

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TEMPERAMENTO DE VACAS CRUZADAS HOLANDÊS-GIR:
RESPOSTA AO TREINAMENTO PARA A PRIMEIRA ORDENHA
E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS**

**Paula Alicia Batista Taborda
Engenheira Agrônoma**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TEMPERAMENTO DE VACAS CRUZADAS HOLANDÊS-GIR:
RESPOSTA AO TREINAMENTO PARA A PRIMEIRA ORDENHA
E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS**

Paula Alicia Batista Taborda

Orientador: Prof. Dr. Mateus J. Rodrigues Paranhos da Costa

Coorientadores: Dr. Tiago da Silva Valente

Dr. Marcos Vinicius Barbosa da Silva

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Genética e
Melhoramento Animal.**

T114t

Taborda, Paula Alicia Batista

Temperamento de vacas cruzadas Holandês-Gir: Resposta ao treinamento para a primeira ordenha e estimativa de parâmetros genéticos / Paula Alicia Batista Taborda. -- Jaboticabal, 2021

91 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Mateus Jose Rodrigues Paranhos da Costa

Coorientador: Tiago da Silva Valente e Marcos Vinicius Barbosa da Silva

1. Bovino de leite. 2. Temperamento na ordenha. 3. Parâmetros genéticos. 4. Habituação de novilhas. 5. Inferência Bayesiana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TEMPERAMENTO DE VACAS CRUZADAS HOLANDÊS-GIR: RESPOSTA AO TREINAMENTO PARA A PRIMEIRA ORDENHA E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS

AUTORA: PAULA ALICIA BATISTA TABORDA

ORIENTADOR: MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA

COORIENTADOR: MARCOS VINÍCIUS GUALBERTO BARBOSA DA SILVA

COORIENTADOR: TIAGO DA SILVA VALENTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal


Profa. Dra. ALINE CRISTINA SANT' ANNA (Participação Virtual)
UFJF / Juiz de Fora/MG


Pesquisador Dr. ROBERTO CARVALHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. LUCIANDRA MACEDO DE TOLEDO (Participação Virtual)
APTA - Instituto de Zootecnia / Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. LUCIA GALVÃO DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / Unesp - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de outubro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paula Alicia Batista Taborda, nascida em 25 de agosto de 1986, na cidade de Paysandú, Uruguai. Iniciou seus estudos em Engenharia Agrônômica em 2005 na Faculdade de Agronomia da Universidade da República Oriental do Uruguai, em Montevideu, Uruguai. Em 2008, durante 12 meses, foi assistente honorária do Departamento de Produção Animal e Pastagens, no departamento de Zootecnia (Melhoramento Genético Animal), da Faculdade de Agronomia da Universidade da República Oriental do Uruguai, em Montevideu. Em 2010 deu continuidade à especialização de orientação Agropecuária na cidade de Paysandú da carreira de Engenharia Agrônômica, obtendo a graduação em 2012. No mesmo ano iniciou o Mestrado em Ciências Agrônômicas, opção Ciência Animal, na Faculdade de Agronomia, Universidade da República Oriental do Uruguai, nas cidades de Montevideu e Paysandú (Uruguai), obtendo o título em 2017. De 2011 a 2017 ocupou o cargo de professor assistente do Departamento de Produção Animal e Pastagens, na cátedra de Zootecnia (Melhoramento Genético Animal) na Faculdade de Agronomia da Universidade da República Oriental do Uruguai, Estação Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”, EEMAC, na cidade de Paysandú. Paralelamente, de 2011 a 2017, assumiu o cargo de professor assistente no Instituto de Produção Animal, Departamento de Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da República, em Montevideu. Em 2017 iniciou seus estudos de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campús de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil.

Dedico

Ao meu bebê Caetano, meu maior desejo e presente, o amor de todos os meus dias.

À minha mãe Maia e irmã Iaia, obrigada por sempre me acompanharem e me darem forças, embora estivéssemos a mais de 2.000 km de distância, estávamos sempre juntas e agora mais!

À Blu que sempre esteve comigo nesses anos.

Eu adoro todos vocês!!

AGRADECIMENTOS

Ao Sagrado Coração de Jesus.

A minha mãe Maia e minha irmã Iaia por sempre estar presentes nos momentos importantes de minha vida, são meu pilar e meu exemplo de vida, admiro e adoro vocês!

A meu bebê Caetano, meu maior tesouro, meu amor, vou te apoiar sempre e caminhar no seu lado, te amo! Você me escolheu para ser sua mãe e vou fazer isso com todas as minhas forças!

Ao Programa de Pós-graduação e Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, pela oportunidade de realizar meu doutorado e a todos os docentes deste programa que aportaram seu conhecimento e ofereceram sua amizade a mim.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da bolsa de estudo.

Ao Prof. Mateus J. R. Paranhos da Costa pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao Tiago Valente e Marcos Vinicius pela co-orientação e ensinamentos.

A Monique pela amizade, acompanhamento nas fazendas, ensinamentos e muitos dias compartilhados.

As fazendas que deram a oportunidade de coletar os dados para o estudo que serão de utilidade também para eles.

Quero fazer um agradecimento especial para Suelen Carol e Suellen que sempre estiveram comigo nos momentos felizes e tristes, fizeram sentir como em casa, vou levar vocês sempre no meu coração!

Também quero agradecer meus amigos do grupo ETCO Júlia, Mayara, Valentina, André, João, Luane, Douglas pelos momentos vividos e nossa amizade.

A Karen que me ajudou no começo quando tudo era novo para mim e fizemos uma linda amizade.

A meus amigos do grupo de Melhoramento, Patrícia, Gerardo, Marissa, em especial a Cherlynn que esteve sempre comigo nos momentos de melhoramento e estágio, a Marta, que compartilhamos momentos de alívio, compreensão e sorrisos.

Ao Rodrigo, Ana Carolina e Andrea que me ajudaram nos últimos momentos de minha carreira, incentivando para acabar e ajudando nas minhas dúvidas.

Aos professores da banca do exame geral de qualificação, professora Dra. Aline Cristina Sant'Anna, Professores Dr. Mateus J. R. Paranhos da Costa, Dr. Henrique Nunes de Oliveira, Dr. Humberto Tonhati, Dr. Roberto Carvalheiro, pela disposição, ensinamentos, aportes e sugestões muito bem recebidas.

Aos professores da banca da defesa, professoras Dra. Aline Cristina Sant'Anna, Dra. Lucia Galvão de Albuquerque, Dra. Luciandra Macedo de Toledo, professores Dr. Mateus J. R. Paranhos da Costa, Dr. Roberto Carvalheiro, pela disposição, ensinamentos, aportes e sugestões muito bem recebidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. <i>Importância da avaliação temperamento para a bovinocultura leiteira.....</i>	<i>4</i>
2.2. <i>A importância da adoção de boas práticas de manejo para vacas leiteiras primíparas.....</i>	<i>8</i>
2.3. <i>Variação genética e estimativa de parâmetros genéticos para características de temperamento em bovinos leiteiros.....</i>	<i>12</i>
2.3.1. <i>Estimativas de herdabilidade de temperamento em bovinos leiteiros.....</i>	<i>13</i>
2.3.2. <i>Associação entre temperamento e outras características de interesse econômico.....</i>	<i>17</i>
3. Objetivo geral.....	19
4. Objetivos específicos.....	19
5. Referencias.....	20
 CAPITULO 2 – Individual differences in the behavioral responsiveness of F1 Holstein-Gyr heifers to the training for milking routine.....	 26
1. Introduction.....	27
2. Materials and methods.....	28
2.1. <i>Location and animals.....</i>	<i>28</i>
2.2. <i>Training protocol.....</i>	<i>29</i>
2.3. <i>Statistical analyses.....</i>	<i>31</i>
3. Results and discussion.....	32
4. Conclusion.....	43
5. References.....	44

CAPITULO 3 - Estimation of genetic parameters for milking temperament in Holstein-Gyr cows.....	47
1. Introduction.....	48
2. Materials and methods.....	50
2.1. <i>Animals and housing conditions.....</i>	<i>50</i>
2.2. <i>Milking temperament assessment.....</i>	<i>52</i>
2.3. <i>Statistical analyses.....</i>	<i>53</i>
3. Results and discussion.....	56
4. Conclusions.....	61
5. References.....	62
 CAPITULO 4 – Considerações finais.....	 67

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Associações genéticas e fenotípicas entre reatividade na ordenha e características produtivas, reprodutivas e de saúde em vacas da raça Girolando**", protocolo nº 005215/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	01/05/2018 a 30/05/2020
Espécie / Linhagem	Bovinos leiteiros da raça Girolando
Nº de animais	2000 vacas em lactação, 50 novilhas recém-paridas
Peso / Idade	550 kg vacas em lactação de 2,5 a 8 anos, 350-390 kg recém-partidas de 2,5 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda comercial

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

TEMPERAMENTO DE VACAS CRUZADAS HOLANDÊS-GIR: RESPOSTA AO TREINAMENTO PARA A PRIMEIRA ORDENHA E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS

O objetivo com a presente pesquisa foi contribuir com o conhecimento da variabilidade genética e fenotípica do temperamento na ordenha em gado leiteiro cruzado Holandês-Gir. A pesquisa foi realizada com o desenvolvimento de dois estudos. O estudo 1 teve como objetivo avaliar as diferenças individuais nas reações comportamentais de novilhas F1 Holandês-Gir submetidas a protocolos de habituação a humanos e aos procedimentos de ordenha. Em uma fazenda comercial 31 novilhas foram submetidas a um treinamento dividido em duas fases: habituação à proximidade humana (fase 1) e à sala de ordenha e ao contato físico com humanos (fase 2). Os resultados indicam que existe variação individual nas novilhas no treinamento para primeira ordenha. A maioria delas reduziu o medo em relação aos humanos e se habituou aos procedimentos de ordenha, então um treinamento prévio ordenha para diminuir reatividade. O estudo 2 teve como objetivo estimar parâmetros genéticos como herdabilidade, repetibilidade, correlações genéticas e fenotípicas para a reatividade na ordenha e produção de leite em vacas Holandês - Gir. A partir de 6.641 dados fenotípicos de reatividade na ordenha de 1.298 vacas cruzadas Holandês-Gir e dados genealógicos fornecidos pela Associação de Criadores de Girolando foram realizadas as estimativas dos componentes de (co) variância e parâmetros genéticos utilizando os programas da família BLUPF90 mediante inferência Bayesiana com THRGibbs1f90. Existe variação genética na variável reatividade na ordenha, o caráter é hereditário e tem alta repetibilidade. Existe uma grande importância em incluir a reatividade na ordenha como uma variável para seleção genética ao longo prazo.

Palavras-chave: *Bos taurus*, *Bos indicus*, habituação a ordenha, herdabilidade, reatividade na ordenha.

TEMPERAMENT OF HOLSTEIN-GIR CROSSED COWS: RESPONSE TO TRAINING FOR FIRST MILKING AND ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS

ABSTRACT: The aim of this research was to contribute to the knowledge of the genetic and phenotypic variability of the milking temperament traits in Holstein-Gyr crossbred dairy cattle. Two studies were carried out. The aim of study 1 were evaluate individual differences in the behavioral reactions of F1 Holstein-Gyr heifers submitted habituation protocols to humans and to milking procedures. The study was carried out in a commercial farm with 31 heifers, which were underwent to a training protocol divided into two phases, addressing the cows' habituation to human proximity (phase 1) and to the milking parlor and physical contact with humans (phase 2). The results showed individual variation in heifers' reactions during training procedures for the first milking. Most of them have reduced fear of humans and become habituated to the milking parlor and physical contact. Thus, training leads decrease cows' reactivity during first milking. The aim of study 2 were estimate genetic and phenotypic variability of milking reactivity and milk production traits in Holstein-Gyr cows. The study was carried out with 6,641 records of milking reactivity from 1,298 Holstein-Gyr crossbred cows. Genealogical data were provided by the Girolando Breeders Association. The estimates of (co)variance components and genetic parameters were performed using BLUPF90 family programs. It was observed genetic variation in the milking reactivity, which showed low heritability and high repeatability Milking reactivity must be considered in selective breeding programs of Girolando cattle.

Keywords: *Bos taurus*, *Bos indicus*, habituation to milking, heritability, milking reactivity.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

É certo que a seleção artificial desempenhou um importante papel na promoção de mudanças genéticas em populações de animais desde o início do processo de domesticação (BROUCEK et al., 2008). Esse processo seletivo inicial muito provavelmente levou em conta características comportamentais, que mais se adequavam às necessidades humanas, dentre elas a menor distância de fuga em relação aos humanos (PRICE, 1984) e menor agressividade (HASKELL; SIMM; TURNER, 2014), por exemplo.

A seleção para características do comportamento voltou a ganhar importância nos últimos anos, principalmente em função do crescente interesse pela questão do bem-estar animal, que tem estimulado técnicos e produtores a se preocuparem se os animais estão em boas condições de bem-estar, sem padecer de estresse e sofrimento, com a expectativa que animais com melhor temperamento lidem melhor com as condições de criação e manejo, favorecendo a manifestação de seu potencial produtivo (HASKELL; SIMM; TURNER, 2014; FRIEDRICH, BRAND, SCHWERIN. 2015).

Há ainda o desafio dos animais de produção terem que se adaptar a novos sistemas de criação e de manejo. Por exemplo, num passado recente o contato diário desses animais com os humanos era praticamente inevitável. Entretanto, esta situação tem mudado e, atualmente, principalmente na cadeia produtiva da pecuária leiteira, muitos sistemas têm sido automatizados, resultando na redução do contato entre humanos e animais. Paralelamente, ainda existem sistemas de produção em que os humanos estão muito presentes, interagindo frequentemente com os animais (SCHUTZ; PAJOR, 2001; CHANG et al., 2020). Por esse motivo, é essencial compreender os animais por meio de seus sinais comportamentais, a fim de identificar possíveis distúrbios e adaptações que o animal expressa diante de cada situação em que são criados (RUSHEN; DE PASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999;

BROOM, 2001; JAGO et al., 2006; SUTHERLAND; ROGERS; VERKERK, 2012; FRIEDRICH, BRAND, SCHWERIN. 2015).

Os rebanhos leiteiros brasileiros são, na sua maioria, compostos por bovinos cruzados zebus (*Bos indicus*), sendo que grande parte das fazendas leiteiras comerciais (~80%) tem seus rebanhos formados com base em bovinos da raça Gir, sejam puros ou cruzados. Esses cruzamentos são predominantemente realizados com o gado Holandês, com o propósito de combinar as características de adaptação ao ambiente tropical da raça Gir com o maior potencial para produção de leite do gado Holandês (MADALENA; PEIXOTO; GIBSON, 2012; PARANHOS DA COSTA; SANT'ANNA; MAGALHÃES SILVA, 2015). Dado o sucesso nesse cruzamento, surge a raça Girolando, caracterizada como uma raça sintética fixando as características do produto do cruzamento 5/8 Holandês e 3/8 Gir, que tem gerado animais com alta produtividade e qualidade exigidos pela indústria (MADALENA; PEIXOTO; GIBSON, 2012; CANAZA-CAYO et al., 2014). Embora as raças de origem asiáticas sejam mais adaptadas ao ambiente tropical, dada sua maior resistência natural ao calor e aos parasitas e a capacidade de uso nutricional de forragens de baixa qualidade, entre outras (FRISCH; VERCOE, 1992), uma das principais desvantagens desses animais está relacionada ao temperamento, mais reativo (PARANHOS DA COSTA; SANT'ANNA; MAGALHÃES SILVA, 2015).

Existem duas maneiras de lidar com bovinos leiteiros mais reativos, que são complementares e não exclusivas. Uma delas é pela adoção das boas práticas de manejo (BPM), que tem potencial para reduzir a reatividade dos animais pela indução ambiental, que ocorre quando se utiliza processos de habituação e de condicionamento dos animais às rotinas de manejo e aos humanos que as realizam para melhorar a interação humano-animal (BREMNER, 1997; BOISSY, BOUISSOU, 1988; JAGO et al., 2006; SUTHERLAND, HUDDART, 2012; KUTZER et al., 2015; UJITA et al., 2020). A outra maneira é incluir as avaliações de temperamento como um critério de seleção nos programas de melhoramento dos rebanhos (WICKHAM, 1979; LAWSTUEN et al., 1988; CUE et al., 1996; SEWALEM et al., 2011; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014; CHANG et al., 2020).

Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de estratégias de indução ambiental para melhorar o temperamento dos bovinos, principalmente com relação à preparação das novilhas para a primeira ordenha (BOISSY; BOUISSOU, 1988; BREMNER, 1997; VAN REENEN et al., 2002; DANIELS et al., 2007; SUTHERLAND; HUDDART, 2012; KUTZER et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2018). Em geral, esses estudos buscam avaliar os resultados da aplicação de BPM para estimular o contato humano-animal e reduzir a reatividade dos animais aos manejos que farão parte de sua rotina diária, como no caso da ordenha, por exemplo.

Paralelamente, são desenvolvidos estudos com foco na análise genética do comportamento, buscando entender as bases genéticas na expressão de características comportamentais indicadoras de temperamento em populações de bovinos (BROUCEK, et al., 2008; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014). Existem estudos relevantes sobre a estimativa de parâmetros genéticos para o temperamento na ordenha, mas são inteiramente baseados em *Bos taurus*, principalmente nas raças Holandês, Jersey e Ayrshire (O'BLENESS; VAN VLECK; HENDERSON, 1960; DICKSON et al., 1970; WICKHAM, 1979; LAWSTUEN, HANSEN, STEUERNAGEL, 1988; VISSCHER; GOODARD, 1995; CUE; HARRIS; RENDEL, 1996; PRYCE; COFFEY; BROTHERSTONE, 2000; HIENDLEDER et al., 2003; SEWALEM; MIGLIOR; KISTEMAKER, 2011). Não foram encontrados estudos que estimem parâmetros genéticos para temperamento na ordenha em *Bos indicus*, os únicos estudos encontrados com foco na estimação de parâmetros genéticos em temperamento para esta espécie foram medidos no tronco de contenção e na balança (MOURÃO; BERGMANN; FERREIRA, 1998; PEIXOTO et al. 2016).

Este estudo é de grande relevância para os sistemas leiteiros no Brasil, como já foi mencionado, 80% da produção de leite provém de animais cruzados Holandês e Gir (MADALENA; PEIXOTO; GIBSON, 2012). Os dois tópicos abordados neste trabalho são de grande relevância, visto que a habituação de novilhas cruzadas para a primeira ordenha pode gerar maior facilidade de manejo, caracterizado por menor reatividade na ordenha, animais permitirem maior aproximação, redução no nível de estresse e, conseqüentemente, maior produtividade. No mesmo sentido, a estimativa de parâmetros genéticos para características relacionadas a reatividade na ordenha em bovinos da raça Girolando

é inovadora, referindo-se ao fato de não existirem estimativas reportadas na literatura científica, e pela possibilidade das estimativas de herdabilidade para temperamento na ordenha trazerem a possibilidade de incorporar tal característica em programas de melhoramento genético da raça. É esperado que, a longo prazo, selecionando animais com temperamento calmo para a ordenha se aumente a produtividade e lucratividade do sistema.

2. Revisão de literatura

2.1. Importância da avaliação de temperamento para a bovinocultura leiteira

Já se passaram quase 30 anos desde que a Dra. Temple Grandin (GRANDIN, 1993) ofereceu soluções simples e integradoras sobre como melhorar o manejo de bovinos, levando-se em conta três elementos básicos que determinam a ocorrência de problemas de manejo: o temperamento animal, as instalações e as pessoas responsáveis por realizar o trabalho.

Nas unidades de produção leiteira, contato dos humanos com os bovinos é muito intenso e frequente, portanto, características como mansidão, docilidade e facilidade para realização dos manejos são necessárias para se realizar o trabalho com segurança e eficiência, proporcionando condições para se melhorar os resultados produtivos. Esses resultados não são alcançados quando se trabalha com animais muito reativos, resultando em maior dificuldade para a realização dos manejos e maior risco de danos às instalações e de acidentes com os animais e os trabalhadores (GRANDIN, 1993; BROUCEK et al., 2008). Todos esses inconvenientes resultam em despesas extras, menor eficiência para realização do trabalho e maior número de pessoas necessárias para realizar o trabalho. Além disso, a produtividade e a qualidade do leite produzido também podem ser comprometidas, uma vez que os animais mais reativos apresentam maior nível de leite residual e, conseqüentemente, maior probabilidade de desenvolverem mastite (RUSHEN; DE PASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999; SUTHERLAND; HUDDART, 2012).

De forma complementar e como bem demonstrado por Rushen et al. (1999), a qualidade do manejo tem um papel importante na modulação do comportamento de vacas leiteiras. Os autores avaliaram durante cinco dias os efeitos de dois tipos de manejo durante o processo de ordenha (aversivo e gentil) nas respostas produtivas e no temperamento de vacas da raça Holandês. O tratamento aversivo consistiu em bater na vaca com força na cabeça ou no flanco com a palma da mão aberta (quatro vezes a cada período de manejo). Também foi usado um bastão elétrico, aplicando-se os choques em um dos flancos das vacas uma vez por dia. Além disso, foi usada a superfície plana de uma pá de plástico para bater na região dos chifres e nos flancos das vacas (também uma vez ao dia). Todos esses procedimentos de manejo foram acompanhados por gritos dirigidos aos animais pelo trabalhador. Por outro lado, no manejo gentil as vacas foram escovadas e recebiam feno e cevada misturados ao melaço e o trabalhador falava com elas com tom de voz suave. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois tratamentos para a produção de leite (médias de 18,48 e 19,20 kg de leite/dia para os manejos aversivo e gentil, respectivamente), mas houve diferença na quantidade de leite residual (médias de 3,60 e 2,10 kg de leite/dia para os tratamentos aversivo e gentil, respectivamente). Durante o tempo de preparação para a ordenha, as vacas submetidas ao tratamento aversivo se movimentaram com maior frequência que as do tratamento gentil (médias de 3,23 e 2,31 mov./min., respectivamente), seguindo a mesma tendência durante a ordenha (1,83 e 1,17 mov./min., respectivamente). Os autores concluíram que tratamento aversivo resultou no aumento do leite residual e em maior reatividade das vacas durante a ordenha.

Há evidências de que ocorram diferenças individuais nas respostas comportamentais de bovinos submetidos a diferentes tipos de manejo nas fazendas (BROUCEK et al., 2008); sendo reconhecido também que algumas características do temperamento dos bovinos se manifestam durante o manejo da ordenha, principalmente quando há mudanças no ambiente como, por exemplo, pela forma com que as vacas são abordadas pelos humanos ou como reagem a novas instalações ou a novos ruídos e odores (HASKELL; SIMM; TURNER, 2014). Uma definição operacional muito utilizada para caracterizar temperamento dos bovinos, foi proposta por Fordyce, Goddard e Seifert (1982); caracterizando o temperamento

como “a reação dos animais ao contato com humanos, geralmente atribuída ao medo”.

Tem sido reconhecido por vários autores que o temperamento é influenciado por componentes genéticos e ambientais (MURPHEY; DUARTE; TORRES PENEDO, 1980; GRANDIN, 1993; PARANHOS DA COSTA; SANT’ANNA; MAGALHÃES SILVA, 2015). Complementarmente, é também reconhecido haver diferenças na forma com que vacas primíparas e múltiparas reagem ao serem colocadas na sala de ordenha, sendo também reconhecido haver diferenças individuais dentro de cada uma dessas categorias de animais, caracterizando extremos de animais muito calmos ou muito nervosos, como relatado por Szentléleki et al. (2015). Com base nos resultados obtidos por esses autores em um estudo conduzido com vacas da raça Holandês (21 primíparas e 19 múltiparas), buscando avaliar as relações entre a reatividade durante a preparação do úbere e a ordenha, a produção de leite e a velocidade de ordenha, os autores concluíram que nem a produção de leite nem a velocidade de ordenha das vacas primíparas foram associadas ao temperamento das vacas avaliado na preparação do úbere e na ordenha. Por outro lado, os autores identificaram uma associação entre o temperamento avaliado durante a preparação do úbere com a velocidade de ordenha de vacas múltiparas, com as vacas mais reativas apresentando maior tempo de ordenha.

Há muitas formas de se realizar a avaliação do temperamento de bovinos, uma das mais frequentes é caracterizada pela aplicação de escores, previamente definidos em uma escala categórica que tem como base níveis crescentes de movimentação corporal dos animais. Esse tipo de medida é geralmente feito quando o animal é submetido a algum tipo de manejo, avaliando-se a reação do animal ao procedimento realizado (DICKSON et al. 1970; WICKHAM, 1979; LAWSTUEN et al., 1988; CUE et al., 1996; PARANHOS DA COSTA, BROOM, 2001; SEWALEM et al., 2011; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014; CHANG et al., 2020). Em geral são atribuídas pontuações de 1 a 5 ou de 1 a 9, sendo que os valores extremos representam o menor e maior nível de movimentação, respectivamente; que correspondem a caracterização de animais com o melhor e o pior temperamento (DICKSON et al. 1970; WICKHAM, 1979; LAWSTUEN et al., 1988; CUE et al., 1996;

PARANHOS DA COSTA, BROOM, 2001; SEWALEM et al., 2011; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014; CHANG et al., 2020). Esses métodos podem ser aplicados com os animais contidos ou não. Por exemplo, o teste de reatividade das vacas leiteiras durante a ordenha, consiste em dar um escore de reatividade segundo a movimentação das patas traseiras e o corpo do animal, e contar o número de passos e de coices (BREUER et al., 2000) de vacas submetidas ao manejo de preparação para a ordenha (*pre-dipping*) e durante a fixação das teteiras, estando as vacas contidas na linha de ordenha (DICKSON et al., 1970; WICKHAM, 1979; LAWSTUEN et al., 1988; CUE et al., 1996; BRENMER, 1997; BREUER et al.; 2000; PARANHOS DA COSTA, BROOM, 2001; SEWALEM et al., 2011). Por outro lado, os testes que podem ser realizados sem a contenção das vacas, como é o caso do teste da distância de fuga, que consiste em registrar a menor distância que exibir comportamentos de fuga (FORDYCE, GODDARD, SEIFERT, 1982). Há ainda o teste de velocidade de saída, que mede a velocidade com que um animal sai do tronco de contenção ou da balança (BURROW; SEIFERT; CORBET, 1988; BOISSY et al., 2005; SUTHERLAND; ROGERS; VERKERK, 2012; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014).

A partir do ano 2014, o Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando passou a informar, no Sumário Brasileiro de Touros, Resultado do Teste de Progênie os resultados de avaliação do temperamento de touros, realizado durante as Provas de Pré-Seleção de Touros, usando-se os procedimentos do modelo animal para calcular as capacidades previstas de transmissão (PTAs). Foi elaborado um sistema de avaliação linear que contempla medidas de conformação e de manejo onde esta última inclui facilidade de ordenha e temperamento. O temperamento é medido como a docilidade do animal sendo avaliada por meio de uma pontuação. As classificações variam de 1 a 9, sendo um para animais excessivamente agitados e nove para animais excessivamente calmos. Por sua vez, facilidade de ordenha corresponde ao tempo e esforço despendido no momento da ordenha. Vacas de menor facilidade de ordenha são mais propensas a doenças por maior retenção de leite, também conhecido como leite residual. Para a avaliação, é utilizada uma pontuação que varia de 1 a 9, sendo um para vacas que são difíceis de ordenhar, e nove para vacas que são extremamente fáceis de ordenhar (SILVA, et al., 2020; PANETTO et al., 2021).

Segundo uma revisão bibliográfica feita por Chang et al. (2020) a avaliação da reatividade na ordenha foi incluída em índices de seleção aplicados na Austrália e nos países Nórdicos. Na Austrália na raça Holandesa o peso econômico relativo para temperamento foi definido em 8,72%, enquanto na Dinamarca, Suécia e Finlândia, foram definidos pesos econômicos relativos de 1,33, 1,08 e 1,06% para bovinos das raças Holandês, Jersey e *Red Dairy Cattle*, respectivamente. De acordo com esses autores, há várias razões que limitam a incorporação do temperamento nos índices de seleção, dentre elas destacam-se as dificuldades para coleta de informações fenotípicas padronizadas em larga escala e a definição de um valor econômico preciso; além da grande variação existente nos sistemas de produção de bovinos leiteiros, que torna muito relevante o papel da interação genótipo-ambiente na expressão dessa característica.

2.2. A importância da adoção de boas práticas de manejo para vacas leiteiras primíparas

São vários os estudos que mostraram que a adoção das boas práticas de manejo de novilhas leiteiras resulta em melhores índices produtivos, reprodutivos, de saúde e na longevidade produtiva desses animais (BOISSY; BOUISSOU, 1988; BREMNER, 1997; VAN REENEN et al., 2002; DANIELS et al., 2007; SUTHERLAND; HUDDART, 2012; KUTZER et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2018).

Durante os primeiros dias de lactação as vacas de primeira cria são expostas a novas experiências, incluindo a proximidade com humanos e as novas rotinas de manejo relacionadas ao processo de ordenha e a todos os estímulos a ele associados (novas instalações, ruído e odores). Em resposta a essa novidade, as primíparas geralmente ficam estressadas, resultando em contração muscular e apresentação de comportamentos inquietação, esquiva ou fuga, com movimentos intensos das pernas na tentativa de afastar as pessoas ou retirar as teteiras; essas reações dificultam o manejo, aumentando o tempo necessário para a realização do trabalho (BREMNER, 1997). Alterações extremas do comportamento também podem ocorrer, como por exemplo, vacas que saltam ou forçam as estruturas da sala de ordenha na tentativa de sair, o que exige maior cuidado durante o manejo de

forma a minimizar o risco de acidentes com os animais e os trabalhadores, além do potencial de causar danos às instalações.

Muitas pesquisas têm sido realizadas em busca de uma solução para esse problema, em geral com o objetivo de reduzir o medo de vacas primíparas em relação aos humanos e a novas rotinas de manejo, habituando-as ou condicionando-as aos estímulos presentes durante a ordenha, incluindo o contato físico com humanos.

Os trabalhos de Brenner (1997) foram pioneiros na avaliação dos problemas que as primíparas da raça Holandês causam durante a ordenha. Em um experimento com um grupo de 50 primíparas, o autor comparou três tratamentos, no primeiro (controle) um grupo de primíparas não recebeu nenhum tipo de manejo de contato prévio com o ser humano ou com a sala de ordenha; no segundo elas foram habituadas com a proximidade de humanos e com a sala de ordenha (nesse caso os equipamentos usados para a realização da ordenha foram ligados para habituá-las aos ruídos e elas também foram estimuladas com contatos físicos, com humanos passando as mãos na cabeça, corpo, costas e úbere) e no terceiro grupo, elas foram conduzidas pela sala de ordenha, com livre escolha da posição na linha de ordenha, para, em seguida, serem contidas nas posições escolhidas. Posteriormente ao parto, os autores observaram os comportamentos dessas vacas primíparas ao longo dos primeiros sete dias de ordenha, registrando-se a facilidade de entrada na sala de ordenha, reações ao primeiro toque e durante lavagem do úbere e a colocação das teteiras (incluindo o registro de casos em que o conjunto de teteiras foi removido pelas vacas), além das medidas de produção de leite. O grupo de primíparas que foram habituadas previamente aos humanos e à sala de ordenha foi o que apresentou as melhores reações à aproximação e ao contato físico realizado por humanos, sendo que 70% delas apresentaram a menor distância de fuga e menor inquietação durante a ordenha comparada ao grupo controle. O autor destacou que a habituação dos animais com as salas de espera e de ordenha e com os procedimentos de ordenha foi muito útil, uma vez que as vacas dos grupos 2 e 3 entraram na sala de ordenha com muito mais facilidade. Notou-se também que as vacas do terceiro grupo apresentaram menor reação quando da preparação do úbere para ordenha. Entretanto, segundo o autor, foram observadas diferenças

individuais importantes nos animais integrantes dos três grupos avaliados, sendo que em alguns casos os comportamentos indesejáveis não foram totalmente reduzidos, mesmo nos tratamentos em que as novilhas foram previamente habituadas com as rotinas do manejo de ordenha.

Com uma abordagem semelhante, Sutherland e Huddart (2012) avaliaram a eficácia do treinamento de novilhas sobre a reatividade e outras respostas comportamentais e fisiológicas de vacas primíparas submetidas ao manejo de ordenha. Foram avaliadas 40 novilhas da raça Holandês, divididas em dois grupos, com alta (AR) e baixa reatividade (BR), segundo a avaliação realizada com a medida da velocidade de fuga. As novilhas desses dois grupos foram submetidas a dois tipos de manejo, sem (controle) e com treinamento, sendo que nesse último as novilhas eram conduzidas para a sala de ordenha sem ameaças, gritos e nem objetos que forçavam os animais a caminharem e, quando necessário, o trabalhador usava comandos de voz suaves e toques com as mãos para estimular as novilhas a se moverem. Cada novilha do grupo com treinamento foi conduzida até a sala de ordenha do tipo carrossel por dois dias consecutivos, enquanto as novilhas do grupo controle (sem treinamento) permaneceram no pasto. No primeiro dia, quando as novilhas treinadas saíam do carrossel, elas eram conduzidas de volta para a sala de espera. Este processo foi repetido duas vezes na ordenha da manhã e três vezes na ordenha da tarde do primeiro dia de treinamento. Nas sessões do segundo dia repetiu-se os procedimentos anteriores e foram criados novos estímulos, expondo as novilhas aos ruídos da ordenhadeira, além de receberem o spray no úbere (o mesmo aplicado durante o *pre-dipping*) e foram tocadas na parte superior do úbere e nas pernas traseiras. Os testes comportamentais de distância de fuga (no pasto), aproximação voluntária e velocidade de fuga foram realizados ao final do treinamento e antes e após o parto. Os resultados mostraram que o treinamento reduziu a distância de fuga das novilhas BR, mas não das de AR. Segundos esses autores, as respostas comportamentais das novilhas nos testes com restrição de movimento foram positivamente correlacionadas com a produção de leite, a duração da ordenha e o volume de leite residual. Surpreendentemente as vacas BR treinadas movimentaram e deram mais coices durante a colocação das teteiras que as BR não treinadas. A produção de leite foi menor durante a primeira semana nas vacas AR treinadas do que nas não treinadas e o volume de leite residual foi mais baixo nas

vacas treinadas, independente da classificação para temperamento (AR e BR). As concentrações plasmáticas de cortisol foram menores no quinto dia de lactação que no primeiro dia e mais altas nas vacas com AR depois da ordenha que antes. Os autores (SUTHERLAND; HUDDART, 2012) concluíram que o treinamento pode reduzir a reatividade das vacas aos seres humanos e reduzir o estresse durante a primeira semana de lactação; no entanto, ressaltaram também que o temperamento de cada animal pode influenciar a eficácia do treinamento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kutzer et al. (2015). Esses autores também trabalharam com novilhas treinadas (NT, n = 30) e não treinadas (NNT, n = 29). O treinamento consistiu em habituar as novilhas com a sala de ordenha pelos menos 10 dias antes do parto. Foram registrados o comportamento e a frequência cardíaca das vacas nos primeiros sete dias após os partos e as distâncias de fuga foram medidas no 1o, 7o e 28o dia após o parto. Os resultados mostraram que as vacas NT apresentaram menor reatividade e uma menor frequência de passos e coices durante a preparação do úbere para a ordenha, por outro lado, as vacas NNT apresentaram maior probabilidade de posicionar a cauda entre as patas traseiras e manter os olhos bem abertos durante o processo de ordenha. A frequência cardíaca diminuiu ao longo do tempo do 1o a 7o dia e foi levemente mais elevada no grupo treinado que no não treinado. Não houve diferença na produção de leite entre as NT e NNT. A distância de fuga não foi influenciada pelo treinamento, mas esta distância foi reduzida em novilhas com alto nível inicial de medo, enquanto as novilhas com um baixo nível inicial de medo de humanos geralmente tinham distâncias de fuga curtas desde o início.

Em um estudo conduzido com vacas da raça Gir (UJITA et al., 2020) foram avaliadas 27 vacas (7 novilhas, 7 primíparas e 13 multíparas de 2 a 4 partos), sendo que todas elas foram submetidas a estimulação tátil (5 min./dia) antes do parto por 14 dias, sempre com as vacas contidas em um tronco de contenção. As reações dos animais foram avaliadas atribuindo-se escores para as seguintes categorias do comportamento: vocalizar, bufar, ruminar, movimentar, deslocamento, coices, movimento da orelha, velocidades de entrada e saída do tronco de contenção saída; além disso, foram realizadas medidas de frequência respiratória e temperatura retal. Os autores observaram expressivo aumento no número de animais que saíram do

tronco de contenção caminhando ao longo do período de estudo (de 56,6 para 96,0% do dia 1 para o dia 14, respectivamente), além de redução na expressão dos comportamentos de movimentação dos animais e das orelhas e de vocalização e da frequência respiratória e temperatura retal.

Segundo os resultados da maioria das pesquisas aqui relatadas, o treinamento influenciou o temperamento das novilhas, com repercussões nas respostas comportamentais, resultando em grande variação individual nas avaliações realizadas.

É importante considerar o efeito que causa um treinamento prévio a ordenha para novilhas em parto. Segundo a bibliografia consultada, a habituação das novilhas na aproximação com o humano e a habituação das novilhas para o processo da ordenha reduz a distância de fuga, reduz os comportamentos indesejáveis, como inquietude das vacas no momento da preparação do úbere e posterior fixação do conjunto de ordenha. Além disso, a habituação das vacas aos humanos e aos processos da ordenha reduzem o volume de leite residual, indicando que elas ficaram menos reativas aos novos ruídos, odores, manejo, trabalhadores e instalações.

2.3. Variação genética e estimativa de parâmetros genéticos para características de temperamento em bovinos leiteiros

O temperamento dos bovinos é geralmente avaliado considerando o grau de reatividade dos animais quando submetidos a algum tipo de manejo ou expostos a situações estressantes ou a novos objetos ou instalações. Essa característica tem implicações econômicas, pois pode comprometer ou favorecer as respostas produtivas. Entretanto, essa característica não tem sido considerada nos índices de seleção utilizados pelos programas de melhoramento genético de bovinos (HASKELL; SIMM; TURNER, 2014), provavelmente pela falta de definição de um indicador objetivo (CHANG et al., 2020).

Para a definição dos indicadores de temperamento que tenham potencial para serem considerados em programas de melhoramento genético deve-se ter

boas estimativas de quanto de sua variação é devida aos efeitos genéticos e quanto aos efeitos ambientais (GRANDIN, 1993; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014; CHANG et al., 2020).

2.3.1. Estimativas de herdabilidade para temperamento em bovinos leiteiros

É reconhecido que o temperamento é caracterizado como uma expressão fenotípica, havendo, portanto, uma interação de fatores genéticos e ambientais modulando a sua manifestação (GRANDIN, 1993). A determinação da proporção em termos da variação fenotípica de uma população devido a fatores genéticos ou ambientais é verificada através da estimativa da herdabilidade (FALCONER; MACKAY, 2002).

Como reportado por Haskell, Simm e Turner (2014) e Friedrich, Brand e Schwerin (2015), existe uma grande variação nas estimativas de herdabilidade (h^2) para o temperamento de vacas leiteiras (valores reportados variando de 0,07 a 0,47). Essa grande diferença nos valores de herdabilidade pode ser atribuída à origem do gado leiteiro avaliado, seja *Bos taurus* ou *Bos indicus*, além das variações entre as raças dentro de cada uma dessas espécies e em função da idade dos animais no momento da avaliação, dentre outras. Existem também diferenças devido à metodologia utilizada para medição, tamanho da amostra e métodos estatísticos utilizados (O'BLENESS; VAN VLECK; HENDERSON, 1960; DICKSON et al., 1970; VISSCHER; GOODARD, 1995; CUE; HARRIS; RENDEL, 1996; MOURÃO; BERGMANN; FERREIRA, 1998; PRYCE; COFFEY; BROTHERSTONE, 2000; HIENDLEDER et al., 2003; SEWALEM; MIGLIOR; KISTEMAKER, 2011; PEIXOTO et al. 2016).

Por exemplo, é reconhecido haver diferenças marcantes na facilidade de manejo entre bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) e asiática (*Bos indicus*) (FRISCH; VERCOE, 1992; HASKELL; SIMM; TURNER, 2014), por conta disto é esperado haver complementaridade em relação às características produtivas, reprodutivas e adaptabilidade a determinados ambientes, criando a possibilidade de incorporar características benéficas desses dois grupos genéticos ao realizar o cruzamento entre eles (CUNNINGHAM; SYRSTAD, 1987).

A maioria das estimativas de herdabilidade para temperamento na ordenha foi realizada principalmente com rebanhos da raça Holandês (*Bos taurus*) (O'BLENESS; VAN VLECK; HENDERSON, 1960; DICKSON et al., 1970; VISSCHER; GOODARD, 1995; CUE; HARRIS; RENDEL, 1996; PRYCE; COFFEY; BROTHERSTONE, 2000; HIENDLEDER et al., 2003; SEWALEM; MIGLIOR; KISTEMAKER, 2011), havendo só dois estudos com *Bos indicus*, mas esses trabalhos avaliaram o temperamento com os animais contidos na balança ou no curral, não sendo possível encontrar na literatura científica artigos com estimativas dos componentes de variância para o temperamento na ordenha (MOURÃO; BERGMANN; FERREIRA, 1998; PEIXOTO et al. 2016).

No estudo de Mourão, Bergmann e Ferreira (1998) foram avaliadas 456 fêmeas das raças Indubrasil (I), Nelore (N) e Tabapuã (T) e de suas progênes F1 cruzadas com touros da raça Holandês (H). O temperamento foi avaliado usando a aplicação de uma escala subjetiva com escores variando de 1 (definindo pelos autores como “dócil”) a 5 (“agressivo”) durante a contenção dos animais no tronco. Foram observadas diferenças entre os grupos genéticos avaliados, com as vacas das raças N e T apresentando médias de reatividade ($2,25 \pm 0,13$ e $2,16 \pm 0,15$, respectivamente) superiores à média de I ($1,81 \pm 0,12$). A mesma tendência foi observada em animais cruzados, com os animais H x N ($2,69 \pm 0,13$) diferindo estatisticamente de H x T ($2,26 \pm 0,18$) e H x I ($2,20 \pm 0,14$). Esses resultados indicam que existe variação dentro das raças zebuínas e entre as categorias dentro de cada raça, pois as novilhas cruzadas com 26 meses de idade apresentaram maior reatividade que as vacas adultas (~88 meses de idade). Para esses mesmos grupos genéticos foram estimadas as herdabilidades para a reatividade no tronco de contenção que variou de 0,06 a 0,27, dependendo do método de estimação utilizado, regressão filha-mãe ($h^2 = 0,27 \pm 0,16$) ou DFREML máxima verossimilhança restrita livre de derivadas ($h^2 = 0,06$, apenas para as F1, e $h^2 = 0,15$, para mães + filhas).

Por sua vez, Peixoto et al. (2016) estimaram herdabilidade para temperamento em bovinos da raça Guzerá. Nesse estudo as avaliações foram realizadas durante a pesagem dos animais, aplicando-se escores que variaram de 1 (vacas calmas, que não se moviam durante a pesagem) a 5 (vacas vigorosas e

inquieta, com movimentos contínuos do corpo, pernas e cauda, além da expressão de vocalizações e alterações na respiração). Com base em 2.648 registros de 1.324 vacas, os autores obtiveram um valor estimado de herdabilidade de 0,29. Os autores usaram o modelo REML para estimar parâmetros genéticos aplicando um modelo animal de repetibilidade univariada e bivariada. Nesse estudo foi constatado que o temperamento é influenciado pelos seguintes efeitos fixos: manejo de cada fazenda, idade do animal, estação de coleta de dados (seca / chuvosa), ordem de entrada na balança, estado fisiológico (lactantes ou não) e pelo peso corporal de cada animal.

Dos estudos com *Bos taurus* destacam-se os resultados obtidos por Pryce, Coffey e Brotherstone (2000) e Hiendleder et al. (2003). Avaliando bovinos da raça Holandês, essas duas pesquisas trabalharam com escores de temperamento na ordenha que variaram de 1 (nervoso/agressivo) a 9 (quieto/dócil). Os dois estudos reportaram estimativas de herdabilidade muito baixas (0,07), sendo que Pryce, Coffey e Brotherstone (2000) usaram o método de REML para a estimação de parâmetros genéticos a partir de 44.674 registros; por sua vez, Hiendleder et al. (2003) usaram o modelo animal de BLUP.

Destaca-se também os resultados de Sewalem, Miglior e Kistemaker (2011), que estimaram valores de herdabilidade de 0,13 para temperamento na ordenha implementando o método REML. Os autores destacaram que 84,6% dos animais avaliados apresentaram temperamento médio e calmo, a partir de 1.940.092 vacas da raça Holandês durante os primeiros seis meses de lactação tomando registros no animal só uma vez. O escore utilizado foi de 1 (animais muito nervosos) ao 5 (animais muito calmos).

Valores de herdabilidade semelhantes para temperamento na ordenha também foram observados por Cue, Harris e Rendel (1996) para bovinos da raça Holandês (0,14) e Jersey (0,17), sendo encontrado um valor mais alto para a raça Ayrshire (0,33) totalizando 206.000 registros para as raças envolvidas na avaliação utilizando escore com escala de 1 (vigoroso) a 9 (calmo), e implementando análise multivariada REML para a estimativa de herdabilidades.

Na Nova Zelândia, Wickham (1979) estimou valores similares de herdabilidade para as raças Holandês (0,12; 6.300 vacas) e Jersey (0,11; 7.800

vacas). O temperamento na ordenha foi medido pelos trabalhadores que classificaram as vacas em temperamento satisfatório, esporadicamente insatisfatório e frequentemente insatisfatório. O temperamento na ordenha foi também relacionado com valores econômicos e destacou que o ganho genético que se pode obter por incluir esta variável nos métodos de seleção é entre 13 aos 20 %.

Valores moderados de herdabilidade para a reatividade na ordenha foram encontrados por Visscher e Goddard (1995), sendo 0,22 para a raça Holandês (14.596 registros) e 0,25 na raça Jersey (4.695 registros). As avaliações foram realizadas com aplicação de um modelo touro REML multivariado e as medidas de reatividade na ordenha foram feitas com aplicação de escores que variaram de 1 (aceitável) ao 5 (inadequado), as médias e respectivos desvios padrão dos escores foram $2,6 \pm 0,9$ para Holandês e $2,5 \pm 0,8$ para Jersey.

Estimativas mais altas de herdabilidade foram obtidas por O'Bleness, Van Vleck e Henderson (1960) e Dickson et al. (1970) com bovinos da raça Holandês. Ambos os grupos de pesquisas utilizaram um modelo de regressão para calcular valores de herdabilidade, com estimativas de 0,40 (O'BLENESS; VAN VLECK; HENDERSON, 1960) com base em 25.000 registros e igual a 0,47 (DICKSON et al., 1970) usando informações de 27 rebanhos com 1.017 registros, esses autores usaram uma pontuação de 1 (calmo) a 4 (nervosos) para avaliar o temperamento durante a ordenha.

Segundo a bibliografia consultada, as estimativas de herdabilidade para temperamento na ordenha possuem uma grande variabilidade, que depende do método de estimação, tamanho da amostra e raças envolvidas, mas o que é importante notar que se selecionada para esta característica, no longo ou mediano prazo se obtém uma mudança genética no rebanho leiteiro além que temperamento na ordenha já é incluído como índice de seleção em vários países.

2.3.2. Associação entre temperamento e outras características de interesse econômico.

Características poligênicas, ou seja, características influenciadas pela ação de múltiplos genes podem apresentar correlações fenotípicas, genéticas e ambientais com outras características. Existem dois agentes causais nas correlações genéticas, pleiotropia e desequilíbrio de ligação. A pleiotropia é o efeito causal de um gene que afeta dois ou mais caracteres, enquanto o desequilíbrio de ligação é propriedade de alguns genes que não se segregam independentemente (FALCONER; MACKAY, 2002). Se estivermos estudando uma característica, é possível que ela esteja correlacionada a outras características devido a esses efeitos, o que leva a determinar se essas correlações são positivas (quando há mudanças devido à seleção de uma característica resultam na mudança da outra característica, correlacionada, no mesmo sentido), negativas (por exemplo, modificando uma característica positivamente a outra é afetada negativamente) ou neutra, quando a seleção para uma característica não promove alterações em outras (FALCONER; MACKAY, 2002).

Resultados de estudos com bovinos leiteiros têm mostrado que o temperamento está associado com a saúde do úbere (LAWSTUEN; HANSEN; STEUERNAGEL, 1988), sobrevivência (CUE; HARRIS; RENDEL, 1996), produção de leite (PIRES et al., 2013), desempenho reprodutivo (LAWSTUEN; HANSEN; STEUERNAGEL, 1988), velocidade de ordenha (LAWSTUEN; HANSEN; STEUERNAGEL, 1988; CUE; HARRIS; RENDEL, 1996; SEWALEM; MIGLIOR; KISTEMAKER, 2011) e com características de conformação (CUE; HARRIS; RENDEL, 1996).

Tem sido demonstrado também, para os bovinos leiteiros, que o temperamento, avaliado pela mensuração do medo em relação aos humanos, pode ter uma correlação baixa tanto negativa quanto positiva com a produção de leite. Por exemplo, para a raça Holandês, foram estimados valores de correlações genéticas de temperamento com a produção de leite de 0.08 (O'BLENESS; VAN VLECK; HENDERSON, 1960). Valores similares foram encontrados por outros autores para a

mesma raça (p.ex., 0,05 por DICKSON et al., 1970; 0,11 por VISSCHER; GODDARD, 1995 e 0,19 BROUCEK et al., 2008).

Lawstuen, Hansen e Steuernagel (1988) ao analisar 15.380 registros de lactação em rebanhos da raça Holandês, estimaram correlações entre temperamento, velocidade de ordenha, resistência à mastite, desempenho reprodutivo (que incluiu o número de inseminações como fator principal), edema do úbere, saúde geral e facilidade de parto. Os resultados mostraram correlações fenotípicas positivas de diferentes graus, sendo a menor (0,08) entre temperamento e desempenho reprodutivo e a mais alta (0,33) entre temperamento e resistência à mastite e saúde geral. Os autores destacaram que as filhas de touros que tinham um temperamento calmo tendiam a ser ordenhadas mais rapidamente (maior velocidade de ordenha) com correlação genética igual a 0,36, eram mais resistentes a problemas de mastite (correlação genética entre temperamento e resistência a mastite: 0,46) e apresentavam partos com menos dificuldades (correlação genética entre temperamento e facilidade ao parto: 0,48).

Valores semelhantes foram encontrados para as raças Holandês e Jersey por Cue, Harris e Rendel (1996), que encontraram correlações genéticas entre características de temperamento na ordenha e velocidade de ordenha (0,23), produção de leite (0,03), conformação (0,12), sobrevivência (0,35) e adaptabilidade a ordenha (0,97), sendo que esta última característica foi avaliada considerando o tempo que os animais levaram para se ajustarem à rotina de ordenha após o parto.

Em pesquisa desenvolvida no Canadá, Sewalem, Miglior e Kistemaker (2011) estudaram as correlações genéticas do temperamento de vacas da raça Holandês canadense. Os autores encontraram valores de 0,247 para a correlação genética entre temperamento na ordenha e velocidade de ordenha, indicando que vacas com temperamento calmo permitem uma ordenha mais rápida, com impacto positivo na redução do tempo total de ordenha.

A implementação de boas práticas de manejo e o uso da seleção genética para a variável de temperamento na ordenha são ferramentas para reduzir o medo dos animais em relação aos seres humanos e, por conta disso, reduzir o risco de acidentes de trabalho (que podem colocar em risco a saúde dos animais e dos

trabalhadores), aumentar a eficiência em tempo e qualidade do trabalho, aumentar a produtividade e, desse modo, aumentar a lucratividade da atividade produtiva.

Há diversos estudos publicados que informam estimativas de parâmetros genéticos para temperamento e produção de leite, mas a maioria corresponde a raças de *Bos taurus* e muito poucos de *Bos indicus*. Deve ser esclarecido que a bibliografia consultada sobre *Bos taurus* a maioria dos trabalhos foi para estimar parâmetros genéticos para a variável de temperamento durante a ordenha, e a bibliografia encontrada com *Bos indicus* estimando parâmetros genéticos para a reatividade na balança ou no curral, nenhuma publicação tratou do temperamento na ordenha. Por esse motivo, o presente trabalho tem a novidade de apresentar a estimativa de parâmetros genéticos para temperamento na ordenha utilizando vacas cruzadas *Bos taurus* e *Bos indicus*.

3. Objetivo geral

Contribuir com o conhecimento sobre a variabilidade genética e fenotípica do temperamento na ordenha em gado leiteiro cruzado Holandês - Gir.

4. Objetivos específicos

1) Avaliar as diferenças individuais nas reações comportamentais de novilhas F1 Holandês-Gir submetidas a protocolos de habituação a humanos e aos procedimentos de ordenha.

2) Estimar parâmetros genéticos como herdabilidade, repetibilidade, correlações genéticas e fenotípicas para a reatividade na ordenha e produção de leite em vacas Holandês-Gir.

5. Referencias

- BOISSY, A.; BOUISSOU, M. F. 1988. Effects of early handling on heifers' subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 20, p. 259–273.
- BOISSY, A.; FISHER, A. D.; BOUIX, J.; HINCH, G. N.; LE NEINDRE, P. 2005. Genetics of fear in ruminant livestock. **Livestock Production Science**, v. 93, n. 1, p. 23–32.
- BREMNER, K. J. 1997. Behaviour of dairy heifers during adaptation to milking. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, n. 105, p. 105–108.
- BREUER, K.; HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; MATTHEWS L. R.; COLEMAN, G.J. 2000. Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 66. p. 273–288.
- BROOM, D. M., 2001. Effects of dairy cattle breeding and production methods on animal welfare. **Proceedings 21st World Buiatrics Congress**. Punta del Este, Uruguay, p. 1-7.
- BROUCEK, J.; UHRINCAT, M.; SOCH, M.; KISAC, P. 2008. Genetics of behaviour in cattle. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 4. n. 4. p. 166–172.
- BURROW, H.; SEIFERT, G.; CORBET, N. 1988. A new technique for measuring temperament in cattle. **Proceedings of Australian Society of Animal Production**, v. 17, p. 154-157.
- CANAZA-CAYO, A. W.; LOPES, P. S.; DA SILVA, M. V. G. B.; COBUCCI, J. A.; TORRES, R. DE A.; MARTINS, M. F.; ARBEX, W. A. 2014. Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2072–2077.

- CHANG, Y.; BRITO, L. F.; ALVARENGA, A. B.; WANG, Y. 2020. Incorporating temperament traits in dairy cattle breeding programs: challenges and opportunities in the phenomics era. **Animal Frontiers**, v. 10, p. 29–36.
- CUE, R. I.; HARRIS, B. L.; RENDEL, J. M. 1996. Genetic parameters for traits other than production in purebred and crossbred New Zealand dairy cattle. **Livestock Production Science**, v. 45, p. 123-135.
- CUNNINGHAM, E. P.; SYRSTAD, O. 1987. **Crossbreeding *Bos indicus* and *Bos taurus* for milk production in the tropics**. FAO Animal Production and Health Paper 68. FAO: Rome. Disponível em <http://www.fao.org/3/t0095e/t0095e00.htm>.
- DANIELS, K. J.; DONKIN, S. S.; EICHER, S. D.; PAJOR, E. A.; SCHUTZ, M. M. 2007. Prepartum milking of heifers influences future production and health. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2293–2301.
- DICKSON, D. P.; BARR, G. R.; JONHSON, L. P.; WIECKERT, D. A. 1970. Social dominance and temperament of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 7, p. 904-907.
- FALCONER, D.; MACKAY, T. 2002. **Introducción a la Genética Cuantitativa**. Editorial Acribia, S.A.: Zaragoza.
- FRIEDRICH, J.; BRAND, B.; SCHWERIN, M. 2015. Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding – a review. **Archives Animal Breeding**, v. 58, p. 13–21.
- FRISCH J.; VERCOE J. 1992. Genotype (breed) and environment interaction with particular reference to cattle in the tropics. **Asian-Australasian Association of Animal Societies**, v. 5, n. 3, p. 401-409.
- FORDYCE, G.; GODDARD, M.E.; SEIFERT, G.W. 1982. The measurement of temperament in cattle and the effect of experience and genotype. **Animal Production**, v. 14, p. 329-332.

- GRANDIN, T. 1993. Behavioral principles of cattle handling under extensive conditions. In: _____ (Ed.) **Livestock Handling and Transport**, p.43-57. CAB International, Wallingford, UK.
- HASKELL, M. J.; SIMM, G.; TURNER, S, P. 2014. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 368, p. 1-18.
- HIENDLEDER, S.; THOMSEN, H.; REINSCH, N.; BENNEWITZ, J.; LEYHE-HORN, B.; LOOFT, C.; XU, N.; MEDJUGORAC, I.; RUSS, I.; KÜHN, C.; BROCKMANN, G. A.; BLÜMEL, J.; BRENIG, B., REINHARDT, F.; REENTS, R.; AVERDUNK, G.; SCHWERIN, M.; FÖRSTER, M.; KALM, E.; ERHARDT, G. 2003. Mapping of QTL for body conformation and behavior in cattle. **Journal of Heredity**. v. 94, n. 6, p. 496–506.
- JAGO, J. G.; DAVIS, K. L.; COPEMAN, P. J.; WOOLFORD, M. M. 2006. The effect of pre-milking teat-brushing on milk processing time in an automated milking system. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 2, p. 187–192.
- KUTZER, T.; STEILEN, M.; GYGAX, L.; WECHSLER, B. 2015. Habituation of dairy heifers to milking routine - Effects on human avoidance distance, behavior, and cardiac activity during milking. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5241–5251.
- LAWSTUEN, D.A.; HANSEN, L.B.; STEUERNAGEL, G.R. 1988. Management traits scored linearly by dairy producers. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 788–799.
- MADALENA, F.E.; PEIXOTO, M.G.; GIBSON, J. 2012. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, n. 6, p. 1-49.
- MOURÃO, G. B.; BERGMANN J. A. G.; FERREIRA, M. B. D. 1998. Diferenças genéticas e estimação de coeficientes de herdabilidade para temperamento em fêmeas Zebus e F1 Holandês x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 27, n. 4, p. 722-729.

- MURPHEY, R.M.; DUARTE, F.A.; TORRES PENEDO, M.C. 1980. Approachability of bovine cattle in pastures; breed comparisons and a breed x treatment analysis. **Behavior Genetics**, v. 10, n. 2, p. 171-81.
- O'BLENESS, G. V.; VAN VLECK, L. D.; HENDERSON, C. R. 1960. Heritabilities of some type appraisal traits and their genetic and phenotypic correlations with production. *Journal of Dairy Science*. v.43, n.10, p. 1490–1498.
- PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; BROOM, D. 2001. Consistency of side choice in the milking parlour by Holstein \pm Friesian cows and its relationship with their reactivity and milk yield. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 70, p. 177-186.
- PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; SANT'ANNA, A. C.; MAGALHÃES SILVA, L. C. 2015. Temperamento de bovinos Gir e Girolando: efeitos genéticos e de manejo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 36, n. 286, p. 100-107.
- PANETTO, J.C.C.; SILVA, M. V. G. B.; VERNEQUE, R.S.; MACHADO, M. A.; FERNANDES, A. R.; MARTINS, M. F.; FAZAR, D. R.; ARBEX, W. A.; OLIVEIRA, J. C.; PEREIRA, M. A. 2021. Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro – Sumário Brasileiro de Touros - 4ª Avaliação Genômica de Touros - Resultado do Teste de Progênie - Maio 2021. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2021. p. 102. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 254).
- PEIXOTO, M. G.; BRUNELI, F. A.; BERGMANN, J. A.; SANTOS, G. G.; CARVALHO, M. R.; BRITO, L. F.; PEREIRA, M. C.; PIRES, M. F. 2016. Environmental and genetic effects on the temperament variability of Guzerá (*Bos indicus*) females. **Livestock Research for Rural Development**, v. 28. n. 15, p. 9.
- PIRES, M. F.; DOS SANTOS, G.; TOMITA BRUNELI, F. A.; GARCIA BERGMANN, J. A.; CINACHI PEREIRA, M.; PEIXOTO, M. G. 2013. Parâmetros genéticos e fenotípicos para temperamento de fêmeas Guzerá, sob seleção para leite, no Brasil. **X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal** Uberaba, MG.
- PRICE, E. O. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. **The Quarterly Review of Biology**, v. 59, p. 1-32.

- PRYCE, J. E.; COFFEY, M. P.; BROTHERSTONE, S. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in registered Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2664–2671.
- RUSHEN, J.; DE PASSILLÉ, A. M.; MUNKSGAARD, L. 1999. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 720–727.
- SANT'ANNA, A., BALDI, F., VALENTE, T., ALBUQUERQUE, L., MENEZES, L., BOLIGON, A. PARANHOS DA COSTA, M. 2015. Genetic associations between temperament and performance traits in Nelore beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 132, p. 42-50.
- SCHUTZ, M. M., PAJOR, E. A. 2001. Genetic control of dairy cattle behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 84, E. Suppl. p.31-38.
- SEWALEM, A.; MIGLIOR, F.; KISTEMAKER, G. J. 2011. Genetic parameters of milking temperament and milking speed in Canadian Holsteins. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 512-516.
- SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; GONÇALVES, G. S.; PANETTO, J. C. do C.; PAIVA, L. DE C.; MACHADO, M. A.; REIS, D. R. de L.; FERREIRA JUNIOR, E. 2020. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando / Sumário de Touros Resultado do Teste de Progênie (Avaliação Genética / Genômica) Junho 2020. p. 87. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 248)
- 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**, v. 95, n. 12, p. 6983–6993.
- SUTHERLAND, M. A.; ROGERS, A. R.; 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 and Behavior**, v. 107, n. 3, p. 329–337.

- SUTHERLAND, M.; WHITE, T.; CHEN, L.; HEMPSTEAD, M.; HUDDART, F. 2018. To train or not to train heifers to the milking parlour prior to calving? That is the question for New Zealand dairy farmers. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 78, p. 177–182.
- SZENTLÉLEKI, A.; NAGY, K.; SZÉPLAKI, K.; KÉKESI, K.; TÓZSÉR, J. 2015. Behavioural responses of primiparous and multiparous dairy cows to the milking process over an entire lactation. **Annals of Animal Science**, v. 15, n. 1, p. 185–195.
- UJITA, A.; RIBEIRO VICENTINI, R.; PEREIRA LIMA, M.L.; NEGRÃO, J. A.; DE OLIVEIRA FERNANDES, L.; PENIDO OLIVEIRA, A.; VERONEZE, R.; EL FARO ZADRA, L. 2020. Improvements in the behaviour of Gir dairy cows after training with brushing. **Journal of Applied Animal Research**, v. 48, n. 1, p. 184–191.
- 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. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2551–2561.
- VISSCHER, P. M.; GOODARD, M. E. 1995. Genetic parameters for milk yield, survival, workability, and type traits for Australian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 1, p. 205-220.
- WICKHAM, B. W. 1979. Genetic parameters and economic values of traits other than production for dairy cattle. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. New Zealand Society of Animal Production. v. 39, p.180-193.

CAPITULO 2 – Individual differences in the behavioral responsiveness of F1 Holstein-Gyr heifers to the training for milking routine*

Abstract

The objective of this study was to assess individual differences in behavioral responses of 31 F1 Holstein-Gyr heifers subjected to habituation protocols to humans and milking procedures. Training was divided in two phases (P1 and P2): habituation to humans (P1), and to the milking parlor and human physical contact (P2). Flight distances (FD) were assessed during P1, and numbers of steps and kicks (as binary) were recorded during P2. The last two measurements and milking reactivity (scored from 1 = cow stands quietly to 8 = cow is very agitated) were recorded during the first four days of milking. Repeated behavioral measurements were used to evaluate individual changes fitting a linear regression for each animal, and the b-coefficients were used to classify heifers as habituated, neutral or sensitized. The percentages of assessment days that each heifer/cow kicked during P2, and during the first four days of milking were calculated. Pearson's correlation coefficients between b-coefficients were estimated. General linear models were fitted to assess the effects of interval classes (defined by the number of days between the last day in training and the first day in milking) and behavioral responses during P1 and P2 on milking reactivity and number of steps on the first day of milking and on b-coefficients of these variables. Individual differences in behavioral responses were observed. Most heifers (~87 %) habituated during P1 and ~ 44 % of them reduced number of steps during P2. Almost 52 % of the heifers did not step or exhibit only one step and ~ 93 % of them did not kick when fitting the milking cluster in the first day of milking. Around 56 % of them increased the number of steps along milking assessments, while ~33 % reduced it. The b-coefficients of FD and for the number of steps in P2 were not associated to the b-coefficients of milking assessed variables. The b-coefficient and the number of steps on the first assessment day of P2 showed a significant effect ($P < 0.05$) on milking reactivity scores ($F = 6.06$ and 6.54 ,

* Paranhos da Costa, M.J.R., Taborda, P.A.B., Carvalhal, M.V.L., Valente, T.S. 2021. Individual differences in the behavioral responsiveness of F1 Holstein-Gyr heifers to the training for milking routine. **Applied Animal Behaviour Science**, 241, 105384. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105384>.

respectively) and number of steps ($F = 5.73$ and 7.88 , respectively) assessed in the first day of milking. None of the other independent variables showed significant effect on b-coefficients of milking reactivity scores and number of steps during milking. We conclude that training reduces fear to humans and cows' reactivity to milking, and that individual difference between heifers play an important role in the training results.

Keywords: dairy cattle, habituation, milking reactivity, temperament

1. Introduction

Milking primiparous cows in the early stage of lactation is a challenge for dairy farmers, since the animals usually show strong reactions when being driven to the milking parlor and subjected to the daily milking routine (Van Reenen et al., 2002; Sutherland and Huddart, 2012). Such reactions often lead to increased labor time and a higher risk of work-related accidents, creating handling difficulties and welfare problems for both, humans and cows. Alongside animal health, productivity and milk quality may also get compromised due to the higher amount of residual milk in more reactive cows, which leads, consequently, to higher somatic cell count of milk and higher risk of mastitis (Haskell et al., 2014; Hedlund and Løvlie, 2015).

It was observed individual differences have an important role in the way that the first-lactation cows react toward the milking machines, affecting, for example, the milk ejection of Holstein-Frisian primiparous cows (Van Reenen et al., 2002). These differences are probably related to cow's temperament, which modulates the way that each one reacts to potentially stressful situations, as reported for calves by Lecorps et al. (2018) and for dairy cows by Hedlund and Løvlie (2015).

Many studies have evaluated the effect of early positive handling (or training) to reduce heifers' fear toward humans and to the milking parlor and, by this, to lessen first-lactation cows' reactivity during milking (Breuer et al., 2003; Jago et al., 2006; Sutherland and Huddart, 2012; Sutherland and Dowling, 2014; Sutherland et al., 2018; Ujita et al., 2021). Most of these studies were performed comparing groups of

animals exposed or not (control) to training procedures and, up to date, we did not find any study addressing the individual differences in heifers' behavior throughout the training period, especially for F1 Holstein-Gyr heifers, despite this subject has been previously assumed as significantly important for dairy cows, due to the direct effect on their welfare and productivity (Sutherland and Huddart, 2012; Hedlund and Løvlie, 2015).

Habituation is a non-associative learning process that results in decreased responsiveness to repeated stimulus (Grissom and Bhatnagar, 2008), and it has been used to reduce fear response to novelty, like the situation faced by primiparous cows when subjected to the daily milking routine procedures (Kutzer et al., 2015). Thus, the aim of this study was to assess the individual differences in behavioral responses of F1 Holstein-Gyr heifers subjected to habituation protocols to humans and milking procedures. Accordingly, we propose the following hypotheses: 1) there are individual differences in heifers' behavior subjected to the habituation protocols and 2) these differences have a key role in the modulation of first-lactation cows' reactivity when exposed to the milking procedures.

2. Materials and methods

This study was approved by the Committee of the Ethical Use of Animals of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil (Protocol n. 005215/18).

2.1. Location and animals

The study was conducted in a commercial dairy farm (Fazenda Floresta[®]) located at the municipality of Lins, state of Sao Paulo, Brazil (19°44'54" S and 47°55'55" W). A total of 31 F1 Holstein-Gyr heifers were evaluated between February and April 2018. All heifers were in late pregnancy when joined the training, calving within an interval of 15 to 35 days after joining training procedures. The average age at first calving was 945 ± 72 days (ranging from 791 to 1068 days).

2.2. Training protocol

The training protocol was carried out in two phases. The phase 1 was carried out in a paddock, during feeding time for 11 consecutive days, once a day, in the morning, as follow: two people stayed with the heifers, and one of them tried to approach and touch each animal individually. The approach attempt of each heifer was carried out once a day, after selecting the target heifer, which was far from the others. Each approach was done slowly (one step per second), talking with soft voice and without eye contact with her. The other person stayed far, observing and recording the flight distance (FD) of each heifer. The FD test stopped immediately when the heifer moved away from the person in each approaching attempt, and the FD was recorded. It is important to point out that all heifers were in close contact with humans before starting the phase 1 of training, since they had daily contact with the stockpeople during the delivery of food supplement. The number of FD assessments per heifer ranged from 5 to 11 (mode = 8).

The phase 2 was carried out in a milking parlor and lasted nine days. In the first four consecutive days, the heifers were driven into the milking facilities once a day, aiming to habituate them to the new environment. During these days, the heifers stayed in the holding yard for 15 min., fans and sprinklers turned on, then they were driven, in a calm and peaceful way, through the milking parlor without being restrained. In the last five days, after repeating the initial procedures of this phase, the heifers were positioned in the parlor and physically stimulated by a handler located in the milker's pit.

Tactile stimulation was carried out by using a rod made wood (with natural color, 2 m long, and 5 cm diameter) with white plastic bags attached to one of its extremities, forming a plastic swab like structure, with 30 cm long and 20 cm in diameter, with which the heifer's body was touched. The tactile stimulation of each heifer was carried on a soft manner for three minutes, brushing her hips, rib, belly and udder. Heifers' reactions toward tactile stimulation were recorded by counting the number of steps and kicks.

After calving all primiparous cows were subjected to the milking routine, and their reactions when fitting the milking cluster were assessed throughout four

consecutive days, by counting the numbers of steps and kicks, and also ascribing one of the eight milking reactivity scores (adapted from Paranhos da Costa and Broom, 2001) described in Table 1. These assessments were carried out by one previously trained observer, who showed an almost perfect interrater reliability ($\kappa > 0.90$) tested against a gold standard Trainer (a senior researcher), when scoring milking reactivity.

Aiming to check the effect of time last from the end of phase 2 of training to calving on cows' responses to milking procedures, the intervals between the last days in training and the first milking day were recorded. Based on this information three interval classes (IC) were considered: IC1 = calving in up to 7 days after finishing training period, IC2 = calving between 8 and 14 days after finishing training period, and IC3 = calving in more than 14 days after finishing training period. Twelve heifers (~39%) were allocated in IC1, six (~19%) in IC2, and 13 (~42%) in IC3.

Table 1. Description of the milking reactivity scores used to assess F1 Holstein-Gyr primiparous cows' reactions when fitting the milking clusters.

Score	Descriptions
1	Cow stands quietly
2	Cow remains still, but it can arch its back and stretch its legs
3	Cow gently moves only one hind leg
4	Cow gently moves both back legs, backing up them in an alternate way
5	Cow shows occasional vigorous hind legs movements
6	Cow shows vigorous hind and front legs movements
7	Cow kicks
8	Cow is very agitated, showing vigorous movements and frequent kicking, making milking procedure impossible without tying her hind legs.

Adapted from Paranhos da Costa and Broom (2001).

2.3. Statistical analyses

The repeated behavioral measurements recorded in each pre-calving training phase and during the first four consecutive days of milking were used to evaluate individual changes over time, by carrying out a linear regression model for each animal. The regression coefficients (b) were further used as an individual measure to classify the heifers that habituated (negative b-coefficients), were neutral (b-coefficients equal to zero) or sensitized (positive b-coefficients) in each training phase. Moreover, the determination coefficient (R²) of each individual linear regression model and the P-value of each b-coefficient was used to determine which heifer/cow had a consistent and significant behavioral change overtime.

Kicking was assumed as a binomial variable (0 = no kick or 1 = at least one kick) and the occurrence was daily recorded during phase 2 and when fitting the milking clusters post-calving. Based on these records, the percentage of days that each animal kicked was calculated for phase 2 (five days) and milking assessments (four days). Heifers/cows with less than five records in training phase 1 and 2, and at least three records post-calving assessments were removed from data analyses (being one from phase 1 and phase 2 of training; and three from milking assessments).

Pearson coefficients of correlations between the b-coefficients of each training phase and b-coefficients of post-calving assessments were calculated. A general linear model was used to assess the effects of heifers' behavioral responsiveness during training phase 1 and 2 (represented by their b-coefficients) on cow's response when fitting the milking cluster during the first day post-calving (milking reactivity scores and number of steps). The same model was used to assess the heifer's responsiveness during phases 1 and 2 on the b-coefficient of milking reactivity scores and number of steps post-calving, assessed when fitting the milking cluster during four consecutive days. The model included the interval classes as fixed effect, and b-coefficients of phase 1 and 2, number of steps on the first assessment day of phase 2 and the percentage of kicking of phase 2 as covariates. P-values were assumed as significant when < 0.05. All statistical analyses were carried out in SAS software package (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. Results and discussion

This study was carried out aiming to evaluate individual differences in the behavioral responsiveness of F1 Holstein-Gyr heifers subjected to pre-milking habituation protocols, which were designed with the goal of simultaneously reducing the fear of people and reactivity by cows during milking procedures. Table 2 shows a summary of the descriptive statistic (means, standard deviations (SD), minimum and maximum values and the coefficients of variation (CV, %) for flight distance (FD, m), number of steps during phase 2 of training, milking reactivity score, and the number of steps during milking, considering the first and last days of each phase (phases 1 and 2 of training and milking). The high SD and CV values indicate the relevance of individual differences in the way that heifers/cows reacted to training and milking procedures.

Table 2. Means, standard deviations (SD), mode, minimum (Min.) and maximum (Max.) values and the coefficients of variation (CV, %) for flight distance (m), steps during phase 2 of training, milking reactivity score and steps during milking, considering the first and last days of each phase (phases 1 and 2 of training and milking).

Traits	N	Mean	SD	Min.	Max.	CV (%)
First day of training/milking						
Flight distance (m)	30	1.72	1.22	0.0	3.0	70.82
Number of steps during phase 2	30	5.60	7.73	0	27	138.05
Milking reactivity (score)	28	3.04	2.17	1	8	71.43
Number of steps during milking	28	5.29	7.74	0	25	146.35
Last day of training/milking						
Flight distance (m)	30	0.69	0.52	0.0	1.0	75.37
Number of steps during phase 2	30	3.37	4.69	0	22	139.21
Milking reactivity (score)	28	3.93	1.90	1	8	48.46
Number of steps during milking	28	4.89	6.30	0	25	128.82

The training started in a paddock, being carried out twice a day during feeding time, when two humans stayed close to the heifers and one of them tried to approach

each one of them at a time, measuring its FD. All heifers showed a short FD in the first assessment day, and most of them reduced it expressively in the last assessment. Among them, only one heifer showed FD equal to zero on the first assessment day and another 10 animals (~34 %) had FD lower than 1.0 m. In addition, the FD of 90 % of the heifers were lower than 1.0 m on the last assessment day. Thus, as expected, on this phase most heifers (26 out of 30, ~87 %, Fig. 1) got habituated to humans, showing a decrease in FD over time.

Only four heifers were classified as sensitized over the assessment days showing positive *b*-coefficients. However, it is important to highlight that three of them had a very short FD (0.0, 0.1 and 0.8 m) on the first assessment day, and their *b*-coefficients were close to zero, ranging from 0.006 to 0.0417 (Fig. 1).

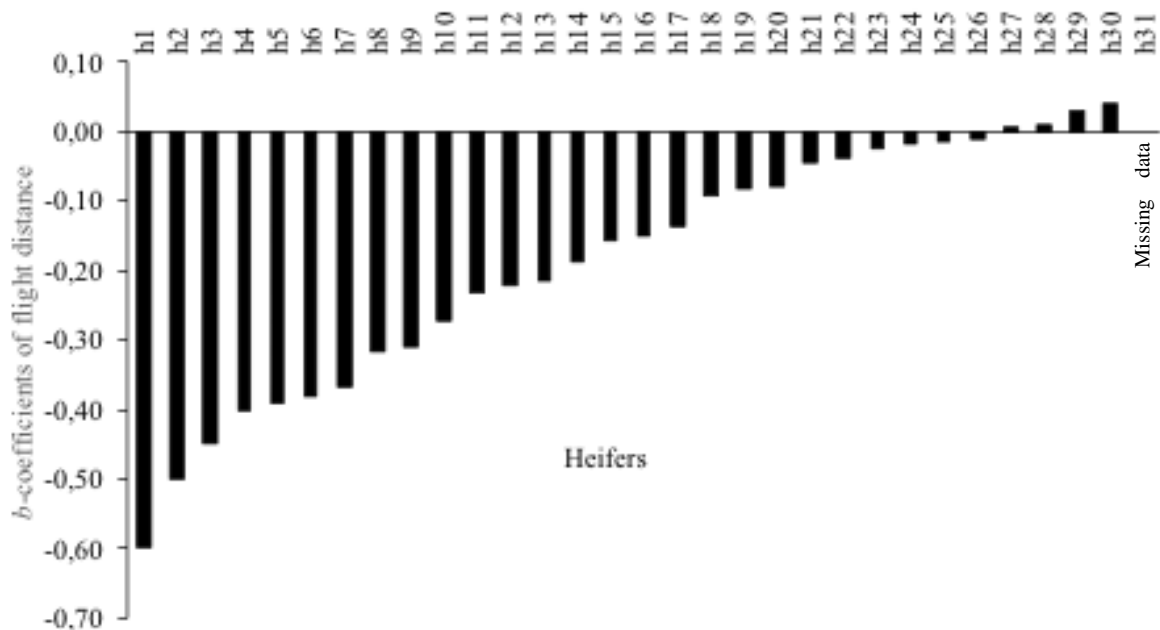


Figure 1. Distribution of flight distance *b*-coefficients (crescent order) for 30 F1 Holstein-Gyr heifers on the phase 1 of training.

Similar results were reported by Bremner (1997) for heifers subjected or not to a training protocol, reporting that approximately 60 % and 80 % of the trained heifers from two different herds reduced their FD throughout the training period. Boissy and Bouissou (1988) also observed a reduction in FD of early handled Friesian heifers

(between birth to 9 months of age) when compared to the control group. Additionally, Kutzer et al. (2015) described that most Holstein-Friesian and Swiss heifers reduced FD after being submitted to a habituation process. Based on these results, we assume that the habituation of F1 Holstein-Gyr heifers to humans in a paddock was a useful strategy to facilitate handling, along with reducing flight distance. Such changes have potential to improve the welfare of these animals by lowering fear of humans.

Nevertheless, our results also indicated that it is important to consider the individual differences between dairy heifers when carrying out initiatives to habituate them to human beings, considering the way that FD have changed over time. More than one third of the heifers (~37 %) assessed in our study habituated and were consistent in reducing FD, by showing high values for the determination coefficient ($R^2 > 0.50$) in which ~82 % (9 out of 11) had P-value < 0.05 for the b-coefficient. On the other hand, a considerable number of heifers that habituated to humans (negative b-coefficient, $N = 15/30$, 50 %) were significantly less consistent in reducing FD over time as indicated by $R^2 \leq 0.50$ and P-value > 0.05 . A clear tendency was observed among these animals, showing important individual variation in FD, which fluctuated, going up and down, throughout the assessment days (Fig. 2 and Supplementary Fig. S1). Thus, it worth mentioning that b-coefficients can be assumed as good indicators of individual differences in the way that animals habituated, sensitized, or did not change (neutral) only when the R^2 was greater than 0.50. When this is not the case, b-coefficients should be used with caution, preferably combined with the graphic visual analyses, as showed in the Supplementary Fig. S1. From a practical point of view, it is also important to identify the inconsistent animals when carrying out training protocols.

Individual differences in behavior are of considerable biological significance been directly influenced by genetic and environmental factors, thus, it is imperative to define a strategy to capture such variation across different environmental stimuli. By this, we might be able to improve our understanding of the nature of the individual differences. As individuals can differ significantly in their behavioral responses, the use of a single regression for each animal can be considered as an indicator of individual differences in the way heifers/cows react over time. This approach gains

special relevance considering that little attention has been paid to the assessment of the individual ability of dairy cattle to cope with their environment when comparing with other farm animal species (Koolhaas and Van Reenen, 2016).

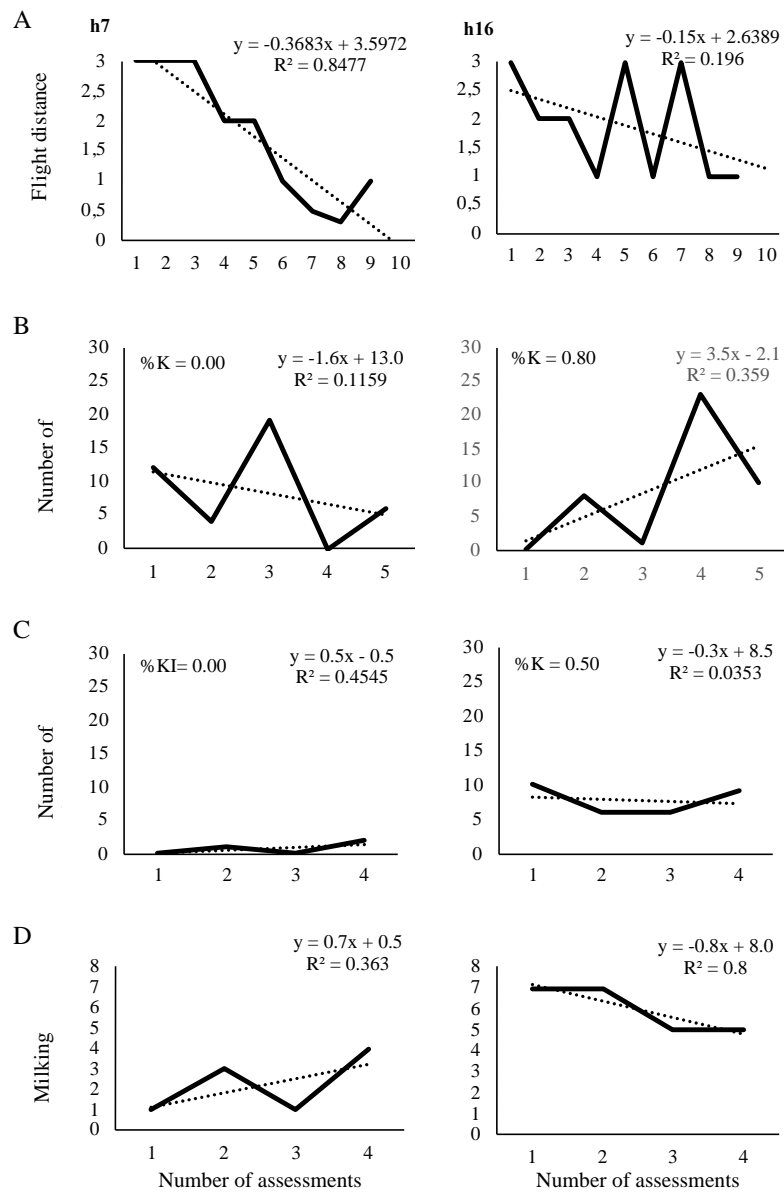


Figure 2. Two examples (heifers 7 and 16) of the linear regressions of flight distance (A, m), numbers of steps (B = phase 2 of training and C = first milking) and milking reactivity scores (D), and percentage of assessments sessions that the heifer/cow kicked (%K) recorded from the F1 Holstein-Gyr heifers/cows exposed to two habituation protocols and first milking. Complete information is showed in Supplementary Fig. (S1).

Soon after eleven days of human approach in a paddock, the heifers were processed into the milking parlor for four consecutive days, aiming to habituate them to the new environment and handling procedures (phase 2). It was observed a considerable individual variation in animals' response on the first assessment day of phase 2, in which 11 heifers presented zero steps, and eight heifers more than 10 steps. During this training phase, 14 heifers reduced the number of steps over time, and an equal number got sensitized ($N = 14/30$, ~47 %, for both classes). Three of them (~10 %) were classified as neutral (b-coefficients equal to zero), in which two of them did not show any reaction (zero steps when kept inside the milking parlor) when subjected to the phase 2 of training.

Again, although the b-coefficients were all not significant (P -value > 0.05) there were clear individual differences in the way that the heifers reacted to the second phase of training, as indicated by their determination coefficient and b-coefficients (Fig. 3 and Supplementary Fig. S1). In addition, it was observed that there is a considerable individual variation across different environmental stimulus since the b-coefficients for FD (phase 1) and for the number of steps (phase 2) were not associated ($N = 30$ in both phases, Pearson coefficient of correlation, $r = -0.14$, $P = 0.48$). This result indicates that the heifers reacted differently to distinct environmental challenges when subjected to the FD test and during training in the milking parlor, leading to different behavioral responses over time.

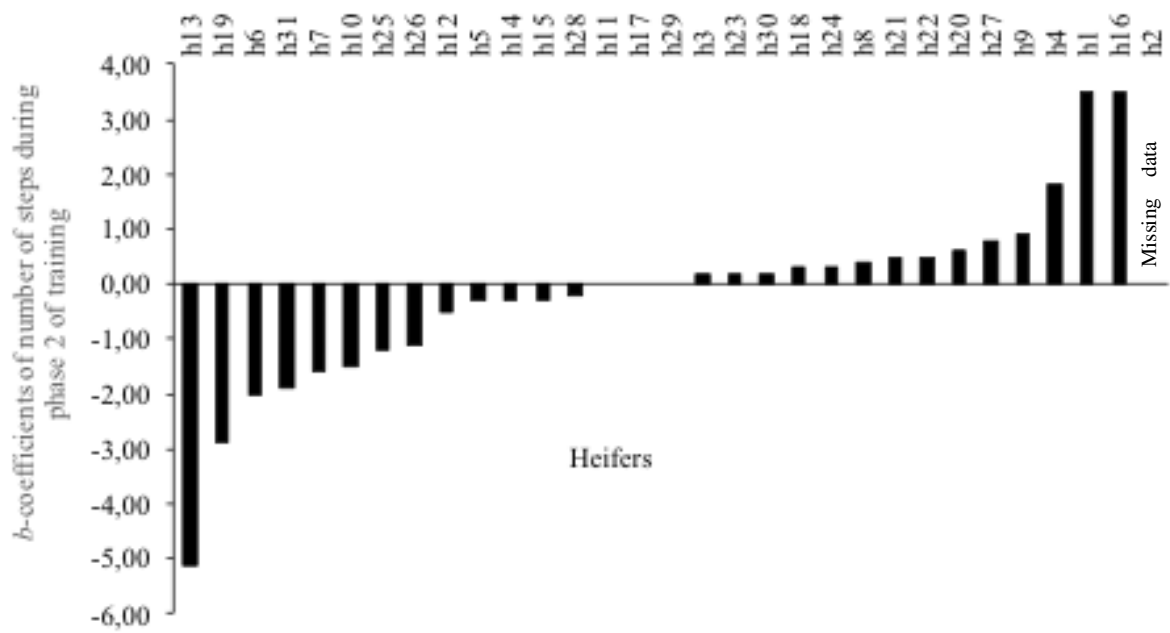


Figure 3. Distribution of *b*-coefficients (crescent order) for number of steps from 31 F1 Holstein-Gyr heifers assessed when carrying out tactile stimulation during phase 2 of training.

The individual variation on heifers' behavioral expressions across different situations corroborates the model proposed by Réale et al. (2007), defining five main dimensions of temperament. Thus, the distinct environments that the heifers were exposed during the tests might be directly related to different dimensions of each animal temperament explaining the important observed variation on their responsiveness between phases 1 and 2 of training. Besides the environmental effects, it worth mentioning that given the gestation stage the heifers were under considerable physiological, metabolic, and endocrine changes which might be associated with distinct stress levels.

The majority of the F1 Holstein-Gyr heifers ($N = 18/31$, 58 %) did not kick when receiving tactile stimulation on the first assessment day of phase 2. Moreover, around one-third of them ($N = 10/30$, ~33 %) did not kick in any of the five consecutive days. The percentage of days that each heifer kicked is showed in Fig. 4. Only one heifer was consistent in kicking by showing this behavior everyday of phase 2. It worth mentioning that the proposed training protocol also aimed to reduce

kicking during the first milking, since when it happens there is an increase in the risk of accident and labor time, impoverishing milking efficiency.

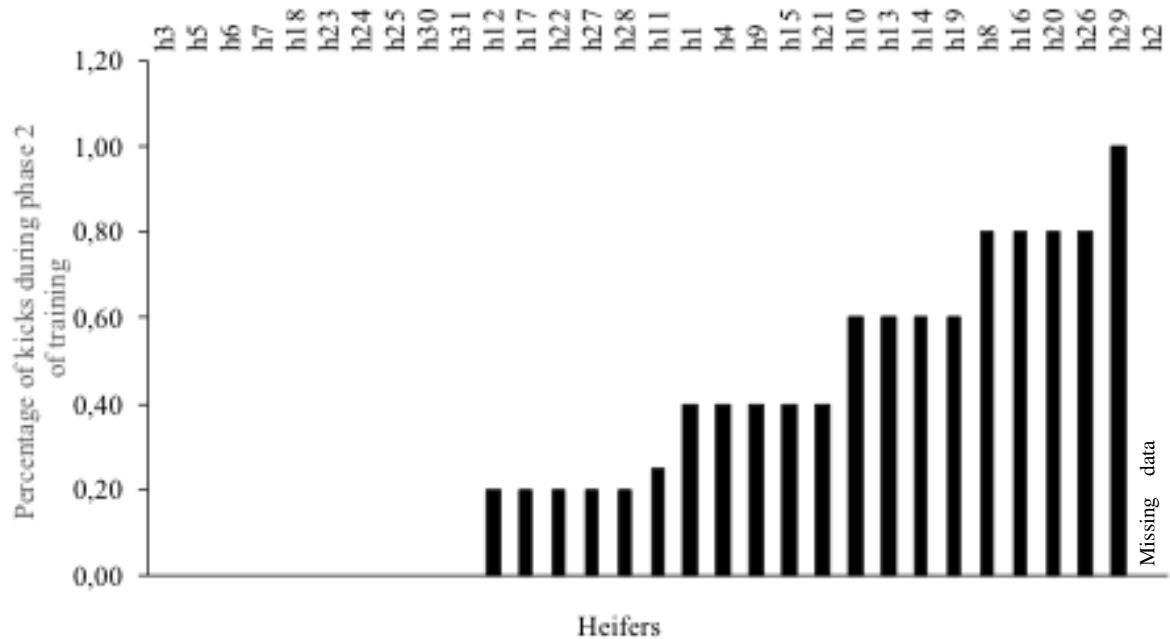


Figure 4. Individual differences among 31 F1 Holstein-Gyr heifers in the percentages of kicking (crescent order) during phase 2 of training.

At the end of phase 2, all animals were subjected to post-calving assessment. More than one-third of the heifers ($N = 12/31$, ~39 %) calved within the first week after the last day being trained in phase 2; six of them calved within the second (~19 %), seven (~23 %) within the third and other six (~19 %) within the fourth week after finishing phase 2 of training. All cows were subjected to the normal daily milking routine one day after calving, being milked in the same milking parlor where the phase 2 of training was carried out.

Almost half of the cows ($N = 14/31$, ~45 %) did not step and ~93 % ($N = 28/30$) did not kick when fitting the milking cluster for the first time after calving. However, four of them changed their behavior over time, stepping (3 or more steps) at least in two of the following assessment days when fitting the milking cluster to carry out the milking procedures, and only one of them kicked during the following days. When considering the four consecutive milking assessment days after calving, ~32 % of the heifers ($N = 9/28$) reduced the number of steps over time, four did not

change (~14 %, two of them did not step in any of the assessment days) and 15 (~54 %) increased it, being classified as habituated (negative b -coefficients), neutral (b -coefficients equal to zero) or sensitized (positive b -coefficients), respectively. Additionally, the cows were consistent in the expression of kicking behavior in which only two (2/28, ~7%) kicked at the first day of post-calving assessment but stopped kicking in the following days when fitting the milking cluster.

The individual differences in the way cows changed their stepping behavior over time when fitting the milking cluster, as indicated by their b -coefficients, are showed in Fig. 5 and Supplementary Fig. S1. The b -coefficients of FD and number of steps in phase 2 were not associated to the b -coefficients of number of steps ($r = 0.09$ and -0.08 , respectively) and cows' reactivity score ($r = 0.12$ and -0.06 , respectively) during milking procedures ($N = 30, 30$ and 28 , respectively, and all $P > 0.05$).

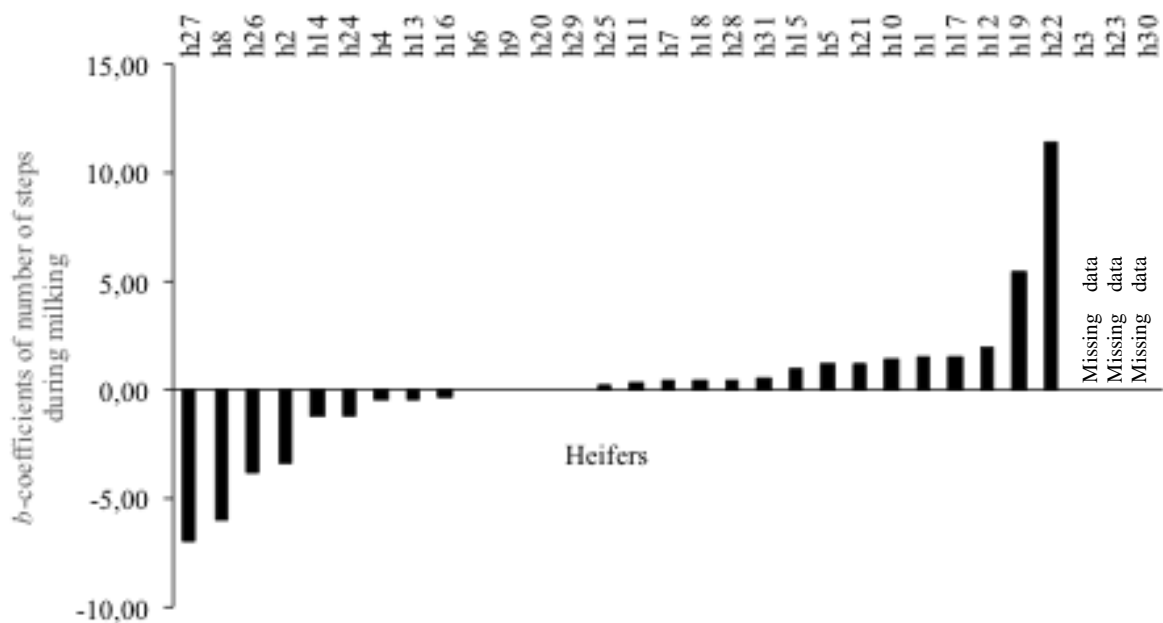


Figure 5. Distribution of b -coefficients (crescent order) for number of steps of 28 F1 Holstein-Gyr heifers assessed when fitting the milking cluster during the first four consecutive days of milking procedures.

According to Jago et al. (2006), pre-calving training resulted in reducing the number of steps and kicks during milking. Additionally, Ujita et al. (2021) also reported the heifers submitted to a prepartum training exhibited better behavioral responses when entering the milking parlor as well as a gradual reduction in their milking behavior responsiveness overtime. On the other hand, Sutherland and Huddart (2012) reported that heifers trained before calving exhibited higher frequency of steps and kicks during milking cluster attachment. Our results partially corroborate Jago et al. (2006) and Ujita et al. (2021) since ~46 % of the cows were classified as habituated or neutral for the number of steps and the great majority of them did not kick in any of the four consecutive days of milking assessment. This partially unexpected result may have occurred because our study was carried out with *Bos indicus* crossed dairy heifers, which are more reactive (Haskell et al., 2014) than the *Bos taurus*. It should be highlighted that the reduction in the number of kicks during milking has a practical value since cows that Fig. 3. Distribution of b-coefficients (crescent order) for number of steps from cows that often exhibit kicking behavior needs to have their hind legs tied with a rope to reduce the risk of work-related accidents.

A different tendency was observed for cow's responsiveness measured by using milking reactivity scores throughout four consecutive days post-calving, in which 6 from 28 cows (~21 %) habituated to the milking process, three did not change the milking reactivity score (~11 %), and 19 (~68 %) were classified as sensitized, increasing their reactivity scores throughout four consecutive days (Fig. 6). These results are in line with Sutherland and Huddart (2012) findings. Behavioral post-calving assessments also showed the presence of consistent individual variation in the way F1 Holstein-Gyr primiparous cows reacts toward environmental challenges (Supplementary Fig. S1). Moreover, it should be considered that alongside behavioral changes, there are strong physiological variations among animals due to the transition from late gestation to lactation, which might modulate cow's responsiveness during milking.

Among the independent variables included in the statistical models, the b-coefficient of phase 2 and the number of steps on the first assessment day in the phase 2 showed a significant effect ($P < 0.05$) on the milking reactivity scores ($F =$

6.06 and 6.54, respectively, $DF = 1$ for both) and number of steps ($F = 5.73$ and 7.88 , respectively, $DF = 1$ for both) assessed in the first day of milking. These results indicated that heifers which reduce the number of steps over time or showed a lower number of steps in the first day of phase 2 of training will be less reactive and show a lower number of steps in the first milking. None of the others independent variables had significant effect on the b -coefficients of milking reactivity scores and number of steps assessed during the first four consecutive days of milking ($P > 0.05$). It is important to highlight that almost 75 % of the animals ($N = 23/31$) received a reactivity score equal or smaller than 4, and only one cow was scored as 8 (see Table 1 for score description) in the first day post-calving. These results indicate that the training procedure was efficient in reducing animal's responsiveness in the first day of milking without working disruption as normally occurs for non-trained cows. This result corroborates the Kutzer et al. (2015) and Ujita et al. (2021) findings, who reported that trained heifers exhibited lower reactions measured by their behavior while entering the milking parlor and by the number of steps and kicks on the first day of lactation compared to untrained heifers.

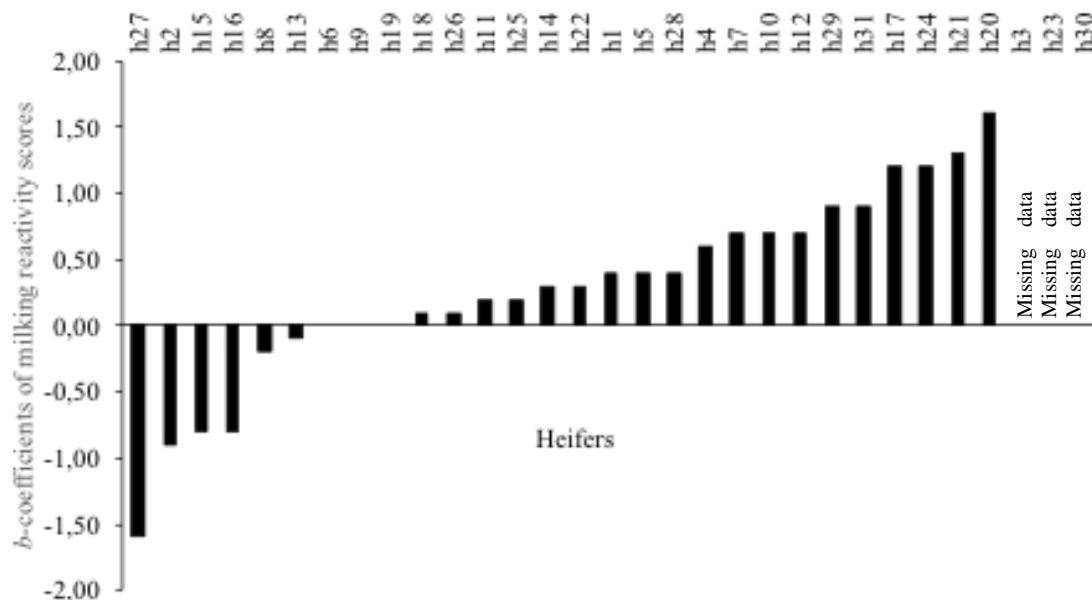


Figure 6. Distribution of b -coefficients (crescent order) for milking reactivity scores of the 28 F1 Holstein-Gyr heifers assessed when fitting the milking cluster during the first consecutive four days of milking.

These results are in line with Sutherland and Huddart (2012) findings. Behavioral post-calving assessments also showed the presence of consistent individual variation in the way F1 Holstein-Gyr primiparous cows reacts toward environmental challenges. Moreover, it should be considered that alongside behavioral changes, there are strong physiological variations among animals due to calving, which might lead to distinct cow's responsiveness during milking.

None of the independent variables (interval classes, *b*-coefficient, and the percent of kicking accessed pre-calving) included in the statistical models showed a significant effect on the milking reactivity scores and number of steps in the first day of milking, nor on *b*-coefficient of milking reactivity scores and number of steps post-calving, assessed during the four consecutive days of milking ($P > 0.05$). However, it is important to highlight that almost 71% of the animals ($N = 22/31$) received a reactivity score smaller than 4, and only one cow was scored as 8 (see Table 1 for score description) in the first day post-calving. These results indicate that the training procedure was efficient in reducing animal's responsiveness in the first day of milking without working disruption as normally occurs for non-trained cows. This result corroborates the Kutzer et al. (2015) and Ujita et al. (2021) findings, who reported that trained heifers exhibited lower reactions measured by their behavior while entering the milking parlor and by the number of steps and kicks on the first day of lactation compared to untrained heifers.

Many studies have reported that pre-calving training reduces heifers' reactivity (Van Reenen et al., 2002; Breuer et al., 2003; Jago et al., 2006; Sutherland and Huddart, 2012; Kutzer et al., 2015; Ujita et al., 2021), showing beneficial effects of pre-calving training when milking primiparous cows. This was confirmed by the milkers, who were in charge of milking the cows which participated in this study, reporting that the training made milking easier and faster, the cows were easily driven into the milking parlor and did not show any escaping behavior. Additionally, they did not face any situation that result in risk of labor accident. These personal communications are in line with Bremner (1997) and Ujita et al. (2021) results, showing that the trained heifers entered the milking parlor easily and had lower reactions during milking procedures when compared with the control ones.

Nevertheless, as pointed out by Bremner (1997) and Sutherland and Huddart (2012), and also confirmed by our results, the individual variation in the way heifers react to training should not be ignored. Therefore, we recommend that special attention should be paid to each heifer temperament when carrying out the training procedures.

4. Conclusion

There were clear individual differences in the way that F1 Holstein- Gyr heifers reacted to the training procedures when preparing them for the first milking, following the general tendency of animals showing consistent individual variation in the way they respond to environmental challenges. Therefore, we accept the first hypothesis that there are individual differences in heifers' reactions when subjected to the habituation protocols.

Since there were no clear association between animals' responses through the training phases and during first milking procedures, we also accept the second hypothesis, assuming that these individual differences strongly modulate the first-lactation cows' reactivity when exposed to the milking procedures.

Despite of this, it was observed a beneficial effect of training in reducing cows' reactivity when subjected to the first milking routine, as demonstrated by the higher frequency of low reactivity scores in the first day of milking as well as by the tendencies of low frequency of kicking behavior in an expressive number of cows. Thus, we recommend the use of training protocols to facilitate the first milking and that heifers' temperament should be taken into account when doing it.

5. References

- Boissy, A., Bouissou, M-F., 1988. Effects of early handling on heifers' subsequent reactivity to humans and unfamiliar situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20, 259–273. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(88\)90051-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(88)90051-2)
- Bremner, K.J., 1997. Behavior of dairy heifers during adaptation to milking. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* 57, 105–108.
- Breuer, K., Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., 2003. The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of nonlactating heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 84, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00146-1)
- Grissom, N., Bhatnagar, S., 2009. Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem.* 92, 215–224. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.001
- Haskell, M.J., Simm, G., Turner, S.P., 2014. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. *Front. Genet.* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00368>.
- Hedlund, L., Lovlie, H., 2015. Personality and production: Nervous cows produce less milk. *J. Dairy Sci.* 98, 5819–5828. DOI: 10.3168/jds.2014-8667
- Jago, J.G., Davis, K.L., Copeman, P.J., Woolford, M.M., 2006. The effect of pre-milking teat-brushing on milk processing time in an automated milking system. *J. Dairy Res.* 73, 187–192. DOI: 10.1017/S002202990500155X
- Koolhaas, J.M., Van Reenen, C.G., 2016. Animal Behavior and Well-Being Symposium: interaction between coping style/personality, stress, and welfare: relevance for domestic farm animals. *J. Anim Sci.* 94, 2284–2296. doi: 10.2527/jas.2015-0125

- Kutzer, T., Steilen, M., Gygax, L., Wechsler, B., 2015. Habituation of dairy heifers to milking routine - Effects on human avoidance distance, behavior, and cardiac activity during milking. *J. Dairy Sci.* 98, 5241–5251. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8773>
- Lecorps, B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G., 2018. Pessimism and fearfulness in dairy calves. *Sci. Rep.* 8, 1421. doi: 10.1038/s41598-017-17214-3
- Paranhos da Costa, M.J.R., Broom, D., 2001. Consistency of side choice in the milking parlour by Holstein±Friesian cows and its relationship with their reactivity and milk yield. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 70, 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00158-1).
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., Mcdougall, P.T., Dingemans, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 82, 291–318. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2007.00010.
- Sutherland, M., White, T., Chen, L., Hempstead, M., Huddart, F., 2018. To train or not to train heifers to the milking parlour prior to calving? That is the question for New Zealand dairy farmers. *New Zealand J. Anim. Sci. Prod.* 78, 177–182.
- Sutherland, M.A., Dowling, S.K., 2014. 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.* 9, 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2013.09.001>.
- 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>
- Ujita, A., El Faro, L., Vicentini, R.R., Lima, M.L.P., Fernandes, L.O., Oliveira, A.P., Veroneze, R., Negrão, J.A., 2021. Effect of positive tactile stimulation and

prepartum milking routine training on behavior, cortisol and oxytocin in milking, milk composition, and milk yield in Gyr cows in early lactation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 234. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105205>.

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. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74338-5

(Supplementary Fig. S1 is available in the end of this thesis).

CAPITULO 3 - Estimation of genetic parameters for milking temperament in Holstein-Gyr cows

Abstract

Dairy cattle with high temperament can cause several inconveniences during milking, leading to labor difficulties, increasing the risk of accidents with animals and workers, and compromising milk yield and quality. The aim of this study was to estimate variance components and genetic parameters for milking temperament and its genetic correlations with milk yield in crossbred Holstein-Gyr (HG) cattle raised in Brazil. A total of 6,641 records from 1,298 primiparous and multiparous lactating cows were collected in three commercial farms. Milking temperament, measured as milking reactivity of each cow, was assessed during pre-milking udder preparation (RP) and when fitting the milking cluster (RF) by ascribing scores from 1 (cow stands quietly) to 8 (cow is very agitated, showing vigorous movements and frequent kicking). The numbers of steps (S_{RP} and S_{RF}) and kicks (K_{RP} and K_{RF}) were also recorded during pre-milking udder preparation and when fitting the milking cluster, respectively. Milk yield (MY) was recorded from the farms data base, in two of them it was considered data from the monthly milk control, which could or could not coincide with the days to the milking reactivity measurement, and in the remaining farm the milk yield data was recorded in the same day that milking reactivity assessment. Genetic parameters were estimated using the THRGibbs1f90 program applying a threshold model which included contemporary group (comprised by farm, year and season of birth, genetic group 1/2 HG, 3/4 HG, and other HG crosses, application of exogen oxytocin and parity) as a fixed effect, animal age at the assessment day (linear and quadratic effects) and number of days in milking (linear effect) as covariates, and direct additive genetic and residual effects as random effects. The heritability estimates were: $RP = 0.11 \pm 0.04$, $RF = 0.18 \pm 0.05$, $MY = 0.15 \pm 0.06$, $S_{RP} = 0.09 \pm 0.03$, $K_{RP} = 0.10 \pm 0.04$, $S_{RF} = 0.12 \pm 0.07$ and $K_{RF} = 0.34 \pm 0.12$. The repeatability estimates were 0.35 ± 0.04 ; 0.41 ± 0.03 and 0.84 ± 0.07 for RP, RF, and milk yield, respectively; and 0.38 ± 0.02 , 0.20 ± 0.05 , 0.45 ± 0.02 , and 0.53 ± 0.06 for S_{RP} , K_{RP} , S_{RF} and K_{RF} , respectively. Positive and strong genetic correlations between RP-RF

(0.78 ± 0.12), RP- S_{RP} (0.88 ± 0.07), RP- K_{RP} (0.52 ± 0.23), RF- S_{RF} (0.93 ± 0.12) and RF- K_{RF} (0.70 ± 0.35) were found. Estimated heritability for milking reactivity were low magnitude but it can be included as selection trait in Holstein-Gyr crosses and a genetic progress through this trait will be seen in the long term. Milking reactivity during pre-milking udder preparation has a positive and high genetic correlation with milking reactivity during fitting the milking cluster, also exist a positive genetic correlation between milking reactivity and counting of steps and kicks during pre-milking udder preparation and during fitting the milking cluster. Milking temperament is a consistent character in each cow. A greater number of records are necessary to estimate with accuracy the genetic and phenotypic correlations between milking reactivity and milk yield, since in our study we cannot affirm correlations between the characteristics because they present a high standard deviation and the highest posterior density interval containing 95% have a very high range including the zero.

Keywords: dairy cattle, *Bos taurus*, *Bos indicus*, heritability, milking reactivity.

1. Introduction

Individual variability has been observed in the behavior of dairy cattle in response to a stressor or environmental challenge, reflecting a considerable impact on performance, reproduction, health and animal welfare (SUTHERLAND et al., 2012; HASKELL et al., 2014; FRIEDRICH et al., 2015). During milking, a calm handling facilitates carrying out needed procedures as well as minimizes short and long-term losses. Additionally, working with calm animals allows obtaining higher milk yield and, consequently greater profitability compared to processing nervous animals into the milking parlor (GRANDIN, 1993; BROUCEK et al., 2008; HASKELL et al., 2014).

Results from previous studies suggest that animals with calmer temperament have better production rates and greater milking speed (WICKHMAN, 1979; LAWSTUEN et al., 1988; CUE et al., 1996; SAMORÉ et al., 2010; SEWALEM et al., 2011) than the nervous ones. Breuer et al. (2000) working with Holstein cows

reported that special attention is required for animals showing higher level of body and leg movements, and kicks during milking, which inevitably leads to difficulties in carrying out the handling procedures. These variables have been used to characterize the level of stress during milking and it is consequently expected to be accompanying inhibition of milk ejection and decreased milk yield (BREUER et al., 2000).

The estimation of genetic parameters for milking temperament in dairy cattle have been widely reported in the literature, with heritability values ranging from low to moderate magnitude from 0.07 to 0.47 (O'BLENESS et al., 1960; DICKSON et al., 1970; VISSCHER and GOODARD, 1995; CUE et al., 1996; PRYCE et al., 2000; HIENDLEDER et al., 2003; SEWALEM et al., 2011; PIRES et al., 2013). Low heritability estimates (0.07) for milking temperament of Holstein cows were reported by Pryce et al. (2000) and Hiendleder et al. (2003) when applying a score from 1 (defined for authors as "nervous/aggressive") to 9 ("quiet/docile"). Sewalem et al. (2011) estimated heritability of 0.13 working with a data base of 1,940,092 Holstein cows measured by applying a score ranging from 1 ("very nervous") to 5 ("very calm"). Similarly, Cue et al. (1996) reported heritability estimates equal to 0.14 and 0.17 for milking temperament of Holstein and Jersey cows, respectively, and a higher estimate (0.33) for Ayrshire cows. These authors used a scoring system that ranged from 1("vicious") to 9 ("placid").

For the same trait, Visscher and Goddard (1995) estimated heritability of 0.22 for Holstein (14,596 records) and 0.25 for Jersey (4,695 records) cows. Milking temperament scores ranged from 1 ("acceptable") to 5 ("undesirable"). For Holstein breed, heritability in milking temperament were estimated at 0.40 (O'BLENESS et al., 1960) based on 25,000 records and 0.47 (DICKSON et al., 1970) using information from 27 herds with 1,017 records through a score of 1 ("calm") to 4 ("nervous").

In a dairy industry, the estimation of genetic parameters as heritability, repeatability, genetics and phenotype correlations for milking temperament have been studied, but mainly the studies carried out on this subject refer to *Bos taurus*, showing the importance of using local breeds to improve profitability while reducing health and welfare issues (O'BLENESS et al., 1960; DICKSON et al., 1970;

VISSCHER and GOODARD, 1995; CUE et al., 1996; PRYCE et al., 2000; HIENDLEDER et al., 2003; SEWALEM et al., 2011; PIRES et al., 2013). The introduction of milking temperament trait as a selection index in dairy production is a tool to select calmer animals and in the long term achieve a genetic change in the herd for this characteristic (HASKELL et al., 2014; CHANG et al., 2020). If we focus on genetic-environment interaction the *Bos indicus* breeds are more adapted to tropical conditions, but their temperament is under concern for dairy producers since the cows are usually more reactive to the milking procedures, presents higher fear of human approach and are less productive (FORDYCE et al., 1982; PARANHOS DA COSTA et al., 2015). Crossing *Bos indicus* with *Bos taurus* animals is one strategy to address this problem, and in Brazil the greater part (80%) of milk production is provided by crossed between Holstein (*Bos Taurus*) and Gyr cattle (*Bos indicus*) (FERREIRA et al., 2002; MADALENA et al., 2012). Up to date, we did not find any study estimating genetic parameters of milking temperament in *Bos indicus* cattle and their crosses, for this reason, this study contributes to the novelty for Brazil and other dairy production systems that use *Bos taurus* and *Bos indicus* in cross. The aim of this study was to estimate genetic and phenotypic parameters of milking temperament and their genetic correlations with milk yield in crossbred Holstein-Gyr (HG) cattle raised in Brazil.

2. Materials and methods

This study was approved by the Committee of the Ethical Use of Animals of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil (Protocol n. 005215/18).

2.1. Animals and housing conditions

The study was conducted from April to February 2018 to May 2019. Phenotypic data was collected from three commercial dairy farms associated to the Girolando Breeders Association (GIROLANDO) and is comprised of 6,641 records from 1,298 lactating Holstein-Gyr cows, daughters of 164 sires and 715 dams. The

Girolando Breeders Association provided the pedigree data containing 19,531 sires and 349,222 dams.

In two of the farms (farms 1 and 2) the cows were housed in free stall and on the remaining (farm 3) they were kept on pasture. Every day, twice a day, in the morning and afternoon, they are carried walking to the milking parlor; two farms (2 and 3) milked with in an automatic cluster removal system and the remaining farm (farm 1) milked with a carrousel system. In all farms, once the cow calves, it is separated from the calf before 24 hours, and subsequently the cow directly integrates the milking herd. The replacement of animals in the dairy herd is from the calves themselves born on the farms.

All dairy cows used in the present study were born between 2009 and 2017. Most of the cows were 3/4 Holstein-Gyr (688, 53%), followed by F1 Holstein-Gyr (544, 41.9%) and only 66 (5.1%) represented other Holstein-Gyr crosses. A total of 869 (66.9%) cows were primiparous and 429 (33.1%) multiparous, within primiparous cows, 498 (57%) were 3/4 Holstein-Gyr, 337 (39%) were 1/2 Holstein-Gyr and 34 (4%) were other Holstein-Gyr crosses; within multiparous cows, 207 (48%) were 1/2 Holstein-Gyr, 190 (44%) were 3/4 Holstein-Gyr and 32 (7%) were other Holstein-Gyr crosses.

Cow birth seasons were classified as rainy (September to February) and dry (March to August). The average age at first calving was 32 ± 14 months (ranging from 21.8 to 61.3 months). Lactation days were calculated as the number of days in lactation that the cow was at the time of the milking temperament measurement, ranging from 9 to 305 days, being 432 cows in start lactation (9 to 100 days), 619 middle lactation (100 to 200 days) and 247 cows in end of lactation (200 to 305 days), with an average of milk yield of 20.5 ± 6.3 L/day (ranging from 3.0 to 59.4 L/day).

After pre-milking udder preparation and before of milking process 327 (25.2%) cows received application of exogenous oxytocin and 971 (74.8%) did not. Within cows that received application of exogenous oxytocin 181 (55.4%) were primiparous and 146 (44.6%) were multiparous; and those cows that did not received application

of exogenous oxytocin, 688 (70.9%) were primiparous and 283 (29.1%) were multiparous.

2.2. Milking temperament assessment

From each farm, phenotypic data of milking temperament was collected as milking reactivity during three consecutive days for three consecutive months, totaling 9 measurements for each cow in the first milking of the day. However, as commercial farms not all animals were available to be recorded 9 times for reasons out of our control, such as health issue or other treatment, generating unequal number of available measurements. Of total data collected, most animals (318 cows, 24%) were evaluated 3 times out of 9, then 201 cows (15%) had 6 registers, and 161 (12%) of cows 8 registers (Table 1).

Table 1. Number of cows and respective percentages according to the number records of milking reactivity score.

Number of records of milking reactivity score	Number of cows	%
1	42	3
2	128	10
3	318	24
4	69	5
5	142	11
6	201	15
7	112	9
8	161	12
9	125	10
Total	1298	100

Milking reactivity was recorded during pre-milking udder preparation (RP) and when fitting the milking cluster (RF) by assigning one of the scores described in Table 2. The numbers of steps and kicks were also recorded during pre-milking udder preparation (S_{RP} and K_{RP} , respectively), and when fitting the milking cluster (S_{RF} and K_{RF} , respectively).

Table 2. Description of the milking reactivity scores used to assess Holstein-Gyr cows' milking temperament during pre-milking udder preparation and when fitting the milking cluster.

Score	Descriptions
1	Cow stands quietly
2	Cow remains still, but it can arch its back and stretch its legs
3	Cow gently moves only one hind leg
4	Cow gently moves both back legs, backing up them in an alternate way
5	Cow shows occasional vigorous hind legs movements
6	Cow shows vigorous hind and front legs movements
7	Cow kicks
8	Cow is very agitated, showing vigorous movements and frequent kicking, making milking procedure impossible without tying her hind legs.

Adapted from Paranhos da Costa and Broom (2001).

Milk yield was collected according to data provided by the farms, in two farms this variable was considered from the monthly milk control, it was considered as a monthly average which could or could not coincide with the days to the milking reactivity measurement, and the remaining farm the milk yield data provided from the same day that milking reactivity was measurement, therefore, each cow presented a milk yield value of its own for each day of milking reactivity. These differences in data base in milk yield variable may imply errors in the estimates of correlation when the milk yield characteristic is associated with milking reactivity.

2.3. Statistical analyses

In total, 119 contemporary groups comprised by farm, year and season of birth, genetic group, application of exogenous oxytocin and parity (primiparous or multiparous). The THRGIBBS1F90 software belonging to the family of BLUPf90 (MISZTAL et al., 2002) was used to estimate (co)variance components and genetic parameters implementing a Bayesian Inference using Gibbs sampling algorithm. A multi-trait analysis was performed to estimate variance components, heritability and repeatability for reactivity, steps and kicks pre-milking udder preparation (RP , S_{RP} , K_{RP}), and reactivity, steps and kicks during fitting the milking cluster (RF , S_{RF} , K_{RF}). Genetic and phenotypic correlations of milking reactivity traits with milk yield were also estimated. Considering milking reactivity scores a categorical trait, the Bayesian

threshold is the most appropriate method for conducting genetic analyses which assumes that the number of levels are related to an underlying continuous scale containing fixed and random effects (VAN TASSELL et al., 1998). Data from milking reactivity during pre-milking udder preparation (RP) was considerate as a score from 1 to 7 (score 8 was eliminated because it contained few data and was added to score 7), milking reactivity during fitting the milking cluster (RF) was considerate as a score from 1 to 8, steps and kicks during pre-milking udder preparation (S_{RP} , K_{RP}) and during fitting the milking cluster (S_{RF} , K_{RF}) and milk yield (MY) was considerate as continuous variables, all analyzed by THRGIBBS1F90 software.

The animal model used included direct additive genetic and residual effects as random effects and CG as a fixed effect, the animal age at the time of milking reactivity measurement (with linear and quadratic effects), and the number of days in milk (linear effect) were included as covariates for all traits. The matrix presentation of the general model used is as follow:

$$y = X\beta + Za + Wpe + e$$

Where: y is the vector of observations; β is the vector of fixed effects; a is the vector of direct additive genetic effect of the animal; pe is the vector related to permanent environment random effects of animal (each daily milking reactivity measurement considered as repeated measurement); X , Z and W , are known incidence matrices relating β , a and pe to y ; e is the vector of residual.

It was assumed that $E[y] = X\beta$; $\text{Var}(a) = A \otimes G$; $\text{Var}(pe) = I \otimes PE$; $\text{Var}(e) = I \otimes R$, where A is the relationship matrix among all animals in the pedigree file, \otimes is the direct product, G is the (co)variance matrix of direct additive genetic effects, PE is the (co)variance matrix of permanent effects, I is the identity matrix and R is the (co)variance matrix of residual effects.

The vectors β , a , and pe are location parameters from the conditional distribution. A uniform distribution of β was assumed a priori, which reflects a vague prior knowledge about this vector. For (co)variance matrices of random effects, inverted Wishart distributions were defined as prior distributions. Thus, the

distribution of y given the parameters of location and scale was assumed (VAN TASSELL and VAN VLECK, 1996):

$$y|\beta, a, R \sim \text{MVN} [X\beta + Za + Wpe, \text{INR}]$$

For analysis, chains of 1,200,000 iterations were generated, with samplings every 20 cycles. The first 300,000 iterations were discarded as fixed burn-in. Thus, 45,000 samples were used for parameter estimations.

Data convergence was checked through the criteria proposed by Geweke (1992) and Heidelberger and Welch (1983) using the R software, with the Bayesian Output Analysis (BOA) package in R 4.1.0 software (The R Development Core Team).

After obtaining the correctly converged variances, heritability (h^2) and repeatability (R) for milking reactivity, steps (S_{RP} , S_{RF}) and kicks (K_{RP} , K_{RF}); and phenotypic (r_{P1P2}) and genetic (r_{A1A2}) correlations between milking reactivity and milk yield during the moments of pre-milking udder preparation and when fitting the milking cluster were estimated as:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2} \quad R = \frac{(\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2)}{(\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2)}$$

$$r_{P1P2} = \left(\frac{\text{Cov}(P1, P2)}{\sigma_{P1} \sigma_{P2}} \right) \quad r_{A1A2} = \left(\frac{\text{Cov}(A1, A2)}{\sigma_{A1} \sigma_{A2}} \right)$$

Where: σ_a^2 is additive genetic variance; σ_{pe}^2 is permanent variance (contain repeated measurement of milking reactivity by days); σ_e^2 is residual variance; $\text{Cov}(P1, P2)$ is phenotype co(variance) between 2 traits; $\text{Cov}(A1, A2)$ is genetic co(variance) between 2 traits; σ_{P1} and σ_{P2} were phenotype standard deviation of traits 1 and 2; σ_{A1} ; σ_{A2} were genetic standard deviation of traits 1 and 2.

3. Results and discussion

For all the phenotypic data collected cows presented higher reactivity score during udder preparation (RP: 4.33 ± 1.43) compared to the moment when fitting the milking cluster (RF: 2.74 ± 1.47), with mode values of 5 and 1, respectively. In the same way, during udder preparation there was a greater number of steps (S_{RP} : 5.08 ± 3.69 , ranging from 0 to 38) and kicks (K_{RP} : 0.11 ± 0.63 , ranging from 0 to 16) when compared to the moment of fitting the milking cluster (S_{RF} : 1.61 ± 2.05 , ranging from 0 to 42, and K_{RF} : 0.01 ± 0.23 , ranging from 0 to 10) as showing in table 3 and figure 1. The high SD and CV (%) in the number of kicks during pre-milking udder preparation (K_{RP}), and steps and kicks when fitting the milking cluster (S_{RF} and K_{RF} , respectively) indicate an important individual difference in the way that cows react to these handling procedures (Table 5).

Table 3. Means, standard deviations (SD), mode, minimum (Min.) and maximum (Max) values the coefficients of variation (CV, %) for reactivity, steps and kicks during pre-milking udder preparation (RP, S_{RP} and K_{RP} , respectively), reactivity, steps and kicks during fitting the milking cluster (RF, S_{RF} and K_{RF} , respectively), milking yield (MY) trait in total data measured in Holstein-Gyr cross cattle.

Traits	N	Mean \pm SD	Mode	Min	Max	CV (%)
RP	6,641	4.33 ± 1.43	5	1	7	32.94
S_{RP}	6,641	5.08 ± 3.69	-	0	38	72.74
K_{RP}	6,641	0.11 ± 0.63	-	0	16	546.87
RF	6,641	2.74 ± 1.47	1	1	8	53.84
S_{RF}	6,641	1.61 ± 2.05	-	0	42	126.84
K_{RF}	6,641	0.01 ± 0.23	-	0	10	1747.82
MY	6,641	20.47 ± 6.32	-	3.00	49.00	30.87

According to the convergence criteria applied in this study for all trait analyses and the number of remaining Markov chains (45,000) was adequate for obtaining the convergence of all parameters estimation. Table 4 shows the posterior means of

additive genetic, permanent environment and residual variances, heritability, and repeatability obtained for milking reactivity related traits and milk yield. The posterior density of heritability and repeatability estimates are shown in Figure 2.

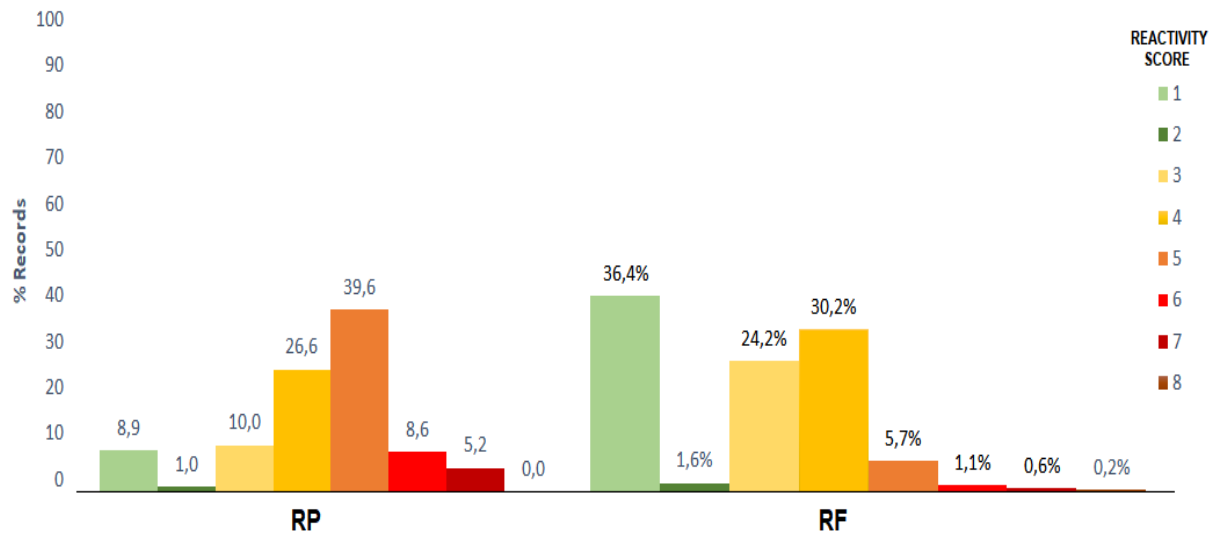


Figure 1. Distribution of the categorical scores of milking reactivity during pre-milking udder preparation (RP) and when fitting the milking cluster (RF).

The posterior means of heritability for milking reactivity during udder preparation (RP) and when fitting the milking cluster (RF) were 0.11 ± 0.04 and 0.18 ± 0.05 , respectively. These results are in line with the values reported in the literature, which are similar to those estimated by Lawsteuen et al. (1988), Wickhman (1979), Cue et al. (1996) and Sewalem et al. (2011) for Holstein cows (h^2 values ranged from 0.11 to 0.14). However, the heritability estimated in the present study was lower than that found by O'Bleness et al. (1960), Dickson et al. (1970) and Visscher and Goddard (1995) for Holstein cows (0.40, 0.47 and 0.22, respectively). The estimated mean heritability for number of steps (0.09 ± 0.03) and kicks (0.10 ± 0.04) were similar to the estimate for udder preparation, and the estimations for the number of steps and kicks when fitting the milking clusters were 0.12 ± 0.07 and 0.34 ± 0.12 , respectively. It should be noted that the only bibliography found for discussion in estimation of genetic parameters for milking reactivity is based entirely on *Bos taurus* dairy cattle herds and our results are from *Bos taurus-Bos indicus* crosses dairy cattle.

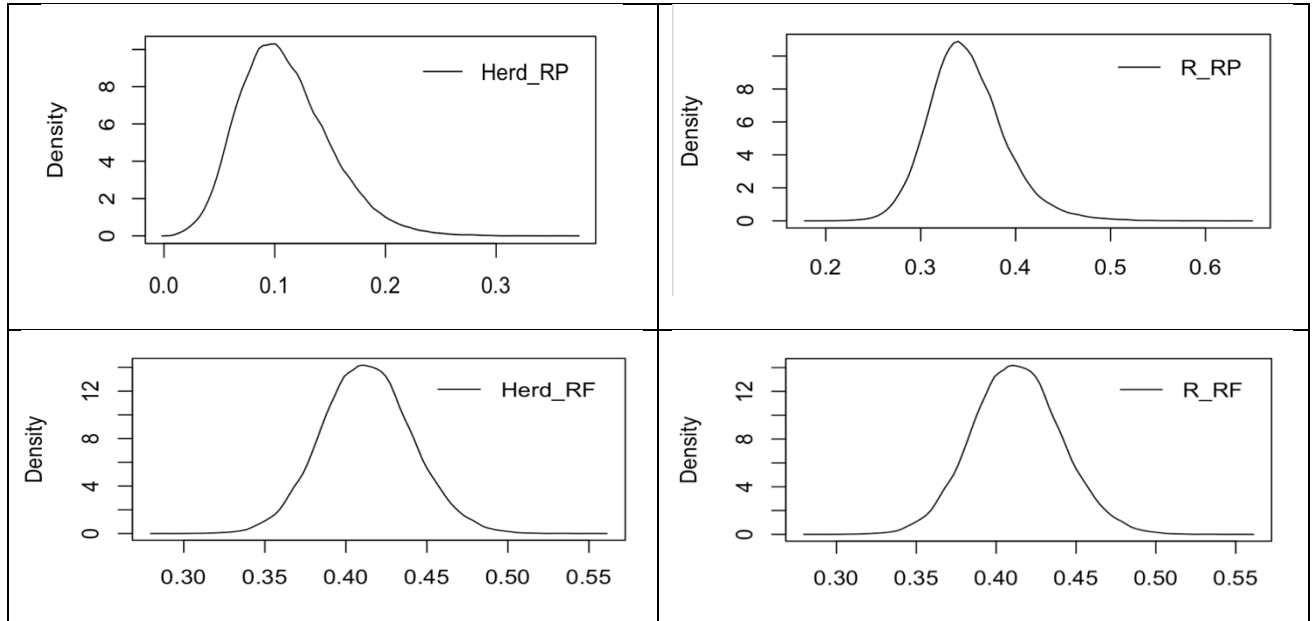


Figure 2. Posterior density of heritability and repeatability estimates for milking reactivity (RP and RF) traits.

Table 4. Descriptive statistics of a posterior density (95% highest posterior density intervals, HPD) of variance components, heritability (h^2) and repeatability (R) estimates for milking reactivity (RP, RF), steps (S_{RP} , S_{RF}), kicks (K_{RP} , K_{RF}) and milk yield (MY).

Traits	σ_a^2	σ_{PE}^2	σ_e^2	$h^2 \pm SD$	HPD	$R \pm SD$	HPD
RP	1.59±0.58	3.57 ± 0.84	9.81±2.27	0.11±0.04	0.03-0.19	0.35±0.04	0.27–0.43
S_{RP}	1.04±0.38	3.47±0.40	7.32±0.30	0.09±0.03	0.03-0.15	0.38±0.02	0.35-0.41
K_{RP}	0.35±0.14	0.31±0.07	2.73±0.41	0.10±0.04	0.03-0.18	0.20±0.05	0.11-0.29
RF	0.13±0.05	0.17 ± 0.05	0.44±0.07	0.18±0.05	0.07-0.28	0.41±0.03	0.36-0.47
S_{RF}	12.88±8.35	30.41±4.24	52.33±12.93	0.12±0.07	0.01-0.22	0.45±0.02	0.41-0.50
K_{RF}	4.41±1.98	2.22±0.87	5.78±1.27	0.34±0.12	0.12-0.53	0.53±0.06	0.40-0.63
MY	8.01±3.33	35.28±3.04	8.05±0.16	0.15±0.06	0.05-0.27	0.84±0.07	0.83-0.86

SD = standard deviation, σ_a^2 = genetic additive variance, σ_{PE}^2 = permanent variance, σ_e^2 = residual variance, RP = reactivity during pre-milking udder preparation, RF = reactivity during fitting the milking cluster, S_{RP} = steps during pre-milking udder preparation, S_{RF} = steps during fitting the milking cluster, K_{RP} = kicks during pre-milking udder preparation, K_{RF} = kicks during fitting the milking cluster, MY = milk yield.

The MY heritability in our study was of lower magnitude (0.15 ± 0.06) than that obtained in other studies with Holstein, Gyr and Brown Swiss breeds (0.20, 0.22, and 0.24; RENNÓ et al., 2003; LAGROTTA et al., 2010, CAMPOS et al., 2015, respectively), as well as than the estimate reported by the national breeding program for Girolando cattle ($h^2_{MY} = 0.29$) (DA SILVA et al., 2020).

Our repeatability estimate was moderate for milking reactivity, steps and kick during udder preparation and fitting the milking cluster ranging from 0.20 to 0.53 (Table 6). Similar results were reported by Erf et al. (1992), Kramer et al. (2013) and Wethal and Heringstad (2019). These authors estimated values ranging from 0.32 to 0.56 in Holstein, Brown Swiss and Norwegian Red cattle herds.

It was observed a strong, positive and favorable genetic correlation (0.78 ± 0.12) between milking reactivity during udder preparation (RP) and milking reactivity when fitting the milking cluster (RF) (Table 5). In the same way, genetic correlations between $RP-S_{RP}$ (0.88 ± 0.07), $RP-K_{RP}$ (0.52 ± 0.23), $RF-S_{RF}$ (0.93 ± 0.12) and $RF-K_{RF}$ (0.70 ± 0.35) were also high and positive. Thus, only one of these traits can be used to access Holstein-Gyr cow's temperament during milk with the aim to implement a breeding program which includes milking reactivity related traits. We can infer that most reactive cows measured through milking reactivity score present a greater expression of steps and kicks, and in inverse, cows with a lower milking reactivity, expressed less steps and kicks. It is advisable to implement the counting of the number of steps during the different moments in the milking process; it is easy to measure and does not need any score for its measurement. These results confirm what was suggested by Breuer et al. (2000), when recommended counting of steps and kicks as an alternative to measure milking reactivity in dairy herds.

Table 5. Posterior estimates of genetic (above diagonal) and phenotypic (below diagonal) correlations (mean \pm standard deviation) and the highest posterior density interval containing 95% of the observations (inside brackets) between milking reactivity (RP, RF), steps (S_{RP} , S_{RF}), kicks (K_{RP} , K_{RF}) and milk yield (MY) traits.

Traits	RP	S_{RP}	K_{RP}	RF	S_{RF}	K_{RF}	MY
RP	-	0.88 \pm 0.07 (0.75 – 0.99)	0.52 \pm 0.23 (0.06 – 0.91)	0.78 \pm 0.12 (0.55 – 0.99)	-	-	-0.13 \pm 0.30 (-0.72 – 0.46)
S_{RP}	0.76 \pm 0.04 (0.67 – 0.83)	-	0.10 \pm 0.31 (-0.49 – 0.63)	-	-	-	-0.04 \pm 0.26 (-0.55 – 0.48)
K_{RP}	0.98 \pm 0.01 (0.97 – 0.99)	0.66 \pm 0.05 (0.55 – 0.76)	-	-	-	-	-0.02 \pm 0.27 (-0.55 – 0.49)
RF	0.32 \pm 0.12 (0.09 – 0.56)	-	-	-	0.93 \pm 0.12 (0.60-0.99)	0.70 \pm 0.35 (-0.13-0.96)	0.19 \pm 0.27 (-0.33 – 0.71)
S_{RF}	-	-	-	0.98 \pm 0.01 (0.97-0.99)	-	0.82 \pm 0.19 (0.40-0.97)	0.23 \pm 0.22 (-0.18-0.60)
K_{RF}	-	-	-	0.42 \pm 0.23 (0.04-0.76)	0.44 \pm 0.23 (0.06-0.79)	-	0.61 \pm 0.26 (0.14-0.96)
MY	-0.01 \pm 0.09 (-0.19 – 0.17)	0.09 \pm 0.08 (-0.14 – 0.16)	-018 \pm 0.08 (-0.34 – -0.01)	-0.04 \pm 0.10 (-0.24 – 0.17)	-0.05 \pm 0.09 (-0.02-0.14)	0.05 \pm 0.27 (-0.45-0.55)	-

RP = reactivity during pre-milking udder preparation, RF = reactivity during fitting the milking cluster, S_{RP} = steps during pre-milking udder preparation, S_{RF} = steps during fitting the milking cluster, K_{RP} = kicks during pre-milking udder preparation, K_{RF} = kicks during fitting the milking cluster, MY = milk yield.

The phenotypic and genetic correlation estimates between reactivity milking, steps, kicks and milk yield cannot allow the orientation and degree of the phenotypic and genetics correlations cannot be inferred, since the estimated value of the standard deviations and the highest posterior density interval containing 95% have a very high range including the zero, so, the values of the correlations estimated can be negative, zero, or positive. Therefore, we cannot affirm that the selection for a milking reactivity trait will infer about milk yield, is necessary a greater number of records per cow and a greater number of individuals evaluated to increase the reliability of these correlations and to be able to infer the result.

4. Conclusions

Although the heritability estimated for milking temperament, steps and kicks during udder preparation and when fitting the milking cluster reached low magnitude, there is a possibility that if selection is made through this trait, long-term genetic progress can be seen. Thus, the estimations of heritability and repeatability for milking temperament justify the inclusion of this trait as a selection criteria trait for Holstein-Gyr cross in Brazil.

We can confirm that milking temperament during udder preparation have a positive and high genetic correlation with milking temperament during fitting the milking cluster, also exist a positive genetic correlation between milking temperament and counting of steps and kicks during udder preparation and when fitting the milking cluster. Animals with high milking temperament are known to express more steps and kicks during milking process making handling difficult. Counting steps during milking process is an appropriate measurement for include milking temperament in selection indexes for Holstein-Gyr cross, because is easy and inexpensive to measure, and it can be used to assess milking temperament objectively.

A greater number of records are necessary to estimate with accuracy the genetic and phenotypic correlations between milking temperament and milk yield, since in our study we cannot affirm correlations between the characteristics because they present a high standard deviation and the highest posterior density interval containing 95% have a very high range including the zero.

5. References

- BREUER, K.; HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; MATTHEWS L. R.; COLEMAN, G.J. 2000. Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 66. p. 273–288.
- BROUCEK, J.; UHRINCAT, M.; SOCH, M.; KISAC, P. 2008. Genetics of behaviour in cattle. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 4. n. 4. p. 166–172.
- CAMPOS, R.V.; COBUCCI, J.A.; KERN, E.L.; COSTA, C.N.; MCMANUS, C. M. 2015. Genetic parameters for linear type traits and milk, fat, and protein production in Holstein cows in Brazil. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 476-484.
- CUE, R.I.; HARRIS, B.L.; RENDEL, J.M. 1996. Genetic parameters for traits other than production in purebred and crossbred New Zealand dairy cattle. **Livestock Production Science**, v. 45, p. 123-135.
- DA SILVA, M.V.G.B.; MARTINS, M.F.; GONÇALVES, G.S.; PANETTO, J.C.; PAIVA, L. DE. C.; MACHADO, M.A.; DE LIMA, D.R.; FERREIRA JUNIOR, R.F.E. 2020. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando - Sumário de Touros – Resultado do Teste de Progenie (Avaliação Genética / Genômica) - Junho 2019. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p. 87. (**Embrapa Gado de Leite. Documentos, 248**). ISSN 1516-7453
- DICKSON, D.P.; BARR, G.R.; JONHSON, L.P.; WIECKERT, D.A. 1970. Social dominance and temperament of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 7, p. 904-907.
- ERF, D.F.; HANSEN, L.B.; LAWSTUEN, D.A. 1992. Inheritance and relationships of workability traits and yield for holsteins¹. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 7, p.1999–2007. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77959-4.

- FERREIRA, A.; CORDEIRO, M.; RIBEIRO, C. 2002. Girolando: raça tropical desenvolvida no Brasil. **Circular Técnica 67**. EMBRAPA/ISSN 1678-037X.
- FRIEDRICH, J.; BRAND, B.; SCHWERIN, M. 2015. Genetics of cattle temperament and its impact on livestock production and breeding – a review. **Archives Animal Breeding**, v. 58, p. 13–21.
- FORDYCE, G.; GODDARD, M.E.; SEIFERT, G.W. 1982. The measurement of temperament in cattle and the effect of experience and genotype. **Animal Production**, v. 14, p. 329-332.
- GEWEKE, J. 1992. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to calculating posterior moments. In: BERNARDO, J.M.; BERGER, J.O.; DAWID, A.P.; SMITH, A.F.M. **Bayesian statistics**. 4th ed. Oxford: Oxford University, p.169-193.
- GRANDIN, T. 1993. Behavioral principles of cattle handling under extensive conditions. In: _____ (Ed.) **Livestock Handling and Transport**, p.43-57. CAB International, Wallingford, UK.
- HASKELL, M.J.; SIMM, G.; TURNER, S.P. 2014. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 368, p. 1-18.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P.D. Simulation run length control in the presence of an initial transient. **Operations Research**, v. 31, p. 1109-1144, 1983.
- HIENDLEDER, S.; THOMSEN, H.; REINSCH, N.; BENNEWITZ, J.; LEYHE-HORN, B.; LOOFT, C.; XU, N.; MEDJUGORAC, I.; RUSS, I.; KÜHN, C.; BROCKMANN, G. A.; BLÜMEL, J.; BRENIG, B., REINHARDT, F.; REENTS, R.; AVERDUNK, G.; SCHWERIN, M.; FÖRSTER, M.; KALM, E.; ERHARDT, G. 2003. Mapping of QTL for body conformation and behavior in cattle. **Journal of Heredity**. v. 94, n. 6, p. 496–506.

- KRAMER, M.; ERBE, M.; BAPST, B.; BIEBER, A.; SIMIANER, H. 2013. Estimation of genetic parameters for novel functional traits in Brown Swiss cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 5954–5964. doi:10.3168/jds.2012-6236.
- LAGROTTA, M.R.; EUCLYDES, R.F.; VERNEQUE, R.S.; SANTANA JÚNIOR, M.L.; PEREIRA, R.J.; TORRES, R.A. 2010. Relação entre características morfológicas e produção de leite em vacas da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 423-429.
- LAWSTUEN, D.A.; HANSEN, L.B.; STEUERNAGEL, G.R. 1988. Management traits scored linearly by dairy producers. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 788–799.
- MADALENA, F.E.; PEIXOTO, M.G.; GIBSON, J. 2012. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, n. 6, p. 1-49.
- MISZTAL, I.; TSURUTA, S.; LOURENCO, D.A.L.; MASUDA, Y.; AGUILAR, I.; LEGARRA, A.; VITEZICA, Z. 2016. Manual for BLUPF90 family of programs. Available at http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90_all2.pdf. Acess 1st June, 2017.
- O'BLENESS, G.V.; VAN VLECK, L.D.; HENDERSON, C.R. 1960. Heritabilities of some type appraisal traits and their genetic and phenotypic correlations with production. **Journal of Dairy Science**. v.43, n.10, p. 1490–1498.
- PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; BROOM, D., 2001. Consistency of side choice in the milking parlour by Holstein-Friesian cows and its relationship with their reactivity and milk yield. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 70, p. 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(00\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00158-1).
- PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; SANT'ANNA, A.C.; MAGALHÃES SILVA, L.C. 2015. Temperamento de bovinos Gir e Girolando: efeitos genéticos e de manejo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 36, n. 286, p. 100-107.

- PIRES, M.F.; DOS SANTOS, G.; TOMITA BRUNELI, F.A.; GARCIA BERGMANN, J.A.; CINACHI PEREIRA, M.; PEIXOTO, M.G. 2013. Parâmetros genéticos e fenotípicos para temperamento de fêmeas Guzerá, sob seleção para leite, no Brasil. **X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal** Uberaba, MG.
- PRYCE, J.E; COFFEY, M P.; BROTHERSTONE, S. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in registered Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2664–2671.
- RENNÓ, F.P.; DE ARAÚJO, C.V.; PEREIRA, J.C.; DE FREITAS, M.S.; TORRES, R.A.; RENNO, L.N.; AZEVÊDO, A.G.; KAISER, F.R. 2003. Correlações genéticas e fenotípicas entre características de conformação e produção de leite em bovinos da raça Pardo-Suíça no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 419-1430.
- SAMORÉ, A.B; RIZZI, R.; ROSSONI, A.; BAGNATO, A. 2010. Genetic parameters for functional longevity, type traits, somatic cell scores, milk flow and production in the Italian Brown Swiss. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, n. 2, e28 dx.doi.org/10.4081/ijas.2010.e28.
- SEWALEM, A.; MIGLIOR, F.; KISTEMAKER, G.J. 2011. Genetic parameters of milking temperament and milking speed in Canadian Holsteins. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 512-516.
- SUTHERLAND, M.A.; ROGERS, A.R.; 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 and Behavior**, v. 107, n. 3, p. 329–337.
- VAN TASSELL, C.P.; VAN VLECK, L.D. 1996. Multiple-trait Gibbs sampler for animal models: Flexible programs for Bayesian and likelihood-based (co)variance component inference. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2586–2597.

- VAN TASSELL, C.P.; VAN VLECK, L.D.; GREGORY, K.E. 1998. Bayesian analysis of twinning and ovulation rates using a multiple trait threshold model and Gibbs sampling. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2048-2061.
- VISSCHER, P.M.; GOODARD, M.E. 1995. Genetic parameters for milk yield, survival, workability, and type traits for Australian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 1, p. 205-220.
- WETHAL, K.B.; 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**, v. 102, p.8221–8233. doi:10.3168/jds.2019-16625.
- WICKHMAN, B.W. 1979. Genetic parameters and economic values of traits other than production for dairy cattle. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. v. 39, p. 180-193.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

Na bovinocultura leiteira, durante muitos anos há uma orientação para a seleção de animais com foco no aumento da produção e da qualidade do leite, além de aspectos relacionado à conformação corporal (principalmente de úbere e tetos). Hoje em dia, esses caracteres são importantes, mas há um novo desafio, estudar e selecionar animais segundo a reatividade para ordenha, especialmente com o crescimento do interesse em sistemas de ordenha são cada vez mais automatizados. Tem sido demonstrado que a reatividade na ordenha tem um valor econômico, portanto, é importante incluir esta variável como estudo, manejo e integrá-la aos índices de seleção.

Conforme relatado, 80% da produção leiteira no Brasil provêm de vacas cruzadas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Essas vacas têm são geralmente mais reativas, muitas vezes dificultando o processo de ordenha e comprometendo a produção de leite. Devido à sua maior reatividade, esses animais saltam, caem ao solo, deitam-se, gerando riscos de acidentes para elas mesmas e para os trabalhadores. O tempo e eficácia da ordenha também ficam comprometidos, pois, um animal altamente reativo gera problemas na hora de ordenhar, fica mais inquieto, movimentando o corpo, dando muitos passos e coices que dificultam o manejo, podendo retirar o conjunto de ordenha, e por sua vez reter leite no úbere gerando leite residual que aumenta o risco de problemas de mastite. Animais que respondem mal ao manejo e, em outras situações, sofrem experiências emocionais e físicas negativas, modificando para pior seu estado de bem-estar, comprometendo sua saúde e desempenho produtivo.

O temperamento é determinado por fatores genéticos e ambientais e pode ser melhorado, visto que são dois mecanismos diferentes, mas podem andar juntos e complementar-se. Se houver necessidade de mudanças no curto prazo, boas práticas de manejo podem ser implementadas, com elas podemos fazer mudanças no comportamento das vacas leiteiras, principalmente vacas primíparas que nunca ingressaram na sala de ordenha. Por meio dessa prática, o medo dos animais em relação aos humanos pode ser reduzido e as vacas se habituem às novas

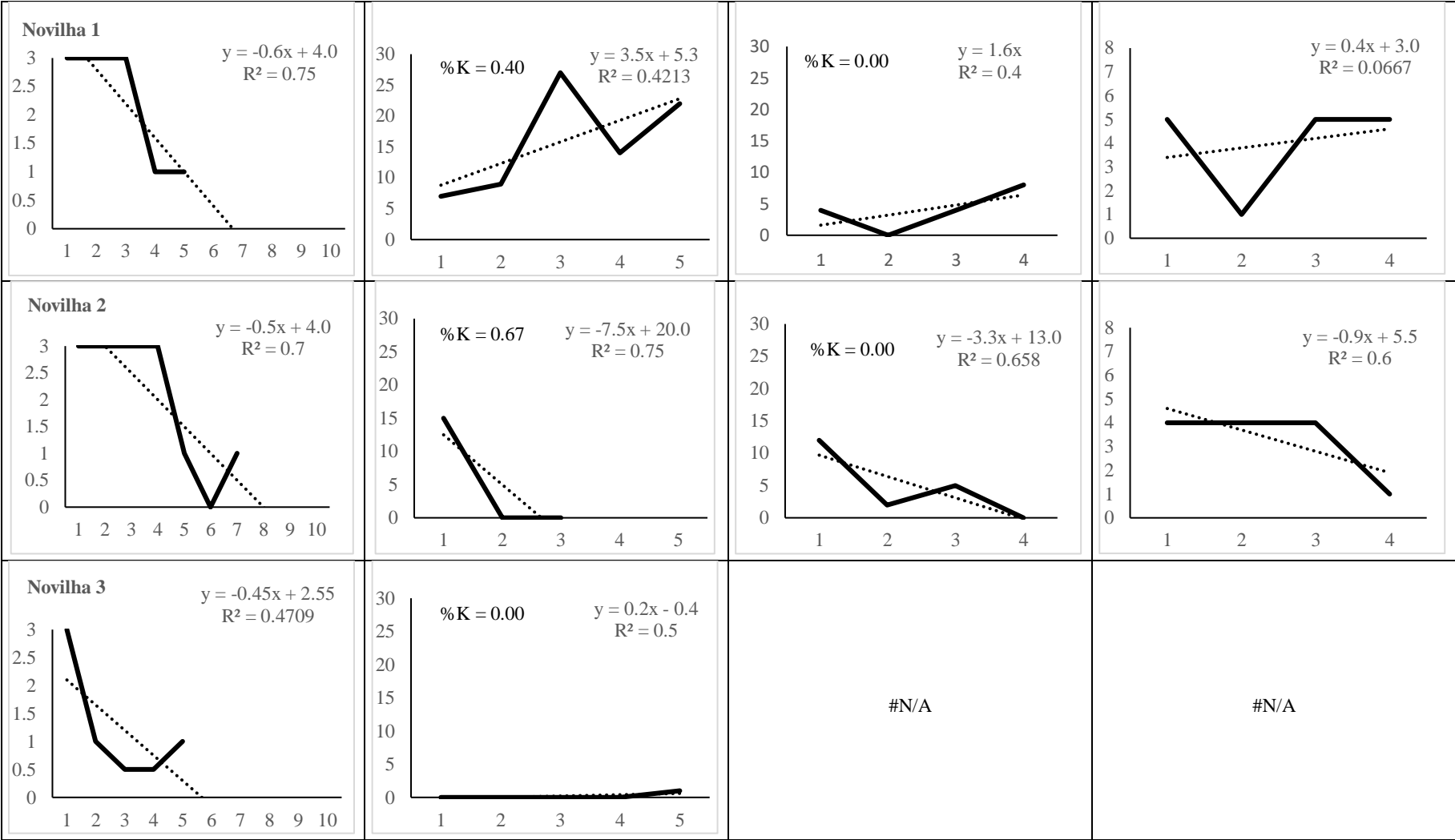
instalações e rotinas de manejo. Para que isto ocorra é necessário que os manejos sejam realizados com a adoção das boas práticas de bem-estar animal, conforme descrito nesta tese e na bibliografia consultada. Existe uma grande variação individual entre as vacas, que foi percebida entre cada uma das etapas do treinamento realizado e também durante a ordenha. Também não houve correlação entre as etapas do treinamento e a ordenha, portanto, cada vaca irá reagir de forma diferente, então um adequado manejo a ser realizado é focar em cada animal, entender e respeitar seus tempos, comportamentos e temperamento.

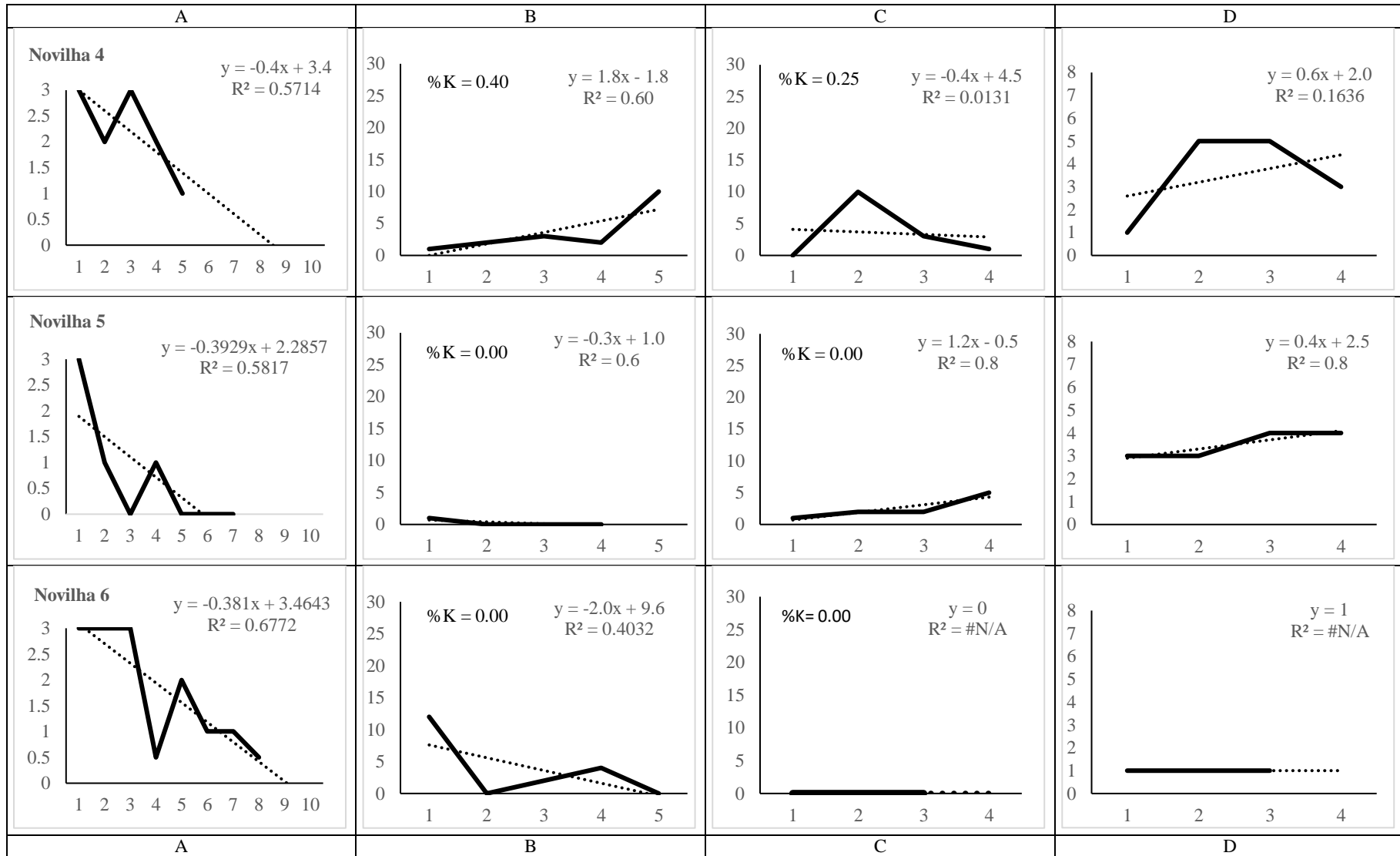
Por outro lado, de forma mais lenta, mas cumulativa, a implementação da seleção genética para a variável de reatividade na ordenha também é eficaz. Se a seleção for realizada de forma adequada e consistente, é possível obter um rebanho com características de reatividade na ordenha mais favoráveis ao longo do tempo. Apesar dos coeficientes de herdabilidade estimados nesse trabalho foi baixa, mas se a base de dados for aumentada, uma nova estimativa de este parâmetro pode se incrementar. O mesmo irá ocorrer com a precisão das correlações genéticas e fenotípicas entre reatividade na ordenha e outras características como as produtivas ou também podem ser reprodutivas e de saúde.

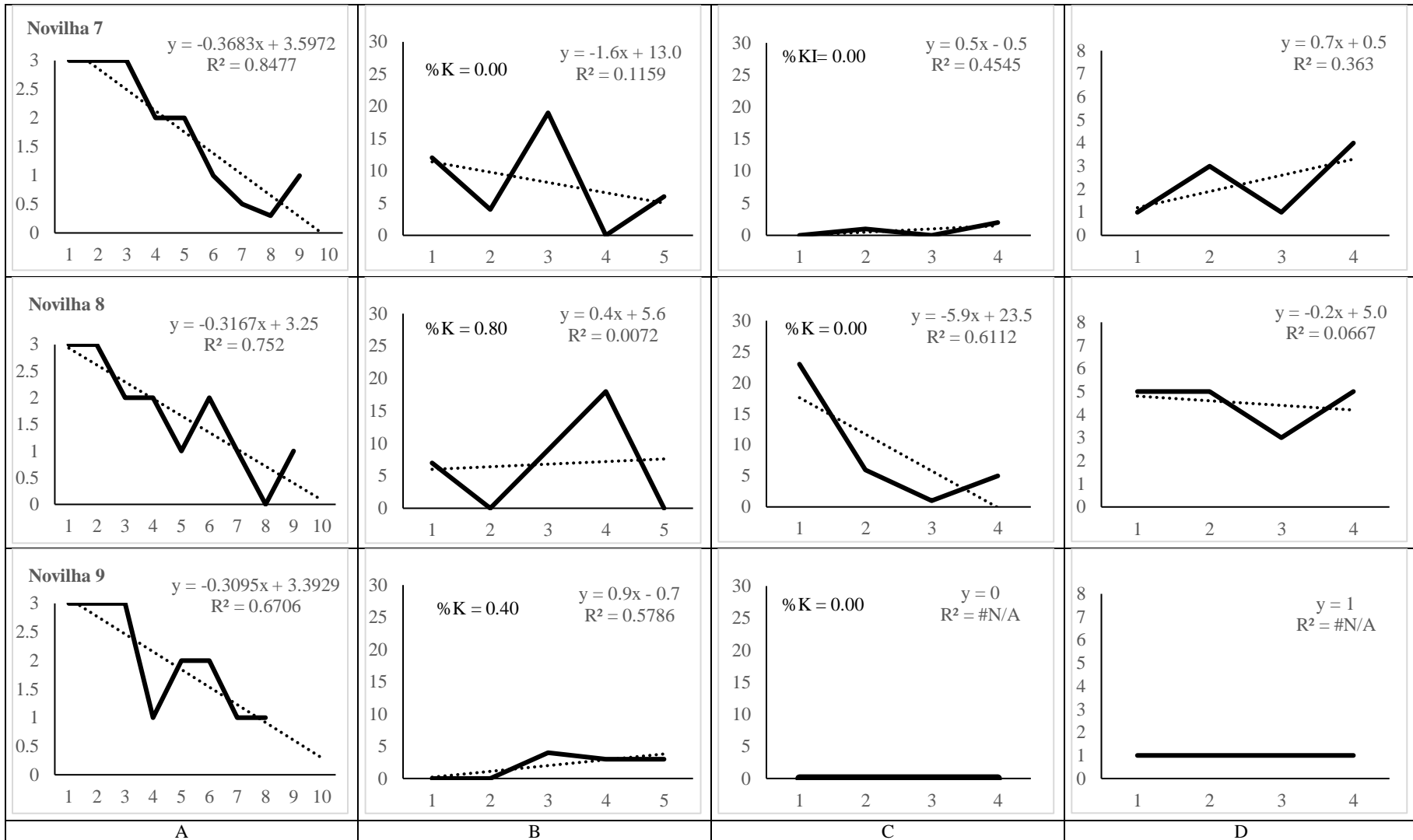
Na literatura existem diversos trabalhos *com Bos indicus* e *Bos taurus* sobre habituação de bezerros, novilhas e até vacas para a ordenha, com os quais conseguimos discutir nosso trabalho. Mas, quando nos referimos à estimativa de parâmetros genéticos para reatividade na ordenha, foi encontrada bibliografia referida para *Bos taurus*, mas não para *Bos indicus*, principalmente para o cruzamento Holandês-Gir, o que gera grande relevância o nosso trabalho.

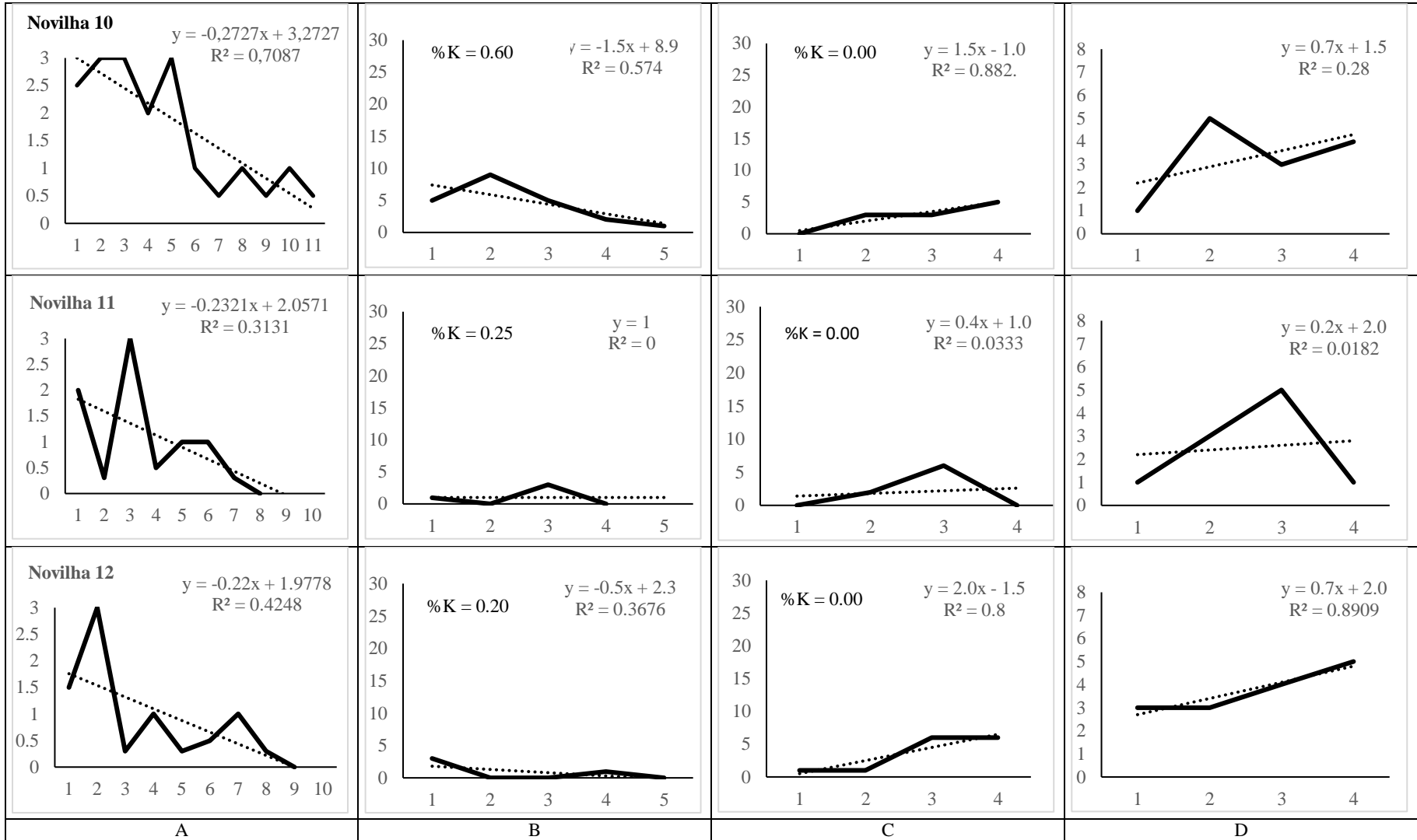
As estratégias propostas nesta tese para melhorar a reatividade na ordenha de vacas leiteiras no Brasil foram eficazes para serem implementadas pelas fazendas.

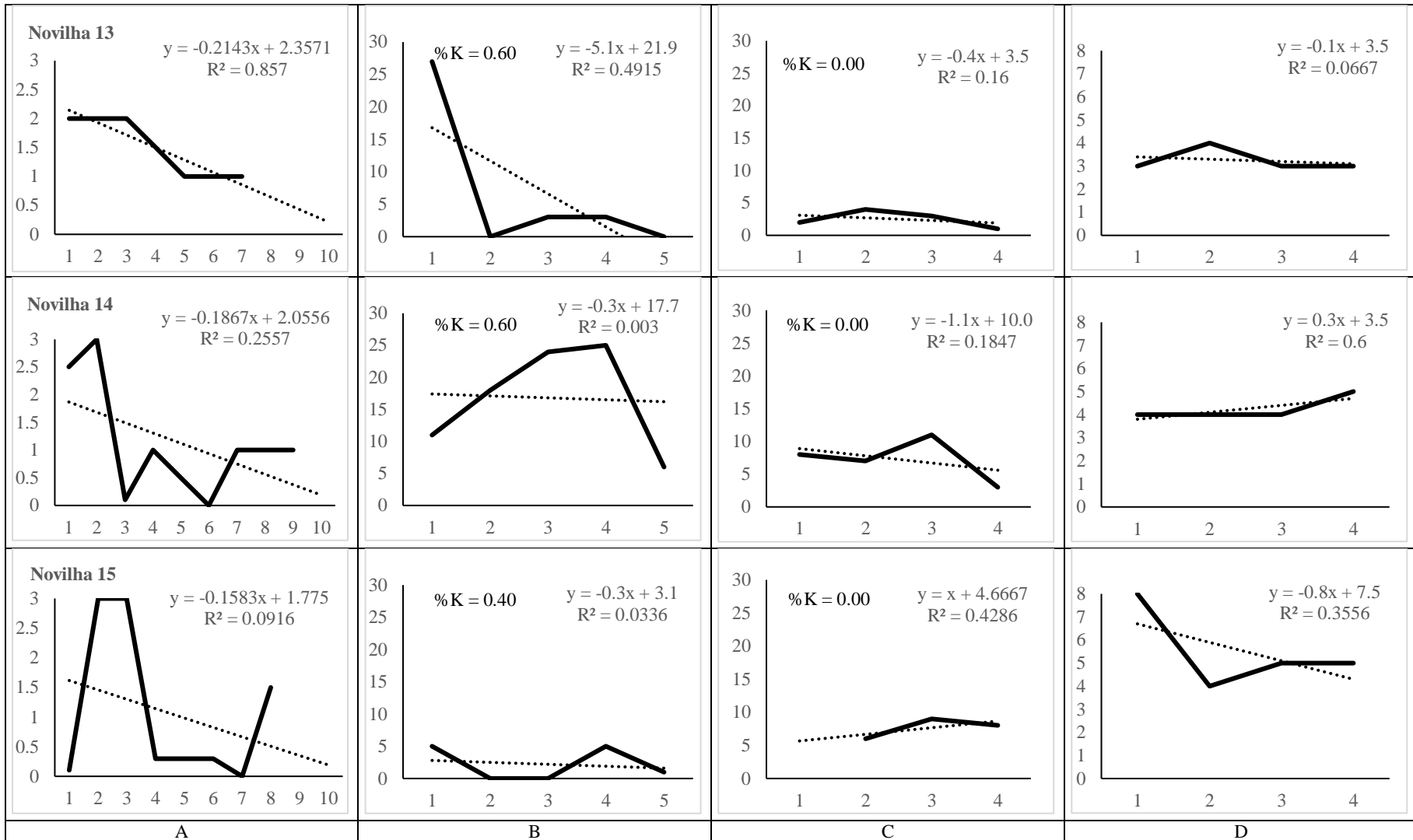
Supplementary Fig. S1

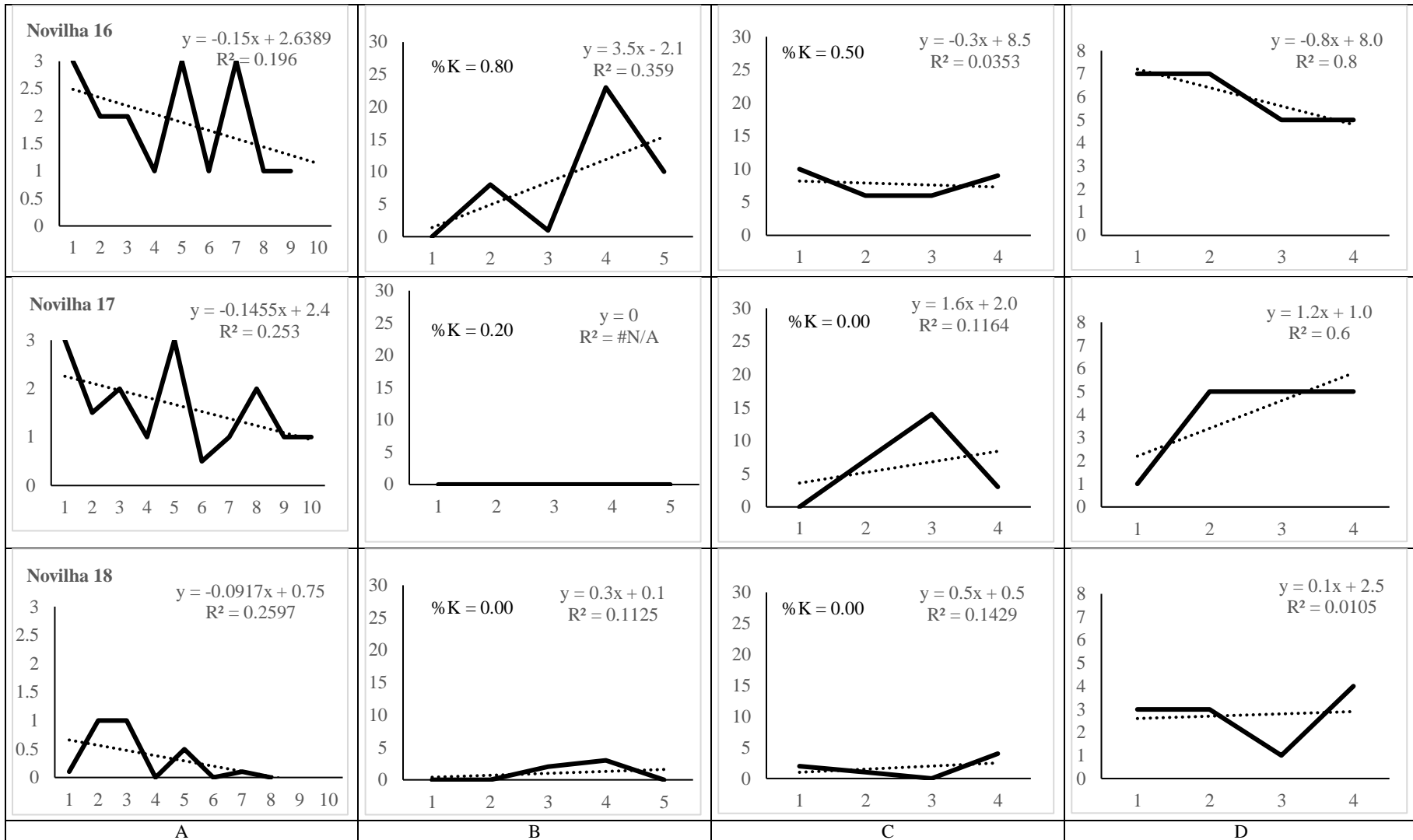


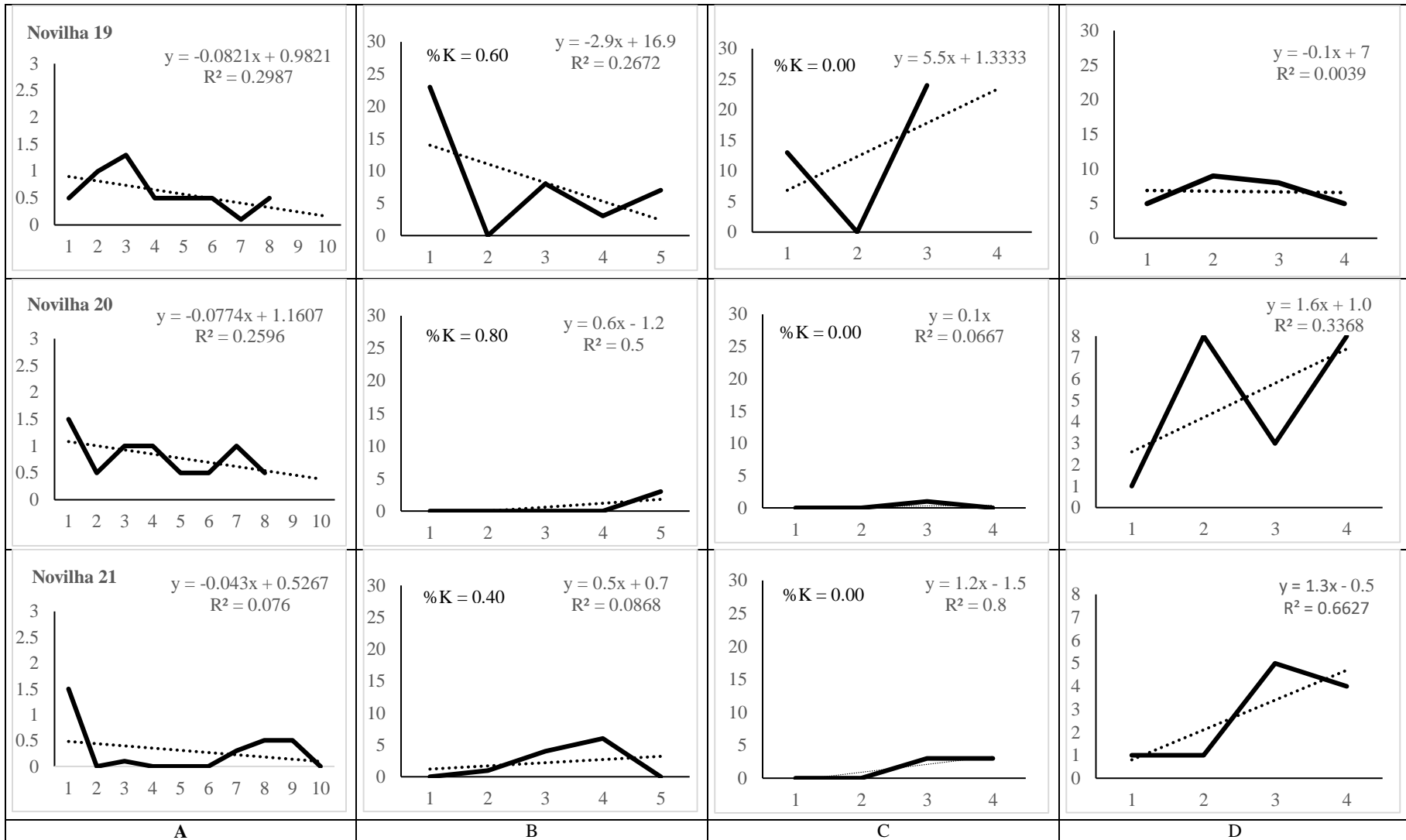


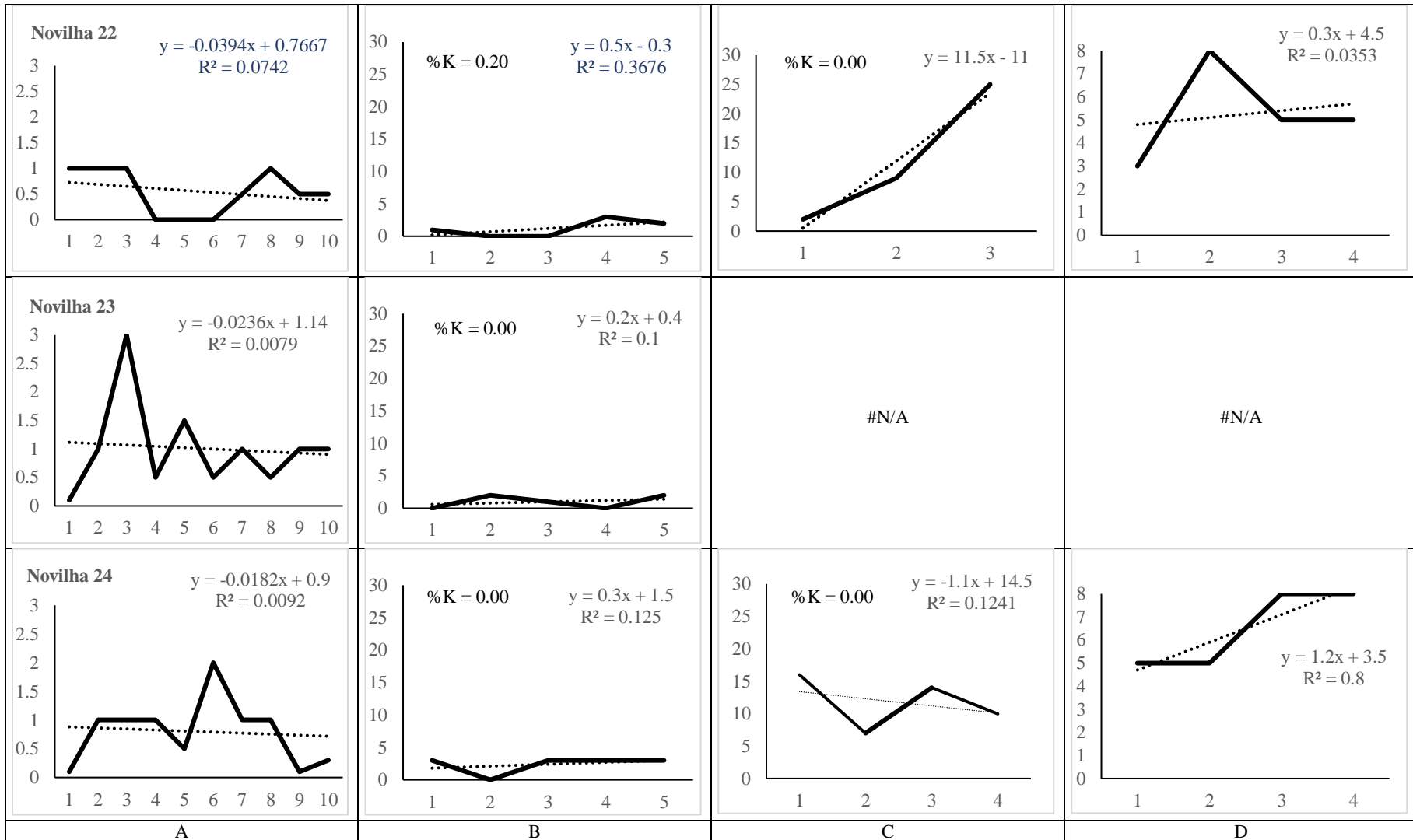


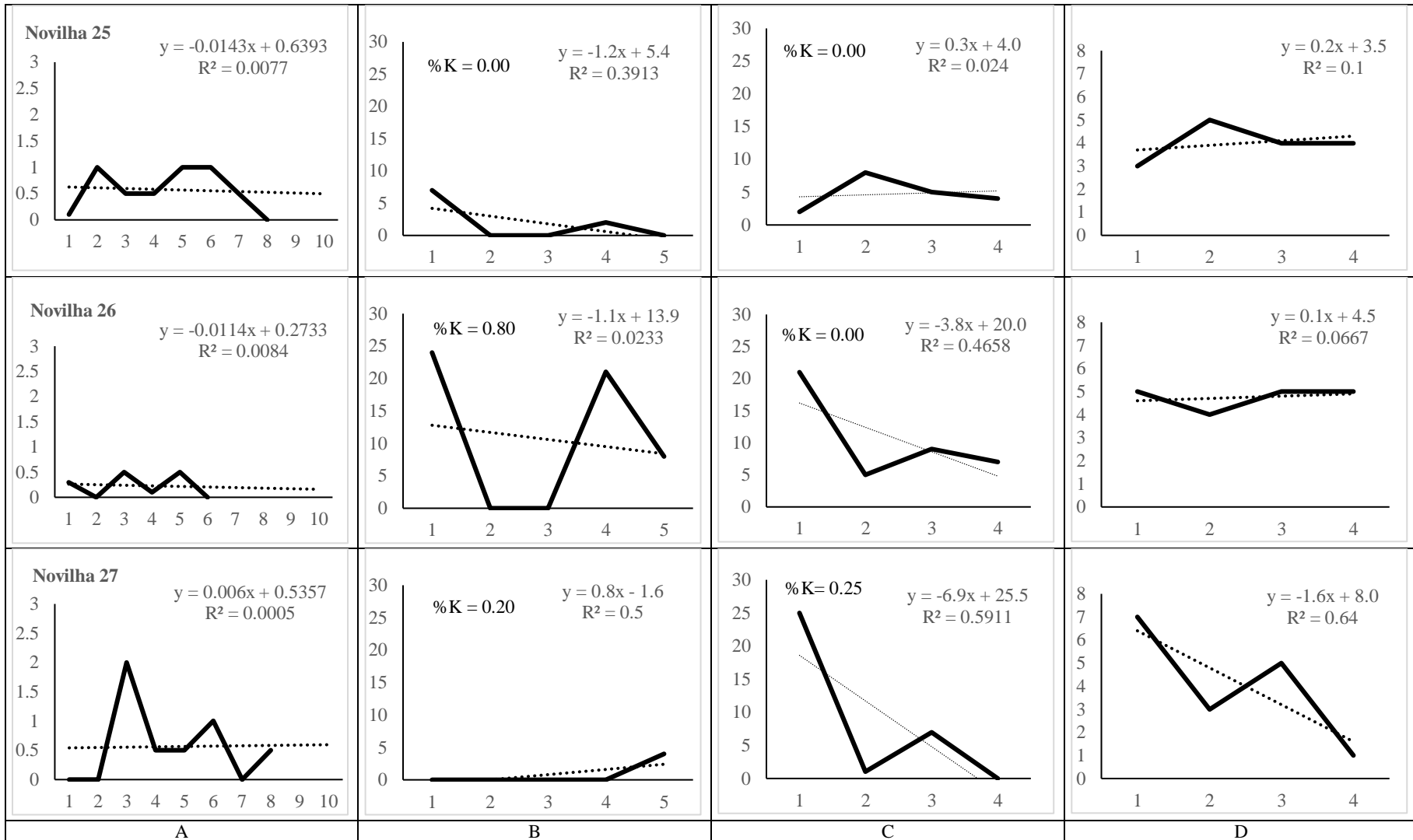


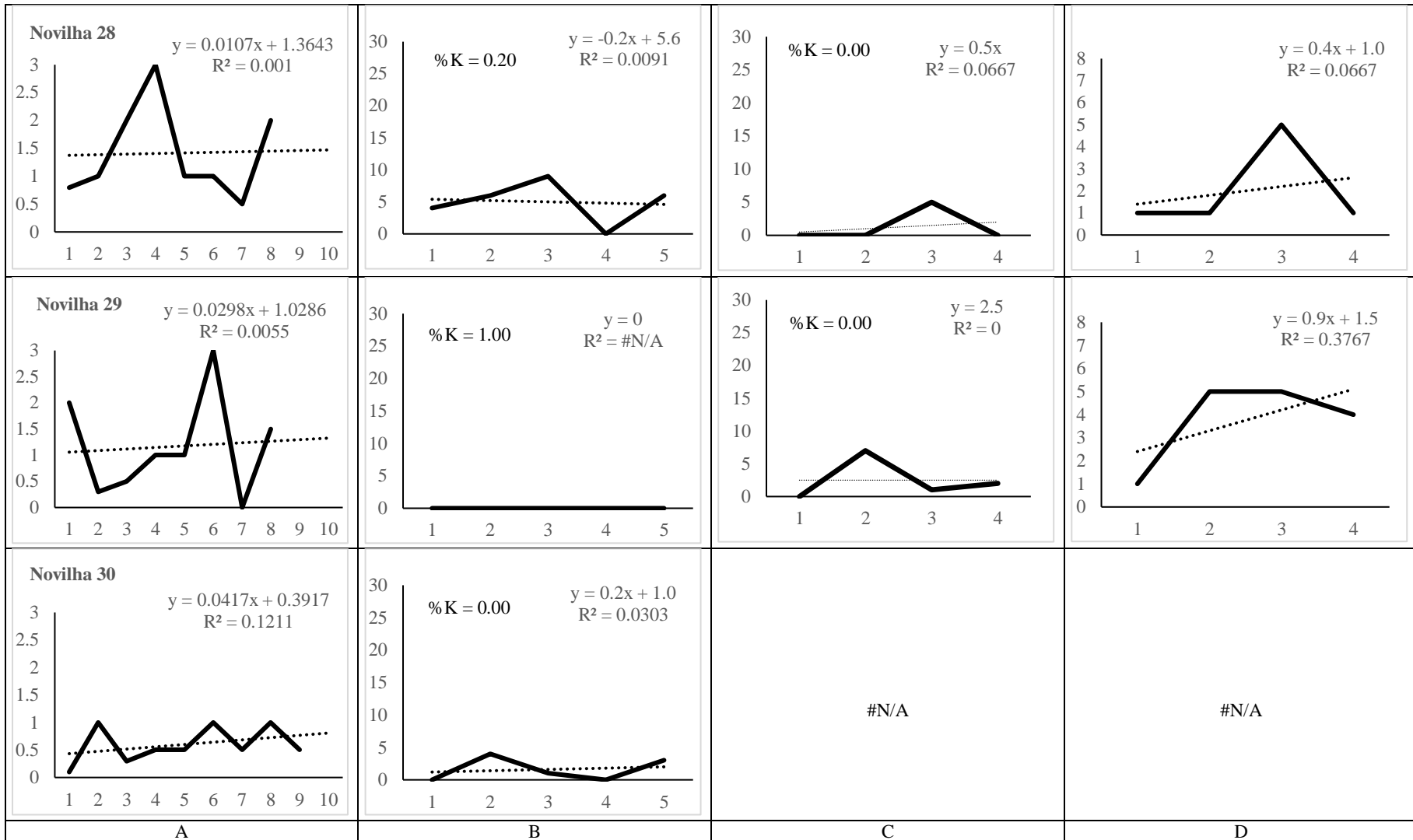












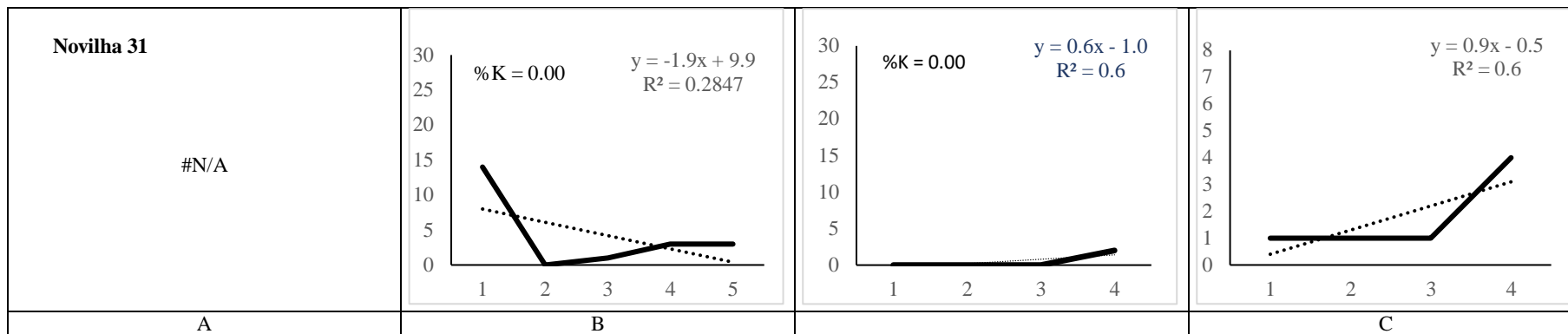


Figura S1. Distância de fuga (A, m), número de passos (B e C), escores de reatividade na ordenha (D) e porcentagem de sessões em que a cada novilha/vaca deu pelo menos um coice (%K) registrada em 31 novilhas/vacas F1 Holandês-Gir quando exposta a dois protocolos de habituação (A e B) e primeira ordenha (C e D), e respectivas equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2). #N/A = sem registro