

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
LAUKSAIMNIECĪBAS FAKULTĀTE
Agrobiotehnoloģijas institūts

Latvia University of Agriculture
Faculty of Agriculture
Institute of Agrobiotechnology

Mg. biol., Mg. med. vet.
Dace Smiltiņa

LATVIJĀ AUDZĒTO SLAUCAMO GOVJU PIENA PROTEĪNA
SELEKCIJAS MOLEKULĀRI ĢENĒTISKAIS NODROŠINĀJUMS

THE MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE DAIRY COWS' MILK
PROTEIN POLYMORPHISM IN LATVIA

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Lauksaimniecības zinātņu nozarē, Lopkopības apakšnozarē
Lauksaimniecības zinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai
(Dr. agr.)

SUMMARY OF PH.D. THESIS

Doctoral degree in the sector of agricultural sciences
Sub-sector: animal breeding

Promocijas darba izpildītāja:

Jelgava
2016

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Lauksaimniecības universitātes Lauksaimniecības fakultātes (LLU LF) laboratorijā laika posmā no 2009. gada aprīļa līdz 2014. gada jūnijam.

Promocijas darba zinātniskais vadītājs *Dr. agr.* Ziedonis Grīslis,

Valsts emeritētais zinātnieks

Promocijas darba zinātniskā konsultante *Dr. agr.* Rita Sarma, Lauku atbalsta dienesta, ES tiešo maksājumu departamenta vecākā referente

Oficiālie recenzenti:

Īzaks Rašals – *Dr.habil.biol.*, profesors (Latvijas Universitāte)

Dainis Edgars Ruņģis – *Dr.biol.*, vadošais pētnieks (Latvijas Valsts Mežzinātnes institūts ‘Silava’)

Imants Jansons – *Dr.agr.*

Promocijas darba aizstāvēšana notiks LLU Lauksaimniecības zinātņu nozares Lopkopības apakšnozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2016.gadā 25.novembrī plkst.14.00 LLU 207.auditorijā, Jelgavā, Lielā ielā 2.

Ar promocijas darbu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā ielā 2, Jelgavā, LV-3001 un <http://llu.fund.lv/>.

Atsauksmes sūtīt Lauksaimniecības zinātņu nozares Lopkopības apakšnozares Promocijas padomes sekretārei, *Dr.agr.*, asoc.profesorei Līgai Paurai, Lielā ielā 2, Jelgavā, LV-3001, Latvija, e-pasts: liga.paura@llu.lv

Ph.D. Thesis work developed at 2014 at Laboratory of the Faculty of Agriculture of Latvia University of Agriculture in the period of April 2009 to June 2014.

Scientific supervisor of Ph.D. work: *Dr. agr.* Ziedonis Grīslis

Scientific adviser of Ph.D. work: *Dr. agr.* Rita Sarma

Official reviewers:

Isaak Rashal – *Dr.habil.biol.*, professor (Latvia University)

Dainis Edgars Ruņģis – *Dr.biol.*, senior researcher (Latvian State Forest Research Institute ‘Silava’)

Imants Jansons – *Dr.agr.*

Defence of Ph.D. work will take place at open session of promotion council of subsector of animal breeding of sector of agricultural sciences of LUA on 25 november, 2016 at 14.00 in Auditorium 207 of LUA, Jelgava, Street Liela 2.

The Thesis **is available for the review at the Fundamental Library** fund of LUA, Street Liela 2, Jelgava, LV-3001 and/or <http://llu.fund.lv/>.

You are welcome to send your **comments** to the Associate Professor, *Dr.agr.* Liga Paura in Latvia University of Agriculture, Agricultural Sector, Promotional Sub-Sector of Animal Breeding, at Liela Street 2, Jelgava, LV-3001, Latvia and/or e-mail: liga.paura@llu.lv

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta no Eiropas Savienības Sociālā fonda un Valsts pētījumu programmas līdzekļiem

SATURS

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA/.....	4
SAĪSINĀJUMI	5
IEVADS	6
PĒTĪJUMA MĒRĶIS UN UZDEVUMI.....	7
DARBA NOVITĀTE	7
DARBA TAUTSAIMNIECISKĀ NOZĪME	7
DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS	8
1. MATERIĀLI UN METODES	8
1.1. Pētījuma objektu raksturojums.....	8
1.2. DNS izdalīšana.....	9
1.3. Govju piena proteīnu polimorfisma analīzes	9
1.4. Datu analīze	9
2. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	11
2.1. Piena proteīnu gēnu polimorfismu analīzes metodes	11
2.2. Piena proteīnu gēnu polimorfismu analīze	13
2.3. Piena proteīnu gēnu polimorfismu saistība ar piena produktivitāti	16
2.4. Piena proteīnu gēnu polimorfismu saistība ar vaislas buļļu ciltsvērtības rādītājiem	26
SECINĀJUMI	32
IETEIKUMI.....	33
PUBLIKĀCIJU UN ZIŅOJUMU SARAKSTS PAR DARBA TĒMU / <i>PUBLICATIONS</i>	34
PATEICĪBAS	35

CONTENT

ABBREVIATIONS	36
INTRODUCTION	37
THE AIM AND TASKS OF THE STUDY	38
NOVELTY OF THE STUDY	38
ECONOMIC IMPORTANCE OF THE STUDY	39
STRUCTURE AND VOLUME OF THE WORK	39
1. MATERIALS AND METHODS	39
1.1. Description of the study object	39
1.2. DNA extraction.....	40
1.3. Polymorphism analysis of cows' milk proteins	40
1.4. Data analysis	40
2. RESULTS AND DISCUSSION	42
2.1. Methods for the analysis of polymorphism of milk protein genes	42
2.2. The analyze of polymorphism of milk protein genes.....	44
2.3. Association analysis of polymorphisms of milk protein genes with cows' milk productivity	47
2.4. Association analysis of polymorphisms of milk protein genes with bulls' breeding values	53
CONCLUSIONS	57
RECOMMENDATIONS.....	58
ACKNOWLEDGMENTS	59

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA/ APPROVAL OF THE WORK

Par rezultātiem ziņots 13 starptautiskās zinātniskās konferencēs, kongresos un zinātniskajos semināros Latvijā un Slovākijā.

1. Annual XVI International Scientific Conference „*Research for Rural Development 2010*” ar publikācijas prezentāciju „Analysis of Kappa - Casein (CSN3) Alleles in Latvian Brown and Latvian Blue Breed Cows Populations”, 19. - 21.05.2010. LLU, Jelgava, Latvija.
2. Baltijas dzīvnieku audzēšanas XV konferencē ar publikācijas prezentāciju „Incidence of β - Casein Alleles A1 and A2 in Latvian Dairy Cattle Populations”, 31.05. - 01.06.2010. Rīga, Latvija.
3. Starptautiskajā zinātniskajā konferencē „*Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna.*” ar publikācijas prezentāciju „Study of the Milk Protein Genetic Characterization in Latvian Dairy Cattle Breeds’ Populations”, 29.10.2010. LLU VMF, Jelgava, Latvija.
4. Daugavpils Universitātes 53. starptautiskajā zinātniskajā konferencē ar publikācijas prezentāciju „Polymorphism of α_{s1} - Casein (CSN1S1) in the Latvian Brown (LB) Dairy Cattle Breeds”, 13.15.04.2011. DU, Daugavpils, Latvija.
5. Annual XVII International Scientific Conference “*Research for Rural Development 2011*” ar publikācijas prezentāciju „Polymorphism of α_{s1} - Casein (CSN1S1) in the Latvian Dairy Cattle Breeds’ Populations”, 18. - 20.05.2011. LLU, Jelgava, Latvija.
6. 12. Starptautiskajā zinātniskajā konferencē „*New Researchers 2011*” ar publikācijas prezentāciju „Prospects of the β - Casein (CSN2) Alleles A1 and A2 in the Dairy Cattle Population of Latvia”, 21. - 22.09.2011. Nitras Universitāte, Nitra, Slovākija.
7. Daugavpils Universitātes 54. starptautiskajā zinātniskajā konferencē ar publikācijas prezentāciju “Polymorphism of the β - Lactoglobulin (LGB) Alleles A and B in the Dairy Cattle Population of Latvia”, 18. - 20.04.2012. DU, Daugavpils, Latvija.
8. Zinātniskajā seminārā „*Ražas svētki Vecauce – 2012*” ar publikācijas prezentāciju „ β - laktoglobulīna (LGB) alēļu A un B polimorfisms Latvijas govju ganāmpulkā”. MPS Vecauce, 01.11.2012. Vecauce, Latvija.
9. LLU Veterinārmedicīnas fakultātes konference „*Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes*” ar publikācijas prezentāciju „Alfa - laktalbumīna (α - LA) gēna variāciju identificēšana un tā analīze Latvijas govju populācijā”, 22. – 23.11.2012., LLU VMF, Jelgava, Latvija.
10. Daugavpils Universitātes 55. starptautiskajā zinātniskajā konferencē ar publikācijas prezentāciju „Effects of Beta - Lactoglobulin (LGB) Genetic Variants on Milk Productivity”, 10. – 12.04.2013. DU, Daugavpils, Latvija.
11. Daugavpils Universitātes 56. starptautiskajā zinātniskajā konferencē ar publikācijas prezentāciju „Effects of Alfa - Lactalbumin (LAA) Genetic Variants on Milk Productivity”, 09.04. – 11.04.2014. DU, Daugavpils, Latvija.
12. Daugavpils Universitātes 8. starptautiskajā bioloģiskās daudzveidības pētījumu konferencē ar publikācijas prezentāciju „A review of Latvian Blue (LZ) Cows from the List of Animal Genetic Resources in Latvia”, 28.04. – 30.04.2015. Daugavpils, Latvija.
13. Lietuvas Veselības Zinātņu universitātes (LUHS) Dzīvnieku zinātnes institūta (IAS) rīkotajā Starptautiskā konference „Biodiversity of farm animal genetic resources and its significance on ecosystem balance” ar mutisku prezentāciju „Genetic Diversity Of The Renewed Latvian Blue (LZ) Cows' Breed Based On The Milk Protein Polymorphisms”, 19.05. – 20.05.2016., IAS LUHS, Baisogala, Lietuva.

SAĪSINĀJUMI

CSN1S1	Alfa _{s1} - kazeīna gēns
CSN1S2	Alfa _{s2} - kazeīna gēns
CSN2	Beta - kazeīna gēns
CSN3	Kappa - kazeīna gēns
DS	Dānijas sarkanā govju šķirne
HM	Holšteinas melnraibā govju šķirne
Hol	Holšteinas govju šķirņu grupa
HS	Holšteinas sarkanraibā govju šķirne
LAA	Alfa - laktalbumīna gēns (zināms arī kā <i>LALBA</i>)
LB	Latvijas brūnā govju šķirne
LDC	Lauksaimniecības datu centrs
LGB	Beta – laktoglobulīna gēns (zināms arī kā <i>PAEP</i>)
LF	Lauksaimniecības fakultāte
LLU	Latvijas Lauksaimniecības universitāte
LZ	Latvijas zilā govju šķirne
NC	Novērtētā ciltsvērtība (saīsinājums attēlos)
Olbv.	Olbaltumvielas (saīsinājums attēlos)
p	Statistiskā ticamība jeb nozīmīgums:
p _x	hī kvadrātā (χ^2) kritērija metodes;
p _F	ANOVA vai PostHoc rezultātam;
p _p	korelācijas jeb saistības rādītāja Spīrmaņa rho (ρ);
p _V	Krāmera V saistību analīze;
p _r	regresijas modeļa ticamība jeb ietekmes esamība.
PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Restrikcijas enzīma saita polimorfisma jeb restrikcijas enzīma alēlspecifiskā saita metode (restriction fragment lenght polymorphism)
RI	Ražības indekss
SNP	Viena nukleotīda polimorfisms (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
Sr	Sarkano govju šķirņu grupa
XX	Citas, neprecizētas govju šķirnes
VS	Vācijas sarkanā govju šķirne
Zl	Zilo govju šķirņu grupa
ZS	Zviedrijas sarkanraibā govju šķirne

IEVADS

Piens ir parastākais proteīna un mikroelementu avots cilvēkiem. Kopš vēsturiskiem laikiem piens ir kalpojis arī par cilvēku pārtikas produktu. Sugas pēc to iekļaušanas secības piena ieguves procesā var sarindot šādā secībā: cilvēks, kaza, bifelis, aita, jaks un īpaši piemērota izkopšanai un specializēšanai piena ieguvei izrādījušies govju suga (*Bos taurus*).

Piena proteīns ir diētiski vērtīgākais piena komponents, no kura daudzuma un kvalitātes ir atkarīga arī piena un tā pārstrādes produktu (biezpiena, sieru u. c.) kvalitāte un produkcija.

Vairāk nekā 95 % no atgremotāju piena proteīniem kodē **6 struktūrgēni**: divi galvenie piena sūkalu proteīni (α - laktalbumīns un β - laktoglobulīns) un 4 kazeīni (α_{S1} - un α_{S2} - kazeīni, β - kazeīns un κ - kazeīns).

Uz **gēniem balstītās govju selekcijas** pieredzes Latvijā līdz šim vēl nav, jo molekulāri ģenētiskie pētījumi dzīvnieku audzēšanā aizsākās tikai pēdējos gados, līdz ar Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Lauksaimniecības fakultātes (LF) Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijas izveidošanos 2006. gada decembrī.

Gēnu balstītās selekcijas iespējamā efektivitāte Latvijas piena lopkopībā ir šīs selekcijas lietojums, noskaidrojot piena proteīnu vēlamos genotipus, tā palīdzēs analizēt un ieviest jaunus selekcijas standartus piena lopkopībā, lai uzlabotu govju produktivitāti: vidējo izslaukumu, proteīnu daudzumu un to kvalitāti, piemēram, īsāks recēšanas ilgums, biezpiena masas veidošanās laiks un noturīgums, kā arī tauku saturs.

Salīdzinot ar tradicionālo selekciju, gēnu tieša vai marķieru bāzēta selekcija var būt ievērojami efektīvāka. Spriežot pēc dažādu valstu zinātniskajā literatūrā publicētajiem datiem, tā var būt ļoti nozīmīga dzīvnieku produktivitātes celšanā, piena produkcijas kvalitātes un drošuma uzlabošanā, samazinot ar piena un/vai piena produktu saistītu slimību risku, veicinot bioloģisko un pārtikas drošumu.

Cilvēks ir viens no lielākajiem piena un tā pārstrādes produktu patērētājiem. Arī siera ražošanai tiek izvēlēts piens pēc piena kvalitātes rādītājiem, bet ražotāji vēl nav apzinājušies, ka būtu jāizvērtē piena proteīnu molekulāri ģenētiskie varianti katram ganāmpulka dzīvniekam, lai uzlabotu siera kvalitāti, kā arī lai nodrošinātu veselībai nekaitīgu piena produkciju. Gandrīz visi piena proteīni ir aktīvu peptīdu – opioīdu avots. Piemēram, tiek veikti pasākumi β - kazeīna A1 alēles izslēgšanā no piena govju populācijām, lai nepieļautu β - kazomorfīna 7 iespējamās negatīvās izpausmes. Polija ir viena no pirmajām ES valstīm, kas plaši izvērsusi vaislas bulļu pārbaudi pēc β - kazeīna alēļu sastāva. Tāpēc nepieciešams pētīt vairāk piena proteīnu genotipu un to ietekmi arī Latvijā.

Jaunāko genoma un proteoma pētījumu metožu izmantošanai lauksaimniecības dzīvnieku šķirņu pilnveidošanā ģenētisko resursu daudzveidības saglabāšanai ir jākļūst par vienu no lauksaimniecības zinātnes prioritātēm Latvijā.

Molekulāri ģenētisko metožu optimizācija un aktualizācija nepieciešama LLU LF laboratorijas vajadzībām, lai ieviestu metodes, kuras varētu lietot

ilgstošā laika periodā Latvijas govju populācijas izpētē, ganāmpulku izkopšanā un iegūto datu apkopošanā.

PĒTĪJUMA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

Izvirzītais **mērķis** ir sekmēt govju selekciju Latvijā, izstrādājot un pārbaudot molekulāri ģenētisko analīžu nodrošinājumu kvalitātes un kvantitātes analīzei Latvijā audzēto slaucamo govju populācijā, balstoties uz piena proteīna gēnu polimorfismu pētniecību.

Lai realizētu mērķi, tika izvirzīta darba **hipotēze**: Latvijā audzēto slaucamo govju piena proteīnu molekulāri ģenētiskās variācijas ir saistītas ar piena ražības un kvalitātes rādītājiem.

Lai pārbaudītu izvirzīto hipotēzi un realizētu darba mērķi, izvirzīti **uzdevumi**.

1. Atlasīt molekulāros marķierus, kuri būtu piemēroti piena proteīna gēnu (α_{S1} - kazeīna, α_{S2} - kazeīna, β - kazeīna, κ - kazeīna, α - laktalbumīna un β - laktoglobulīna) polimorfismu raksturošanai Latvijā audzēto slaucamo govju populācijā.
2. Veikt atlasīto govju piena proteīna gēnu polimorfismu pirmējo raksturošanu Latvijā audzēto slaucamo govju populācijā.
3. Izpētīt Latvijā audzēto slaucamo govju piena produktivitātes rādītāju saistību ar izvēlētajiem piena proteīna gēnu molekulārajiem marķieriem.
4. Pētīt Latvijā audzēto un vaislai izmantoto buļļu ciltsvērtības rādītāju saistību ar izvēlētajiem piena proteīna gēnu molekulārajiem marķieriem.

DARBA NOVITĀTE

Latvijā pirmo reizi:

- 1) veikti laboratoriski pētījumi par α_{S1} -, β - un κ - kazeīnu, α - laktalbumīna, β - laktoglobulīna gēnu polimorfismu Latvijā audzēto slaucamo šķirņu govju populācijās LLU laboratorijā, aprobējot jaunapgūtās molekulārās ģenētikas pētījumu metodes;
- 2) veikta DNS amplifikācija un piena proteīnus determinējošo gēnu alēlo variantu noteikšana no Latvijā audzēto slaucamo govju bioloģiskā materiāla kolekcijas LLU LF laboratorijā, lietojot PCR - RFLP metodi;
- 3) noteikta α_{S1} -, β - un κ - kazeīnu, α - laktalbumīna, β - laktoglobulīna gēnu ietekme uz piena produktivitātes rādītājiem Latvijā audzētajām slaucamajām govīm.

DARBA TAUTSAIMNIECISKĀ NOZĪME

1. Iegūtie α_{S1} -, β - un κ - kazeīnu, α - laktalbumīna, β - laktoglobulīna gēnu uzbūves un polimorfismu dati papildina LR ZM Lauksaimniecības datu centra (LDC) datubāzi.
2. Izpētīti citu valstu ieteikumi ražotājiem un patērētājiem par izpētīto α_{S1} -, β - un κ - kazeīnu, α - laktalbumīna, β - laktoglobulīna gēnu uzbūves un

polimorfismu datu piemērotību dažādām produktivitātes pazīmēm, kurus var lietot arī Latvijā dažādu šķirņu selekcionētajām un audzētajām slaucamajām govīm un vaislai izmantojamiem bulļiem.

3. Pēfīto un izvērtēto α_{s1} -, β - un κ - kazeīnu, α - laktalbumīna, β - laktoglobulīna gēnu molekulāro marķieru datus var izmantot LR ZM Lauksaimniecības datu centra ciltslīetu speciālisti un Šķīrnes dzīvnieku audzētāju biedrības slaucamo govju šķīrņu selekcijas uzlabošanai, pamatojoties uz piena proteīnu gēnu alēlo formu rādītājiem un to saistību ar piena produktivitātes rādītājiem.

DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms ir 143 lappuses. Darbs sastāv no deviņām nodaļām: anotācija, zinātniskā darba aprobācija, ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti un diskusija, secinājumi, ieteikumi, literatūras atsauces. Nodaļas sadalītas kopsummā 17 apakšnodaļās. Darbs satur 33 tabulas, 55 attēlus un papildus 52 pielikumus. Literatūras sarakstā ir apkopotas 356 atsauces.

1. MATERIĀLI UN METODES

Pētījumi veikti laika posmā no 2009. gada aprīļa līdz 2014. gada jūnijam.

1.1. Pētījuma objektu raksturojums

Latvijā audzēto slaucamo govju šķīrņu pētījumu grupu veidojām no septiņām Latvijā audzēto piena šķīrņu (Latvijas brūnā (LB) un Latvijas zilā (LZ), Holšteinas melnraibā (HM), Holšteinas sarkanraibā (HS), Zviedrijas sarkanraibā (ZS), Dānijas sarkanā (DS) un Vācijas sarkanā (VS)) 719 liellopu bioloģiskajiem materiāliem, t. sk. 625 govju asins un 94 Ciltslietu un mākslīgās apsēklošanas stacijas vaislas bulļu spermas šūnu paraugiem.

Latvijā audzēto slaucamo govju šķīrņu piena produktivitātes rādītāju saistību ar govju piena proteīnu gēnu (α_{s1} - kazeīna, α_{s2} - kazeīna, beta - kazeīna, kappa - kazeīna, α - laktalbumīna un beta - laktoglobulīna) genotīpiem ne visām genotipētajām govīm varēja iegūt piena pārraudzības datus, un tāpēc analizēto govju skaits samazinājās līdz 545 govīm, par kurām Zemkopības ministrijas Lauksaimniecības datu centā ieguvām piena produktivitātes datus.

Latvijā audzēto slaucamo govju šķīrņu vaislas bulļu novērtētās ciltsvērtības rādītāju saistību ar piena proteīnu gēnu genotīpiem analizējām 73 paraugos, par kuriem LDC datubāzē ieguvām ciltsvērtību novērtējums uz 2012. gada pirmo ceturksni.

Kopumā bioloģisko materiālu ieguvām no 81 slaucamo govju ganāmpulka dažādās Latvijas reģionos. Pētījumā izmantoti arī Latvijas brūnās (LB) un Latvijas zilās (LZ) šķīrnes govju paraugi no dzīvniekiem, kuri ir iekļauti Latvijas dzīvnieku ģenētisko resursu sarakstā, kas atrodas LLU LF MGPL

Depozitārijā, kā arī citu šķirņu govju bioloģiskie paraugi no Latvijas saimniecībām.

1.2. DNS izdalīšana

Genomisko DNS izdalījām no 625 govju asinīm un 94 bulļu spermas šūnām. Darbā tika izmantots firmas Fermentas (Lietuva) genomiskās DNS izdalīšanas komplekts (*Genomic DNA Purification Kit #K512*, Fermentas, Lietuva) un firmas QIAgene (ASV) PUREGENE® DNS izdalīšanas komplekts (*PUREGENE® DNA Isolation Kit*). Abu komplektu metodika tika pielāgota darbam ar konkrētu daudzumu asiņu vai spermas šūnu.

1.3. Govju piena proteīnu polimorfisma analīzes

Pētījumu veicām, izstrādājot, optimizējot un aprobējot kompleksas metodes lietošanai LLU LF MGP laboratorijā sešu piena proteīna gēnu – alfa_{s1} – kazeīna (*CSN1S1*), alfa_{s2} – kazeīna (*CSN1S2*), beta – kazeīna (*CSN2*), kappa – kazeīna (*CSN3*) un alfa – laktalbumīna (*LAA*), beta – laktoglobulīna (*LGB*) – alēlo formu molekulāri ģenētiskai izpētei.

Izanalizējot MGPL pieejamo aparatūru, tika nolemts ar restrikcijas enzīma saita polimorfisma (RFLP; restriction fragment length polymorphism) metodi analizēt Latvijā audzējamām govīm pasaulē biežāk pētītās piena proteīnus determinējošo gēnu alēles. Attiecīgi *CSN1S1* pētījām B un C alēli, *CSN2* – A1 un A2, *CSN3*, *LAA* un *LGB* A un B alēli.

1.4. Datu analīze

Izmantojot 719 Latvijā audzēto govju DNS paraugu datus, tika veikta Latvijas govju populācijas analīze pēc pieciem piena proteīna gēniem. No iegūtajiem molekulārās ģenētikas analīzes datiem katra gēna polimorfismam tika aprēķināti alēļu un genotipu sastopamības biežumi visai analizētajai grupai kopumā un izdalot govju šķirnes. Izmantojot datorprogrammu DNASP 5.10.01 (Librado, Rozas, 2009; Rozas et al., 2003), izveidojām visu piecu piena proteīna gēnu sešu SNP (katrā gēnā viens, izņemot *CSN3*) haplotipu kombinācijas un noteicām to frekvences. No turpmākā darba tika izslēgti retie haplotipi, kuri kopējā grupā bija retāk nekā piecos (5) paraugos.

Katram gēna lokusam jeb polimorfismam tika noteikts Hārdija–Veinberga ģenētiskais līdzsvars jeb sagaidāmais heterozigotātes indekss visai analizētajai grupai un katrai šķirnei atsevišķi. Iegūtais heterozigotātes indekss tika salīdzināts ar iegūto heterozigotātes biežumu, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) kritērija metodi.

Veicot saistību jeb asociāciju analīzi (no angļu valodas “*association analyze*”), tiek noteikts (1) statistiski nozīmīgas atšķirības esamība starp analizējamajām grupām un (2) statistiski nozīmīgas korelācijas esamība starp analizējamajiem lielumiem.

Visā grupā tika pārbaudīta statistiski nozīmīgas atšķirības esamība starp neparametriskajām pazīmēm (alēļu un genotipu skaits, govju dzimums, šķirne un to skaits), tika izmantota *crosstab* (krustu rēķins) analīze ar hī kvadrāta (χ^2) kritērija jeb Pīrsona χ^2 metodi pie ticamību $p_{\chi} < 0,05$ (Arhipova, Bāliņa, 2006).

Pirms saistības analīzes veikšanas gan govju, gan vaislas buļļu paraugi tika iedalīti trīs grupās: (1) Sr jeb sarkano govju šķirņu grupa, (2) Hol jeb Holšteinas govju šķirņu grupa un (3) Zl jeb zilo govju šķirņu grupa.

Pirms parametrisko pazīmju saistības analīzes ar genotipu un/vai šķirni tika veikta šķirņu grupu un piena proteīna gēnu genotipu savstarpējā saistību analīze, izmantojot Pīrsona χ^2 metodi, lai noteiktu atšķirību starp grupām, un, otrkārt, Krāmēra V metode, lai noteiktu korelāciju starp konkrētiem rādītājiem. Korelācijas līmenis tika noteikts pēc V koeficienta vērtības: līdz 0,20 korelācija ir ļoti vāja, no 0,20 līdz 0,40 korelācija ir vāja, no 0,40 līdz 0,60 korelācija ir vidēji cieša, no 0,60 līdz 0,80 korelācija ir cieša, virs 0,80 korelācija ir ļoti cieša.

Statistiski ticamu saistību jeb asociāciju katram piena proteīna variantam noteicām, analizējot: (1) atšķirību starp neparametrisko pazīmju (genotipu un/vai šķirnes grupu vai haplotipu) grupu parametrisko rādītāju vidējiem lielumiem, izmantojot viena vai divu faktoru dispersiju jeb vienu vai divu virzienu (*one or two way*) ANOVA testu pie ticamības (p_F), kas mazāka par 0,05 (Arhipova, Bāliņa, 2006); (2) korelāciju starp grupu rādītājiem, izmantojot eta (η) koeficientu. Korelācijas līmenis tika noteikts pēc η koeficienta vērtības: līdz 0,20 korelācija ir ļoti vāja, no 0,20 līdz 0,40 korelācija ir vāja, no 0,40 līdz 0,60 korelācija ir vidēji cieša, no 0,70 līdz 0,90 korelācija ir cieša, virs 0,90 korelācija ir ļoti cieša.

Lai noteiktu atšķirību starp katru divu genotipu grupām vai šķirņu grupām, tiek izmantots PostHoc tests. Statistiski ticamu atšķirību gadījumi grafiskajos attēlos tiek norādīti ar bultiņām un ticamības līmeni.

Lai veiktu Latvijā audzēto govju piena produktivitātes rādītāju saistību analīzi ar piecu piena proteīna gēnu genotipiem, tika iegūti slaucamo govju 305 dienu (standarlaktācijas) pirmo trīs laktāciju produktivitātes rādītāji. Laktācijas datus tika iekļauti tādi parametriskie rādītāji kā izslaukums kilogramos, tauku un olbaltumvielu daudzums kilogramos un tauku un olbaltumvielu saturs procentuāli. Par svarīgāku rādītāju tika uzskatīts izslaukuma daudzums, no kura ir atkarīgs olbaltumvielu un tauku daudzums kilogramos. Pēc tam pēc svarīguma ir olbaltumvielu un tauku saturs procentos, no kura varētu būt atkarīgs olbaltumvielu un tauku daudzums kilogramos attiecīgi.

Lai veiktu Latvijā audzēto un izmantojamo vaislas buļļu ciltsvērtības rādītāju saistības analīzi ar piecu piena proteīna gēnu genotipiem, tika izmantoti parametriskie rādītāji, kā novērtētā ciltsvērtība izslaukumam, kg, olbaltumvielu un tauku daudzums, kg, un tauku un olbaltumvielu saturs procentuāli, kā arī ražības indekss (RI). Novērtētās ciltsvērtības rādītāji katra buļļa gadījumā var būt gan ar pozitīvu, gan ar negatīvu vērtību, jo tiek aprēķināta pēc formulas, kurā tiek ņemts vērā konkrētas šķirnes rādītāja vēlamais vidējais lielums konkrētā datumā. RI tiek aprēķināts pēc formulas Lauksaimniecības datu centra datubāzē.

Abu saistību analīzēs par svarīgāku rādītāju tika uzskatīts izslaukuma daudzums kilogramos vai tā novērtētā ciltsvērtība, no kā ir atkarīgs olbaltumvielu un tauku daudzums kilogramos vai to novērtētās ciltsvērtības. Pēc tam pēc svarīguma ir olbaltumvielu un tauku saturs procentos vai to novērtētās ciltsvērtības, no kuriem varētu būt atkarīgs olbaltumvielu un tauku daudzums kilogramos attiecīgi.

Visas statistiskās analīzes tika veiktas, izmantojot statistikas programmas: IBM SPSS Statistics versiju 21.0 (IBM Corp. Released 2012) un PAST (PALaeontological Statistics, ver. 1.63; Hammer et al., 2001).

2. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

2.1. Piena proteīnu gēnu polimorfismu analīzes metodes

Polimorfismu analīze. Apskatot literatūru par izvēlētajiem pieciem piena proteīniem, konstatējām, ka pētījumā gala rezultātā tiek analizētas proteīna variācijas, bet metodikā tiek izmantota viena nukleotīda nomaiņa.

Apkopojot vairākus literatūras avotus (Medrano, Aguilar – Cordova, 1990; Medrano, Sharrow, 1991; Koczan et al., 1993; Mao et al., 1994; Voelker et al., 1998; Strzalkowska et al., 2002; McLachlan, 2006; Sulimova et al., 2007; Martins, 2008), tika atlasīti seši viena nukleotīda polimorfisma jeb SNP piecos piena proteīna gēnos (1. tabula).

Attiecīgi kazeīna proteīnu gēnos *CSN1S1* c.-175A>G, kura rezultātā notiek B un C varianti, *CSN2* – c.4451A>C (Pro₆₇₍₈₂₎His; A1 un A2 varianti), *CSN3* gadījumā tika atlasīti divi SNP – c.11625C>T un c.11661A>C –, kuri nodrošina Thr₁₃₆₍₁₅₇₎Ile un Asp₁₄₈₍₁₆₉₎Ala jeb A varianta nomaiņu uz B variantu. Sūkalu proteīniem, attiecīgi, *LAA* tika izvēlēts SNP lokalizēts netranslējamā rajonā jeb c.15A>G, kura gadījumā tiek uzskatīts, ka mainās proteīna A variants uz B, bet *LGB* c.3106T>C, kas izraisa Val₁₁₈₍₁₃₄₎Ala jeb A varianta nomaiņu uz B variantu (1. tabula).

Visu polimorfismu gadījumā tika izvēlēta restrikcijas enzīma saita polimorfisma metodika, kuras pamatā ir konkrēta restrikcijas enzīma jeb fermenta endonukleāzes spēja šķelt DNS sekvenci konkrētā vietā, atpazīstot nukleotīdu secību. Ja sekvencē ir notikusi nukleotīda nomaiņa, tad šķelšana nenotiek (Botstein et al., 1980; Dowling et al., 1996).

Izmantojot izstrādātās metodes, tika izanalizēta Latvijā audzēto slaucamo šķirņu govju DNS paraugu kolekcija, precīzāk, *CSN1S1* polimorfisms tika izanalizēts 675 paraugiem no 719, kas veido pozitīvu rezultātu 93,88 %, *CSN2* – 716 paraugiem ar pozitīvu rezultātu, kas ir 99,58 %, *CSN3* – 487 paraugiem ar pozitīvu rezultātu, kas ir 67,73 %. Sūkalu proteīniem: *LAA* polimorfisma gadījumā 603 paraugiem ieguvām pozitīvu rezultātu, kas ir 83,87 %, bet *LGB* gadījumā – 649 pozitīvus rezultātus, kas ir 90,26 %.

Latvijā audzēto govju populācijas piena proteīnu gēnu polimorfismu pētījumos izmantoto PCR/RFLP apraksts

Gēns	Polimorfisms [#]	PCR Amplifikācijas nosacījumi ^{\$}			Praimeru sekvence	Produkts, bp	RFLP	
		Denaturizācija	Hibridizācija*	Elon- gācija			Enzīms Sekvence	Fragmenti, bp, un proteīna variācija
CSN1S1	c.-175A>G B>C	94 °C / 3 min	94 °C / 30 s 59 °C / 30 s 72 °C / 30 s	72 °C / 10 min	F 5' – TGC ATG TTC TCA TAA TAA CC – 3' R 5' – GAA GAA GCA GCA AGC TGG – 3'	310	MaeIII ↓GTNAC	310 – C 214/96 – B
CSN2	c.4451A>C Pro ₆₇₍₈₂₎ His A1>A2	94 °C / 4 min	94 °C / 30 s 60 °C / 40 s 72 °C / 30 s	72 °C / 4 min	F 5' – CCT TCT TTC CAG GAT GAA CTC CAG – 3' R 5' – GAG TAA GAG GAG GGA TGT TTT GTG GGA GGC TCT – 3'	121	DdeI C↓TNAG	121 – A1 86/35 – A2
CSN3	c.11625C>T un c.11661A>C Thr ₁₃₆₍₁₅₇₎ Ile Asp ₁₄₈₍₁₆₉₎ Ala A>B	95 °C / 2 min	95 °C / 30 s 55 °C / 40 s 72 °C / 30 s	72 °C / 7 min	F 5'– TAT CAT TTA TGG CCA TTG GAC CA – 3' R 5'– CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA GTT – 3'	228	HinfI G↓ANTC HindIII A↓AGCTT	133/93 – A 135/95 – B
LAA (LALBA)	c.15A>G - A>B	94 °C / 10 min	95 °C / 30 s 58 °C / 30 s 72 °C / 60 s	72 °C / 0.5 min	F 5' – CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT– 3' R 5' – AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA– 3'	166	MnII CCTCN ₇ ↓	78/52/36 – A 114/52 – B
LGB (PAEP)	c.3106T>C Val ₁₁₈₍₁₃₄₎ Ala A>B	94 °C / 3 min	94 °C / 30 s 48 °C / 30 s 72 °C / 30 s	72 °C / 5 min	F 5' – TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G – 3' R 5' – GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT – 3'	247	HaeIII GG↓CC	148/99 – A 74(x2)/99 – B

[#] – nukleotīda nomaiņa un, ja ir, aminoskābes nomaiņa aktivizētā proteīnā (neaktivizētā proteīnā) un proteīna variācijas.^{\$} – pie katra SNP norādīts: konkrētā etapa temperatūra/laiks.

* – pie katra SNP norādīts: cikla skaits un trīs etapu – denaturizācijas, anilēšanas un sintēzes – temperatūra/laiks.

Gala rezultātā, apvienojot tehniskos aprakstus no vairāku literatūras avotu metodikas, eksperimentējot, aprobējot, verificējot un validējot tās MGPL, secinājām, ka jaunapgūtā metode nodrošina kvalitatīvus rezultātus, lai analizētu piecu piena proteīna gēnu – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* – polimorfismus.

Veicot pētījumus par metodikas precizitāti, paralēli mūsu pētījumiem par κ - kazeīna gēnu polimorfismu tika veikta Starptautiskā testēšana Igaunijā, Tartu Dzīvības zinātņu universitātes ģenētikas laboratorijā. Iegūtie rezultāti sakrīt pilnībā.

2.2. Piena proteīnu gēnu polimorfismu analīze

Ir izanalizēti 719 Latvijā audzēto slaucamo šķirņu govju, t. sk. 94 vaislas buļļu, DNS paraugi piecu piena proteīnu gēnu polimorfismiem, analizējot katra SNP alēles, genotipus un visu SNP haplotipus. Tādējādi ir iegūts priekšstats par Latvijas govju populāciju, jo grupā tika ietvertas septiņas Latvijā biežāk audzētās govju šķirnes.

Vislielāko kopu piena proteīna ģenētiskā polimorfisma analīzēm veidoja 367 Latvijas brūnās šķirnes liellopi, kas Latvijā ir visizplatītākā piena govju šķirne, 179 Latvijas zilās šķirnes liellopi, 79 Holšteinas melnraibās šķirnes liellopi un 55 Dānijas sarkanās šķirnes liellopi. Pārējo šķirņu īpatņi veido mazāku skaitu, bet arī to analizēšana deva būtiskus rezultātus ģenētiskā polimorfisma analīzē.

Kazeīna proteīnu analīzē *CSN1S1* gadījumā Latvijā biežāk sastopamā alēle ir B (0,96) un genotips BB (0,93). Izvērtējot alēļu biežumus starp dzimumiem, konstatējām, ka 86 CMAS buļļiem alēles B biežums ir par 0,07 mazāks (0,90) nekā govīm (0,97; $p = 2,07 \times 10^{-7}$). Apskatot genotipu frekvences, varam secināt, ka heterozigoti pārstāvji ir izteikti vairāk starp buļļiem (20,93 % buļļiem un 5,43 % govīm; visiem genotipiem $p = 4,99 \times 10^{-7}$), kas varētu nozīmēt, ka tieši buļļu DNS nodrošina C alēles esamību dažādajos ganāmpulkos, jo nevienam no paraugkopas 675 īpatņiem nekonstatējām genotipu CC.

Izpētot veikto pētījumu datus Igaunijā (EE) par audzēto govju šķirņu piena proteīna alēļu frekvencēm, konstatējām, ka vidējie rādītāji ir līdzīgi mūsu iegūtajiem datiem. EE vietējai govju ($n = 118$) šķirnei α_{s1} - CN alēles B frekvence ir 0,92, bet alēles C frekvence ir 0,08 (Lien et al., 1999). Arī Lietuvas (LT) zinātnieku pētījumi uzrāda līdzīgākus rezultātus salīdzinājumā ar mūsu veiktajiem pētījumiem nekā Igaunijas pētījumi. LT slaucamo govju populācijas ($n = 427$) B alēles frekvence ir 0,95 (Pečiulaitiene, 2005). Apskatot citu Eiropas valstu pētnieku darbus, varam konstatēt, ka Bulgārijas zinātnieku pētījumu rezultāti par Bulgāru pelēkās šķirnes govīm ir uzrādījuši, ka alēles B frekvence ir 0,43 un alēles C – 0,57, un pretēji mūsu rezultātiem zinātnieki ir konstatējuši visus trīs genotipus ar novēroto genotipu frekvencēm, attiecīgi BB = 0,18, BC = 0,79, CC = 0,03, ko varētu izskaidrot arī ar šīs šķirnes vēsturisko rašanos (*Bos taurus brachyceros* x *Bos taurus Primigenius*; Neov et al., 2013). Turpretī Čehijas zinātnieku rezultāti ir līdzīgāki mūsu pētījumu rezultātiem nekā Bulgārijas, jo 440 Čehijas vietējās govju šķirnes (*Czech Fleckvieh*) dzīvniekiem

α_{s1} - kazeīna genotipu frekvences attiecīgi ir BB = 0,80, BC = 0,18, CC = 0,16, bet alēļu frekvences attiecīgi ir B = 0,89 un C = 0,11 (Kučerova et al., 2006).

CSN2 gadījumā biežākā alēle ir A1 (0,67) un genotipi A1A1 (0,42) un A1A2 (0,49), neņemot vērā to, ka literatūrā kā vēlamākā alēle govju populācijā aprakstīta A2 alēle (Reichelt et al., 1991; Cade et al., 2000; McLachlan, 2001; Cardak, 2005; A2 Corporation, 2006; Cieslinska et al., 2007; Pečiulaitiene et al., 2007). Apskatot populācijas līdzsvaru pēc konkrētā lokusa, ir redzams, ka novērojamas statistiski ticamas atšķirības ($p_x = 2,72 \times 10^{-3}$) starp sagaidāmo un reālo heterozigoto īpatņu biežumu. Apskatot katru šķirnes grupu atsevišķi, ir novērojama līdzīga situācija pusē no šķirnēm (LB, LZ, HS un VS). Visos gadījumos ir ļoti zems A2A2 genotipa biežums. Turklāt ir redzams, ka šķirnei HM, kurai ir raksturīgs lielāks izslaukuma daudzums, ir novērojams augstāks A2A2 genotipa līmenis un līdzsvars pēc Hārdija–Veinberga vienādojuma.

Vēlamās **CSN2** A2 alēles biežums Igaunijas vietējo govju šķirnei (Vārv et al., 2009) ir ievērojami augstāks (0,60) nekā mūsu Latvijas zilajai šķirnei (0,24). Secinām, ka Igaunijas vietējai šķirnei β – CN labvēlīgās alēles A2 frekvence ir vidēji divreiz augstāka nekā Latvijā audzētajām vietējām govju šķirnēm: Latvijas brūnajai un Latvijas zilajai.

Mūsu pētījumā iekļautajiem 94 vaislas bulļiem piena proteīna gēna alēļu frekvences ir ar nelielu tendenci A1 alēles pārsvaram (0,54) pār alēli A2 (0,46), bet 622 kopas govīm A1 alēles frekvence ir 0,69, B alēles frekvence – 0,31. Turklāt ir arī jāsecina, ka vairāk nekā puse no vaislas bulļiem ir heterozigoti pārstāvji. Tātad, pieņemot, ka pēc genotipa katra alēle iedzimst ar vienādu varbūtību, varam pieļaut, ka bullis labvēlīgo alēli nodod katram savam otrajam pēcnācējam. Salīdzinot alēļu un genotipu frekvenču biežumu starp govīm un bulļiem, ir redzama statistiski ticama atšķirība. Vaislas bulļiem ir augstāks A2 alēles biežums ($p_x = 4,22 \times 10^{-5}$), kā arī heterozigotā un A2 alēles homozigotā genotipa līmenis ($p_x = 3,75 \times 10^{-3}$). Tātad ir labāks fons A2A2 genotipa veidošanai.

Čehijas zinātnieki (Kučerova et al., 2006), pētot **CSN2** alēles A1, A2, A3 un B, konstatēja, ka A1 frekvence ir 0,18, A2 – 0,80, A3 – 0,01 un B – 0,01. Tas norāda uz labāku A2 alēles selekciju nekā Latvijā.

Trešā analizētā kazeīna gēna **CSN3** analizē konstatējām, ka populācijā biežākā ir alēle A (0,92) un tā homozigotais (AA = 0,86) genotips. No literatūras avotiem zinām, ka κ – kazeīna genotipa BB dzīvnieki izceļas ar labākām piena pārstrādes tehnoloģiskajām īpašībām, augstāku siera iznākumu (Martin et al., 2002), bet mūsu populācijā šis genotips (BB = 0,03) un, attiecīgi, alēle B (0,08) ir ļoti reti. Ir izteikts A alēles pārsvars, ko pierāda arī Hārdija–Veinberga vienādojuma analīze, kurā tika konstatētas sagaidāmā un iegūtā heterozigotā genotipa statistiskās atšķirības ($p_x = 1,19 \times 10^{-3}$). Ir arī jāmin, ka tikai Latvijas vēsturiskajās šķirnēs (LB un LZ) ir sastopami visi trīs genotipi, pārējās šķirnēs ir tikai genotips AA.

Mūsu dati par κ – kazeīna A alēles lielo sastopamību piena ražošanas virziena govju populācijās Latvijā saskan ar izpētes datiem Lietuvā un Igaunijā (Pečiulaitiene, 2005; Pečiulaitiene et al., 2007; Vārv et al., 2009). Igaunijā lielāks alēles B biežums konstatēts Igaunijas vietējiem lopiem – Igaunijas

vietējo govju šķirnei (0,24) un Igaunijas sarkano govju šķirnei (0,37). Tomēr arī Igaunijas pētnieki κ - kazeīna pētījumos pārliecinājās, ka visi piena recēšanas parametri bija labāki κ - kazeīna BB genotipa dzīvniekiem (Kübarsepp et al., 2005). LT slaucamo govju populācijas A alēles frekvence ir 0,74, un alēlei B – 0,22 (Pečiulaitiene et al., 2007).

Otra piena proteīnu grupa ir sūkalu proteīni, kur **LAA** un **LGB** biežākā alēle ir B (attiecīgi, 0,94 un 0,78) un genotips BB (attiecīgi, 0,88 un 0,60) abos gadījumos.

LAA gadījumā analizētais lokuss pēc Hārdija–Veinberga vienādojuma ir līdzsvarā visās šķirnes grupas, izņemot Latvijas brūnās šķirnes grupā. Sešu šķirņu grupās ir novērojams alēles B (no 0,82 līdz 1,00) biežuma pārsvars, līdz ar ko var atzīt, ka, domājams, gēnu dreifa rezultātā alēle A tiek izspiesta no populācijas un alēles B biežums pieaug. Turklāt A alēle ir sastopama heterozigotā formā, izņemot Holšteinas melnraibās govju šķirnes gadījumā, kad vienam bullim tika konstatēta arī homozigota forma pēc A alēles. Šīs šķirnes gadījumā A alēles īpatsvars ir visaugstākais, kas, salīdzinot ar Latvijas brūno govju šķirni, ir pat sešas reizes lielāks (0,18 pret 0,03). Apskatot retās A alēles sadalījumu govju un vaislas buļļu starpā, ir redzams, ka vaislas buļļiem šī alēle ir vairāk nekā divas reizes biežāk sastopama (0,12 pret 0,05; $p_x = 5,38 \times 10^{-4}$). Genotipu gadījumā alēles A pārsvars ietekmē heterozigotās formas divkārtšo pārsvaru (0,21 pret 0,10; $p_x = 6,00 \times 10^{-4}$).

No ārzemju zinātnieku (Bell et al., 1981; Formaggini et al., 1999) pētījumu datiem varam secināt, ka B varianta izplatība ir *Bos taurus*, *Bos Indicus*, *Bos (Poephagus) Grunniens* tipiskā (*ancestral*) forma, bet A varianta izplatība nav *Bos Taurus* raksturīga forma. Hipotētiski varam secināt, ka arī mūsu dati apstiprina zinātnieku norādītos rezultātus par A varianta zemo frekvenci dažādās šķirnēs un tās izcelsmi. Pēc mūsu iegūtajiem datiem visaugstākā A alēles frekvence Latvijā ir HM šķirnes dzīvniekiem (0,18) un, salīdzinot ar ārzemju zinātnieku publicētajiem datiem, secinām, ka daudzās valstīs (Voelker et al., 1998; Bojarojc - Nosowicz et al., 2005) A alēles frekvence ir daudz augstāka (līdz pat 0,77 jeb 76,60 %) nekā mūsu pētītajās slaucamo govju šķirnēs Latvijā.

Otra sūkalu proteīna jeb **LGB** gadījumā Latvijā izaudzētajās slaucamo govju šķirnēs ir relatīvi augstāks alēles B biežums: Latvijas brūnajai 0,83, Latvijas zilajai 0,80, bet Holšteinas melnraibajai tikai 0,58. Ja apskatām genotipus, tad ir redzams, ka HS, ZS un VS šķirnēs homozigota forma pēc retās A alēles ir izteikti augstāka nekā pārējās Latvijas populācijas slaucamo govju šķirnēs un arī nekā vidēji (0,03) Latvijas slaucamo govju populācijā. Ja apskatām genotipus, tad ir redzams, ka HS, ZS un VS šķirnēs homozigota forma pēc retās A alēles ir izteikti augstāka nekā pārējās Latvijas populācijas šķirnēs un arī nekā vidēji (0,03) Latvijas govju populācijā. Salīdzinot alēļu frekvenču sadalījumu pa šķirnēm, ir novērojama statistiski ticama ($p_x = 7,16 \times 10^{-11}$) atšķirība. Tāda ir vērojama arī genotipu biežumu sadalījumā ($p_x = 3,25 \times 10^{-5}$).

Salīdzinot mūsu pētījuma datus ar ārzemju zinātnieku (Ikonen et al., 1996; Erhardt et al., 1997; Pečiulaitiene, 2005; Kübarsepp et al., 2005; Zaton–Dobrowolska et al., 2006) publicētajiem datiem, secinām, ka tie uzrāda nedaudz zemāku alēles B biežumu, pētot piena vājpiena proteīna **LGB** polimorfismu

dažādām govju šķirnēm nacionālajos un speciālajos ganāmpulkos. Vienīgā šķirne, kurai ir augstāka biežāk sastopamās alēles frekvence, ir Lietuvas sarkanā ar B alēles biežumu 0,92 (Pečiulaitiene, 2005).

Analizējot visus piecus gēnus kopā, tika izveidoti 15 haplotipi, no kuriem 11 tika konstatēti vismaz piecos paraugos jeb kurus varēja uzskatīt par biežu haplotipu kopējā populācijas grupā. Starp visu piecu proteīnu haplotipiem biežāk sastopamā kombinācija bija no visu proteīnu variāciju biežākajām alēlēm (haplotips H2: DNS sekvence ir AACAGT (1. pozīcijā *CSN1S1*, 2. pozīcijā *CSN2*, 3. un 4. – *CSN3* abi SNP, 5. – *LAA* un 6. – *LGB*), bet proteīnu sekvence ir BA1ABB. Konkrētais haplotips tika konstatēts vairāk nekā pusei no paraugiem (51,81 %). Biežāk sastopamais H2 haplotips nemainās, sadalot paraugus pa govju šķirnēm.

Iegūtie rezultāti sniedz iespēju analizēt piecu proteīnu gēnu divu alēļu genotipu saistību ar piena produktivitātes rādītājiem un ar vaislas buļļu ciltsvērtības indeksiem.

2.3. Piena proteīnu gēnu polimorfismu saistība ar piena produktivitāti

Piena produktivitātes rādītāji ir statistiski nozīmīgi atšķirīgi starp Latvijas slaucamo govju šķirnēm, uzrādot augstākus rādījumus Holšteinas (Holšteinas melnraibā un Holšteinas sarkanraibā) šķirņu grupā, bet zemākus Zl jeb Latvijas zilās šķirnes grupā visās laktācijās.

Četru no piecu (izņemot *CSN1S1*) analizēto piena proteīnu gēnu genotipi ir statistiski nozīmīgi saistīti ar Latvijas slaucamo govju šķirnēm, turklāt divi gēni (*CSN3* un *LAA*) varētu ietekmēt šķirņu veidošanos.

Par piena produktivitātes raksturojošajiem lielumiem izvēlēti govju pirmo trīs laktāciju izslaukums kilogramos, piena tauku un olbaltumvielu daudzums kilogramos un to procentuālā daļa.

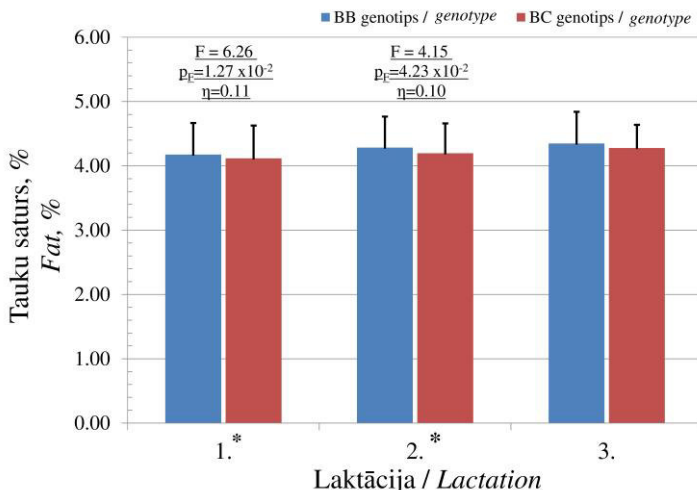
CSN1S1 saistības analīzē ar piena produktivitāti tika izmantoti 519 paraugi, *CSN2* gadījumā – 541 DNS paraugi, bet trešā kazeīna proteīna gēna jeb *CSN3* saistība ar piena produktivitāti tika noteikta, izmantojot 389 govju paraugu. Piena sūkālu proteīnu *LAA* un *LGB* analīzes gadījumā tika izmantoti 434 un 505 govju DNS dati, attiecīgi.

Alfa_{s1} - kazeīna gēna BB genotips statistiski ticami veicina tauku procentuālā satura pieaugumu Latvijā audzēto govju pienā pirmajās divās laktācijās (1. att.). Pirmajā laktācijā govīm ar BB genotipu vidēji ir par 0,26 % augstāks tauku saturs nekā BC genotipa pētāmajiem īpatņiem ($p_F = 1,27 \times 10^{-2}$; $\eta = 0,11$), bet otrajā laktācijā – palielinājums ir par 0,21 % ($p_F = 4,23 \times 10^{-2}$; $\eta = 0,10$).

BB genotips arī palielina izslaukuma daudzumu pirmajās trīs laktācijās, bet atšķirības nav statistiski nozīmīgas. Tātad varam secināt, ka C alēles selekcija nav nepieciešama piena produktivitātes uzlabošanā, jo B alēles homozigotās formas govīm saistītie rādītāji ir augstāki.

CSN1S1 genotipi un govju šķirņu grupas statistiski ticami ir saistīti ar olbaltumvielu daudzumu procentos govju pienā 2. laktācijā ($p_F = 4,72 \times 10^{-2}$). Sī un Zl grupās BC genotipa govju rādītāji ir nedaudz augstāki (~0,10 %) nekā

BB genotipa, bet Hol grupas gadījumā ir pretēji (-0,44 %). Tātad C alēles nozīmīgums ir atkarīgs no šķirnes.



1. att. α_{s1} - kazeīna gēna B un C alēļu genotipu saistības analīze ar tauku saturu procentos pirmajās trijās laktācijās

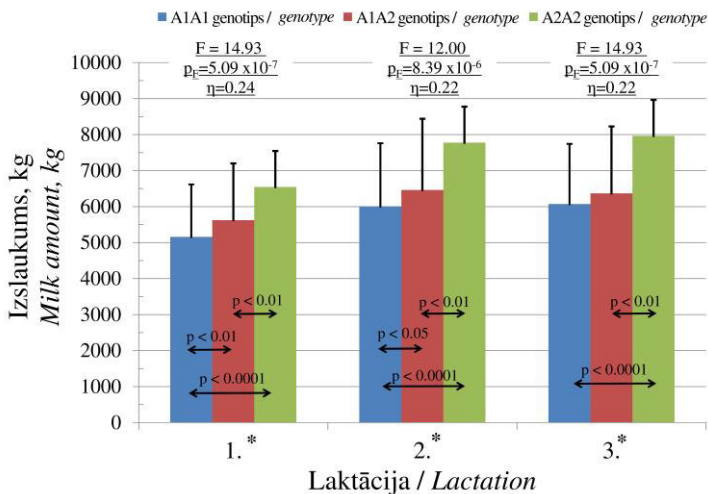
Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 1. Association analysis between genotypes of B and C alleles of α_{s1} – casein gene and fat (%) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Apskatot katru šķirnes grupu atsevišķi, varam konstatēt, ka Holšteinas šķirņu grupā ir statistiski nozīmīga atšķirība starp genotipu grupu rādītājiem 2. laktācijā tauku un olbaltumvielu satura gadījumā. Tauku satura gadījumā ticamība ir $2,78 \times 10^{-2}$, bet olbaltumvielu – $1,86 \times 10^{-2}$. Abu pazīmju gadījumos govīm ar BB genotipu ir augstāks rādītājs, attiecīgi, +1,06 un +0,44.

Beta - kazeīna gēna genotipu pozitīvo ietekmi varējām izteikt attiecībā $A2A2 > A1A2 > A1A1$. Tas nozīmē, ka A2A2 genotips veicina statistiski nozīmīgu izslaukuma pieaugumu pirmajās trīs laktācijās (2. att.). Visu laktāciju gadījumā korelācija (η) starp genotipu sadalījumu un izslaukuma daudzumu ir robežās no 0,24 pirmajā laktācijā līdz 0,22 pārējās divās laktācijās. A2A2 genotipa pārsvars pār A1A2 genotipu ir +920,98 kg jeb 16,38 % pirmajā laktācijā ($p_F = 1,76 \times 10^{-3}$), +1313,42 kg jeb 20,33% 2. laktācijā ($p_F = 1,38 \times 10^{-3}$) un +1597,65 kg jeb 25,10 % 3. laktācijā ($p_F = 1,77 \times 10^{-3}$). Kā redzams 2.attēlā, ar katru laktāciju A2A2 alēles pozitīvais pārsvars palielinās.



2. att. β -kazeīna gēna A1 un A2 alēļu genotipu saistības analīze ar piena izslaukumu kilogramos pirmajās trijās laktācijās

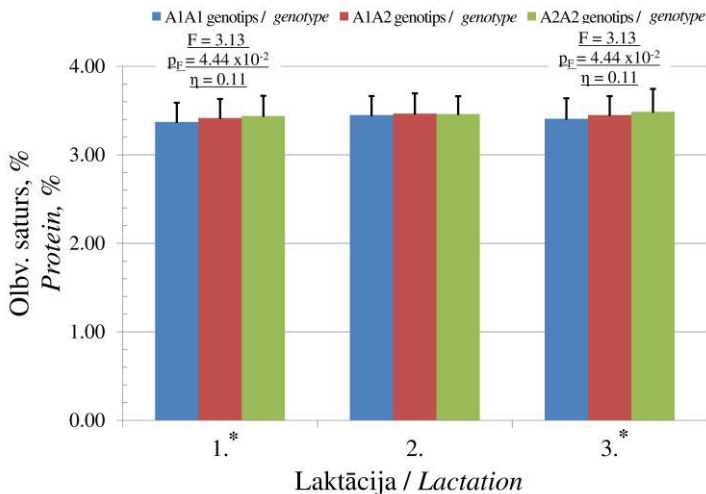
Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 2. Association analyse between genotypes of A1 and A2 alleles of β - casein gene and milk amount (kg) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical signification; η – index of correlation analyses.

Izslaukuma palielināšanās rezultātā 3. laktācijā A2 alēles homozigotā forma tauku daudzumu pienā palielina par gandrīz 1/5 daļu attiecībā pret heterozigoto formu (+54,09 kg jeb 19,52 %; $p_F = 2,59 \times 10^{-2}$) un 2. laktācijā A2 alēles homozigotā forma olbaltumvielu daudzumu pienā palielina par gandrīz 1/5 daļu attiecībā pret heterozigoto formu (+44,67 kg jeb 19,95 %; $p_F = 2,25 \times 10^{-3}$), bet 3. laktācijā – jau vairāk nekā 1/4 daļu (+57,30 kg jeb 26,06 %; $p_F = 1,74 \times 10^{-3}$). Ir jāmin, ka 1. un 3. laktācijas gadījumā β - kazeīna gēna A1 un A2 alēļu genotipiem ir statistiski ticama saistība arī ar olbaltumvielu saturu procentos (3. att.). Tātad varam secināt, ka saistība ar olbaltumvielu daudzumu ir pastāvīga, nevis tikai izslaukuma saistības radīta.

Pēc mūsu iegūtajiem datiem β - CN gēna A2 alēles homozigotajai formai pozitīvā ietekme palielinās, govīm novecojot jeb ar vēlāku laktāciju. Kopumā varam secināt, ka mūsu iegūtie rezultāti ir līdzīgi citu valstu zinātnieku iegūtajiem datiem (Ehrmann et al. 1997; Winkelman, Wickham, 1997, Kaminski et al. 2006), ka govīm piena produktivitātes palielināšanai CSN2 gēna gadījumā tieši A2A2 genotips ir jāpakļauj selekcijai jeb jāpalielina tā biežums populācijā. Tātad ir jāsamazina A1A2 genotipa izplatība starp bulliem.



3. att. β - kazeīna gēna A1 un A2 alēļu genotipu saistības analīze ar olbaltumvielu (olbv.) saturu procentos pirmajās trijās laktācijās

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 3. Association analysis between genotypes of A1 and A2 alleles of β - casein gene and protein (%) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Sadalot analizētos paraugus pa Latvijas govju šķirņu grupām, vienīgā statistiski nozīmīgā saistība ir ar tauku satura daudzumu procentos pirmajā laktācijā ($p_F = 3,49 \times 10^{-3}$).

Analizējot katras šķirnes grupas datus atsevišķi, statistiski nozīmīgu atšķirību sarkano (Sr) šķirņu grupā konstatējam saistībā ar visu laktāciju izslaukuma daudzumu, ņemot vērā to, ka visām šķirnēm kopā nevienā gadījumā netika iegūts statistiski nozīmīgs rezultāts. Tātad varam domāt, ka iegūtā saistība starp CSN2 genotipiem un izslaukuma daudzumu, analizējot tikai genotipus, ir attiecināma uz vairāk uz Latvijas sarkano šķirņu grupu, nevis uz visu pētāmo populāciju.

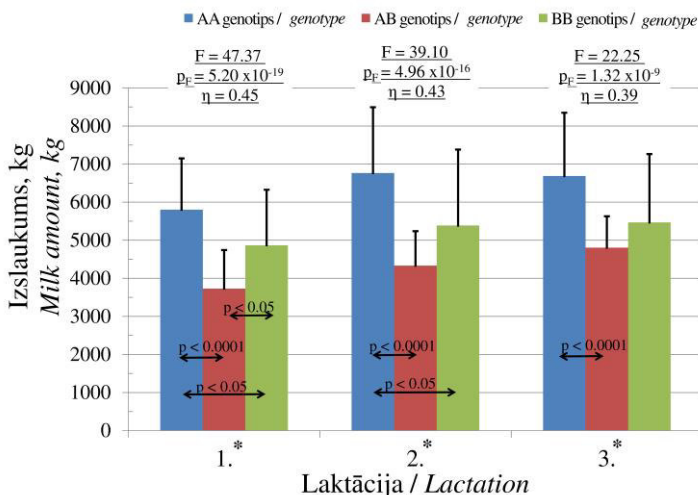
CSN2 A1 un A2 alēle ietekmē ne tikai piena produktivitāti (izslaukuma daudzumu un olbaltumvielu daudzumu procentos), bet ir saistītas ($V = 0,21$) ar Latvijas govju šķirnes grupām, bet neietekmē (lineārās regresijas $p_r > 0,05$) govju šķirni.

Kappa - kazeīna gēna genotipu pozitīvo ietekmi varējām izteikt attiecībā AA > BB > AB visu daudzuma (kg) rādītāju gadījumos. Tomēr ne vienmēr BB > AB rādītāju atšķirība bija statistiski nozīmīga ($p_F > 0,05$).

CSN3 genotips AA statistiski nozīmīgi veicina izslaukuma pieaugumu pirmajās divās laktācijās (4. att.). AA genotipa pārsvars pār BB genotipu ir +933,83 kg jeb 19,19 % pirmajā laktācijā ($p_F = 3,43 \times 10^{-2}$), +1377,78 kg jeb

25,58 % 2. laktācijā ($p_F = 1,47 \times 10^{-2}$) un +1219,48 kg jeb 22,31 % 3. laktācijā ($p_F > 0,05$ jeb = 0,06). Turklāt ir jāmin, ka starp genotipu sadalījumu un izslaukumu daudzumu kilogramos ir statistiski ticama saistība: 1. laktācijā $\eta = 0,45$, 2. laktācijā $\eta = 0,43$, bet trešajā – $\eta = 0,39$. Saistība ar katru nākamo laktāciju samazinās no vidēji ciešas līdz vājai.

Pretrīji iepriekš analizētajai asociācijai ar beta - kazeīna gēna genotipiem kappa - kazeīna gadījumā lielāks izslaukuma pārsvars AA genotipam pār BB genotipu ir tieši pirmās laktācijas laikā. Starp pirmo un otro laktāciju AA alēles pārsvars palielinās, bet uz trešo laktāciju – samazinās. Tātad iespējams, ka κ - CN gēna A alēles homozigotajai formai pozitīvā ietekme ir tieši uz jaunākām govīm.



4. att. κ - kazeīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar piena izslaukumu kilogramos pirmajās trijās laktācijās

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 4. Association analysis between genotypes of A and B alleles of κ - casein gene and milk amount (kg) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Tauku daudzuma gadījumā: AA genotipa pārsvars pār BB genotipu ir +62,12 kg jeb 32,06% pirmajā laktācijā ($p = 8,32 \times 10^{-4}$), +72,08 kg jeb 32,01% 2. laktācijā ($p_F = 2,68 \times 10^{-3}$) un +64,07 kg jeb 27,90 % 3. laktācijā ($p_F = 2,15 \times 10^{-2}$).

Olbaltumvielu daudzuma situācija: AA genotipa pārsvars pār BB genotipu ir +38,67 kg jeb 24,19 % pirmajā laktācijā ($p_F = 1,10 \times 10^{-2}$), +51,21 kg jeb 27,78% 2. laktācijā ($p_F = 9,58 \times 10^{-3}$) un +48,03 kg jeb 26,33% 3. laktācijā ($p_F = 3,35 \times 10^{-2}$).

Gan olbaltumvielu, gan tauku saturam procentos pirmajā laktācijā konstatējām statistiski ticamu saistību, tad arī olbaltumvielu un tauku daudzums kilogramos ir saistīts ar *CSN3* genotipiem neatkarīgi no izslaukuma daudzuma saistības. Pirmās laktācijas gadījumā rādītājiem tauku un olbaltumvielu daudzumam procentos ir atšķirīgs genotipu grupu nozīmīguma sadalījums – $AA > AB > BB$ –, kas ir atšķirīgs no piena izslaukuma daudzuma analīzes.

No literatūras datu analīzes tika konstatēts, ka κ -kazeīna genotipa BB dzīvnieki izceļas ar labākām piena pārstrādes tehnoloģiskajām īpašībām, augstāku siera iznākumu (Martin et al., 2002), ko vajadzētu pārbaudīt arī Latvijas apstākļos. Ņemot vērā, ka BB genotipa govīm izslaukuma daudzums nav zemākais, bet tauku saturs procentos pirmajā laktācijā ir zemāks jeb piens ir liesāks, varam domāt, ka Latvijā ir ieteicams palielināt BB genotipa īpatsvaru. Tomēr nedrīkst izslēgt A alēles homozigoto genotipu, kura govīm tika novērots augstākais izslaukums un augstākais tauku saturs 1. laktācijā. Kopumā varam domāt, ka *CSN3* varētu izmantot selekcijā, lai iegūtu govīs ar pienu ar dažādu treknuma līmeni.

Sagrupējot visus govju paraugus atkarībā no to piederības Latvijas govju šķirņu grupām, konstatējām statistiski nozīmīgu saistību ar izslaukumu (kg) un olbaltumvielu satura daudzumu procentos (paralēli arī olbaltumvielu daudzums kilogramos) visās trīs laktācijās. Izslaukuma daudzuma gadījumā sarkano šķirņu grupā saglabājas attiecība $AA > BB > AB$, kā tas tika novērots, analizējot tikai genotipus, bet ZI grupā BB genotipa rādītājs ir augstāks nekā AA genotipam.

Olbaltumvielu satura daudzumam procentos sarkano šķirņu grupā attiecība ir $AA > AB > BB$ pirmajās divās laktācijās, bet pēdējā – AB un BB grupas rādītāji pēc lieluma apmainās vietām jeb ir $BB > AB$. Bet Latvijas zilo govju šķirņu grupā attiecība ir $BB > AB > AA$ pirmajās divās laktācijās un atkal trešajā laktācijā AB un BB grupas rādītāji pēc lieluma apmainās vietām jeb ir attiecība $AB > BB > AA$.

Holšteinas šķirņu grupā tika konstatēta homozigotā forma pēc biežāk sastopamās alēles.

Analizējot tikai šķirņu grupu datus, iegūstam rezultātus, kas liecina par to, ka statistiski nozīmīga atšķirība starp genotipiem un piena produktivitātes rādītāju ir tieši sarkano šķirņu grupā, kurā statistiski nozīmīgas atšķirības ir saistībā ar tiem pašiem rādītājiem, kā analizējot visas šķirnes grupas kopā.

Tātad, apkopojot informāciju par κ -kazeīna proteīna analīzi, varam secināt, ka piena produktivitātes rādītājus ietekmē gan gēna genotips, gan govju šķirne. Tomēr ir jāmin, ka gēna genotips korelē ar ($V = 0,32$) un ietekmē (lineārās regresijas $p_r = 6,04 \times 10^{-4}$) Latvijas slaucamo govju šķirnes, bet ne 100 %.

Alfa - laktalbumīna genotips BB veicina pieaugumu tauku saturam procentos 1. laktācijā. Šajā gadījumā BB genotipa govīm tika konstatēts augstāks (+0,22) tauku saturs nekā AB genotipa govīm ($p_F = 1,47 \times 10^{-2}$). Korelācijas analīzē tika konstatēta ļoti vāja korelācija starp LAA genotipiem un tauku saturu procentos.

Pārējo analizēto pienu produktivitātes rādītāju gadījumā statistiski ticama atšķirība netika konstatēta, ņemot vērā to, ka visu rādītāju gadījumā BB

genotipu paraugiem vidējās vērtības ir augstākas nekā heterozigotai formai. Iespējams, ka saistība netika konstatēta, jo populācijā netika konstatēta A alēles homozigotā forma.

Pēc rezultātiem varam domāt, ka alēles A izspiešana no populācijas gēnu dreifa rezultātā un alēles B biežuma pieaugums ir saistīts ar B alēles pozitīvo ietekmi uz govju organismu, tai skaitā piena kvalitātes un kvantitātes pazīmēm.

Sadalot visus paraugus atkarībā no to piederības Latvijas govju šķirnes grupām, statistiski nozīmīga atšķirība ir saistībā ar olbaltumvielu daudzumu kilogramos pirmajās divās laktācijās un tauku saturu procentos trešajā laktācijā.

Holšteinas un sarkano šķirņu grupās olbaltumvielu daudzums pienā atkarībā no genotipa sadalās līdzīgi kā analizējot tikai gēna genotipu, tas ir, $BB > AB$. Bet Latvijas zilo govju grupā sadalījums ir pretējs: govīm ar AB genotipu olbaltumvielu pirmajā un otrajā laktācijā ir vidēji par 24,58 un 21,51 kilogramiem attiecīgi vairāk nekā govīm ar BB genotipu.

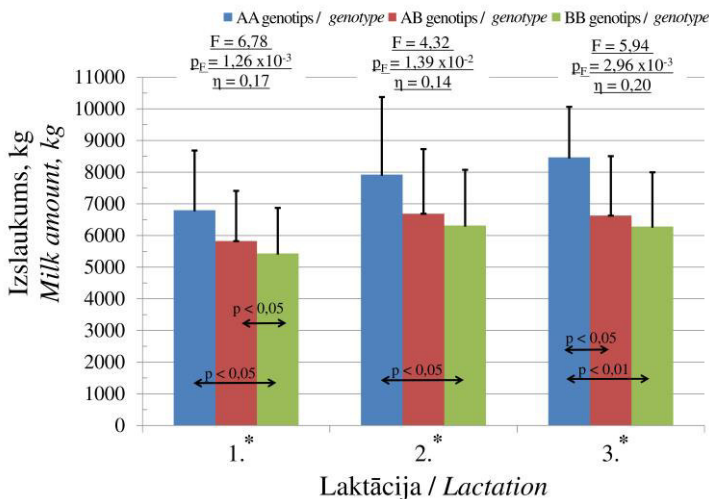
Apskatot saistību analīzi ar tauku saturu procentos 3. laktācijā, ir redzams, ka atšķirīgs daudzuma sadalījums atkarībā no genotipiem ir Holšteinas šķirņu grupā. Šajā grupā heterozigotā genotipa pārstāvēm ir par 0,86 % vairāk tauku nekā B alēles homozigotas nesējām.

Turklāt Hol grupai atsevišķi ir saistība ar 3. laktācijas izslaukumu un tauku saturu procentos: izslaukuma daudzums kilogramos lielāks ir BB genotipa govīm, bet tauku saturs procentos – AB genotipa govīm. Tātad varam secināt, ka α – laktalbumīna gēna gadījumā 3. laktācijā Hol grupas govīs ar BB genotipu dod vairāk piena, bet liesāku, bet ar AB genotipu otrādi: mazāk piena, bet treknāku.

Tātad, apkopojot rezultātus par α - laktalbumīna ģenētisko saistību ar piena produktivitātes rādītājiem, varam secināt, ka A un B alēļu genotipi ietekmē piena tauku saturu procentos 1. laktācijā un daļēji ietekmē (lineārās regresijas $p_r < 0,05$) Latvijas slaucamo govju šķirni. Kā arī ir jāmin, ka LAA ģenētiskā variācija ir nozīmīga Holšteinas šķirņu grupas govīm.

Beta - laktoglobulīna genotipu pozitīvo ietekmi varējām izteikt attiecībā $AA > AB > BB$, analizējot izslaukumu, tauku un olbaltumvielu daudzumu rādītājus, bet $BB > AB > AA$ – tauku un olbaltumvielu saturam procentos.

AA genotips statistiski ticami palielina izslaukuma pieaugumu pirmajās trīs laktācijās (5. att). Apskatot *izslaukuma* datus pa AA un AB genotipu, ir redzams, ka 1. laktācijas gadījumā homozigoto genotipu govju vidējais rādītājs ir par +974,27 kg jeb 16,73 % ($p_F = 1,26 \times 10^{-3}$) lielāks, 2. laktācijā – +1235,69 kg jeb 18,84 % ($p_F = 1,39 \times 10^{-2}$), bet 3. laktācijā – par +1840,31 kg jeb 27,77 % ($p_F = 2,96 \times 10^{-3}$). Pēc datiem ir redzams, ka ar katru laktāciju izslaukuma pārsvars AA genotipam palielinās un 3. laktācijas laikā A alēles homozigotajām govīm vidēji izslaukums ir par vairāk nekā 1/4 lielāks nekā heterozigotām govīm.



5. att. β - laktoglobulīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar piena izslaukumu kilogramos pirmajās trijās laktācijās

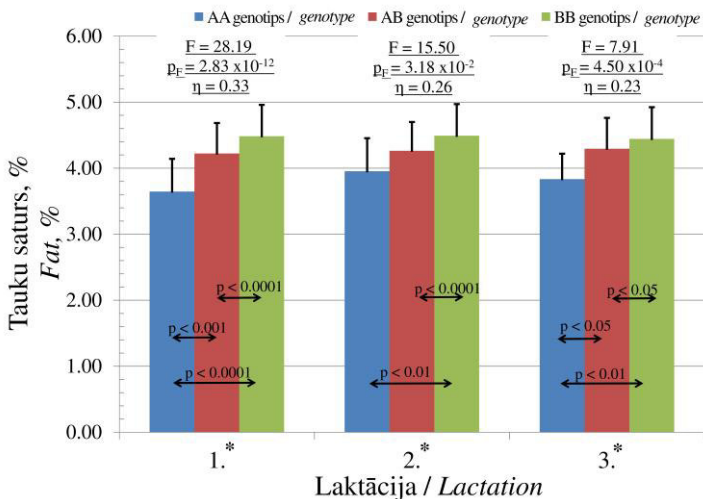
Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 5. Association analysis between genotypes of A and B alleles of β - lactoglobulin gene and milk amount (kg) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Olbumvielu saturs ir statistiski ticami saistīts ar analizētajiem genotipiem 1. laktācijā, kad BB genotipa pārsvars pār AB ir par 0,05 procentu daļām ($p_F = 2,40 \times 10^{-2}$). Paskatoties pārējo laktāciju abu genotipu attiecības, ir redzams, ka BB genotipa pārsvars samazinās. Kā interesantu faktu var minēt, ka, skatoties pēc genotipu grupām, vidēji palielinoties olbaltumvielu daudzumam izslaukumā 1. laktācijā, samazinās olbaltumvielu saturs procentuāli.

Tauku saturs gadījumā (6. att.) BB genotipa pārsvars pret AB 1. laktācijā ir 0,26 procentu daļas ($p_F = 8,37 \times 10^{-8}$), 2. laktācijas gadījumā ir 0,23 procentu daļas ($p_F = 5,21 \times 10^{-6}$), bet 3. laktācijā – par 0,15 procentu daļām ($p_F = 3,40 \times 10^{-2}$). Pēc datiem ir redzams, ka B alēles homozigotās formas pārsvars jeb pozitīvā ietekme samazinās ar katru laktāciju.



6. att. β -laktoglobulīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar tauku saturu procentos pirmajās trijās laktācijās

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu ar standartnovirzi; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 6 Association analysis between genotypes of A and B alleles of β -lactoglobulin gene and fat (%) at the first three lactations

Bar with a straight edge points to signs of an average group size with a standard deviation; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Apvienojot izslaukuma un tauku satura rezultātus, varam konstatēt, ka AA genotips Latvijā audzēto govju populācijā nodrošina lielāku piena daudzumu nekā AB genotips, bet liesāku jeb ar mazāku tauku saturu. Tātad būtu ieteicams palielināt A alēles un attiecīgi AA genotipa īpatsvaru Latvijas govju populācijā, tādējādi nodrošinot liesāku pienu, ko mūsdienās vairāk pieprasa patērētāji. Šobrīd ir novērojama pretēja aina, jo starp analizētajiem piena govju paraugiem 61,81 % ir ar genotipu BB, kas nodrošina maz piena ar augstu tauku saturu.

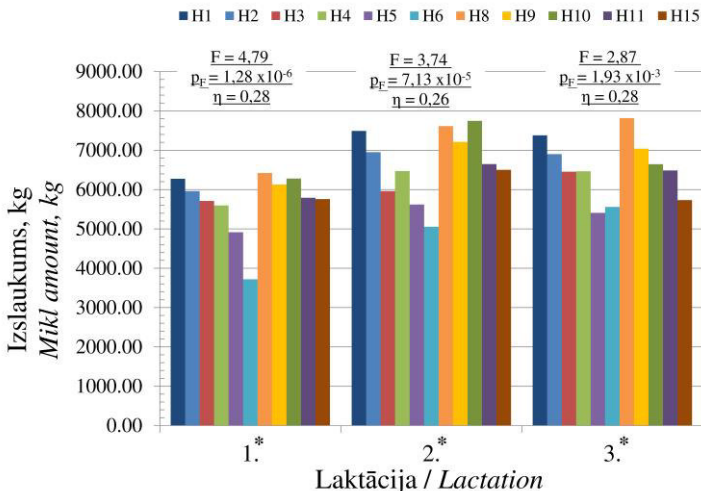
Apskatot, kā LGB genotipi un Latvijas govju šķirņu grupas kopā ietekmē piena produktivitātes rādītājus, var konstatēt, ka saglabājas statistiski nozīmīga atšķirība starp grupām saistībā ar izslaukuma daudzumu pirmajās divās laktācijās, kā arī saistībā ar olbaltumvielu saturu procentos 1. laktācijā. Izslaukumam sarkano šķirņu gadījumā ir $AB > AA > BB$, Hol grupā – $AA > AB > BB$, kas sakrīt ar attiecību, analizējot tikai genotipu, bet Latvijas zilo šķirņu grupā: $AB > BB > AA$. Tātad varam secināt, ka divu šķirņu grupu gadījumā izslaukuma daudzuma palielināšanai vislabākais genotips ir heterozigota.

Olbaltumvielu saturam procentos 1. laktācijā Sr un Hol grupu gadījumā saglabājas genotipu pozitīvā attiecība, kāda tika novērota, analizējot β -laktoglobulīna gēna genotipus atsevišķi – $BB > AB > AA$ –, bet Zl grupā attiecība ir mainīta – $AA > BB > AB$.

Kopumā pirmajā laktācijā Sr un Hol šķirņu grupās biežāk sastopamā LGB genotipa (BB) govīm ir maz piena, bet ar augstu olbaltumvielu saturu, bet Latvijas zilo govju šķirņu grupā biežāk sastopamā genotipa govīm ir vidēji daudz piena ar vidēju olbaltumvielu saturu.

Visu **piecu piena proteīnu gēnu** analizēto alēļu **haplotipi** ir saistīti ar šķirņu grupām: dažādās grupās biežākie haplotipi ir dažādi.

Haplotipi statistiski ticami ir saistīti ar izslaukumu (7. att.) un tauku saturu procentos visās trīs laktācijās.



7. att. **Piecu piena proteīnu gēnu haplotipu saistības analīze ar izslaukuma daudzumu pirmajās trīs laktācijās**

Stabiņš norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu; * – norāda uz saistību ar rādītāju konkrētā laktācijā; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 7. **Association analysis between haplotype of five milk protein genes and milk amount (kg) at the first three lactations**

Bar edge points to signs of an average group size; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyse.

Vislielākais izslaukums kilogramos ir govīm ar H8 haplotipu, bet vismazākais starp laktācijām atšķiras: pirmajā un otrajā tas ir haplotips H6, bet trešajā – H5. Pirmajā laktācijā izslaukuma atšķirība starp H8 un H6 haplotipu govīm ir 2701,75 kg, bet otrajā laktācijā – 2560,27 kg. Trešajā laktācijā starp lielākā un mazākā izslaukuma haplotipiem (H8 un H6) atšķirība ir 2409,00 kg. Ir redzams, ka ar katru nākamo laktāciju atšķirība samazinās.

Apskatot rezultātus par tauku saturu procentos, konstatējām, ka starp laktācijām atšķiras haplotips ar lielāko vai mazāko tauku saturu pienā. Pirmajā laktācijā lielākais rādītājs ir H4 haplotipa grupai, bet mazākais – H10. Atšķirība starp grupām ir 0,59 %. Otrajā laktācijā lielākais rādītājs ir H9 haplotipa govīm, bet mazākais H10 (atšķirība 0,70 %). Trešajā laktācijā, attiecīgi, H11 un H3 (0,59 %). Apskatot pirmās laktācijas augstākā tauku satura rādītuma haplotipa

H4 rādījumus pārējās laktācijās, ir redzams izteikts kritums jeb tauku satura samazināšanās no 4,53 līdz 3,96. Tātad varam secināt, ka govīm ar šādu H4 haplotipu samazinās tauku saturs ar katru nākošo laktāciju. Līdzīga situācija ir novērojama H1, H2 un H3 haplotipam.

Sadalot paraugus pa šķirņu grupām, statistiski ticamu atšķirību konstatējām saistībā ar 2. laktācijas tauku saturu procentos ($p_F = 2,85 \times 10^{-2}$). Konkrētajā gadījumā, pirmkārt, Hol grupā atšķiras haplotips ar augstāko rādītāju: Sr un ZI grupā tas ir H9, bet Hol grupā – H11.

Sr un ZI gadījumā ir novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības saistībā ar 2. laktācijas izslaukumu (attiecīgi, $p_F = 1,89 \times 10^{-2}$ un $3,04 \times 10^{-2}$).

2.4. Piena proteīnu gēnu polimorfismu saistība ar vaislas bulļu ciltsvērtības rādītājiem

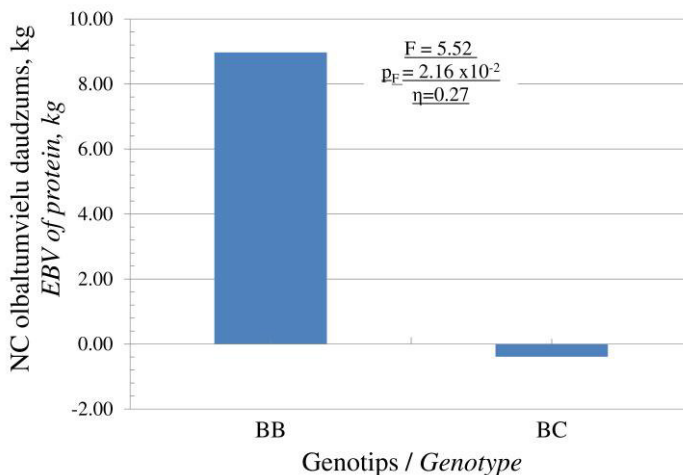
Ir zināms, ka piena proteīni var stimulēt spermas kapacitāti, tādējādi palielinot spermas daudzumu, kas saistās pie olšūnas apvalka (*plural zona pellucidae*), kurš palielina apaugļošanās iespēju (Coutinho da Silva et al., 2014). Tātad varam secināt, ka piena proteīna koncentrācija ir svarīga apaugļošanās intensitātei un spermas kvalitātei, t. sk. iedzimstošajam materiālam. No tā izriet, ka piena proteīna polimorfisms ir nozīmīgs arī vaislas bulļiem.

Analizējot *CSN1S1* saistību ar vaislo bulļu ciltsvērtības rādītājiem, tika izmantoti 72 paraugi, *CSN2* gadījumā – 73 DNS paraugi, bet trešā kazeīna gēna jeb *CSN3* saistība ar rādītājiem tika noteikta, izmantojot 63 vaislas bulļu paraugus. Piena sūkalu proteīnu *LAA* un *LGB* analīzes gadījumā tika izmantoti 73 vaislas bulļu DNS dati. Saistību analīzē netika ietverti ZI grupas vaislas bulļi, jo netika iegūti novērtētās ciltsvērtības dati.

Trīs novērtēto ciltsvērtību rādītāju (izslaukuma daudzums, olbaltumvielu daudzums un tauku saturs) gadījumā atšķirības starp šķirņu grupām ir statistiski nozīmīgas, bet viena rādītāja (tauku daudzums) gadījumā nozīmīgums ir uz ticamības robežas. Turklāt novērtētā ciltsvērtība pēc izslaukuma daudzuma vidēji korelē ar šķirņu grupām. Analizējot ražības indeksa atšķirību starp abām (Sr un Hol) grupām, redzam, ka tas ir augstāks tieši sarkano šķirņu grupas bulļiem.

Pēc datiem konstatējām, ka kazeīnu proteīnu gēni nav saistīti ar šķirņu grupām vaislas bulļiem, bet abu sūkalu proteīnu gēnu gadījumos ir statistiski nozīmīgas atšķirības starp genotipu sadalījumu Sr un Hol šķirņu grupās ($p_X = 2,65 \times 10^{-5}$ un $2,77 \times 10^{-3}$). Turklāt šiem sadalījumiem ir novērojama vidēji cieša korelācija pēc Krāmiera V rādītāja (attiecīgi, 0,49 un 0,40), un varam teikt, ka sūkalu gēnu genotips ietekmē daļēji (ap 41,0 %; dati nav parādīti) šķirnes grupu vaislas bulļiem.

Alfa_{s1} - kazeīna gēna genotips BB vaislas bulļiem statistiski nozīmīgi palielina to meitu pirmās laktācijas piena tauku (8. att.) un olbaltumvielu (9. att.) daudzumu kilogramos, salīdzinot ar heterozigoto genotipu. Kā arī B alēles homozigotais genotips vaislas bulļiem palielina novērtētās ciltsvērtības pēc izslaukuma daudzumu vērtību, bet ne statistiski ticami.



8. att. α_{s1} - kazeīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar novērtēto ciltsvērtību (NC) pēc olbaltumvielu daudzumu kilogramos

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 8. Association analysis between genotypes of A and B alleles of α_{s1} - casein gene and estimated breeding values (EBV) of protein (kg)

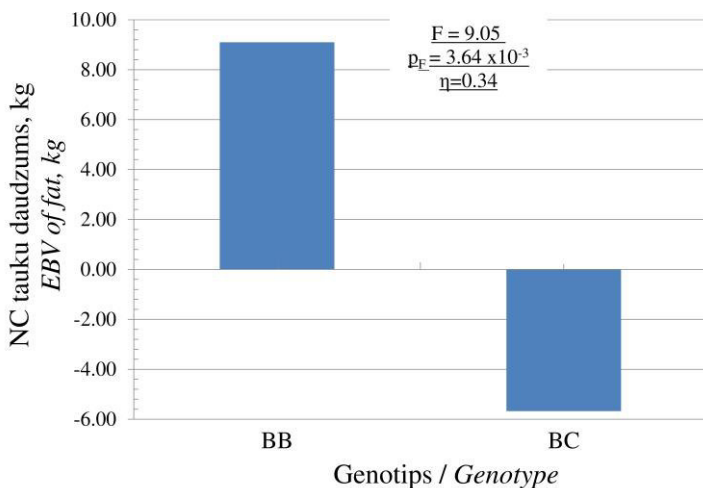
Bar with a straight edge points to signs of an average group size; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Apskatot novērtētās ciltsvērtības pēc tauku daudzuma sadalījumu atkarībā no *CSN1S1* genotipiem (8. att.), ir redzams, ka vaisla buļļa ar homozigotu genotipu pēc biežās alēles jeb ar genotipu BB meitu pirmās laktācijas pienā ir vidēji par 14,78 kilogramiem vairāk tauku nekā heterozigota genotipa gadījumā ($p_F = 3,64 \times 10^{-3}$). Konkrētā korelācija pēc statistiskās ir ar 0,34 lielu biežumu jeb vāja korelācija.

Apskatot novērtētās ciltsvērtības pēc olbaltumvielu daudzuma sadalījumu atkarībā no *CSN1S1* genotipiem (9. att.), ir redzams, ka vaisla buļļu ar genotipu BB meitu pirmās laktācijas pienā ir vidēji par 9,36 kilogramiem vairāk olbaltumvielu nekā heterozigota genotipa gadījumā ($p_F = 2,16 \times 10^{-2}$). Konkrētā korelācija pēc statistikas ir vēl vājāka ($\eta = 0,27$).

Varam secināt, ka vaislas buļļu ar *CSN1S1* BB genotipu meitām pirmajā laktācijā ir vairāk piena kilogramos, attiecīgi arī vairāk tauku un olbaltumvielu pret ciltsvērtības vēlamo lielumu.

Sadalot paraugus atkarībā no to piederības šķirņu grupām, konstatējām, ka, analizējot abas šķirņu grupas kopā, statistiski ticama atšķirība ir novērtētajai ciltsvērtībai pēc izslaukumam ($p_F = 2,50 \times 10^{-5}$) un tauku saturam procentos ($p_F = 3,48 \times 10^{-2}$).



9. att. α_{s1} - kazeīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar novērtēto ciltsvērtību (NC) pēc tauku daudzumu kilogramos vaislas buļļiem

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig. 9 Association analysis between genotypes of A and B alleles of α_{s1} - casein gene and estimated breeding values (EBV) of fat (kg) of breeding bulls

Bar with a straight edge points to signs of an average group size; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical signification; η – index of correlation analyses.

Sarkano šķirņu gadījumā BB genotips vaislas buļļiem palielina novērtēto ciltsvērtību pēc izslaukuma daudzuma (+376,14 kg; $p_F = 4,73 \times 10^{-2}$), bet Holšteinas šķirņu grupā palielinājums ir BC genotipa gadījumā (+247,92 kg; $p_F > 0,05$). Tomēr ir arī jāmin, ka Hol grupā abu genotipu gadījumā vidējie rādītāji ir lielāki par ciltsvērtības vēlamu, bet Sr grupā BC genotipa grupas rādītājs ir negatīvs pret ciltsvērtības vēlamu.

Novērtētās ciltsvērtības pēc tauku satura ($p_F = 3,48 \times 10^{-2}$) gadījumā dati ir pretēji: Sr grupā pozitīvāks rezultāts ir vaislas buļļiem ar BC genotipu (+0,04 %; $p_F > 0,05$), bet Hol grupā – ar BB genotipu (+0,30 %; $p_F = 4,37 \times 10^{-2}$). Holšteinas šķirnēm, neatkarīgi no genotipa, tauku saturs procentos ir mazāks nekā ciltsvērtības vēlamais, bet sarkanajām šķirnēm vaislas buļļiem ar BC genotipu tauku saturs ir pozitīvs pret ciltsvērtības vēlamu, bet nedaudz.

Kā arī BB genotips statistiski nozīmīgi ($p_F = 3,89 \times 10^{-2}$) palielina (+8,45 punkti) ražības indeksu Latvijas sarkano šķirņu grupā.

Apkopojot visus datus par α_{s1} – kazeīna saistību analīzi vaislas buļļu gadījumā, varam secināt, ka pozitīvais genotips jeb genotips, kas nodrošina labākus novērtētās ciltsvērtības rādītājus, ir biežās alēles B homozigotais genotips.

Beta - kazeīna gēna genotipiem, gan ņemot, gan neņemot vērā šķirnes grupas, nekonstatējam statistiski nozīmīgu ietekmi uz vaislas buļļu novērtētās ciltsvērtības rādītājiem. Genotipu pozitivitātes attiecību Latvijas populācijās var

pierakstīt $A2A2 > A1A1 > A1A2$, kas atšķiras no govju laktācijas datiem. Ir jāmin, ka $A2A2$ genotipu vaislas bulļa meitu pirmās laktācijas izslaukuma daudzums kilogramos vidēji ir par +280,44 kg (jeb 2,15 reizes) un +353,69 kg (jeb 3,06 reizes) lielāks nekā, attiecīgi $A1A1$ un $A1A2$ genotipu vaislas bulļu meitu pirmās laktācijas izslaukuma daudzums.

Sadalot paraugus pēc šķirņu grupām, ir atšķirīga pozitīvo genotipu attiecība: Sr grupā attiecība ir $A1A1 > A2A2 > A1A2$, bet Hol grupā – $A2A2 > A1A1 > A1A2$.

Apkopojot iegūtos rezultātus, secinām, ka β - kazeīna $A1$ un $A2$ alēļu genotipu nozīmīgums novērtētās ciltsvērtības rādītāju sakarā ir statistiski nenozīmīgs.

Kappa - kazeīna gēna genotipiem, gan ņemot, gan neņemot vērā šķirnes grupas, nekonstatējām statistiski nozīmīgu ietekmi uz vaislas bulļu novērtētās ciltsvērtības rādītājiem, ko varam izskaidrot ar faktu, ka visi Latvijas govju populācijas vaislas bulļi ir homozigoti pēc biežākās A alēles.

Alfa - laktalbumīna genotips BB statistiski ticami palielina vaislas bulļu novērtētās ciltsvērtības pēc olbaltumvielu saturu procentos ($p_F = 3,57 \times 10^{-2}$) un ražības indeksa ($p_F = 2,23 \times 10^{-2}$) vērtības.

Novērtētās ciltsvērtības pēc olbaltumvielu satura gadījumā augstāks rādītājs ir lielākajai genotipu grupai jeb vaislas bulļiem ar BB genotipu (+0,09 %), kā arī ražības indekss augstāks ir vaislas bulļiem ar BB genotipu (6,52 punkti).

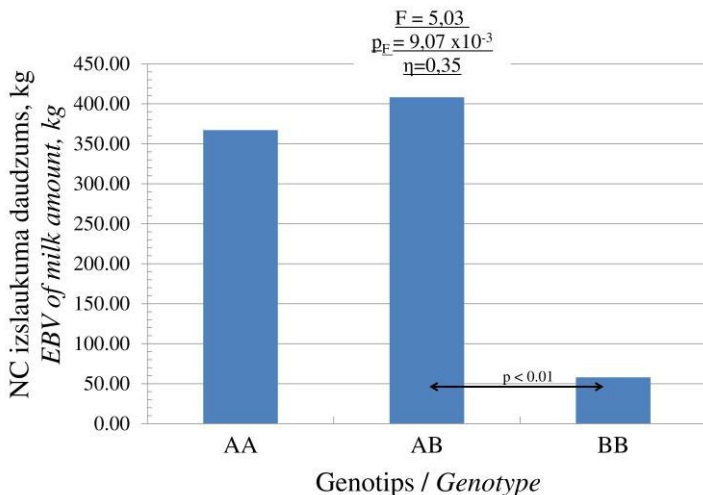
Ir jāmin, ka novērtētās ciltsvērtības pēc izslaukuma daudzuma atšķirības starp genotipa grupām ir statistiski nenozīmīga, bet lielāks rādītājs ir tieši LAA heterozigotu vaislu bulļu grupā (+158,46 kg).

Sadalot paraugus pēc šķirņu grupām, nekonstatējām statistiski nozīmīgas saistības. Apskatot novērtēto ciltsvērtību pēc izslaukuma daudzuma, varam redzēt, ka abu šķirņu grupu gadījumā lielāks piena izslaukums ir bulļu meitām, kuru vaislu bulļu genotips LAA ir BB . Turklāt sarkano šķirņu grupā AB genotipa vaislu bulļu meitām vidējais izslaukuma daudzums ir 117,00 kg zem vēlamās normas.

Ir jāmin, ja analizēta tikai Holšteinas šķirņu grupu, saglabājas statistiski nozīmīgais rezultāts kā analizējot visu populāciju kopā. Hol šķirņu grupā LAA gēna genotipiem ir saistība ar novērtēto ciltsvērtību pēc olbaltumvielu satura procentos ($p_F = 3,32 \times 10^{-2}$) un ražības indeksu ($p_F = 3,48 \times 10^{-2}$). Abu rādītāju gadījumā BB genotipu grupā ir augstāks rādījums nekā AB genotipu grupām.

Apkopojot iepriekš minēto α - laktalbumīna gēna A un B alēļu genotipu ietekmi uz vaislas bulļu novērtētās ciltsvērtības rādītāju lielumiem, varam secināt, ka pozitīva ietekme ir BB genotipam, īpaši Holšteinas šķirņu grupā.

Beta - laktoglobulīna genotipu pozitīvo ietekmi novērtētās ciltsvērtības pēc izslaukuma daudzuma gadījumā var izteikt $AB > AA > BB$ un starp genotipiem ir novērota statistiski ticama atšķirība ($p_F = 9,07 \times 10^{-3}$; 10. att.). Tātad varam secināt, ka populācijā biežāk sastopamais genotips nav vēlams vaislu bulļiem, ja ganāmpulks tiek veidots piena izslaukuma palielināšanai. Turklāt ir jāmin, ka biežāk sastopamajam genotipam (BB) ir izteikti, līdz pat septiņām reizēm, mazāks piena daudzums nekā pārējos genotipos ($AB > BB$ ir ar $p_F = 8,82 \times 10^{-3}$).



10. att. β -laktoglobulīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze ar novērtētās ciltsvērtības (NC) pēc izslaukumu kilogramos vaislas buļļiem

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig.10. Association analysis between genotypes of A and B alleles of α_{s1} -casein gene and estimated breeding values (EBV) of milk amount (kg) of breeding bulls

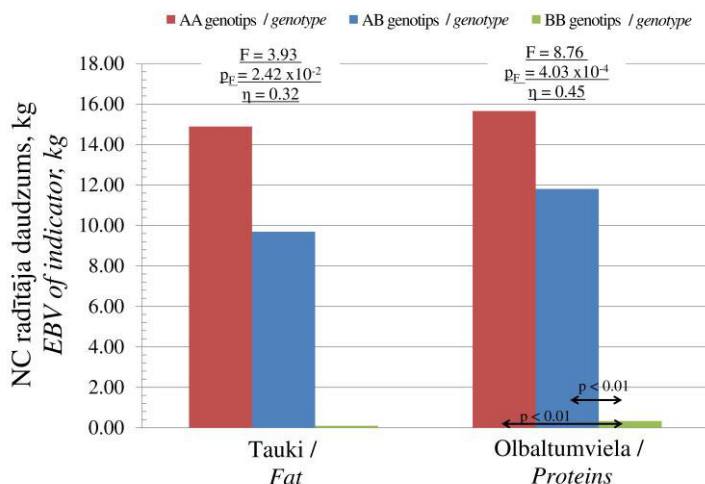
Bar with a straight edge points to signs of an average group size; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical signification; η – index of correlation analyses.

Vaislas buļļu novērtētās ciltsvērtības pēc tauku daudzuma kilogramos vērtībām starp genotipiem netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība, neņemot vērā to, ka vidējo rādītāju atšķirība starp AA genotipu vaislas buļļiem un BB genotipa vaislas buļļiem ir lielāka nekā 100 reizes. Olbaltumvielu daudzumam atšķirība starp vidējiem rādītājiem ir mazāka (47,45 reizes), bet atšķirība ir statistiski nozīmīga ($p_F = 5,95 \times 10^{-3}$).

Novērtētās ciltsvērtības pēc tauku un pēc olbaltumvielu daudzuma pienā ir statistiski ticami (attiecīgi, $p_F = 2,42 \times 10^{-2}$ un $4,03 \times 10^{-4}$; 11. att.) saistīts ar *LGB* genotipiem, un to pozitīvais iedalījums ir atšķirīgs no izslaukuma daudzuma rādītāja: $AA > AB > BB$. Tā kā ir vērojama atšķirība genotipa pozitīvajā ietekmē, salīdzinot ar novērtētās ciltsvērtības pēc izslaukuma daudzuma rādītājiem, tas liek domāt, ka, saistība ar genotipiem ir daļēji individuāla konkrētajiem rādītājiem.

Nemot vērā paraugu piederību šķirņu grupām, statistiski ticama atšķirība tika konstatēta novērtētās ciltsvērtības pēc olbaltumvielu satura procentos gadījumā ($p_F = 3,74 \times 10^{-2}$). Sarkanajām šķirnēm pozitīvs vidējais rādītājs ir tikai vaislas buļļiem ar BB genotipu, bet Holšteinas šķirņu grupā – ar AA genotipu. Tātad varam domāt, ka pozitīvais genotips ir atšķirīgs dažādām šķirnēm. Tas apstiprina iepriekš iegūtos rezultātus par korelāciju starp *LGB* un šķirņu grupām ($V = 0,40$). Turklāt Hol grupā atšķirības starp genotipiem ir statistiski

nozīmīgas: p_F visiem genotipiem ir $9,24 \times 10^{-3}$, bet starp AA un BB genotipu grupām – $6,94 \times 10^{-3}$.



11. att. β -laktoglobulīna gēna A un B alēļu genotipu saistības analīze novērtēto ciltsvērtību (NC) pēc tauku un pēc olbaltumvielu daudzumu kilogramos vaislas bulliem

Stabiņš ar nogriezni norāda uz pazīmes vidējo grupas lielumu; F – dispersijas analīzes rādītājs; p_F – ticamības jeb nozīmīguma līmenis; η – korelācijas analīzes rādītājs.

Fig.11 Association analysis between genotypes of A and B alleles of α_{s1} - casein gene and estimated breeding values (EBV) of fat and protein amount (kg) of breeding bulls Bar with a straight edge points to signs of an average group size; * - refers to the association with the performance at a particular lactation; F – index of ANOVA; p_F – statistical significance; η – index of correlation analyses.

Apkopojot sniegto informāciju par β -laktoglobulīna gēna A un B alēļu genotipu nozīmīgumu vaislas bullu novērtētās ciltsvērtības sakarā, varam secināt, ka izslaukuma palielināšanu telēm veicina AB genotips, ja netiek ņemta vērā šķirņu piederība, un tauku un olbaltumvielu daudzumu – AA genotips. Ņemot vērā paraugu šķirņu piederību, sarkano šķirņu grupā nozīme parādās arī BB genotipam, bet minimāla. Bet Holšteinas šķirņu grupā saglabājas AA un AB genotipu pozitīvā ietekme.

Latvijas govju populācijā vaislas bullu šķirņu grupās ir atšķirīgs **piecu piena proteīnu gēnu haplotipu** sadalījums jeb novērojama statistiski ticama atšķirība ($p_X = 2,00 \times 10^{-4}$; $V = 0,40$), bet biežāk sastopamais ir haplotips H15.

Statistiski nozīmīga atšķirība starp piecu piena proteīnu gēnu haplotipu grupām, neņemot vērā šķirņu grupu piederību, ir vaislas bullu novērtētai ciltsvērtībai pēc tauku un pēc olbaltumvielu daudzumam kilogramos (attiecīgi, $p_F = 8,01 \times 10^{-3}$ un $9,56 \times 10^{-3}$).

Abu novērtēto ciltsvērtību gadījumos augstākais rādītājs ir, ja vaislas bullis ir ar H1 haplotipu, bet zemākais rādītājs – H15 haplotips, kas ir biežākais haplotips. Atšķirība starp H1 un H15 haplotipiem ir *CSN1S1*, *CSN2* un *LGB*

lokusos. Kazeīnu proteīnu lokusos ir populācijā biežāk sastopamā alēle, bet laktoglobulīna proteīna lokusos – retāk sastopamā alēle.

Meitu pirmās laktācijas

Novērtētās ciltsvērtības pēc tauku daudzuma gadījumā vaislas buļļu meitām pirmajā laktācijā tauku daudzuma atšķirība starp augstāko un zemāko vidējo rādījumu ir 25,18 kg ($p_F = 5,60 \times 10^{-3}$), bet olbaltumvielu daudzuma gadījumā – 17,40 kg ($p_F = 1,70 \times 10^{-2}$). Turklāt ir jāmin, ka abu radītāju gadījumā H15 haplotipa grupas vidējais lielums ir negatīvs, kas nozīmē, ka šīs grupas vaislas buļļu meitām tauku un olbaltumvielu daudzums pirmās laktācijas pienā ir zem vēlamā.

Sadalot vaislas buļļu paraugus pēc šķirņu grupām, statistiski nozīmīgu atšķirību starp haplotipu/šķirņu grupām konstatējām saistībā ar novērtēto ciltvērtību pēc olbaltumvielu saturu procentos ($p_F = 2,17 \times 10^{-2}$). Katrā no šķirņu grupām ir cits haplotips ar augstāko un zemāko rādījumu: Sr grupā attiecīgi H3 un H9, bet Hol grupā – H1 un H9 vai H11.

Bez statistiskā nozīmīguma ir interesanti dati par vaislas buļļu novērtēto ciltsvērtību pēc izslaukuma kilogramos, kur Sr grupā mazākā vidējā vērtība bija H15 haplotipa grupas vaislas buļļiem, bet Hol grupā konkrētā haplotipa grupā vidējais rādījumu bija par 917,10 kilogramiem vairāk. Tātad varam secināt, ka H15 haplotips nav vēlams sarkano šķirņu vaislas buļļiem, bet ir vēlams Holšteinas šķirņu vaislas buļļiem.

SECINĀJUMI

1. *CSN1S1* B un C alēļu, *CSN2* A1 un A2 alēļu, *CSN3*, *LAA* un *LGB* A un B alēļu polimorfismi ir piemēroti Latvijā audzēto govju pētījumiem, nodrošinot kvalitatīvu analīzi. Apvienojot tehniskos aprakstus no vairāku literatūras avotu metodikas, eksperimentējot, aprobējot, verificējot un validējot tās LLU LF MGPL, jaunapgūtās metodes nodrošina kvalitatīvus rezultātus, lai analizētu piecu piena proteīnu gēnu – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* – polimorfismus.
2. Ir veikta *CSN1S1* B un C alēļu, *CSN2* A1 un A2 alēļu, *CSN3*, *LAA* un *LGB* A un B alēļu polimorfismu izpēte vidēji 626 Latvijā audzētajām govīm. Iegūtie rezultāti sniedz iespēju analizēt piecu proteīnu gēnu divu alēļu genotipu un visu gēnu haplotipu saistību ar piena produktivitātes rādītājiem un ar vaislas buļļu novērtētās ciltsvērtības rādītājiem un ražības indeksu.
3. Iegūtie rezultāti pierāda, ka Latvijas populācijā, neņemot vērā šķirnes iedalījumu, izslaukuma palielināšanos veicina β - kazeīna A2A2 genotips, κ - kazeīna AA genotips un beta - laktoglobulīna AA genotips. Individuāli olbaltumvielu satura procentos palielināšanos statistiski nozīmīgi veicina *CSN2* A2A2 genotips 3. laktācijā, *CSN3* AA genotips un *LGB* BB genotips 1. laktācijā. Individuāli tauku satura procentos pieaugumu statistiski nozīmīgi ietekmē alfa_{S1} – kazeīna BB genotips 1. un 2. laktācijā, kappa - kazeīna AA un beta -

laktoglobulīna BB genotips visās laktācijās un alfa - laktalbumīna BB genotips 1. laktācijā.

Visu piecu piena proteīnu gēnu haplotipi statistiski ticami ir saistīti ar izslaukuma un tauku saturu procentos rādījumiem visās trīs laktācijās ar dažādiem pazīmes veicinošajiem haplotipiem.

4. Iegūtie rezultāti pierāda, ka, neņemot vērā šķirnes iedalījumu, Latvijas audzēto un vaislai izmantoto bulļu novērtēto ciltsvērtību pēc izslaukuma daudzuma palielināšanos veicina beta - laktoglobulīna AB genotips.

Individuāli novērtēto ciltsvērtību pēc olbaltumvielu un pēc tauku daudzumu kilogramos palielina alfa_{S1} - kazeīna BB genotips un beta - laktoglobulīna AA genotips.

Novērtētās ciltsvērtības pēc olbaltumvielu saturu procentos, kā arī ražības indeksa pieaugumu statistiski nozīmīgi ietekmē alfa - laktalbumīna BB genotips.

Piecu piena proteīnu gēnu haplotipi, neņemot vērā šķirņu grupu piederību, ir saistīti ar novērtēto ciltsvērtību pēc tauku un pēc olbaltumvielu daudzuma kilogramos, kur lielākais rādījums ir bulļiem ar H1 haplotipu.

IETEIKUMI

lopkopības zinātniekiem un speciālistiem, mākslīgās apsēklošanas speciālistiem, dzīvnieku audzētājiem un produkcijas ražotājiem

Iesakām Latvijā sākt veikt piena šķirņu govju un vaislas bulļu ģenētisko skrīnīngu pēc pieciem piena proteīna gēniem – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* –, lai varētu nodrošināt vēlamo genotipu pārmantojamību un uzkrāšanos ganāmpulkos Latvijā, kuri ļautu efektīvi paaugstināt piena lopu produktivitāti pēc kvalitatīvajām un kvantitatīvajām pazīmēm.

Iegūtā pieredze ļauj secināt, ka ir iespējams lietot genotipēšanu praktiskajā slaucamo govju selekcionēšanā un līdz ar to samazināt genotipēšanas izdevumus ar minimāliem zaudējumiem, salīdzinot ar potenciālo kandidātu pilnīgu genotipēšanu. Vaislas bulļu un govju genotipēšanu ir vēlams veikt praktiskajā slaucamo govju selekcionēšanā Latvijā, nodrošinot tikai vēlamo alēļu iedzimstību.

Iesakām turpināt veidot Latvijas govju genofondu jeb DNS kolekciju, bioloģisko materiālu ņemot, govij piedzimstot vai to marķējot. Tādējādi tiktu nodrošināta pilnīga informācija par Latvijā audzēto govju populācijas genotipiem un veicināta molekulārā selekcija ar visvairāk vēlamajām alēlēm.

Pēc pētījumā iegūtajiem datiem iesakām veikt Latvijā audzēto dažādu piena govju šķirņu detalizētāku ģenētisko analīzi pēc pieciem piena proteīna gēniem – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* –, veidojot DNS paraugu kolekciju pēc šķirnēm.

Pēc iegūtajiem datiem, kā arī pēc informācijas literatūrā un datubāzē iesakām veikt Latvijas brūnās un Latvijas zilās šķirnes padziļinātu piecu piena proteīna gēnu – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* – DNS variāciju jeb

nesinonīmo polimorfismu analīzi, lai noskaidrotu un saglabātu Latvijas vēsturisko šķirņu genofondu.

Pēc informācijas literatūras avotos iesakām veikt ģenētisko saistību analīzi Latvijā audzēto piena govju populācijā starp pieciem piena proteīna gēniem – *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* un *LGB* – un vēlamajām pienu nozares tehnoloģijas pazīmēm, tādējādi papildinot informāciju par vēlamajiem genotipiem. Kā arī tādējādi iegūstot kvalitatīvi un kvantitatīvi ekonomiskākus piena produktus.

PUBLIKĀCIJU UN ZIŅOJUMU SARAKSTS PAR DARBA TĒMU / PUBLICATIONS

Pētījumu rezultāti apkopoti astoņos zinātniskos rakstos un publicēti piecos recenzējamos zinātniskos izdevumos.

Starptautiski citējamās žurnālos / International cited journals:

1. Smiltiņa, D., Grīslis, Z. (2010) Analysis of kappa - casein (CSN3) alleles in Latvian Brown and Latvian Blue breed cows' populations. *Annual 16th International Scientific Conference Proceedings "Research for Rural Development 2010*, ISSN 1691–4031, Volume 1, pp.71 - 74 (*Indeksēts datubāzēs: SCOPUS, EBSCO Academic Search Complete, CAB Abstracts, CABI electronic resource*).
2. Smiltiņa, D., Bāliņš, A., Grīslis, Z. (2010) Study of the milk protein genetic characterization in Latvian dairy cattle breeds' populations. *International scientific conference Veterinarmedicine Proceeding 2010*, ISSN 1407 - 1754, p.125 - 129 (*Indeksēts datubāzēs: EBSCO Central & Eastern European Academic Source, CAB Abstracts, CABI electronic resource*).
3. Smiltiņa, D., Bāliņš, A., Grīslis, Z. (2012) Identification of Variations in the Alfa - Lactoalbumin Gene in Cows Population of Latvia. *Proceedings of Conference on "Current events in veterinary research and practice – 2012*, ISSN 1407 – 1754, pp.143 - 147 (*Indeksēts datubāzēs: CAB Abstracts, CABI electronic resource*).
4. Smiltiņa, D., Bāliņš, A., Grīslis, Z. (2015) A Review of Latvian Blue (LZ) Cows from the List of Animal Genetic Resources in Latvia. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Biodiversity Research*. Daugavpils: Akadēmiskais apgāds SAULE. p. 165-177. ISBN 978–9984–14 (*Indeksēts datubāzēs: Web of Science*).

Starptautiskos žurnālos/International journals

1. Dace Smiltiņa, Andris Bāliņš, Ziedonis Grīslis (2011) Prospects of the β – casein (CSN2) alleles A1 and A2 in the dairy cattle population of Latvia. *PhD Students, Young Scientists and Pedagogues Conference Proceedings "Young Researchers 2011"*, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University in Nitra, ISBN 978–80–8094–946–4, pp.703–708.

Latvijas zinātniskajos žurnālos/Latvian scientific journal

1. Dace Smiltina, Andris Balins, Ziedonis Grislis, Rita Sarma (2015) Effects of alfa – lactalbumin (LAA) genetic variants on milk productivity. *Proceedings of the 56rd International Scientific Conference of Daugavpils University 2014*. DU Akadēmiskais apgāds SAULE, ISBN 978 – 9984.
2. Dace Smiltina, Andris Balins, Ziedonis Grislis, Rita Sarma (2014) Effects of beta – lactoglobulin (LGB) genetic variants on milk productivity. *Proceedings of the 55rd International Scientific Conference of Daugavpils University 2013*, ISBN 978–9984–14–665–2.
3. Dace Smiltiņa, Andris Bāliņš, Ziedonis Grīslis (2013) Polymorphism of the β – lactoglobulin (LGB) alleles A and B in the dairy cattle population of Latvia. *Proceedings of the 54rd International Scientific Conference of Daugavpils University 2012*, ISBN 978–9984–14–613–3.
4. Dace Smiltiņa, Andris Bāliņš, Ziedonis Grīslis (2012) Polimorphism of α_{s1} – casein (CSN1S1) in the Latvian Brown (LB) dairy cattle breed. *Proceedings of the 53rd International Scientific Conference of Daugavpils University 2011*, ISBN 978–9984– 14–563–1.

PATEICĪBAS

- Es pateicos visiem, ar ko es tieši sadarbojos pētījuma laikā.
- Pateicos bijušajai LLU MPS Vecauce direktorei Ivetai Grudovskas kundzei, direktora vietniecei Indrai Eihvaldei un Lopkopības speciālistu kolektīvam par bioloģisko paraugu ieguves organizatoriskajiem pasākumiem mūsu pētījumam 2010. gada decembrī.
- Pateicos par veiksmīgu sadarbību un ilgstošu pretimnākšanu Siguldas CMAS valdes priekšsēdētājam Nilam Ivaram Feodorova kungam, Kurzemes CMAS valdes priekšsēdētājam Gatim Kaķa kungam, Vidzemes Veterinārā servisa biroja vadītājai Valentīnai Stjades kundzei un viņu vadītajiem kolektīviem par pētījumam atvēlētajiem vaislas buļļu bioloģiskā materiāla paraugiem un to uzglabāšanai nepieciešamo aukstumaģentu.
- Īpaši es pateicos saviem vecākiem un meitai par katru atbalsta brīdi, ko viņi ir veltījuši man personīgi ar visu savu mīlestību, lai es varētu šo darbu paveikt.

ABBREVIATIONS

ADC	State Agency "Agricultural Data Centre"
AF	Faculty of Agriculture
AN	Angeln
BAIS	Breeding and artificial insemination station
Blue	group of blue colour cow breeds
<i>CSNIS1</i>	alpha _{S1} - casein gene
<i>CSNIS2</i>	alpha _{S2} - casein gene
<i>CSN2</i>	beta - casein gene
<i>CSN3</i>	kappa - casein gene
DR	Danish Red cow breed
EBV	Estimated breeding value
HB	Holstein Black and White cow breed
Hol	group of Holstein cow breeds
HR	Holstein Red and White cow breed
<i>LAA</i>	alpha - lactalbumin gene (also <i>LALBA</i>)
LAU	Latvia University of Agriculture
LB	Latvian Brown cow breed
<i>LGB</i>	beta - lactoglobulin gene (also <i>PAEP</i>)
LZ	Latvian Blue (<i>Latvijas zilā</i>) cow breed
MGRL	Molecular Genetics Research Laboratory
PCR	Polymerase Chain Reaction
p	statistical significance or importance to:
p _F	results of ANOVA or PostHoc
p _V	Cramer's V association analysis
p _x	Chi-squared (χ^2) test
p _{ρ}	Spearman's rank correlation coefficient ρ (rho)
Red	group of red colour cow breeds
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SR	Swedish Red and White
YI	yield/ productivity index

INTRODUCTION

Milk is the most common source of protein and microelements for people. Since historical times milk has served as a human food product. According to the sequence in the milk extraction process the species can be ranked in the following order: man, goat, buffalo, sheep, yak and cow species (*Bos Taurus*) which turned out to be particularly suitable for cultivating and specialisation for milking.

Milk protein is the most valuable component of milk from a dietary point of view. The quality and the yield of milk and its processing products (cottage cheese, cheese etc.) depend on it.

More than 95% of ruminants' milk proteins are coded by **6 structural genes**: two main whey proteins (α - lactalbumin and β - lactoglobulin) and 4 caseins (α_{S1} - and α_{S2} - caseins, β - casein and κ - casein).

So far Latvia has not acquired any experience with gene-assisted selection, since molecular genetic research in animal breeding started only in recent years when the Molecular Genetics Research Laboratory (MGRL) of the Faculty of Agriculture (AF) of Latvia University of Agriculture (LAU) was established in December of 2006.

The potential effectiveness of gene assisted selection in Latvian milk cattle breeding is that the use of this selection method, by finding out the desirable genotypes of milk proteins, will help analysing and introducing new selection standards in milk cattle breeding, to improve the productivity of the cow population: the average yield of milk, amount of protein, the total content of proteins and their quality, for instance, shorter duration of clotting/renneting time, shorter time of curds mass formation and stability, as well as fat content.

Compared to the traditional breeding, direct gene or marker based selection can be significantly more effective. Judging by the data from scientific literature of different countries, it can be significant in increasing the productivity of animals, improving the quality and safety of milk products by reducing the risks of milk and/or milk product related diseases and promoting biological and food safety.

Humans are one of the biggest consumers of milk and milk products. Also for cheese production, milk is chosen according to its quality indicators, but the manufacturers are still not aware of the necessity to evaluate the molecularly genetic variants of milk proteins in each animal of the cattle herd, to improve the quality of cheese and to provide milk products, which are harmless to our health. Almost all milk proteins are a source of active peptides – opioids. For example, measures have been taken to exclude β - casein A1 allele from dairy cow populations, not to allow the potential negative effects of β - casomorphine 7. Poland is one of the first EU countries, which has widely deployed testing of breeding bulls for checking the composition of β – casein alleles. It is also necessary to do more research on milk protein genotypes and their influence in Latvia.

The use of the latest methods of genome and proteome research for the improvement of agricultural animal breeds and preservation of diversity of genetic resources should be one of the priorities of agricultural science in Latvia.

The optimisation and upgrading of molecular genetic methods is necessary for the needs of Molecular genetics research laboratory of AF of LUA, to introduce the methods which could be used for a longer period of time in the research of Latvian cow population and summarization of the obtained data.

THE AIM AND TASKS OF THE STUDY

The **hypothesis** of the thesis – the molecular genetic variation of milk proteins of dairy cows reared in Latvia is related to milk yield and quality indicators.

The **aim** of the thesis is to promote cow breeding in Latvia by developing and testing molecular genetics analyses for quantity and quality analysis of the dairy cow population of Latvia, based on the research of polymorphism of genes encoding milk proteins.

The following **tasks** have been set to reach the aim:

1. To select molecular markers which would be suitable for characterization of polymorphism of milk protein genes (α_{S1} - casein, α_{S2} - casein, β - casein, κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin) in the population of dairy cows reared in Latvia.
2. To make the primary characterization of the selected polymorphisms of bovine milk protein genes in the population of dairy cows reared in Latvia.
3. To study the association of milk productivity indicators of dairy cows reared in Latvia with the selected molecular markers of milk protein genes.
4. To study association of the estimated breeding values of the breeding bulls reared in Latvia with the selected molecular markers of milk protein genes.

NOVELTY OF THE STUDY

The following studies have been undertaken for the first time in Latvia:

1. research of polymorphism of the α_{S1} - casein, β - casein, κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin genes in the population of dairy cows and bulls reared in Latvia at the Molecular Genetics Research Laboratory of the Faculty of Agriculture of Latvia University of Agriculture by approving five molecular genetics methods;
2. DNA amplification and definition of allele variation of genes encoding milk proteins in biological material of dairy cows and bulls reared in Latvia at the Molecular Genetics Research Laboratory of the Faculty of Agriculture of Latvia University of Agriculture by using a PCR - RESP method;
3. determination of the association of α_{S1} - casein, β - casein, κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin gene polymorphisms with milk productivity indicators of dairy cows reared in Latvia and with estimated breeding values of the breeding bulls of milk producing breeds reared in Latvia.

ECONOMIC IMPORTANCE OF THE STUDY

1. The obtained results about the frequency of polymorphisms of the α_{S1} - casein, β - casein, κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin genes in the population of dairy cows reared in Latvia complements the data base of the State agency "Agricultural Data Centre" of the Ministry of Agriculture of the Republic of Latvia.

2. Genotyping and analysis of molecular markers data of the α_{S1} - , β - and κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin genes can be used by pedigree specialists of the State Agency "Agricultural Data Centre" of the Ministry of Agriculture of the Republic of Latvia and members of Animal Breeders Association of Latvia for improving dairy cow breeds, on the basis of association between alleles of milk protein genes and milk production indicators.

3. Other national research recommendations described in the thesis on associations between α_{S1} - , β - and κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin genes and different production indicators can be used as baseline data of different breeds of dairy cows and breeding bulls selected and raised in Latvia.

STRUCTURE AND VOLUME OF THE WORK

Thesis is written on 143 pages in Latvian following classical scheme. The work is structured in nine chapters: Annotation, Approval of the work, Introduction, Literature review, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Advice, References. The chapters are formed of seventeen sections. The text contains by 33 Tables, 55 Figures and it is supplemented by 52 appendices. 356 references are included in the reference list

1. MATERIALS AND METHODS

The research was elaborated in the period of April 2009 to June 2014

1.1. Description of the study object

Research group of breeds of dairy cows raised in Latvia was formed of seven breeds (Latvian Brown (LB) and Latvian Blue (LZ; *Latvijas zilā*), Holstein Black and White (HB), Holstein Red and White (HR), Swedish Red and White (SR), Danish Red (DR) and Angeln (AN)) using the biological material of 719 cattle, including blood of 625 cows and sperm cell samples of 94 breeding bulls of Breeding and artificial insemination station (BAIS),

At study of association of milk productivity indicators of dairy cows reared in Latvia with the genotypes of milk protein genes (α_{S1} - casein, β - casein, κ - casein, α - lactalbumin and β - lactoglobulin) the number of cows was reduced to 545 dairy cows with productivity data in at least one of three lactations at

State agency "Agricultural Data Centre" of the Ministry of Agriculture of the Republic of Latvia were selected.

At study association of estimated breeding values of the breeding bulls' reared in Latvia with the selected molecular markers of milk protein genes 73 samples with information about estimated breeding values in the first quarter of year 2012 in ADC data base were selected

Overall, the biological material was obtained from 81 herds of dairy cows in different regions of Latvia. The research also used samples of cows of Latvian Brown and Latvian Blue breeds that are included in the Latvian animal genetic resources list from MGRL of AF of LAU depository, and different samples of cows from Latvian farms.

1.2. DNA extraction

Genomic DNA extraction was done from cows' blood and bulls' sperm samples. In the work two kits of genomic DNA extraction were used: Genomic DNA Purification Kit #K512 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and PUREGENE® DNA Isolation Kit (QIAGEN, USA). Methods of both kits were adjusted for work with different blood and sperm quantity than in protocol.

1.3. Polymorphism analysis of cows' milk proteins

Research was made by developing, optimizing and approbating complex methods for molecular genetic analysis of alleles of six milk protein genes: α_{S1} – casein (*CSN1S1*), α_{S2} – casein (*CSN1S2*), β – casein (*CSN2*), κ – casein (*CSN3*), α - lactalbumin (*LAA*) and β – lactoglobulin (*LGB*), to be used in laboratory of MGR of AF of LAU.

After analysing the available equipment of MGRL, as a genetic method was chosen the restriction enzyme site polymorphisms (RESP) method and most often analysed alleles of milk proteins, respectively, for *CSN1S1* allele B and C, for *CSN2* – A1 and A2, but for *CSN3*, *LAA* and *LGB* A un B alleles.

1.4. Data analysis

Using data of 719 DNA samples of cows raised in Latvia the analysis of Latvian cows' population was carried out through five milk protein genes. Numbers and frequencies of alleles and genotypes for entire population were estimated by direct counting from the results of molecular genetic analyses, but for group of each breed were calculated by dividing samples. By using DNASP 5.10013 (Librado, Rozas, 2009; Rozas et al., 2003) haplotypes combinations of six SNP (one for each gene except *CSN3*) were defined and frequencies calculated. Rare haplotypes (number less than five (5) in whole group) were not taken into account for association analysis.

Expected heterozygote indexes were estimated for both allele at the locus or polymorphism. Population heterozygote was calculated as the ratio of the

number of heterozygous individuals vs. the total number of subjects. Deviations from the Hardy - Weinberg equilibrium were tested by the chi square (χ^2) test.

Also for the entire population the association between non-parametrical indicators (number of alleles and genotypes for different sex or breeds of cows) was analyzed. For that calculation was used crosstab method with χ^2 test or Pirson χ^2 test at the confidence $p_\chi < 0.05$ (Arhipova, Bāliņa, 2006).

Before association analysis both cows' and breeding bulls' samples were divided into 3 groups: (1) Red or group of cows of breeds with red color, (2) Hol or group of cows of Holstein breeds, (3) Bl or cows of breeds with blue color.

Before parametrical indicator (for example, yield of milk) association analysis with genotypes and/or breeds, the connection between group of breed and genotype of milk protein gene was tested by using Pirson χ^2 test to determinate the differences between groups and Cramer's V test to determinate association or correlation between indicators. Association strength was defined by value of V coefficient: till 0.20 association is very weak, from 0.20 till 0.40 association is weak, from 0.40 till 0.60 association is medium strong, from 0.60 till 0.80 association is strong, more than 0.80 association is very strong.

Statistically significant/credible association for each milk protein variation was assessed by analyzing: (1) difference between average value of parametric indicators in each group of non-parametric indicators (genotype and/or group of breed and haplotype), using one or two-way ANOVA test at the confidence $p_\chi < 0.05$ (Arhipova, Bāliņa, 2006); (2) association or correlation between indicators, using eta (η) coefficient test. Association strength was defined by value of η coefficient similar to V coefficient.

To determine difference between each two groups of genotypes or groups of breeds the PostHoc test was used. If the result was statistically significant, the comparison values in tables of results were indicated with the same alphabet letter in superscript.

For study of association of milk's productivity indicators of dairy cows reared in Latvia with the selected molecular markers of milk protein genes data were obtained about each cow's 305 days (standard lactation) first three lactations. Lactation data contained parametrical data about milk amount or yield in kilograms, protein and fat amount in kg, and percentage of proteins and fat. Yield was considered the most important parameter, as amount of proteins and fats in kilograms depends on the milk yield. The next important indicator is percentage of proteins and fats of which the amount of proteins and fats in kilograms might be depending respectively.

For study of association of estimated breeding values (EBV) of the breeding bulls' reared in Latvia with the selected molecular markers of milk protein genes parametrical data as EBV of milk amount in kg, protein and fat amount in kg, their percentage and yield index (YI). were used. Estimated breeding values for each breeding bull can have both positive and negative value, because it is calculated according to a formula that takes into account preferred average value of the indicator of the particular breed in a specific date. YI also is calculated using a formula of the database of "Agricultural Data Centre".

In both studies, as a more important indicator was considered yield quantity of which protein and fat quantities in kilograms are depending. The next in order of importance is percentage of proteins and fats of which the amount of proteins and fats in kilograms might be depending respectively.

For all analysis statistical software IBM SPSS Statistics version 21.0 (IBM Corp. Released 2012) and PAST (Palaentological Statistics, ver. 1.63; Hammer et al., 2001) was used.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Methods for the analysis of polymorphism of milk protein genes

Analysis of polymorphisms. Analysing the literature about the selected five milk proteins, we found that by conducting research, as a result the protein variations are analysed, but in the methodology single nucleotide polymorphisms (SNP) is used.

Summarizing several sources of scientific literature (Medrano, Aguilar – Cordova, 1990; Medrano, Sharrow, 1991; Koczan et al., 1993; Mao et al., 1994; Voelker et al., 1998; Strzalkowska et al., 2002; McLachlan, 2006; Sulimova et al., 2007 Martins, 2008) six SNPs of five milk protein genes (Table 1) were chosen. Respectively, in casein protein genes: *CSN1S1* c.-175A>G, leading to the protein variation change B to C; *CSN2* – c.4451A>C (Pro₆₇₍₈₂₎His; A1 and A2 variations); for *CSN3* were selected two SNPs: c.11625C>T and c.11661A>C, leading to Thr₁₃₆₍₁₅₇₎Ile and Asp₁₄₈₍₁₆₉₎Ala or A variation change to B variation (Table 1).

For whey proteins, respectively, for *LAA* was selected SNP located in non-translated region or c.15A>G, in which case it is considered that changes A variations of the B, but for *LGB* c.3106T>C, leading to the amino acid change Val₁₁₈₍₁₃₄₎Ala or protein variation change A to B (Table 1).

The restriction enzyme site polymorphism (RESP) method was selected as a research method for all SNPs based on the ability of specific restriction enzyme or enzyme endonuclease to digested DNA sequence of a particular place, recognizing the nucleotide sequence. If in this sequence of particular place there is polymorphisms or change of nucleotide, then digesting does not occur.

Using the selected methods the collection of DNA samples of dairy cows reared in Latvia were analyzed more precisely, *CSN1S1* polymorphism was analyzed in 675 samples from 719, which is a positive result for 93.88 %, *CSN2* – 716 samples with positive results (99.58%), *CSN3* – 487 samples with positive results, which make 67.73%. For whey proteins: *LAA* SNP was positive in the analysed 603 samples, which is 83.87 %, but for *LGB* – 649 positive samples or 90.26 %. At the end, summarizing technical descriptions of methods described in several sources literature, making experiments, approving, verifying and validating in MGRL, this conclusion was made, that the newly acquired method ensures quality results for the analysis of polymorphisms of five milk protein genes: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB*.

Table 1

Description of PCR/RESP used for study of polymorphisms of milk protein genes at cows' population reared in Latvia

Gene	Polymorphism [#]	PCR			Sequence of primers	Product, bp	RESP	
		Amplification conditions ^{\$}					Enzyme Sequence	Fragments, bp, and protein variations
		Dena- turation	Annealing*	Elon- gation				
CSN1S1	c.-175A>G B>C	94 °C / 3 min	30 94 °C / 30 s 59 °C / 30 s 72 °C / 30 s	72 °C / 10 min	F 5' – TGC ATG TTC TCA TAA TAA CC – 3' R 5' – GAA GAA GCA GCA AGC TGG – 3'	310	MaeIII ↓GTNAC	310 – C 214/96 – B
CSN2	c.4451A>C Pro ₆₇₍₈₂₎ His A1>A2	94 °C / 4 min	35 94 °C / 30 s 60 °C / 40 s 72 °C / 30 s	72 °C / 4 min	F 5' – CCT TCT TTC CAG GAT GAA CTC CAG – 3' R 5' – GAG TAA GAG GAG GGA TGT TTT GTG GGA GGC TCT – 3'	121	DdeI C↓TNAG	121 – A1 86/35 – A2
CSN3	c.11625C>T un c.11661A>C Thr ₁₃₆₍₁₅₇₎ Ile Asp ₁₄₈₍₁₆₉₎ Ala A>B	95 °C / 2 min	35 95 °C / 30 s 55 °C / 40 s 72 °C / 30 s	72 °C / 7 min	F 5'– TAT CAT TTA TGG CCA TTG GAC CA – 3' R 5'– CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA GTT – 3'	228	HinfI G↓ANTC HindIII A↓AGCTT	133/93 – A 135/95 – B
LAA (LALBA)	c.15A>G - A>B	94 °C / 10 min	45 95 °C / 30 s 58 °C / 30 s 72 °C / 60 s	72 °C / 0.5 min	F 5' – CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT– 3' R 5' – AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA– 3'	166	MnII CCTCN ₇ ↓	78/52/36 – A 114/52 – B
LGB (PAEP)	c.3106T>C Val ₁₁₈₍₁₃₄₎ Ala A>B	94 °C / 3 min	34 94 °C / 30 s 48 °C / 30 s 72 °C / 30 s	72 °C / 5 min	F 5' – TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G – 3' R 5' – GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT – 3'	247	HaeIII GG↓CC	148/99 – A 74(x2)/99 – B

[#] - Nucleotide replacement and, if so, the replacement amino acids in activated protein (inactive protein), and protein variations[§] - for each SNP temperature and time for each step are indicated

* - for each SNP number of cycles and three steps: denaturation, annealing and synthesis, temperature/time are indicated

Conducting studies on methodological accuracy, parallel to our studies on κ - casein gene polymorphism International testing at the genetics laboratory of University of Life Sciences of Tartu was performed. The results coincided completely.

2.2. The analysis of polymorphism of milk protein genes

DNA samples of 719 dairy cows raised in Latvia, including 94 breeding bulls, have been analyzed on polymorphisms of five milk proteins, by studying alleles and genotypes of each SNPs of each gene and haplotypes of all SNPs. Thus, the idea of the Latvian cows' population was obtained, since seven more common grown breeds of Latvia were included in the collection.

The biggest part of the collection is represented by 367 samples of Latvian brown breed, which is the most common breed in Latvia. Another big part of the collection is represented by 179 samples of Latvian blue breed, 79 samples of Holstein Black and White (HB) and 55 samples of Danish Red breed. Samples of other breeds are with smaller number of samples, but analyzing them significant results were obtained in the analysis of genetic polymorphisms.

For **CSN1S1** gene the most frequently occurring allele is B (0.96) and genotype – BB (0.93) in Latvia. Analyzing frequencies of alleles depending on the sex, we found, that frequency of allele B of 86 breeds bulls' is less than 0.07 cows (0.90 vs. 0.97; $p = 2.07 \times 10^{-7}$). Analyzing the frequencies of genotypes, we can make the conclusion, that samples with heterozygote are more common between breeding bulls than cows (20.93 % for bulls and 5.43 % for cows; $p = 4.99 \times 10^{-7}$ for all genotypes). So, it might imply, that these are breeding bulls that are responsible for C allele in different stoking, because among 675 samples we did not find any with homozygote genotype CC.

Investigating the results of other research of different countries, we found out that results of research of Estonia (EE) are similar to ours. For Estonian Native breed cows' ($n = 118$) α_{s1} - CN allele B is with the frequency of 0.92, but that of allele C – 0.08 (Lien et al., 1999). Also Lithuanian (LT) researchers have more similar results: for dairy cows' population of LT ($n = 427$) allele B is with frequency 0.95 (Pečiulaitienė, 2005). In other countries of Europe, the results of similar studies are a little different. For example, for *Bulgarian Grey* (Neov et al., 2013) allele B is with frequency 0.043, but allele C – 0.57. As well as in this research, contrary to ours, all three genotypes were found with frequencies: BB = 0.18, BC = 0.79, CC = 0.03, respectively. These results can be explained with the historical occurrence of the breed (*Bos taurus brachyceros* x *Bos taurus Primigenius*; Neov et al., 2013). In contrast, the Czech scientists' results for 440 *Czech Fleckvieh* breed cows' by alleles are closer to our results (B = 0.89, C = 0.11), but by genotypes – to Bulgarian' results with all three genotypes, respectively, BB = 0.80, BC = 0.18, CC = 0.16 (Kučerová et al., 2006).

In case of **CSN2** the common allele is A1 with frequency 0.67 and genotypes A1A1 (0.42), and A1A2 (0.49), despite the fact that in literature as more preferable for cows' populations allele A2 is mentioned (Reichelt et al., 1991; Cade et al., 2000; McLachlan, 2001; Cardak, 2005; A2 Corporation,

2006; Cieslinska et al., 2007; Pečiulaitiene et al., 2007). Regarding the population balance or deflection from Hardy - Weinberg at a given locus there is statistically significant difference ($p_{\chi} = 2.72 \times 10^{-3}$) between the expected and obtained heterozygote frequencies. Similar results are for half of breeds (LB, LZ, HR and AN). For all breeds the frequency of genotype A2A2 is very low. Furthermore, it appears that for HB breed, which has higher milk amount than other breeds, higher frequency of A2A2 and equilibrium by Hardy - Weinberg equation are observed.

The frequency of preferable allele A2 of *CNS2* in Estonian Native breed cows (Värv et al., 2009) is significantly higher (0.60) than in Latvian brown breed cows (0.31) or Latvian blue breed cows (0.24). We can conclude, that in Estonian Native breed the frequency of benevolent allele A2 of β - CN is two times higher.

In 94 breeding bulls included in our study there was a small tendency of allele A1 dominance (0.54) over the allele A2 (0.46), but 622 dairy cows are with bigger tendency to allele A1 dominance (0.69 vs. 0.31). Besides, it should be also concluded that more than half of breeding bulls are with heterozygote genotype. So, assuming that by the genotype each allele is inherited with equal probability, we can assume that the bull transfers the beneficial allele to every second of his offspring. When comparing allele or genotype frequencies between cows and breeding bulls, a statistically significant/ difference is observed. Breeding bulls have higher frequency of allele A2 ($p_{\chi} = 4.22 \times 10^{-5}$) and also the level of heterozygote and homozygote of allele A2 genotypes ($p_{\chi} = 3.75 \times 10^{-3}$). So there is a better background for A2A2 genotype formation.

Czech researchers found that there is better situation for selection of allele A2 in their country than in Latvia. In their study it was found that *CSN2* alleles A1, A2, A3 and B are with frequencies 0.18, 0.80, 0.01 and 0.01, respectively (Kučerova et al., 2006).

In the study of the third casein protein **CSN3** it was found, that in population common allele is A with frequency 0.92 and common homozygote genotype AA – 0.86. From literature it is known that cows' with genotype BB of κ – casein are distinguished by better dairy technological features, higher cheese outcome (Martin et al., 2002), but in our population this genotype and, respectively, allele B are very rear (BB = 0.03 and B = 0.08). There is a pronounced predominance of allele A, as demonstrated by the analysis of Hardy - Weinberg equation, in which statistically significant differences between the expected and observed heterozygote genotypes were recognized ($p_{\chi} = 1.19 \times 10^{-3}$). It should be noted that only in historical breeds of Latvia (LB and LZ) all three genotypes were found, but in other breeds – only genotype AA.

Our data about very high occurrence of allele A of κ – casein in dairy cows of Latvian population coincide with the research data in Lithuania and Estonia (Pečiulaitiene, 2005; Pečiulaitiene et al., 2007; Värv et al., 2009). Estonian researchers found higher frequency of allele B in Estonian Native breed cows (0.24) and in Estonian Red breed cows (0.37). Despite the low level of allele B, Estonian scientists found that all parameters of milk coagulation were better in

cows with genotype BB of *CSN3* (Kübarsepp et al., 2005). In Lithuanian population of dairy cows the frequency of allele A is 0.74 and that of allele B – 0.22 (Pečiulaitiene et al., 2007).

The second group is whey proteins, where for both **LAA** and **LGB** common allele is B (0.94 and 0.78, respectively) and common genotype is BB (0.88 and 0.60, respectively).

In the *LAA* case the analyzed locus is in balance according to Hardy - Weinberg equation across the population, regardless of division in breeds. In all six breeds the predominance of allele B (from 0.82 till 1.00) is observed. Thus it can be recognized, that as a result of genetic drift allele A is forced out of the population and the B allele frequency increases. Furthermore, allele A is only in heterozygote genotypes, except in HB breed, where one breeding bull with homozygote genotype after allele A was found. In this breed also the frequency of allele A is the highest, which, compared to Latvian Brown breed, is six times higher (0.18 vs. 0.03). Analyzing the the distribution of rear allele A in cows and breeding bulls, it can be observed that for breeding bulls this allele is two times more common than for cows (0.12 vs. 0.05; $p\chi = 5.38 \times 10^{-4}$). Prevalence of allele A influences the double prevalence of frequency of heterozygote genotype (0.21 vs. 0.10; $p\chi = 6.00 \times 10^{-4}$).

From the data of different researches (Bell et al., 1981; Formaggini et al., 1999) we can conclude that variation B is typical or ancestral for *Bos Taurus*, *Bos Indicus*, *Bos (Poephagus) Grunniens*, therefore variation A is not widespread in *Bos Taurus*. Hypothetically, it can be concluded that our data also confirm the researchers' indicated results with regard to low frequency of variation A in different breeds and origins.

According to our data, the highest frequency of allele A in Latvia is for dairy cows of HB breed (0.18). Comparing these data to those of other researches, it can be concluded, that in other countries (Voelker et al., 1998; Bojarojc – Nosowicz et al., 2005) the frequency of allele A is higher (up to 0.77 or 76.60 %) than in our studied breeds in Latvia.

In the case of second protein of whey proteins or **LGB** in historical Latvian dairy cows' breeds the frequency of allele B is relative higher: in Latvian Brown 0.83, in Latvian Blue 0.80, but in Holstein Black and White only 0.58. Analyzing the genotypes it can be seen that in HR, SR and AN breeds homozygote form of rear allele A is markedly higher than in other breeds of Latvian cows' population and average frequency of all population (0.03). Difference in distribution of alleles and of genotypes between breeds is statistically significant ($p\chi = 7.16 \times 10^{-11}$ and $p\chi = 3.25 \times 10^{-5}$, respectively).

Comparing our results with the data from other published researches ((Ikonen et al., 1996; Erhardt et al, 1997; Pečiulaitiene, 2005; Kübarsepp et al., 2005; Zaton - Dobrowolska et al., 2006), we conclude that they show a slightly lower frequency of allele B, researching polymorphisms of whey milk protein LGB in different cows' breeds in national and/or special herds. The only breed with higher frequency of allele B comparing to Latvian population is Lithuanian Red with frequency 0.92 (Pečiulaitiene, 2005).

With all five protein genes or six SNPs 15 haplotypes were made, from which 11 were found in at least five samples or could be regarded as frequent haplotypes in the total population group. As most common haplotype was found the haplotype with common allele in all five proteins or six SNPs positions (haplotype H2: DNS sequence is AACAGT (1. position *CSN1S1*, 2. position *CSN2*, 3. and 4. – *CSN3* both SNPs, 5. – *LAA* and 6. – *LGB*). Protein sequence of H2 is BA1ABB. This haplotype was found in more than half of the samples (51.81 %). Common haplotype does not change by dividing samples in cows' breeds.

The obtained results provide an opportunity to analyze the association of two allele genotypes of five protein genes with milk productivity indicators and with breeding bulls' estimated breeding values and yield index.

2.3. Association analysis of polymorphisms of milk protein genes with cows' milk productivity

Division of breeds of Latvian cows is statistically significantly associated with all the analyzed milk productivity indicators. Higher indicators are observed in-group of Holstein breeds (Holstein Black and White and Holstein Red and White), but lower in Bl group or in Latvian blue breed within the framework of all lactation.

Genotypes of four from five analyzed milk proteins (except *CSN1S1*) are statistically significantly associated with dairy cows' breeds of Latvia, moreover two genes (*CSN3* and *LAA*) could affect the formation of breeds.

The yield of milk in kilograms, fat and protein quantity in kilograms and fat as well as protein contents as a percentage of cows' first three consecutive existing lactations were selected as parameters characterizing milk productivity.

Genotype BB of **alpha_{s1} - casein** gene statistically significantly promotes the increase of fat content (percentage) in the milk of cows raised in Latvia at the first two lactations (Fig.1., page 20). At the first lactation cows with genotype BB have on average 0.26 % higher fat content than cows with genotype BC ($p_F = 1.27 \times 10^{-2}$; $\eta = 0.11$), but at the second lactation increase is about 0.21 % ($p_F = 4.23 \times 10^{-2}$; $\eta = 0.10$).

Genotype BB increases also milk yield at first three lactations, but the differences between groups of genotypes are not statistically significant. Therefore, it can be concluded that selection of allele C of *CSN1S1* is not necessary in connection with improvement of milk productivity, because associated indicators are in cows with homozygote of allele B.

Analyzing the influence of genotypes and cows' group of breed together, statistically significant association with protein content as a percentage at 2nd lactation ($p_F = 4.72 \times 10^{-2}$) was found. In Red and Bl groups the indicator for cows with genotypes BC is a little higher (~ 0.10 %) than for cows with genotype BB, but in Hol group the results are opposite (~ 0.44 %). The importance of allele C depends on the breed of cows.

Analyzing each group of breeds separately, it can be concluded that in the group of Holstein breeds there is a statistically significant difference between

average values of indicators of groups of genotype at 2nd lactation in case of protein and fat content as a percentage. In the case of fat content the statistical signification is 2.78×10^{-2} , but in case of protein content – 1.86×10^{-2} . In both cases indicators for cows with genotype BB values are higher: +1.06 and +0.44, respectively.

It was possible to express the positive impact of genotypes of **beta - casein** gene in relation/proportion: A2A2 > A1A2 > A1A1. It means that genotype A2A2 statistically significantly contributes to the increase of milk yield at the first three lactations (Fig.2., page 21). At all lactations, correlation (η) between genotypes and yield amount is within the range 0.24 in the first till 0.22 in the last two lactations. Predominance of genotype A2A2 over genotype A1A2 is + 920.98 kg or 16.38 % at the first lactation ($p_F = 1.76 \times 10^{-3}$), + 1313.42 kg or 20.33 % at the second lactation ($p_F = 1.38 \times 10^{-3}$) and + 1597.65 kg or 25.10 % at the third lactation ($p_F = 1.77 \times 10^{-3}$). As can be seen in Figure 2, with each lactation the positive prevalence of A2A2 increases.

As a result of the increase of milk yield at the 3rd lactation homozygote form of allele A2 increases fat amount in milk by nearly 1/5 against the heterozygous form (+ 54.09 kg or 19.52%; $p_F = 2.59 \times 10^{-2}$) and at the 2nd lactation homozygote form of allele A2 increases protein amount in milk by nearly 1/5 against the heterozygous form (+ 44.67 kg or 19.95 %; $p_F = 2.25 \times 10^{-3}$), but at the 3rd lactation – already by more than 1/4 (+ 57.30 kg or 26.06%; $p_F = 1.74 \times 10^{-3}$). It should be noted that at the 1st and 3rd lactation, genotypes of alleles A1 and A2 of gene β - casein gene are statistically significantly associated with the protein content as a percentage (Fig. 3. on page 22). Therefore it can be concluded, that the association with protein amount is independent, not only created by association with yield.

Analyzing our results, we saw that positive impact of homozygote form of allele A2 of β - CN increases with age, or with subsequent lactations. Overall, it can be concluded that our results are similar to the data obtained by scientists in other countries (Ehrmann et al. 1997; Winkelman, Wickham, 1997, Kaminski et al. 2006), that to increase the productivity of dairy cows it is necessary to subject to selection or increase the frequency in population exactly genotype A2A2 of CSN2 gene. Consequently, the prevalence of genotype A1A2 between the bulls should be reduced.

Dividing/distributing the analyzed samples into/by groups of Latvian cows' breeds, the only statistically significant association is with fat content at the first lactation ($p_F = 3.49 \times 10^{-3}$).

Analyzing the data of each group of breeds separately, statistically significant difference was found at Red group regarding the milk yield amount at all three lactations, despite the fact that no statistically significant results were obtained when all breeds were analyzed together. Thus the author considers that the obtained association between genotypes of CSN2 and milk yield, by analyzing only genotypes, more accurately is attributable to the group of red breeds of Latvian rather than to all population.

In addition alleles A1 and A2 of CSN2 effect not only the milk productivity (yield amount and protein content), but they are associated ($V = 0.21$) with groups of cows' breeds in Latvia, but do not affect the cows' breeds.

It was possible to express the positive impact of genotypes of **kappa - casein** gene in relation: $AA > BB > AB$ for all indicators of amount in kilograms. However, not always the difference between $BB > AB$ was statistically significant ($p_F > 0.05$).

Genotype AA statistically significantly promotes the increase of milk yield at the first two lactations (Fig. 4, page 23). Prevalence of genotype AA to genotype BB is + 933.83 kg or 19.19 % at the 1st lactation ($p_F = 3.43 \times 10^{-2}$), + 1377.78 kg or 25.58 % at the 2nd lactation ($p_F = 1.47 \times 10^{-2}$) and + 1219.48 kg or 22.31 % at the 3rd lactation ($p_F > 0.05$ or $= 0.06$). In addition, it should be noted, that between apportionment of genotypes and yield amount in kilograms there is statistically significant association or correlation: at the 1st lactation $\eta = 0.45$, at the 2nd lactation $\eta = 0.43$, but at the 3rd lactation - $\eta = 0.39$. The association with each subsequent lactation decreases from an average close to weak.

Contrary to the previously analyzed association of genotypes of beta - casein gene, in the case of kappa - casein the highest predominance of genotype AA over genotype BB regarding the yield of milk is at the first lactation. Predominance from the first lactation to the second lactation increases, but to the third lactation – decreases. Thus, possibly, the positive effect of homozygote form of allele A of κ - CN gene is on the younger cows.

In the case of *fat amount (kg)*: the preponderance/ of genotype AA over genotype BB is + 62.12 kg or 32.06 % at the 1st lactation ($p = 8.32 \times 10^{-4}$), + 72.08 kg or 32.01 % at the 2nd lactation ($p_F = 2.68 \times 10^{-3}$) and + 64.07 kg or 27.90 % at the 3rd lactation ($p_F = 2.15 \times 10^{-2}$).

In the case of *protein amount (kg)*: the of genotype AA over genotype BB is + 38.67 kg or 24.19 % at the 1st lactation ($p_F = 1.10 \times 10^{-2}$), + 51.21 kg or 27.78 % at the 2nd lactation ($p_F = 9.58 \times 10^{-3}$) and + 48.03 kg or 26.33 % at the 3rd lactation ($p_F = 3.35 \times 10^{-2}$).

In the case of both protein and fat content percentage at the first lactation statistically significant association was found, therefore we can say that amount of proteins and and fat in kg is associated with CSN3 genotypes irrespective of the milk yield associatione . In the case of the first lactation for indicators of protein and fat content there is different relation of positive impact of genotypes: $AA > AB > BB$.

From the analysis of the data from literature it was found that that cows' with genotype BB of κ – casein are distinguished by better dairy technological features, higher cheese outcome (Martin et al., 2002) and that should be tested under Latvia' s conditions. Taking into account the fact that for cows with genotype BB the amount of milk yield is not the lowest and fat content at the first lactation is lower or milk is leaner, we can think that it is advisable to increase the frequency/ of genotype BB of CSN3 in Latvia. However, homozygote genotype of allele A should not be excluded because for cows with this genotype higher amount of milk and higher fat content at the first lactation

were observed. Overall, we can think that CSN3 gene can be used in selection to form cows with different levels of fat in milk.

Dividing the analyzed samples into groups of Latvian cows' breeds, statistically significant association was defined with milk yield and protein content in percentage (parallel to that also protein amount in kg) at all three analyzed lactations. In the case of milk yield in the group of red breeds the relation of positive impact of genotypes: AA > BB > AB persists as it was observed when analyzing only the genotypes, but in the group of blue breeds, the positive impact of genotype BB is higher than of genotype AA.

In the case of protein content in percentage the relation of positive impact of genotypes of group of red breeds is AA > AB > BB at the first two lactations, but at the last lactation it is AA > BB > AB; the relation of positive impact of genotypes of the group of blue breeds is BB > AB > AA at the first two lactations, but at the last lactation it is BB > AA > AB.

In the group of Holstein breeds there were samples only with homozygote genotype of common allele.

Analyzing the data of each group of breeds separately, we found out that it was in the group of red breeds where statistically significant difference between genotypes and indicators of milk productivity was observed and where statistically significant associations are with the same indicators as analyzing all breeds together.

Thus, summarizing the information on the analysis of κ - casein protein, it can be concluded, that the indicators of milk productivity are affected both by genotypes of CSN3 and by cows' breed.

Genotype BB of **alpha - lactalbumin** gene statistically significantly promotes the increase of fat content (percentage) in the milk of cows raised in Latvia at the first lactation. The cows with genotype BB showed higher (+ 0.22 %) fat content than cows with genotype AB ($p_F = 1.47 \times 10^{-2}$). The correlation analysis revealed very weak association between genotypes of LAA and fat content.

In the case of other indicators no statistically significant difference was found, despite of the fact that in all cases the average value of the group of genotype BB was higher than in the group of heterozygote genotype. Possibly, the significant difference wasn't found because homozygote genotype of allele A wasn't found in the population.

Judging from the results, we can think that forcing out allele A from population in the result of genetic drift and increasing frequency of allele B are due to positive effect of allele B on cows' organisms, including indicators of milk quality and quantity.

Dividing the analyzed samples into groups of Latvian cows' breeds, statistically significant association was defined with protein amount in kilograms at the first two lactations and with fat content in percentage at the third lactation.

In the group of Holstein breeds and red breeds the amount of protein in milk depending on genotypes is distributed similarly as analyzing only genotypes, it is BB > AB. Nevertheless, in the third group of Latvian blue breed the

apportionment is opposite: for cows with genotype AB at the first and the second lactation protein amount is on average by 24.58 and 21.51 kg, higher than that for cows with genotype BB.

In the case of fat content in percentage at the third lactation, there is a different apportionment in the group of Holstein breeds. In this group the subjects with heterozygote genotype on average have 0.86 % higher fat content than those with homozygote of allele B.

Furthermore, separately in Hol group there is the association with milk yield and fat contents at the third lactation. The milk yield on average in kg is higher for cows with genotype BB, but fat content in percentage – for cows with genotype AB. Thus, it can be concluded that in the case of α – lactalbumin gene at the third lactation cows of Holstein breeds and with genotype BB give more milk, but with less fat or leaner, but with genotype AB it is vice versa: less milk, but with higher fat content.

Thus, summarizing the results of genetic association of the α – lactalbumin with milk productivity indicators, it can be concluded that genotypes of alleles A and B have an effect on fat content at the first lactation and also partly affect the breeds of Latvian cows. Along side with the cow's breed the protein amount in different lactations is also effected. . It should also be mentioned that genetic variations of *LAA* are significant for Holstein breeds.

The positive impact of genotypes of **beta - lactoglobulin** gene can be expressed in $AA > AB > BB$ when analyzing the amount indicators, or $BB > AB > AA$ when analyzing fat and protein contents.

Genotype AA statistically significantly promotes the increase of milk yield at the first three lactations (Fig. 5 on page 26). Predominance of genotype AA over genotype AB in the case of milk amount is + 974.27 kg or 16.73 % at the first lactation ($p_F = 1.26 \times 10^{-3}$), + 1235.69 kg or 18.84 % at the 2nd lactation ($p_F = 1.39 \times 10^{-2}$) and + 1840.31 kg or 27.77 % at the third lactation ($p_F = 2.96 \times 10^{-3}$). From the data it is seen that with each next lactation the predominance of genotype AA increases and at the third lactation for cows with homozygote genotype of allele A on average the amount of milk is by 1/4 higher than that for cows with heterozygote genotype.

In the case of protein content/ is statistically significantly association with genotypes at the first lactation, when prevalence of genotype BB over genotype AB is 0.05 % ($p_F = 2.40 \times 10^{-2}$). Regarding the other two lactations the prevalence of genotype BB decreases. An interesting fact worth mentioning that at the first lactation in groups of genotype by smaller average of protein amount in milk is higher protein amount or on average increasing in protein amount, decreases protein content as a percentage.

In the case of fat content (Fig. 6, page 27) the prevalence of genotype BB on genotype AB at the first lactation is 0.26 % ($p_F = 8.37 \times 10^{-8}$), at the second lactation it is 0.23 % ($p_F = 5.21 \times 10^{-6}$), but at the third lactation – 0.15 % ($p_F = 3.40 \times 10^{-2}$). From the data we can see that the prevalence of genotype BB decreases with each next lactation.

Summarizing the results of milk yield and fat content, it can be concluded that genotype AA in cows' population raised in Latvia provides more milk than

genotype AB, but with less fat content or leaner. Therefore, it would be advisable to increase the frequency of allele A and of genotype AA in cows' population raised in Latvia, thus providing leaner milk, which is demanded by consumers nowadays. Currently there is evidence of the opposite nature / scene, because in the analyzed samples of dairy cows 61.81 % are with genotype BB, which provides less milk with high fat content.

Analyzing how genotypes of *LGB* and groups of breeds of Latvian cows together effect milk productivity indicators, the conclusion is that there remains statistically significant difference between the groups associated with/ milk yield amount at the first two lactations and /with protein content as a percentage at the first lactation. In the case of yield for red breeds the relation of positive impact of genotypes is $AB > AA > BB$, for Hol group - $AA > AB > BB$, which match with relation analyzing only association of genotypes, but for Latvian blue breed: $AB > BB > AA$. Therefore, we can conclude that in case of two groups the best genotype to increase the amount of milk yield is heterozygous or AB.

In the case of protein content as a percentage in the first lactation the relation of positive impact of genotypes for Red and Hol groups remains as it was observed when analyzing separately genotypes of β – lactoglobulin gene: $BB > AB > AA$, but for Bl group the relation is different: $AA > BB > AB$.

Overall, in the first lactation in Re and Hol group cows with common genotype BB are with less milk, but with higher protein content, but in Latvian Blue breed cows with common genotype are with medium milk amount and with medium protein content.

Haplotypes of alleles of **all five analyzed milk protein genes** are associated with groups of breeds: different haplotypes are the most common in different groups.

Haplotypes are statistically significantly associated with milk yield (Fig. 7 on page 29) and fat content in percentage at all three lactations. The highest milk yield in kilograms is of cows with haplotype H8, but the average lowest are different between lactations.: in the first two lactations it is group of haplotype H6, but in the third – haplotype H5. In the first lactation difference of yield amount between cows with haplotype H8 and H6 is 2701.75 kg in average, but in the second lactation – 2560.27 kg. In the third lactation difference between haplotypes with the highest and the lowest yield amount is 2409.00 kg. It is evident that with each following lactation difference decreases.

Examining the results of fat content, we found that haplotypes with highest and lowest value differ at all three lactations. At the 1st lactation the highest average result is for cows with haplotype H4, but the lowest – with H10. The difference between groups is 0.59 %. In the 2nd lactation the highest average result is for cows with haplotype H9, but the lowest for H10 (difference 0.70 %), in the 3rd lactation, respectively, haplotype H11 and H3 (0.59 %). Analyzing the haplotype with the highest value in the first lactation or haplotype H4 in the next lactations, decrease or fat content reduction from 4.53 till 3.96 % is observed. Thus we can conclude that fat content decreases with each

following lactation for cows with such haplotype. A similar situation was found also for haplotypes H1, H2 and H3.

Dividing analyzed samples into groups of Latvian cows breeds, statistically significant association was identified relating to fat content as a percentage in the second lactation ($p_F = 2.85 \times 10^{-2}$). In this case, haplotypes with the highest value differ in Hol group: in Red and Bl group it is haplotype H9, but in Hol group – H11.

In Red and Bl groups statistically significant difference or association with milk yield at the second lactation ($p_F = 1.89 \times 10^{-2}$ and 3.04×10^{-2} , respectively).was also found.

2.4. Association analysis of polymorphisms of milk protein genes with bulls' breeding values

It is known that milk proteins can stimulate sperm capacity, thereby increasing the amount of sperm that bind to the egg shell (*plural zonae pellucidae*), thus increasing the possibility of fertilization (Coutinho da Silva et al., 2014). So we can conclude that milk protein concentration is important to fertilization intensity and quality of sperm, including inherited material. Therefore milk protein polymorphisms are also important for breeding bulls.

Association between CSN1S1 and estimated breeding values of breeding bulls 72 samples were analysed, in case of CSN2 – 73 DNA samples, but association of the third casein protein gene or CSN3 was determined, using 63 samples of breeding bulls. In case of analyses of whey proteins LAA and LGB 73 samples of breeding bulls were used. In association analysis the group of breeding bulls of Latvian blue breed, were not included because EBV data for this group for were not in the data base.

In the case of three estimated breeding values (milk yield amount, protein and fat content) differences between breeding groups are statistically significant, but in case of one EBV (fat amount) statistical significance is on the boarder. Analyzing yield index between both groups (Re and Hol), we could see that in average the highest value is for the group of bulls of red breeds.

According to the data we concluded, that casein protein genes aren't associated with groups of bulls' breed, but in case of both whey protein genes there is statistically significant association between distribution of genotype in Re or Hol groups ($p_\chi = 2.65 \times 10^{-5}$ and 2.77×10^{-3} , respectively). In addition, these divisions has an average close correlation according to Cramer's V value (0.49 and 0.40, respectively) and we can say, that genotypes of whey protein genes partly affect (around 41.0 %; data not shown) the breed group of breeding bulls.

Breeding bulls' genotype BB of **alpha_{s1} - casein** gene statistically significantly increase their heifers' milk fat (Fig. 8 on page 31) and protein (Fig. 9 on page 32) amount in kilograms at the first lactation compering to heterozygote genotype. Also breeding bulls' heterozygote genotype of allele B increase estimated breeding value of milk yield, but not statistically significantly.

Analyzing distribution of EBV of fat amount (Fig. 8 on page 31) depending of genotypes of *CSN1S1*, we can see, that for daughters of breeding bulls with homozygote genotype of common allele (or genotype BB) fat amount in average is 14.78 kilograms higher than for daughter of breeding bulls with heterozygote genotype ($p_F = 3.64 \times 10^{-3}$). Particular relevance by statistic is with frequency 0.34 or weak correlation.

Analyzing distribution of EBV of protein amount (Fig. 9 on page 32) depending of genotypes of *CSN1S1*, we can see, that for daughters of breeding bulls with homozygote genotype of common allele (or genotype BB) fat amount in average is 9.36 kilograms higher than for daughter of breeding bulls with heterozygote genotype ($p_F = 2.16 \times 10^{-2}$). Particular relevance by statistic is even weaker ($\eta = 0.27$) than in case of fat amount.

We can draw a conclusion, that the daughters of breeding bulls with genotype BB of *CSN1S1* has more milk in kilograms, respectively, more fat and protein amount compared to breeding preferred value.

Dividing the samples according to breed groups, we concluded, that, analyzing both groups together, statistically significant differences are in case of EBV of milk yield ($p_F = 2.50 \times 10^{-5}$) and of fat content as a percentage ($p_F = 3.48 \times 10^{-2}$).

In the case of Red breed, genotype BB for breeding bulls increase estimated breeding value of milk yield (+ 376.14 kg; $p_F = 4.73 \times 10^{-2}$), but in the group of Holstein breeds increase is in the case of genotype BC (+ 247.92 kg; $p_F > 0.05$). However, it should be noted that in Hol group average value of groups of both genotypes are higher than breeding preferred value, but in Red group average value is positive only for genotype BB.

In the case of EBV of fat content ($p_F = 3.48 \times 10^{-2}$) readings are contrary: in Red group more positive result is for breeding bulls with genotype BC (+ 0.04 %; $p_F > 0.05$), but in Hol group – with genotype BB (+ 0.30 %; $p_F = 4.37 \times 10^{-2}$). In the group of Holstein breeds regardless of genotype the average fat content (in percent) value of group is less than breeding preferred value, but in group of red breeds for breeding bulls with genotype BC average value is positive, but only slightly.

Genotype BB also statistically significantly ($p_F = 3.89 \times 10^{-2}$) increase (+ 8.45 points) yield index of the group of Latvian red breeds.

Summarizing all data about association analyse of α_{s1} - casein in case of breeding bulls, we can conclude, that positive genotype or genotype, which provides better estimated breeding values, is homozygote of common allele B.

For genotypes of **beta - casein** gene any statistical significant association with breeding bulls' EBV or YI, was not found by analysing genotypes separately or together with groups of breeds. However, the positive impact of genotypes can be expressed in the following relation: A2A2 > A1A1 > A1A2, which differs from cow lactation data. It should be noted, that for the daughters of breeding bulls with genotype A2A2 milk yield amount in the first lactation in average is + 280.44 kg or 2.15 times and + 353.69 kg or 3.06 times higher than

for the daughters of breeding bulls with genotype A1A1 and A1A2, respectively.

Dividing samples according to groups of breeds, we get different relation of positive impact of genotypes: in Red group relation is A1A1 > A2A2 > A1A2, but in Hol group – A2A2 > A1A1 > A1A2.

Summarizing the results, we can conclude, that influence of genotypes of alleles A1 and A2 of β - casein on breeding bulls' estimated breeding values is statistically insignificant.

For genotypes of **kappa - casein** gene any statistically significant association with breeding bulls' EBV or YI was not found, by analysing genotypes separately or together with groups of breeds. This result can be explained by the fact that all breeding bulls of Lavian cow population are with homozygote genotype of common allele A.

Genotype BB of **alpha - lactalbumin** gene statistically significantly contributes to the breeding bulls' estimated breeding values of protein content as a percentage

($p_F = 3.57 \times 10^{-2}$) and yield index ($p_F = 2.23 \times 10^{-2}$).

In the case of EBV of protein content the highest value is for larger genotype group or for breeding bulls with genotype BB (+ 0.09%), also yield index is higher for the breeding bulls with genotype BB (6.52 points).

However, it should be mentioned, that higher estimated breeding value of milk yield in average is for breeding bulls with heterozygote genotype of LAA (+ 158.46 kg), nevertheless the results are statistically insignificant.

Dividing the samples according to groups of breeds, the association, that was observed in the analysis of genotypes only, did not persist, neither were new associations found. In the case of EBV of milk yield in both groups of breeds, a higher milk value in average is registered for daughters of father - bulls with genotype BB. Besides in the group of red breeds for breeding bulls with the genotype AB an average estimated breeding value of milk yield is 117.00 kg less than breeding preferred value.

Statistically significant difference was found when analyzing separately group of Holstein breeds. In Hol group genotypes of LAA gene are statistically significantly associated with protein content as a percentage ($p_F = 3.32 \times 10^{-2}$) and with yield index ($p_F = 3.48 \times 10^{-2}$). In both cases, the -group of genotype BB in average has higher value than the groups of genotype AB.

Summarizing the above effect of α - lactalbumin gene of allele A and B genotypes of

on values of EBV indicators, we can conclude, that genotype BB has at positive effect, especially in the group of Holstein breeds.

In the case of estimated breeding value of milk yield, the positive impact of genotypes of **beta - lactoglobulin** gene can be expressed in relation: AB > AA > BB and there is statistically significant difference ($p_F = 9.07 \times 10^{-3}$; Fig.10 on page 34) between genotypes. So we can conclude, that the common genotype of population is not recommended for breeding bulls, if the purpose of cow herd is to increase milk yield. In addition, it should be noted that the common

genotype BB has in average up to seven times less amount of milk than the other genotypes ($AB > BB$ with $p_F = 8.82 \times 10^{-3}$).

EBV of protein and fat amount in kilograms are statistically significant ($p_F = 2.42 \times 10^{-2}$ and 4.03×10^{-4} , respectively; Fig.11 on page 35) associated with genotypes of *LGB* and the positive impact of genotypes is different from milk yield: $AA > AB > BB$. Since there is a difference in positive effect of genotypes compared to the yield indicators, it suggests that possible association for the milk indicators is partly individual. In the case of EBV of fat amount statistically significant difference between genotypes was not found, despite the fact that in average difference between genotype AA and BB is more than 100 times. In the case of EBV of protein amount the average difference between genotype AA and BB is less (47.45 times), but the difference is statistically significant ($p_F = 5.95 \times 10^{-3}$).

Taking in account the samples belonging to different groups of breeds, statistically significant association was found in the case of estimated breeding value of protein content as a percentage ($p_F = 3.74 \times 10^{-2}$). In the case of this indicator a positive average value in the group of red breeds compares to breeding preferred value is only in to the group of breeding bulls with genotype BB, but in the group of Holstein breeds – with the genotype AA. Which confirms the above results on the correlation between *LGB* and group of breeds ($V = 0.40$). In addition, in Hol group differences between genotypes are statistically significant: p_F for all genotypes is 9.24×10^{-3} , but between genotypes AA and BB – 6.94×10^{-3} .

To summarize the information about significance of genotypes of allele A and B of β -lactoglobulin gene in case of breeding bulls' EBV, we can conclude, that the first heifers milk yield increase is promoted by genotype AB, if belonging to a groups of breeds is not taken into account, and protein and fat amount increase by genotype AA. Taken into account belonging to groups of breeds, in-group of red breeds positive effect is also for genotype BB, but minimal. Nevertheless, in-group of Holstein breeds the positive effect of genotypes AA and AB remains.

In groups of the breeding bull breeds of Latvian cow population there is a difference in distribution of **haplotypes** of alleles of **all five milk protein genes** and it is statistically significant ($p_\chi = 2.00 \times 10^{-4}$; $V = 0.40$), but the most common is haplotype H15.

Statistically significant association, not taking into account belonging to the groups of breeds, was found between haplotypes of all five milk protein genes and estimated breeding value of protein and fat amount in kilograms ($p_F = 8.01 \times 10^{-3}$ and 9.56×10^{-3} , respectively).

In both cases of EBVs a higher value is for the group of breeding bulls with haplotype H1, but the lowest – for breeding bulls with haplotype H15 (common haplotype). The difference between haplotypes H1 and H15 is in loci of *CSN1S1*, *CSN2* and *LGB*. In loci of caseins genes are common allele, but in locus of lactoglobulin – rear allele.

In the case of EBV, the fat amount difference is between the highest and the lowest reading of 25.18 kg ($p_F = 5.60 \times 10^{-3}$), but in case of EBV of protein amount – 17.40 kg ($p_F = 1.70 \times 10^{-2}$). In addition, it should be noted, that in the case of both indicators the average value of group of haplotype H15 is negative compared to breeding preferred value, this means that for heifers of bulls of this group at the first lactation the milk fat and protein amount will be below the desired.

Dividing samples according to the groups of breeds, statistically significant difference between groups of haplotypes and breeds was found in the case of protein content as a percentage ($p_F = 2.17 \times 10^{-2}$). There are different groups of haplotypes with highest and lowest value in each group of breeds: in Red group haplotypes H3 and H9, respectively, but in Hol group – haplotypes H1 and H9 or H11.

Without statistical significance, some interesting data were found in case of EBV of milk yield amount in kilograms. In the Red group the lowest value was in-group of breeding bulls with haplotype H15, but in Hol group this group of haplotype showed the highest value, more than 917.10 kilograms. Therefore, we can conclude that haplotype H15 is not recommended for breeding bulls of red breeds, but is desirable for breeding bulls of Holstein breeds.

CONCLUSIONS

1. Polymorphisms of B and C variations of CSN1S1, of A1 and A2 variations of CNS2 and of A and B variations of CSN3, LAA and LGB are suitable for studies of cows raised in Latvia, by providing a qualitative analysis. Summarizing technical description of methods of several written sources, making experiments, approving, verifying and validating in MGRL, conclusion was made, that newly acquired techniques ensure quality results for the analysis of polymorphisms of five milk protein genes: *CSN1S1*, *CNS2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB*.
2. Research of polymorphisms of B and C alleles of CSN1S1, of A1 and A2 alleles of CNS2 and of A and B alleles of CSN3, LAA and LGB was carried out of 626 dairy cows raised in Latvia. The obtained results analysis provide an opportunity to analyze association of two allele genotypes and haplotypes of five protein genes with milk productivity indicators and with breeding bulls' estimated breeding values and yield index.
3. The obtained results prove that in the Latvian population, not taking into account division of breeds, genotype A2A2 of β - casein, genotype AA of κ - casein and genotype AA of beta - lactoglobulin promote increase of milk yield.

Genotype A2A2 of *CSN2* at the 3rd lactation, genotype AA of *CSN3* and genotype BB of *LGB* at the 1st lactation statistically significantly contribute to increase of protein content as a percentage.

Genotype BB of α_{S1} - casein gene at the 1st and 2nd lactations, genotype AA of κ - casein gene and genotype BB of beta - lactoglobulin gene at the first three lactations and genotype BB of α - lactalbumin gene at the 1st

lactation statistically significantly affect increase of fat content as a percentage.

Haplotypes of alleles of all five milk protein genes are statistically significantly associated with milk yield and fat content as a percentage at the first three lactations with a variety of features contributing haplotypes.

4. The obtained results prove, that, not taking into account division of breeds, genotype AB of beta - lactoglobulin gene contributes to estimated breeding value of milk yield of breeding bulls raised and used in Latvia.

Genotypes BB of α_{S1} - casein gene and genotype AA of beta - lactoglobulin gene promote estimated breeding value of protein and fat amount in kilograms.

Genotype BB of alpha – laktalbumin gene statistically significantly contributes to estimated breeding value of protein content as a percentage and yield index.

RECOMMENDATIONS

**to livestock scientists and specialists, specialists of the artificial
insemination, breeders and producers**

We recommend to start implementing - genetic screening for cows and breeding bulls of Latvian dairy breeds by five milk protein genes: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB*, to be able to provide the desired genotype inheritance and accumulation in Latvian herds, which would allow effectively increase the productivity of dairy cattle by the qualitative and quantitative characteristics.

The gained experience suggests that it is possible to use genotyping in practical breeding of dairy cows and thereby reduce genotyping costs to minimal losses compering to complete genotyping of potential candidates. Genotyping of breeding bulls and cows is advisable in practical dairy cow breeding in Latvia, providing heredity of only the desired alleles or genotypes.

We advise to start creating the gene pool or DNA collection of cows raised in Latvia, by taking biological material at the moment of cow's birth or marking. This would provide complete information on genotypes of cows reared in Latvia and promote molecular breeding by most desirable alleles.

According to data of the study, we propose to make detailed genetic analysis for different breeds of dairy cows raised in Latvia by five milk protein genes: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB*, creating DNA sample collection by different breeds.

Following the findings, as well as existing information in literature and the database, we propose to make more thorough analysis of DNA variations or non-synonym polymorphisms of five milk protein genes: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB* for Latvian brown and Latvian blue breeds to establish and maintain the gene pool of the Latvian historical breeds.

According to the sources of literature, we recommend to carry out analysis of genetic association between five milk protein genes: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LAA* and *LGB*, and preferred technology features of milk industry using

population of dairy cows raised in Latvia, thereby adding information about the desired genotypes and thus obtaining more economical milk products regarding their quality and quantity.

ACKNOWLEDGMENTS

- Since the blood samples were obtained from more than 80 cattle herds throughout the territory of the country, then to some extent, we were also dependent on the favour of Latvian private cattle breeders who allowed us to obtain the biological material, for which we are thankful to them.
- Thanks to ex-director of educational research farm of LAU “Vecauce” Iveta Grudovska, to deputy director Indra Eihvalde and livestock specialist team for arranging of biological sample extraction for this study in December 2010.
- Thanks for a successful long-term cooperation and responsiveness to Chairman of the Board of BAIS of Sigulda Nils Ivars Feodorovs, to Chairman of the Board of BAIS of Kurzeme Gatis Kaķis, to Head of Office of Veterinary Service of Vidzeme Valentīna Stjāde and her team, by allowing us to use biological samples of breeding bulls.
- We are grateful to managers, current and former employees of State agency “Agricultural Data Centre” of the Ministry of Agriculture of the Republic of Latvia for possibility to get the productivity data and to use hardware and SAS program/software of ADC to process the data and to make statistical analysis of results at the pilot-study.
- I am very thankful to my family – mammy, dad and lovely daughter.