et al., 2021).

The productive and metabolic traits differed as a function of parity, regardless of the temperament. The MULT cows produced more than the

PRIM cows, which has been reported in previous studies in both production systems (CMS in pasture: [Adrien et al., 2012](#); CMS in confinement: [Wathes et al., 2007](#); [Rupprechter et al., 2018](#); CMS in mixed feeding system: [Morales Piñeyrúa et al., 2018](#); AMS in pasture: [Lessire et al., 2017](#); AMS in confinement: [Penry et al., 2018](#)). Despite this, the MULT cows did not have a greater metabolic status imbalance or subclinical ketosis incidence than PRIM cows, as found in some previous studies ([Wathes et al., 2007](#); [Morales Piñeyrúa et al., 2018](#)); therefore, PRIM cows mobilized their body fat similarly to MULT cows, producing less milk. This might be explained by PRIM cows spending more energy from their body reserves to cope with stress for a longer time in the waiting area, as previously suggested by [Donohue et al. \(2010\)](#). In AMS, MULT (with higher hierarchical rank) cows tend to enter the AMS more often without waiting and have more milking frequency than PRIM cows (with low hierarchical rank) ([Ketelaar-De Lauwere et al., 1998](#); [Córdova et al., 2020](#)). Unfortunately, the time spent in the premilking area was not measured in our study. The greater milking frequency of MULT cows than PRIM cows was confirmed in the present study, which is in accordance with a previous report showing that cows with higher milking frequency produce more milk ([Lyons et al., 2014](#)). Although MULT cows produced more milk than PRIM cows, blood Ca concentrations were not different between parities, contrary to the finding of [Rupprechter et al. \(2018\)](#), who reported lower Ca values for MULT than PRIM cows. Serum protein concentrations also did not differ for MULT and PRIM cows; therefore, protein mobilization might not be different for either parity. The lowest values of serum urea for PRIM cows may have been a consequence of lower protein intake (lower DMI) in these cows ([Bertoni et al., 2008](#)). The low AST values for PRIM cows could indicate differences in hepatic metabolism compared with MULT cows ([Cebra et al., 1997](#); [Steen, 2001](#)). However, the plasma minerals, proteins, and haptoglobin values and their postpartum evolutions followed the expected patterns for both parities ([Abeni et al., 2005](#); [Loor et al., 2013](#)).

5. Conclusion

In conclusion, the production and some metabolic traits of early postpartum Holstein cows kept in an AMS were different according to the cows' temperament, parity, and their interaction. The relationship between temperament and production depended on parity and the temperament tests used, evidencing greater production traits for MULT 'reactive' cows than 'calm' cows, but this did not occur for PRIM cows. These relationships were evidenced by MR and RT tests, but they were not found when using FS and FD tests. Regardless of parity, temperament was related to metabolic status in different ways according to the metabolite and temperament test, in general, having more lipomobilization and greater Ca levels for 'reactive' than for 'calm' cows. Although there was greater productivity in MULT cows than in PRIM cows, the blood biochemistry profiles did not vary according to parity.

Declarations of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

All procedures were approved by the Ethical Committee of Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, file number.2018.7).

Acknowledgements

The authors thankfully acknowledge Marcelo Pla and Juan Negrin (AMS workers) and Jacquelin Santa Cruz (student assistant) for help with data collection in the project. The authors also acknowledge Rocío Martínez and Alejandro Mendoza for help with nutritional data information, and Shane Maloney for English corrections and provided

valuable feedback on the manuscript. Financial support: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Route 50, km 11, Colonia, Uruguay) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación [ANII, Av. Italia 6201, Montevideo, Uruguay (Grant No. POS_NAC_2018_1_151523)].

References

- Abeni, F., Calamari, L., Calza, F., Speroni, M., Bertoni, G., Pirlo, G., 2005. Welfare assessment based on metabolic and endocrine aspects in primiparous cows milked in a parlor or with an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 88, 3542–3552. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73039-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73039-3).
- Adrien, L., Mattiauda, D., Artegoitia, V., Carriquiry, M., Motta, G., Bentancur, O., Meikle, A., 2012. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 6, 292–299. <https://doi.org/10.1017/S17517311100142X>.
- Aleri, J.W., Hine, B.C., Pyman, M.F., Mansell, P.D., Wales, W.J., Mallard, B., Fisher, A.D., 2016. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Res. Vet. Sci.* 108, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.07.007>.
- Bertenshaw, C.E., Rowlinson, P.R., Edge, H.L., Douglas, S., Shiel, R., 2008. The effect of different degrees of 'positive' human–animal interaction during rearing on welfare and subsequent production of commercial dairy heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.12.002>.
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M., 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 3300–3310. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0995>.
- Burdick Sanchez, N.C., Carroll, J.A., Broadway, P.R., Hughes, H.D., Roberts, S.L., Richeson, J.T., Schmidt, T.B., Vann, R.C., 2016. Cattle temperament influences metabolism: metabolic response to glucose tolerance and insulin sensitivity tests in beef steers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.02.009>.
- Careau, V., Thomas, D.K., Humphries, M.M., Réale, D., 2008. Energy metabolism and animal personality. *Oikos* 117, 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.2008.0030-1299.16513.x>.
- Cavestany, D., Blanc, J.E., Kulcsar, M., Uriarte, G., Chilibruste, P., Meikle, A., Febel, H., Ferraris, A., Krall, E., 2005. Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00679.x>.
- Cebra, C.K., Gerry, F.B., Getzy, D.M., Fettman, M.J., 1997. Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle: retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J. Vet. Intern. Med.* 4, 231–237.
- Chebel, R.C., Silva, P.R.B., Endres, M.I., Ballou, M.A., Luchterhand, K.L., 2016. Social stressors and their effects on immunity and health of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99, 3217–3228. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10369>.
- Córdova, H.A., Cardozo, L.L., Alessio, D.R.M., Thaler Neto, A., 2020. Comportamento de vacas da raça Holandesa em ordenha robotizada (behaviour of Holstein cows in robotic milking). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72, 263–272. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10057>.
- Couperus, A.M., Schroeder, F., Hettegger, P., Huber, J., Wittek, T., Peham, J.R., 2021. Longitudinal metabolic biomarker profile of hyperketonemic cows from dry-off to peak lactation and identification of prognostic classifiers. *Animals* 11, 1353. <https://doi.org/10.3390/ani11051353>.
- Damián, J.P., Terrazas, A., Cabrera, E., Simonetti, S., Aragunde, R., Fila, D., 2020. Growth of foetal bones and metabolic profile during gestation in primiparous ewes and multiparous ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 55, 1180–1189. <https://doi.org/10.1111/rda.13760>.
- Dechow, C.D., Sondericker, K.S., Enab, A.A., Hardie, L.C., 2020. Genetic, farm, and lactation effects on behavior and performance of US Holsteins in automated milking systems. *J. Dairy Sci.* 103, 11503–11514. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18786>.
- Donohue, R.H., Kerrisk, K.L., Garcia, S.C., Dickeson, D.A., Thomson, P.C., 2010. Evaluation of two training programs aimed to improve early lactation performance of heifers in a pasture-based automated milking system. *Anim. Prod. Sci.* 50, 939–945. <https://doi.org/10.1071/AN10061>.
- Duffield, T.F., Lissimore, K.D., McBride, B.W., Leslie, K.E., 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92, 571–580. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0).
- Elischer, M.F., Sordillo, L.M., Siegford, J.M., Karcher, E.L., 2015. Short communication: characterizing metabolic and oxidant status of pastured dairy cows postpartum in an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 98, 7083–7089. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8941>.
- Etim, N.N., Williams, M.E., Evans, E.I., Offiong, E.E.A., 2013. Physiological and behavioural responses of farm animals to stress: implications to animal productivity. *Int. J. Adv. Agric. Res.* 1, 53–61.
- Fariña, S., Chilibruste, P., 2019. Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: the case of farm systems in Uruguay. *Agric. Syst.* 176, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.001>.

- Gergovska, Z., Miteva, T., Angelova, T., Yordanova, D., Mitev, J., 2012. Relation of milking temperament and milk yield in Holstein and Brown Swiss cows. *Bulg. J. Agric. Sci.* 18, 771–777.
- Gibbons, J., Lawrence, A., Haskell, M., 2009. Responsiveness of dairy cows to human approach and novel stimuli. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.08.002>.
- Gibbons, J.M., Lawrence, A.B., Haskell, M.J., 2011. Consistency of flight speed and response to restraint in a crush in dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 131, 15–20.
- Grummer, R.R., Mashek, D.G., Hayirli, A., 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 20, 447–470. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.013>.
- Hayirli, A., 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenon-enon in postpartum dairy cattle. *Vet. Res. Commun.* 30, 749–774. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3320-6>.
- Hedlund, L., Løvlie, H., 2015. Personality and production: nervous cows produce less milk. *J. Dairy Sci.* 98, 5819–5828. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8667>.
- Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., Barnett, J.L., Borg, S., Dowling, S., 2002. The effects of cognitive behavioral intervention on the attitude and behavior of stockpersons and the behavior and productivity of commercial dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80, 68–78.
- Houston, A.I., 2010. Evolutionary models of metabolism, behaviour and personality. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 365, 3969–3975. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0161>.
- Huzzey, J.M., Nydam, D.V., Grant, R.J., Overton, T.R., 2011. Associations of prepartum plasma cortisol, haptoglobin, fecal cortisol metabolites, and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 5878–5889. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3391>.
- Kaps, M., Lamberson, W., 2004. *Biostatistics for Animal Science*. CABI Publishing, London, p. 445.
- Kay, J.K., Loor, J.J., Heiser, A., McGowan, J., Roche, J.R., 2015. Managing the grazing dairy cow through the transition period : a review pasture-based transition cow. *Anim. Prod. Sci.* 55, 936–942. <https://doi.org/10.1071/AN14870>.
- Ketelaar-De Lauwere, C.C., Metz, J.H.M., Schouten, W.G.P., 1998. Behaviour of dairy cows under free or forced cow traffic in a simulated automatic milking system environment. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 56, 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00076-2).
- Lessire, F., Froidmont, E., Shortall, J., Hornick, J.L., Dufresne, I., 2017. The effect of concentrate allocation on traffic and milk production of pasture-based cows milked by an automatic milking system. *Animal* 11, 2061–2069. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000659>.
- Loor, J.J., Bertoni, G., Hosseini, A., Roche, J.R., Trevisi, E., 2013. Functional welfare—using biochemical and molecular technologies to understand better the welfare state of periparturient dairy cattle. *Anim. Prod. Sci.* 53, 931–953. <https://doi.org/10.1071/AN12344>.
- Lyons, N.A., Kerrisk, K.L., Garcia, S.C., 2014. Milking frequency management in pasture-based automatic milking systems: a review. *Livest. Sci.* 159, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.011>.
- Marçal-Pedroza, M.G., Campos, M.M., Pereira, L.G.R., Machado, F.S., Tomich, T.R., Paranhos da Costa, M.J.R., Sant'Anna, A.C., 2020. Consistency of temperament traits and their relationships with milk yield in lactating primiparous F1 Holstein-Gyr cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 222, 104881. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104881>.
- Mazer, K.A., Knickerbocker, P.L., Kutina, K.L., Huzzey, J.M., 2020. Changes in behavior and fecal cortisol metabolites when dairy cattle are regrouped in pairs versus individually after calving. *J. Dairy Sci.* 103, 4681–4690. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17593>.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D., Chilibroste, P., 2004. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127, 727–737. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00080>.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28, 209–221.
- Morales Piñeyría, J.T., Fariña, S.R., Mendoza, A., 2018. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 191, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.017>.
- Neave, H.W., Weary, D.M., Von Keyserlingk, M.A.G., 2018. Review: individual variability in feeding behaviour of domesticated ruminants. *Animal* 1–12. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001325>.
- Pajor, E.A., Rushen, J., De Passillé, A.M.B., 2000. Aversion learning techniques to evaluate dairy cattle handling practices. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 69, 89–102. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00119-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00119-2).
- Penry, J.F., Crump, P.M., Hernandez, L.L., Reinemann, D.J., 2018. Association of milking interval and milk production rate in an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 101, 1616–1625. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12196>.
- Proudfoot, K.L., Weary, D.M., LeBlanc, S.J., Mamedova, L.K., von Keyserlingk, M.A.G., 2018. Exposure to an unpredictable and competitive social environment affects behavior and health of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14115>.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev.* 82, 291–318.
- Rupprechter, G., Adrien, M.L., Larriestra, A., Meotti, O., Batista, C., Meikle, A., Noro, M., 2018. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 118, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.02.005>.
- Rushen, J., de Passillé, A.M.B., Munksgaard, L., 1999. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. *J. Dairy Sci.* 82, 720–727. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75289-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75289-6).
- Santos, L.V., Brüggemann, K., Ebinghaus, A., König, S., 2018. Genetic parameters for longitudinal behaviour and health indicator traits generated in automatic milking systems. *Arch. Anim. Breed* 61, 161–171. <https://doi.org/10.5194/aab-61-161-2018>.
- Sawa, A., Bogucki, M., Neja, W., Krężel-Czopek, S., 2017. Effect of temperament on performance of primiparous dairy cows. *Ann. Anim. Sci.* 17, 863–872. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0085>.
- Searle, K.R., Hunt, L.P., Gordon, I.J., 2010. Individualistic herds: individual variation in herbivore foraging behavior and application to rangeland management. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.10.005>.
- Steen, A., 2001. Field study of dairy cows with reduced appetite in early lactation: clinical ex-aminations, blood and rumen fluid analyses. *Acta Vet. Scand.* 42, 219–228.
- Sullivan, B.P., Burnside, E.B., 1988. Can we Change the Temperament in the Dairy Cow? <http://cgil.uoguelph.ca/pub/articles/temp.html>.
- Sutherland, M.A., Dowling, S.K., 2014. The relationship between responsiveness of firstlactation heifers to humans and the behavioral response to milking and milk production measures. *J. Vet. Behav.* 9, 30–33.
- Sutherland, M.A., Huddart, F.J., 2012. The effect of training first-lactation heifers to the milking parlor on the behavioral reactivity to humans and the physiological and behavioral responses to milking and productivity. *J. Dairy Sci.* 95, 6983–6993. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5211>.
- Szentléleki, A., Nagy, K., Széplaki, K., Kékesi, K., Tozsér, J., 2015. Behavioural responses of primiparous and multiparous dairy cows to the milking process over an entire lactation. *Ann. Anim. Sci.* 15, 185–195. <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0064>.
- Tatone, E.H., Duffield, T.F., Leblanc, S.J., Devries, T.J., Gordon, J.L., 2017. Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *J. Dairy Sci.* 100, 1308–1318. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11453>.
- Tyrrell, H.F., Reid, J.T., 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48, 1215–1223.
- Van Reenen, C.G., Van der Werf, J.T.N., Bruckmaier, R.M., Hopster, H., Engel, B., Noordhuizen, J.P.T.M., Blokhuis, H.J., 2002. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. *J. Dairy Sci.* 85, 2551–2561. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74338-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74338-5).
- Wagner-Storch, A.M., Palmer, R.W., 2003. Feeding behavior, milking behavior, and milk yields of cows milked in a parlor versus an automatic milking system. *J. Dairy Sci.* 86, 1494–1502.
- Waiblinger, S., Menke, C., Coleman, G., 2002. The relationship between attitudes, personal characteristics and behaviour of stockpeople and subsequent behaviour and production of dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79, 195–219. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00155-7).
- Waiblinger, S., Boivin, X., Pedersen, V., Tosi, M.V., Janczak, A.M., Visser, E.K., Jones, R.B., 2006. Assessing the human-animal relationship in farmed species: a critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101, 185–242.
- Wankhade, P.R., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Ramesha, K.P., Sejian, V., Rajendran, D., Varghese, M.R., 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: a review. *Vet. World* 10. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1367-1377>.
- Wathes, D., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V., Coffey, M., Brotherstone, S., 2007. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the interrelationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 203–225. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.05.004>.
- Wiktorsson, H., Sorensen, J.T., 2004. Implications of automatic milking on animal welfare. In: Meijering, A., Hogeveen, H., de Koning, C.J.A.M. (Eds.), *Automatic Milking—a Better Understanding*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 371–381.

Anexo III: Publicación III

The effects of heat stress on milk production and the grazing behavior of dairy Holstein cows milked by an automatic milking system

Jéssica T. Morales-Piñeyrúa,^{*,1} Juan P. Damián,[†] Georget Banchemo,[‡] and Aline C. Sant'Anna^{§,2}

^{*}Programa Nacional de Producción de Leche, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia, 70000, Uruguay

[†]Departamento de Biociencias Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 8 km 18, Montevideo, 1300, Uruguay

[‡]Programa Nacional de Producción de Carne y Lana, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km 11, Colonia, 70000, Uruguay

[§]Departamento de Zoología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 36036-900, Brazil

²CNPq Researcher.

¹Corresponding author: jmorales@inia.org.uy

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the productive performance and grazing behavior of 25 primiparous and 44 multiparous Holstein cows in a pasture-based automatic milking system (AMS) while experiencing heat stress (defined as a temperature–humidity index [THI] ≥ 68). Productive traits were analyzed according to the THI from days 0, -1, -2, and -3 in relation to the milking day, and grazing behaviors (expressed as the percentage of daily observation time) were related to the average THI only on the day of observation. Milk yield was not associated with the THI on day 0, but a significant linear relationship was found with the THI on the three previous days, decreasing approximately 0.18 kg (primiparous) and 0.40 kg (multiparous) per THI unit increment. In contrast, for multiparous cows only, the milking frequency was positively associated with the THI on the day of evaluation but not on the previous days, increasing 0.01 milking/THI unit increments. Additionally, for each unit of THI increment, cows spent 0.14% more time standing, whereas they exhibited a decrease in grazing, lying, and ruminating behaviors time by 0.30%, 0.04%, and 0.70%, respectively, for both parities. In conclusion, milk loss was related to heat stress conditions from the previous days, but not milking frequency, which increased with the THI of the same milking day. Lower grazing, lying, and ruminating activities and greater standing behavior were observed due to heat stress.

Lay summary

In higher temperature conditions, dairy cows under pasture-based automatic milking systems may experience heat stress, affecting their health and productive performance. In the present study, the relationships between heat stress, measured by the temperature–humidity index (THI), productive traits, and grazing behaviors were evaluated. Cows exhibited an increase in milking frequency and their time standing, decreasing the time grazing, lying, and ruminating as the THI increased on the same day. Additionally, cows had decreased milk production when the THI increased in the previous days. Understanding how cows adjust their grazing behavior to handle changes in the environment allows for the development of management strategies designed to improve animal welfare.

Keywords: animal welfare; milking visits; pasture; summer.

Abbreviations: AMS, automatic milking system; aT, air temperature; CMS, conventional milking system; INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria; RH, relative humidity; THI, temperature–humidity index

Introduction

Heat stress, measured by the temperature–humidity index (THI), is well known to cause negative impacts on animal welfare, performance, and the economy of the conventional milking system (CMS) (Sejian et al., 2018). However, in automatic milking systems (AMS), the effects of heat stress remain insufficiently studied. Wildridge et al. (2018) reported that cows in AMS exposed to heat stress might show lower milking frequency and produce less milk, having greater productive losses than cows in CMS (Speroni et al., 2006). The milking frequency is related to the animals' motivations to move voluntarily (Prescott et al., 1998). Under heat stress,

cows might decrease their level of activity (John et al., 2016), leading to reduced milking frequency, which would indirectly affect milk production.

On the other hand, feed intake is another factor that could explain the milk loss of cows under heat stress (West, 2003), which could be related to cows' feeding behaviors. In CMS, cows under heat stress have reduced feed intake, rumination, and lying time (Frazzi et al., 2000; Tapki and Sahin, 2006; Garner et al., 2017). This reduction could be different for cows in AMS because they have the opportunity to move to new paddocks according to their motivation to graze or lie (Gregorini et al., 2006). However, it is not known how heat stress impacts

Received February 15, 2022 Accepted June 21, 2022.

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society of Animal Science. All rights reserved.

For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

the grazing behavior and activity of dairy cows associated with AMS. Considering the expected climatic change scenario, it is important to better understand the impacts of warm conditions on livestock production in temperate climate regions. Therefore, the aim of this study was to evaluate the productive performance and grazing behavior of Holstein cows in a pasture-based AMS under heat stress conditions.

Materials and methods

Experimental design and animals

All procedures were approved by the Ethical Committee of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, file number 2018.7). The experiment was performed with 25 primiparous (average milk yield 19.9 ± 4.5 kg and 191 ± 50 days in milk) and 44 multiparous (average milk yield 27.2 ± 4.6 kg, parity of 3.3 ± 1.0 calvings and 180 ± 39 days in milk) Holstein cows of the AMS (GEA Farm Technologies, Bönen, Germany) of the dairy research station of INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay, $34^{\circ}35'S$, $57^{\circ}70'W$). Selectively forced cow traffic was applied in the AMS (as defined by Wiktorsson and Sørensen, 2004), where the cows that had been milked within the past six hours (except for cows that had an incomplete milking at their last entry) were returned to the feeding area, whereas the others were admitted to the waiting area and the milking monobox and then moved to a new pasture area. During the experimental period (November 2019), the cows' diet consisted of access to the pasture (mixture of *Medicago sativa*, *Dactylis glomerata*, and *Lolium perenne*) and commercial concentrate (delivered in the milking and feeding boxes of the AMS). All cows were kept in a single group but had daily access to rotational grazing pasture strips in three of the 43 ha paddocks at sectors A, B, and C, which were opened at different times (Fig. 1). The daily grazing strip sizes were adjusted weekly, totaling an average of 21.9 kg of dry matter/cow per day in the three strips. Paddocks and alleys had no shade, which was only available in the AMS infrastructure. The distance walked from the paddocks to the milking parlor ranged from 10 to 1,020 m, and all cows were exposed to the same distances on each

experimental day. Water was available *ad libitum* from automatic water troughs in the paddocks.

Behavior and productive traits collection

Cows' behaviors during grazing were directly observed by nine trained people (the interobserver reliabilities for all behavioral categories were >0.89 based on the Kappa coefficient) using instantaneous scan sampling at 10 min intervals (DeVries et al., 2003; Hämäläinen et al., 2016; Grille et al., 2019) for 12 h a day during the diurnal period (from 0600 to 1800 hours), for 10 d (5 weekdays, followed by a 2-d interval and then 5 more weekdays of observation). The behaviors recorded were "stand" (the cow was with its body supported by the four legs fully perpendicular to the ground), "lie" (the cow was resting sternally or laterally, with its body in contact with the ground and the body was not supported by the legs), "grazing" (cow with its head down, searching, selecting, cutting or biting a mouthful of grass), "ruminate" (cow regurgitating a bolus and chewing actively, moving her jaw to masticate the bolus), and "inactivity" (animal with its head and ears in a normal position, not performing any apparent activity). In each observation period, one observer remained at the entrance of the paddock, recording the time of entry and exit of the cows. During the observation period, cows could be in any one of the three grazing paddocks (A, B, or C), in the milking box, or in the AMS infrastructure (except the milking box) and alleys, here defined as "other places" that included cows moving to and inside the AMS and the unsuccessful AMS visits (time spent in AMS facilities without being milked).

Daily milk yield (kg/day) and milking frequency (defined as the number of successful voluntary visits to the milking machine) were automatically recorded using the milking system. These values were obtained for 12 days (the same 10 days of behavioral observations plus the 2-day interval between behavioral sessions).

Temperature and humidity index and statistical analysis

The average air temperature (aT in $^{\circ}C$) and relative humidity (RH in %) were obtained from the automatic meteorological

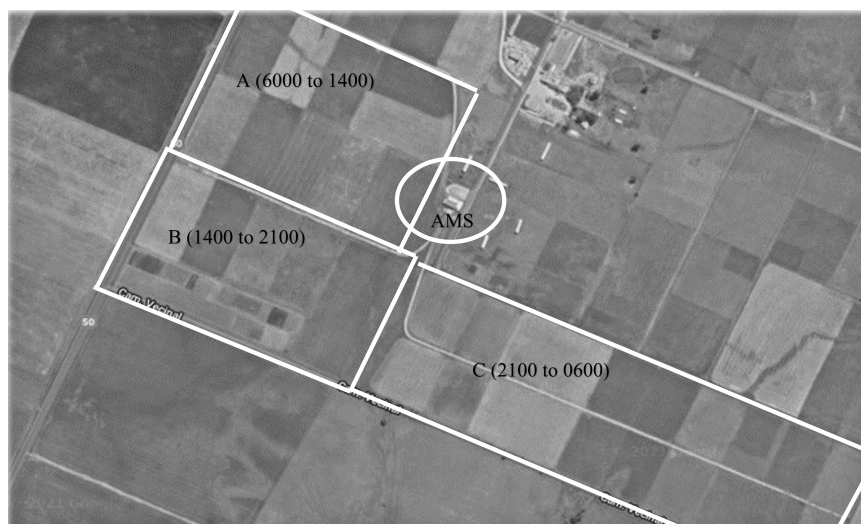


Figure 1. Automatic milking system (AMS) with its grazing paddocks separated into three sectors, A, B, and C, which opened at separate times of the day.

station (temperature and humidity sensor: HMP45C model, Campbell Scientific, Inc., Barcelona, Spain) located 1 km away from the AMS. The daily average THI on the same 12 days of milk yield recordings plus the 3 days preceding the milk yield measurement (referred to as days -3, -2, -1) was calculated according to the National Research Council formula as follows: $\text{THI} = (1.8aT + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times \text{RH}) \times (1.8aT - 26)]$ (NRC, 1971). During the THI assessment period (15 days), the cows were under heat stress conditions since the daily average THI values were above 68 (Román et al., 2019) (Fig. 2).

Linear or generalized mixed models (depending on the response variable distribution) were conducted with SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to explore the association of the daily average THI with the milk yield, milking frequency, cows' behaviors, and location (grazing paddocks or "other places"). First, a linear mixed model with the THI (continuous variable) as a covariate and the random effect of animal repeated within the day of assessment was used to analyze the association of the milk yield and milking frequency with the THI at days 0, -1, -2, and -3 in relation to the milking day. Data were analyzed separately by parity (one dataset for multiparous cows and the other for primiparous cows). The means of the milk yield and milking frequency from the previous days to the experiment and days in milk were also included as covariates with linear effects. In addition, the random effect of sire was included in the milk yield models. Second, to analyze the relationship between the behaviors and THI on the same day of observation, the following categories were used as dependent variables: stand inactive, stand grazing, stand ruminating, lie inactive, lie ruminating, and models for repeated measures, including the fixed effect of parity, were performed. The THI (continuous variable) and days in milk were used as covariates with linear effects and the random effect of animals repeated within the day of assessment. The behavioral categories and locations (grazing paddocks or "other places") were expressed as percentages of the daily observation time. Post hoc analysis was performed using Tukey's test. The α values were considered significant when ≤ 0.05 .

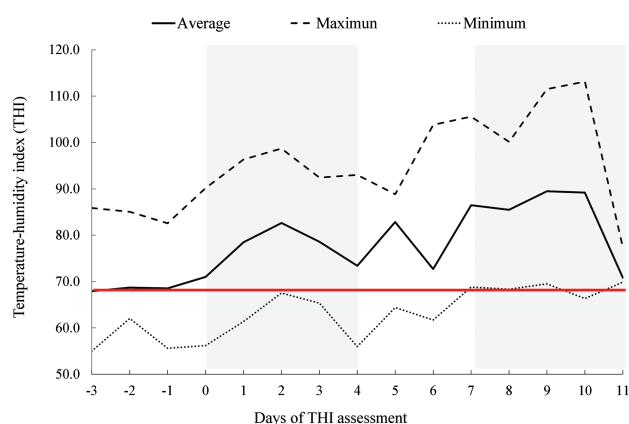


Figure 2. The average, maximum, and minimum temperature-humidity index (THI) was calculated as $(1.8aT + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times \text{RH}) \times (1.8aT - 26)]$ (NRC, 1971) during the 15 days of THI assessment. Holsteins cows were under heat stress (red line indicates that the threshold THI = 68, based on Román et al., 2019). The gray zones are the 10 days of behavioral observation, and the days 0 to 11 correspond to the 12 days of milk yield recordings.

Results and discussion

The milk yield was not associated with the THI of day 0 (same day) for both parities (primiparous, $P = 0.18$; multiparous, $P = 0.32$), but it was related to the THI of the previous days ($P < 0.0001$). The milk yield decreased per THI unit increment for multiparous (day -1: -0.38 kg; day -2: -0.41 kg and day -3: -0.40 kg) and primiparous (day -1: -0.18 kg; day -2: -0.20 kg and day -3: -0.15 kg) cows as a function of the THI. The milking frequency was positively associated with the THI on the same day of evaluation, increasing 0.01 milking/THI unit increment ($P = 0.04$) for multiparous cows but not for primiparous cows ($P = 0.27$). The milking frequency was not related to the THI of the 3 previous days for either parity (all P -values > 0.05). The delay of the direct effects of heat stress on milk yield is consistent with the findings by Wildridge et al. (2018) in pasture-based AMS, but with a greater level of reduction in our study. This may be due to differences in THI conditions from Wildridge et al. (2018) (average THI of 61.6 ± 4.5) compared to the THI values from our study (average THI of 80.5 ± 7.2).

While in the present study the THI values of the same day were positively associated with milking frequency, Wildridge et al. (2018) reported a negative association between the milking frequency and high THI conditions on days -1 and -2. These authors did not separate data by cows' parity and did not report information about shade (e.g. shade locations and availability), which could explain, in part, the differences found between the studies. Considering the common behavioral adaptations of cows during hot weather, it could be expected that cows would reduce their level of activity by staying in the pastures rather than walking to the AMS (generating more heat). A possible explanation is that multiparous cows under severe heat stress moved to the milking facilities more frequently because the pasture and alleys had no shade. More frequent visits to the AMS would increase the chance of cows being milked, resulting in an increase in milking frequency. When there is shade in the waiting area of a pasture-based AMS, cows might increase the voluntary waiting time for milking (Wildridge et al., 2017). We speculate that multiparous cows cope with heat stress conditions by changing their behavior with an increase in AMS visits, which could be motivated by shade seeking and/or by the cows' preference to eat the concentrate (which was offered in the milking box) over forage under heat stress (Gauly and Ammer, 2020).

Regarding grazing behavior, on the one hand, we observed that cows spent 0.14% more time in stand inactive behavior/THI unit increments ($P < 0.0001$). On the other hand, cows exhibited decreased percentage of time spent in stand grazing ($P < 0.0001$), lie inactive ($P = 0.02$), and lie ruminating ($P < 0.0001$) behaviors by 0.30%, 0.04% and 0.70% per THI unit increment, respectively. The stand ruminating behavior was not related to the THI ($P = 0.99$). Heat-stressed dairy cows in CMS spend more time standing and exhibit reduced lying, grazing, and ruminating behaviors (Darcán et al., 2008; Provolo and Riva, 2009; Curtis et al., 2017), which is consistent with our results. In addition, the time spent in grazing paddocks was negatively associated with the THI, while the time spent in "other places" was positively associated with the THI ($P < 0.0001$ for both). The proportion of observation time in the paddocks decreased 1.0%/THI unit increment, and in "other places", it increased 1.0%/THI unit increment. This could mean that heat-stressed cows were seeking shade

(the grazing paddocks had no shade) and, therefore, moved to the AMS and remained in its infrastructures or alleys (i.e., “other places”) and not in the pastures. One of the most instantaneous and profound behavioral changes seen in heat-stressed animals is shade seeking (Curtis et al., 2017), where cows prefer to be in barns than in pastures under heat stress conditions (Ketelaar-de Lauwere et al., 1999). These facts would affect not only cows’ milk performance since they would not be consuming enough food or energy but also their welfare. Therefore, our results reaffirm the importance of having shade in grazing paddocks.

Conclusions

In summary, under the conditions of the present study, we evinced milk loss related to heat stress conditions from the previous days but not for the THI on the same milking day. There was a relationship between the milking frequency and THI value on the same day of evaluation but not with the THI of the previous days. Multiparous (but not primiparous) cows modified their milking frequency according to the THI, visiting the AMS more frequently as the THI increased. Grazing and lying behaviors were reduced, and cows spent less time in paddocks and more time in the alleys and AMS facilities as the THI increased.

Acknowledgments

The authors thank Marcelo Pla and Juan Negrin (AMS workers) and Álvaro Gómez, Cristian González, and Gonzalo Viroga (student assistant) for help with the data collection in the project. Financial support: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria [INIA, Route 50, km 11, Colonia, Uruguay (Grant No. N-23765 PL_25_0_00)] and Agencia Nacional de Investigación e Innovación [ANII, Av. Italia 6201, Montevideo, Uruguay (Grant No. POS_NAC_2018_1_151523)].

Conflict of Interest Statement

None of the authors of this paper have a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Literature Cited

Curtis, A. K., B. Scharf, P. A. Eichen, and D. E. Spiers. 2017. Relationships between ambient conditions, thermal status, and feed intake of cattle during summer heat stress with access to shade. *J. Therm. Biol.* 63:104–111. doi:10.1016/j.jtherbio.2016.11.015.

Darcan, N., F. Cedden, and S. Cankaya. 2008. Spraying effects on some physiological and behavioral traits of goats in a subtropical climate. *Ital. J. Anim. Sci.* 7:77–85. doi:10.4081/ijas.2008.77.

DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, and K. A. Beauchemin. 2003. Short Communication: Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4079–4082. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)74020-X.

Frazzini, E., L. Calamari, F. Calegari, and L. Stefanini. 2000. Behavior of dairy cows in response to different barn cooling systems. *Trans. ASABE* 43:387–394. doi:10.13031/2013.2716.

Garner, J. B., M. Douglas, S. R. O. Williams, W. J. Wales, L. C. Marett, K. DiGiacomo, B. J. Leury, and B. J. Hayes. 2017. Responses of

dairy cows to short-term heat stress in controlled-climate chambers. *Anim. Prod. Sci.* 57:1233–1241. doi:10.1071/an16472.

Gauly, M., and S. Ammer. 2020. Review: challenges for dairy cow production systems arising from climate changes. *Animal* 14:s196S196–s196S203. doi:10.1017/s1751731119003239.

Gregorini, P., S. Tamminga, and S. A. Gunter. 2006. Review: behavior and daily grazing patterns of cattle. *Prof. Anim. Sci.* 22:201–209. doi:10.15232/S1080-7446(15)31095-0.

Grille, L., M. L. Adrien, M. Olmos, P. Chilibros, and J. P. Damián. 2019. Diet change from a system combining total mixed ration and pasture to confinement system (total mixed ration) on milk production and composition, blood biochemistry and behavior of dairy cows. *Anim. Sci. J.* 90:1484–1494. doi:10.1111/asj.13288.

Hämäläinen, W., S. Ruuska, T. Kokkonen, S. Orkola, and J. Mononen. 2016. Measuring behaviour accurately with instantaneous sampling: A new tool for selecting appropriate sampling intervals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 180:166–173. doi:10.1016/j.applanim.2016.04.006.

John, A. J., C. E. F. Clark, M. J. Freeman, K. L. Kerrisk, S. C. Garcia, and I. Halachmi. 2016. Review: Milking robot utilization, a successful precision livestock farming evolution. *Animal* 10:1484–1492. doi:10.1017/S1751731116000495.

Ketelaar-de Lauwere, C. C., A. H. Ipema, E. N. J., van Ouwkerk, M. M. W. B. Hendriks, J. H. M. Metz, J. P. T. M. Noordhuizen, and W. G. P. Schouten. 1999. Voluntary automatic milking in combination with grazing of dairy cows: Milking frequency and effects on behavior. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 64:91–109. doi:10.1016/S0168-1591(99)00027-1.

National Research Council. 1971. *A guide to environmental research on animals*. National Academies Press, Washington, DC.

Prescott, N. B., T. T. Mottram, and A. J. F. Webster. 1998. Relative motivations of dairy cows to be milked or fed in a Y-maze and an automatic milking system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 57:23–33. doi:10.1016/S0168-1591(97)00112-3.

Provolo, G., and E. Riva. 2009. One year study of lying and standing behavior of dairy cows in a freestall barn in Italy. *JAE* 40:27–33. doi:10.4081/jae.2009.2.27.

Roman, L., C. Saravia, L. Astigarraga, O. Bentancur, and A. La Manna. 2019. Shade access in combination with sprinkling and ventilation effects performance of Holstein cows in early and late lactation. *Anim. Prod. Sci.* 59:347–358. doi:10.1071/an16571.

Sejian, V., R. Bhatta, J. B. Gaughan, F. R. Dunshea, and N. Lacetera. 2018. Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12:s431–s444. doi:10.1017/S1751731118001945.

Speroni, M., G. Pirlo, and S. Lolli. 2006. Effect of automatic milking systems on milk yield in a hot environment. *J. Dairy Sci.* 89:4687–4693. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72519-X.

Tapki, I., and A. Sahin. 2006. Comparison of the thermoregulatory behaviors of low and high producing dairy cows in a hot environment. *Anim. Behav. Sci.* 99:1–11. doi:10.1016/j.applanim.2005.10.003.

West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2131–2144. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X.

Wiktorsson, H., and J. T. Sørensen. 2004. Implications of automatic milking on animal welfare. In: Meijering A., H. Hogeveen, C. J. A. M. de Koning, editors. *Automatic milking—a better understanding*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers; pp. 371–381.

Wildridge, A. M., S. C. Garcia, P. C. Thomson, E. C. Jongman, C. F. Clark, and K. L. Kerrisk. 2017. The impact of a shaded premilking yard on a pasture-based automatic milking system. *Anim. Prod. Sci.* 57:1219–1225. doi:10.1071/AN16491.

Wildridge, A. M., P. C. Thomson, S. C. Garcia, A. J. John, E. C. Jongman, C. E. F. Clark, and K. L. Kerrisk. 2018. Short communication: The effect of temperature-humidity index on milk yield and milking frequency of dairy cows in pasture-based automatic milking systems. *J. Dairy Sci.* 101:4479–4482. doi:10.3168/jds.2017-13867.