รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายยีน *BMPR*─*IB* และ *BMP*─*15* กับลักษณะขนาดครอกของแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน

Association between single nucleotide polymorphisms in *BMPR*─*IB* and *BMP*─*15* genes on liter size of Thai indigenous─Anglo-Nubian crossbreds

โดย

ปรัชญาพร เอกบุตร

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก (เงินรายได้มหาวิทยาลัย)

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ได้จัดสรรทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ รหัสโครงการวิจัย NAT560556Sใคร่ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาด และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่สนับสนุนสถานที่ทดลอง และอุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้คือ ตรวจหาความสัมพันธ์ของจุดกลายพันธุ์ของยีน (SNPs) ของ bone morphogenetic protein receptor IB (*BMPR*—*IB*) และ Bone morphogenetic protein 15 (*BMP*—*15*) ต่อลักษณะขนาดครอกของแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน โดยเก็บบันทึกข้อมูล ขนาดครอก ลำดับคลอด เพศ และเจาะเลือดแพะ จำนวน 67 ตัว ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *BMPR*—*IB* และ *BMP*—*15* ด้วย PCR—RFLP วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) กับลักษณะปรากฏด้วยโปรแกรม SAS โดยวิธี general linear model (GLM) ผลการศึกษาพบว่ายีน *BMPR*—*IB* มีเพียงจีโนไทป์เดียวจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *BMP*—*15* กับลักษณะขนาดครอกของแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย—แองโกลนูเบียน (P>0.05) ดังนั้นการปรับปรุงลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย—แองโกลนูเบียนควรใช้ข้อมูลค่าการผสมพันธุ์ร่วมกับเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการให้ลูกดก

คำสำคัญ: ขนาดครอก แพะ *BMP-15* *BMPR-IB*

Abstract

The objective of this study was to detect the association of single nucleotide polymorphism (SNPs) of bone morphogenetic protein receptor IB (*BMPR-IB*) and Bone morphogenetic protein 15 (*BMP-15*) genes on liter size of Thai indigenous–Anglo-Nubian crossbreds. Litter size, parity, sex and blood collected from 67 goats for genotyping of *BMPR-IB* and *BMP-15* by PCR–RFLP. Phenotypic data was used for assess the genetic marker effect by general linear model (GLM) method with SAS. The result showed one genotype of *BMPR-IB* only. So, *BMPR-IB* was eliminated from this study. However, there was no effect between *BMP-15* and litter size trait of Thai native–Anglo-Nubian crossbred goats (P> 0.05). Therefore, breeding and selection to improve litter size in Thai native–Anglo-Nubian crossbred goats should be based on EBVs and further investigation of other genetic markers responsible for high prolificacy.

Keywords: litter size, goat *BMP-15, BMPR-IB*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทที่ 1: บทนำ	1
บทที่ 2: ตรวจเอกสาร	2
2.1 ข้อมูลทั่วไป	2
2.2 พันธุ์แพะเนื้อที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย	3
2.2.1 แพะพื้นไทยเมืองภาคใต้ (Thai Native goat)	3
2.2.2 แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglo Nubian goat)	3
2.2.3 แพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์ ม.อ.-1”	3
2.3 พันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับขนาดครอก	5
2.4 เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker)	6
บทที่ 3: อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	8
3.1 สัตว์และข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา	8
3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด	8
3.3 การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด	8
3.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis	9
3.5 ตรวจหาอุณหภูมิ annealing ของ primer และการเพิ่มปริมาณ DNA	9
3.6 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)	10
3.7 ตรวจสอบ PCR-product ด้วย agarose gel electrophoresis	10
3.8 ย่อย PCR-product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	10
3.9 วิเคราะห์ข้อมูล	11
3.9.1 วิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และอัลลีล	11
3.9.2 ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium	11
3.10 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ	11
3.10.1 โครงสร้างของข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์	11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.10.2 วิเคราะห์หาปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะขนาดครอก 12
3.10.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง genetic marker กับลักษณะขนาดครอก 12
3.10.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง genetic marker กับลักษณะขนาดครอก 12
บทที่ 4: ผลการทดลอง 13
4.1 ความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของยีน 13
4.2 ปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะน้ำหนักแรกเกิด 14
4.3 ปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะขนาดครอก 15
4.4 ความสัมพันธ์ของ genetic markers กับลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน 16
บทที่ 5: สรุปผล 18
เอกสารอ้างอิง 19

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 จำนวนเกษตรกรที่เลี้ยงแพะและจำนวนแพะในประเทศปี 2558 2
ตารางที่ 2.2 จำนวนแพะเนื้อ และแพะนมในประเทศปี 2558 3
ตารางที่ 2.3 ตารางแสดงการเปรียบเทียบสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแพะพื้นเมือง แพะแองโกลนูเบียน และแพะทรัพย์ม.อ. 1 4
ตารางที่ 2.4 ขนาดครอกและอัตราพันธุกรรมในแพะพื้นเมืองและแพะพื้นเมืองลูกผสม 5
ตารางที่ 3.1 ตำแหน่ง ลำดับเบสของไพรเมอร์ เอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนที่นำมาศึกษาลักษณะขนาดครอก 10
ตารางที่ 4.1. ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลีลของ *BMPR–IB* และ *BMP–15* 13
ตารางที่ 4.2 ค่า Lsmean ของพันธุ์ เพศ และขนาดครอก ต่อน้ำหนักแรกเกิดแพะ 14
ตารางที่ 4.3 ค่า Lsmean ของพันธุ์ และเพศ ต่อขนาดครอกของแพะ 15
ตารางที่ 4.4 least square means อิทธิพลของ เพศ ลำดับการคลอด และรูปแบบจีโนไทป์ของ *BMP–15* ต่อลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน 16

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 4. 1 (ก) *BMPR—IB* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII* และ (ข) *รูปแบบ BMP—15* ตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* 13

บทที่ 1

บทนำ

การเลี้ยงแพะเป็นอาชีพทางการเกษตรที่สำคัญอีกอาชีพหนึ่งของเกษตรกรภาคใต้ของไทย โดยเกษตรกรนิยมเลี้ยงแพะพื้นเมืองซึ่งสามารถเลี้ยงเป็นแพะเนื้อหรือแพะนม ทำให้ปริมาณการเลี้ยงแพะระหว่างปี 2545-2552 มีการขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 115 % และมีการกระจายการเลี้ยงแพะไปสู่ภูมิภาคอื่นๆ ของประเทศเพิ่มมากขึ้น (กรมปศุสัตว์, 2552 อ้างโดย มงคล และคณะ, 2553) ลักษณะเด่นของแพะภาคใต้ที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ คือ การให้ลูกดก และมีอัตราการคลอดลูกแฝดสูง แต่แพะพื้นเมืองไทยมีผลการผลิตต่ำ ทำให้มีการผสมข้ามเพื่อให้แพะลูกผสมมีการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการผสมข้ามพันธุ์ทำให้แพะลูกผสมอาจส่งผลกระทบต่อลักษณะครอก (แสนศักดิ์ และคณะ, 2550) โดยแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน 50 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดครอก (1.69) ซึ่งต่ำกว่าแพะพื้นเมืองไทย (1.76) (อภิชาติ และคณะ, 2544)

ลักษณะขนาดครอกเป็นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ ซึ่งได้รับอิทธิพลจากทั้งพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม โดย เถลิงศักดิ์ และคณะ (2554) รายงานค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะจำนวนลูกต่อครอกเมื่อแรกเกิด แพะพื้นเมือง แพะลูกผสมพื้นเมือง x แองโกลนูเบียน แพะลูกผสมพื้นเมือง x แองโกลนูเบียน x บอร์ มีค่า 0.31951, 0.31734 และ 0.16667 ตามลำดับ ซึ่งลักษณะดังกล่าวยังมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงเป็นโอกาสที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งมีการรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะจำนวนลูกแรกคลอดในแกะและแพะเช่น bone morphogenetic protein receptor IB (*BMPR-IB*) และ Bone morphogenetic protein 15 (*BMP-15*) (Chu et al., 2007; Wang et al., 2011a) ดังนั้นการมีขั้นตอนและกระบวนการผลิตที่ชัดเจนและได้มาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญซึ่งจะช่วยให้มีการใช้ประโยชน์จากแพะพื้นเมืองอย่างยั่งยืน รวมทั้งการใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏร่วมกับการศึกษาข้อมูลเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะดังกล่าวควบคู่กันไป เพื่อนำไปใช้ในการวางแผนการจับคู่ผสมที่ถูกต้อง เพื่อให้ได้ลูกแพะมีพันธุกรรมดี เพิ่มกำลังการผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค และเป็นส่วนหนึ่งในการสร้างความเชื่อมั่นให้กับเกษตรผู้เลี้ยงแพะ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างอาชีพการเลี้ยงแพะอย่างยั่งยืน

ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบของเครื่องหมายพันธุกรรมและความถี่ในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน และตรวจสอบความสัมพันธ์ของจุดกลายยีน ของ *BMPR*—*IB* และ *BMP*—*15* ต่อลักษณะขนาดครอกในแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ข้อมูลทั่วไป

แพะมีชื่อวิทยาศาสตร์วิทยาศาสตร์ *Capra aegagrus hircus* อยู่ในวงศ์ Bovidae เป็นสัตว์กีบคู่ขนาดกลาง มีความอดทนแข็งแรงและทนทานต่อโรคได้ดีกว่าสัตว์กีบคู่ชนิดอื่นๆ สามารถปีนป่ายที่สูงซึ่งแพะเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก ขยายพันธุ์ได้เร็ว อายุการเป็นหนุ่มสาวและ ระยะตั้งท้องสั้น (150 วัน) สามารถให้ลูกครั้งละ 1—4 ตัว และให้ลูกได้ปีละ 2 ครอก ใช้พื้นที่การเลี้ยงต่อตัวน้อยเมื่อเทียบกับโค (เกรียงศักดิ์, 2539)

ปัจจุบันมีการเลี้ยงแพะในหลายพื้นที่ทั่วทุกภาคของประเทศ จากสถิติจำนวนเกษตรกรที่เลี้ยงแพะและจำนวนแพะในปี 2558 มีเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะทั้งหมดจำนวน 43,118 ครัวเรือน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในพื้นภาคใต้จำนวน 36,196 ครัวเรือน และจำนวนแพะทั้งหมดในประเทศจำนวน 539,583 ตัว ซึ่งจำนวนแพะมากที่สุดคือ 271,730 ตัว พบว่าอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ รองลงมาคือพื้นที่ภาคกลาง จำนวน 209,155 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 จำนวนเกษตรกรที่เลี้ยงแพะและจำนวนแพะในประเทศปี 2558

ภาค	จำนวน (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ (%)	เกษตร (ครัวเรือน)	เปอร์เซ็นต์ (%)
เหนือ	38,876	7	1,002	2
ตะวันออกเฉียงเหนือ	19,822	4	707	2
กลาง	209,155	39	5,213	12
ใต้	271,730	50	36,196	84
ยอดรวม	539,583	100	43,118	100

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2558)

จำนวนแพะทั้งหมดจำนวน 539,583ตัว จำแนกตามประเภทเป็น แพะเนื้อ จำนวน 515,093 ตัว และแพะนม จำนวน 24,490 ตัว ตามลำดับ แพะเนื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จำนวนแพะเนื้อ และแพะนมในประเทศปี 2558

ภาค	แพะเนื้อ		แพะนม		รวม
	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	
เหนือ	10,977	26,572	327	1,000	38,876
ตะวันออกเฉียงเหนือ	5,268	13,418	358	778	19,822
กลาง	46,257	149,288	2,669	10,941	209,155
ใต้	84,330	178,983	2,778	5,639	271,730
ยอดรวม	146,832	368,261	6,132	18,358	539,583
เปอร์เซ็นต์(%)	27	68	1	4	100

ที่มา : ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2558)

2.2 พันธุ์แพะเนื้อที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย

การเลี้ยงแพะเนื้อเป็นการเลี้ยงแพะที่ค่อนข้างแพร่หลายในกลุ่มเกษตรกรเพราะเป็นระบบการเลี้ยงที่ง่ายต่อการจัดการดูเอาใจใส่ และให้ผลผลิตที่ดี ที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจสูง และพันธุ์แพะเนื้อที่นิยมเลี้ยงในเขตประเทศไทยมีอยู่หลากหลายพันธุ์ เช่นแพะพันธุ์พื้นเมืองไทย พันธุ์แองโกลนูเบียน พันธุ์บอร์ พันธุ์แองโกร่า พันธุ์แคชเมียร์ พันธุ์แบล็คเบงกอล และแพะลูกผสมต่างๆ เป็นต้น

2.2.1 แพะพื้นไทยเมืองภาคใต้ (Thai Native goat)

ลักษณะประจำพันธุ์ มีรูปร่างขนาดเล็ก น้ำหนักโตเต็มที่ 20-30 กิโลกรัม หน้าผากลาดตรง ใบหูเรียวเล็กตั้งชี้ไปข้างหน้า มีหลากหลายสี ขาว ดำ น้ำตาล เทา ทั้งสีเดียว หรือหลายสีในตัวเดียวมีลักษณะคล้ายกับแพะแกมบิง กัตจัง ของประเทศมาเลเซีย หากินเก่งสามารถผสมพันธุ์ได้ทุกฤดูกาลให้ลูกแฝดสูง เลี้ยงลูกได้ดีทนต่อสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น และทนต่อพยาธิตัวกลมมากกว่าลูกแพะผสม (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2553)

2.2.2 แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglo Nubian goat)

เป็นแพะขนาดใหญ่ที่ให้ผลผลิตทั้งเนื้อและนม เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ระหว่างแพะอียิปต์ซาไรบีกับแพะจัมนาปารีของอินเดียแล้วนำไปผสมข้ามพันธุ์กับแพะกลุ่มบริทิซในประเทศอังกฤษ กรมปศุสัตว์นำเข้ามาในปี 2526 เพื่อปรับปรุงพันธุ์แพะพื้นเมืองให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและให้ปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้น ลักษณะประจำพันธุ์แพะแองโกลนูเบียน มีหลายสี ทั้งสีเดียวในตัว หรือมีสีด่าง สันจมูกมีลักษณะเป็นเส้นโค้งนูนคล้ายจมูกชาวโรมัน ใบหูยาวปรกลง น้ำหนักแรกเกิด 2.5-3.5 กิโลกรัม น้ำหนักหย่านม 15-18 กิโลกรัม ขนาดโตเต็มที่มีความสูง 75-100 เซนติเมตร เพศผู้หนัก 60-70 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 50-60 กิโลกรัม ให้น้ำนมเฉลี่ยประมาณวันละ 0.8-1.2 กิโลกรัม ระยะการให้นม 150 วัน (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2553)

2.2.3 แพะเนื้อลูกผสม "ทรัพย์ ม.อ.-1"

เป็นแพะเนื้อลูกผสมที่เป็นผลมาจากการนำแพะแองโกลนูเบียนที่มีจุดเด่นคือ มีรูปร่างขนาดใหญ่ให้ผลผลิตทั้งเนื้อและนม สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในภาคใต้ได้ มาผสมกับแพะพื้นเมืองภาคใต้

ซึ่งมีจุดเด่น คือ เลี้ยงง่าย หากินเก่ง ผสมติดง่าย ให้ลูกดก ทนร้อน ทำให้ได้แพะเนื้อลูกผสมที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของภาคใต้ได้เป็นอย่างดี และให้เนื้อปริมาณมากกว่าเนื้อแพะพื้นเมือง และแพะลูกผสมนี้ได้รับการพัฒนาปรับปรุง โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้มีนโยบายคัดเลือกแพะลูกผสมดังกล่าวที่มีลักษณะขนสั้น ขนสีน้ำตาล หรือน้ำตาลเข้ม ขนหลังสีดำ ใบหูยาว และกึ่งปรกถึงปรก ปรก มีช่วงขา และลำตัวยาว และให้เรียกชื่อแพะลูกผสมนี้ว่า “แพะทรัพย์ ม.อ. 1”

แพะทรัพย์ ม.อ. 1 มีน้ำหนักแรกคลอดอยู่ในช่วง 2.20-2.40 กิโลกรัม น้ำหนักหย่านมเมื่ออายุ 3 เดือน อยู่ในช่วง 9—10 กิโลกรัม และมีน้ำหนักเมื่ออายุ 1 ปี อยู่ในช่วง 23—25 กิโลกรัม และเมื่อโตเต็มที่มีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 43—45 กิโลกรัม จุดเด่นของแพะทรัพย์—ม.อ. คือ มีขนาดของร่างกายไม่ใหญ่เกินไป เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงของเกษตรกรรายใหม่ที่สนใจเลี้ยงแพะเนื้อ และเกษตรกรรายย่อยที่มีทุนในการเลี้ยงไม่มาก ยิ่งไปกว่านั้นจากขนาดที่ไม่ใหญ่มากจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นแพะในพิธีทางศาสนาอิสลาม และสำหรับการบริโภคในระดับท้องถิ่น (Wattanachant, 2008)

ตารางที่ 2.3 ตารางแสดงการเปรียบเทียบสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแพะพื้นเมือง แพะแองโกลนูเบียน และแพะทรัพย์ม.อ. 1

สมรรถภาพการสืบพันธุ์	หน่วย	แพะพื้นเมือง	แพะแองโกลนูเบียน	50%แองโกลนูเบียน - 50%พื้นเมือง
อัตราการเกิดลูก	%	97.4	84.3	83.34
จำนวนลูกเกิด/แม่/ปี	ตัว	1.9	1.31	1.54
อัตราการเกิดลูกเดี่ยว	%	41.4	37.1	18.42
อัตราการเกิดลูกแฝดสอง	%	52.8	51.8	68.42
อัตราการเกิดลูกแฝดสาม	%	5.8	11.1	13.16
อัตราการตายของลูกก่อนหย่านม	%	3.2	7.8	2.5
อัตราการตายของลูกหลังหย่านม	%	2.6	12.7	1.8
ช่วงห่างการให้ลูกระหว่างครอก	วัน	238	247	261

ที่มา : สำนักงานปศุสัตว์เขต 9 (2555)

แพะมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่ เช่น โค และกระบือ คือ แพะใช้เวลาตั้งท้องสั้น รวมทั้งในการให้ลูกแต่ละครั้งสามารถให้ลูกแฝด ทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว (มงคล และคณะ, 2553) จึงเป็นการเพิ่มประชากรแพะได้เร็วกว่าสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะเด่นประจำพันธุ์ของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ภายใต้การเลี้ยงดูของเกษตรกรรายย่อย คือ การให้ลูกดก มีอัตราการคลอดลูกแฝดสูง และมีความทนทานต่อโรคและสภาพภูมิอากาศ (แสนศักดิ์ และคณะ, 2550) อย่างไรก็ตามแพะพื้นเมืองยังมีข้อจำกัดคือ ขนาดตัวเล็ก โตช้า จึงไม่เหมาะต่อการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรม จึงนิยม

นำไปผลิตเป็นแพะลูกผสมพื้นเมืองไทยเพื่อเพิ่มผลผลิตด้านเนื้อและน้ำนม แต่อาจมีผลกระทบต่อขนาดครอกหรือจำนวนลูกแรกเกิดได้ โดย อภิชาต และคณะ (2544) รายงานว่าแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน 50 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดครอก (1.69) ต่ำกว่าแพะพื้นเมืองไทย (1.76)

ปัญหาที่สำคัญของการผลิตแพะในประเทศไทยประการหนึ่ง คือ ปัญหาด้านพันธุ์ (สมเกียรติ, 2548) ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรกรผู้เลี้ยงแพะส่วนใหญ่ไม่มีแผนการปรับปรุงพันธุ์ที่ชัดเจน ปล่อยให้แพะผสมพันธุ์กันเองตามธรรมชาติ (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2539) ขาดระบบการจัดการ และการบันทึกข้อมูลที่แม่นยำ มงคล และคณะ (2553) เพราะเกษตรกรคาดหวังเพียงให้ได้ลูกแพะเพื่อจำหน่ายได้อย่างต่อเนื่อง หรือการเลี้ยงรุ่นต่อไปเท่านั้น แม้ว่าจะปรับปรุงการจัดการให้ดีขึ้นแต่สมรรถนะการผลิตแพะในประเทศไทยยังอยู่ในระดับต่ำ เนื่องมาจากข้อจำกัดในด้านความสามารถทางพันธุกรรม ซึ่งอัตราการให้ลูกแฝดและขนาดครอกจัดเป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่สำคัญ (สมเกียรติ และคณะ, 2544)

อนึ่งมีรายงานปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อขนาดครอก ได้แก่ ฤดูที่ผสมพันธุ์และปีที่ผสมพันธุ์ อายุและลำดับครอกมีอิทธิพลต่อขนาดครอก (อภิชาติ และคณะ, 2544) นอกจากนี้ลำดับครอกและอายุแม่ยังส่งผลต่อขนาดครอกด้วย (สมเกียรติ และคณะ, 2544 และ ธำรง และคณะ, 2544) โดยแม่แพะที่อายุมากและลำดับครอกสูงจะมีโอกาสให้จำนวนลูกต่อครอกสูงกว่าแม่แพะอายุน้อยและลำดับครอกน้อย ดังนั้นหากจะคัดเลือกแพะที่มีขนาดครอกมากกว่า 1 ตัว เป็นแม่พันธุ์อาจจะต้องคัดเมื่อแม่แพะอายุเยอะซึ่งจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปได้ช้า จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลพันธุกรรมมาช่วยในการคัดเลือกโดย ได้มีการรายงานขนาดครอกและอัตราพันธุกรรมในแพะพื้นเมืองและแพะพื้นเมืองลูกผสม ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ขนาดครอกและอัตราพันธุกรรมในแพะพื้นเมืองและแพะพื้นเมืองลูกผสม

พันธุ์[1]	ขนาดครอก	อัตราพันธุกรรม	ที่มา
TN	1.40 ±0.05	0.09 ±0.11	แสนศักดิ์ และคณะ (2550)
TN	1.81±0.50	0.31951	เถลิงศักดิ์ และคณะ (2554)
TN x AG	1.76±0.57	0.31734	เถลิงศักดิ์ และคณะ (2554)
TN x AG x BR	1.88±0.61	0.16667	เถลิงศักดิ์ และคณะ (2554)

[1]TN = Thai native, AG = Ango-Nubian, BR = Boer

2.3 พันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับขนาดครอก

นอกจากการรายงานค่าอัตราพันธุกรรมของการเกิดลูกแฝดหรือขนาดครอกของแพะแล้ว ยังมีการรายงานถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับขนาดครอกในแพะด้วย เช่น การกลายยีนของยีน *BMPR-IB* และ *BMP-15* ส่งผลให้แกะ Small Tailed Han มีจำนวนลูกต่อครอกครอกสูงกว่าการกลายยีนเพียงตำแหน่งเดียว (Chu et al., 2007) ความหลากหลาย (polymorphism) ที่เกิดในแอกซอน 2 (exon 2) ของ *BMP15* ส่งผลต่อขนาดครอกของแพะ 2 สายพันธุ์ของจีน (Wang et al., 2011b) เนื่องจาก *BMP15* มีบทบาทสำคัญต่อการ

เจริญเติบโตของไข่ในระยะแรกไปจนถึงการตกไข่ ทั้งในแกะ แพะ สุกร และคน โดย *BMP15* จะจับกับ *BMPR-IB* เพื่อกระตุ้นการทำงานของ *BMP15* (Lima et al., 2012)

Booroola gene (*FecB*) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีบทบาทเป็นยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการให้ลูกดกในแกะ ซึ่งมี *BMPR-IB* ทำหน้าที่กระตุ้นการการทำงานของ transforming growth factor β (TGFβ) การกลายยีนในตำแหน่ง Q249R ใน *BMPR-IB* ส่งผลให้แกะ Booroola มีการตกไข่เพิ่มขึ้น (Chu et al., 2007) ส่วน BMP-15 หรือ *FecX* เป็น growth factor ของ TGFβ อยู่บนโครโมโซม X เกี่ยวข้องกับการให้ลูกดกในแกะ Inverdale, Hanna, Belclare, Cambridge และ Lacaune ซึ่งการกลายยีนที่ตำแหน่ง Q239Ter ที่เป็นลักษณะ heterozygous ทำให้แกะมีอัตราลูกดกเพิ่มมากขึ้น 0.6 ฟองและเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ (Galloway et al., 2000 อ้างโดย แสนศักดิ์ และคณะ, 2550)

อย่างไรก็ตาม แสนศักดิ์ และคณะ (2550) รายงานว่าความแตกต่างของยีน *BMP15* ไม่มีผลต่อขนาดครอกของแพะพื้นเมืองไทย ซึ่งอาจจะเกิดจากตำแหน่งจุดกลายยีนต่างกัน ความแตกต่างของสภาพแวดล้อมและการจัดการ รวมทั้งโครงสร้างฝูง อาจส่งผลต่อลักษณะขนาดครอกแพะแตกต่างกัน เทคนิคด้านชีวโมเลกุลมีหลายเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลและใช้เป็น marker assisted selection (MAS) เช่น single strand conformation polymorphism (SSCP), single nucleotide polymorphism (SNP) และ polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่ง PCR-RFLP นั้นมีความง่าย สะดวก แม่นยำและนิยมนำมาใช้ในการหาจุดกลายยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ เช่น หาจุดกลายยีน *PITI* ที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตในไก่ (Nie et al., 2008) จุดกลายยีน NF1-C2 กับปริมาณน้ำนมแพะ (Wang et al., 2011a)

2.4 เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker)

คือ เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการจำแนกขนาด และความแตกต่างระหว่างจีโนม บอกตำแหน่งของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่างๆบนจีโนม (Crooijmans et al., 1996) และยังใช้เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการทำแผนผังยีนบนโครโมโซมด้วย รวมทั้งช่วยให้ติดตามข้อมูลการถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งในการทำแผนผังยีนจำเป็นอย่างมากที่จะต้องหาตัวเครื่องหมายให้มากเพียงพอที่จะครอบคลุมพื้นที่บนโครโมโซมทุกเส้นในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การติดตามการถ่ายทอดพันธุกรรมสามารถแบ่งกว้างได้ 3 ชนิดคือ (Liu, 1998)

2.4.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายหรือยีนที่มีคุณสมบัติให้โปรตีน โดยผลผลิตของยีนเครื่องหมายทำให้เกิดลักษณะปรากฏในรูปที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน สามารถใช้บ่งชี้ถึงสรีรวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาได้ เช่น สีตา กรุ๊ปเลือดในมนุษย์ สีขนในสัตว์ปีก เป็นต้น เครื่องหมายพันธุกรรมมีประโยชน์ในการตรวจดูลิงเกจร่วมกับยีนที่สนใจ แต่มีข้อจำกัดบางประการ คือ ในบางลักษณะอาจถูกอิทธิพลของปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีน (epitasis interaction) ทำให้เกิดความสับสนของอัตราส่วนของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นได้

2.4.2 การใช้ตัวบ่งชี้ทางโปรตีน (protein marker) คือ การตรวจสอบลักษณะต่างๆ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาทางชีวเคมี เนื่องจากการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้โปรตีนมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ประจุและขนาดที่แตกต่างกัน ดังนั้นการตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนจึงสามารถดูได้จากความแตกต่างจากอัลลีลของยีน เช่น การวิเคราะห์ไอโซไซม์ (isozyme) อัลโลไซม์ (allozyme) ปัจจุบันวิธีการนี้ได้รับความนิยมน้อยมากเนื่องจากมีความหลากหลายน้อยมาก

2.4.3 การใช้ตัวบ่งชี้ระดับดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นวิธีการที่นิยมกันอย่างแพร่หลายและให้ผลที่แม่นยำกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์เดียวกัน และยังสามารถประยุกต์ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อติดตามการถ่ายทอดโครโมโซมและ genetic loci ที่มียีนสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของสัตว์เลี้ยงหรือผลผลิตทางการเกษตร ในระหว่างการคัดเลือกและการผสมพันธุ์ได้ดีกว่า เทคนิคที่ว่านี้ได้แก่ การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping)

Cheng (1997) กล่าวว่า ลักษณะต่างๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจนั้นล้วนแล้วแต่ถูกควบคุมด้วยยีนแทบทั้งสิ้น ดังนั้นการสร้างแผนที่ยีนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง และแผนที่ยีนที่ดีจะต้องบอกรายละเอียดต่างๆ บนโครโมโซมได้อย่างครบถ้วน เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เทคนิคที่นำมาช่วยในการสร้างแผนที่ยีนบนโครโมโซมได้อย่างรวดเร็วคือ การใช้ polymerase chain reaction (PCR) โดยเทคนิคนี้จะเป็นพื้นฐานที่สามารถใช้งานได้สะดวกมากในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 สัตว์และข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

เก็บรวบรวมข้อมูลพันธุ์ประวัติแพะศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กฯ ตั้งแต่ปี 2550—2557 จำนวน 508 ข้อมูล ประกอบด้วยข้อมูล เบอร์พ่อ เบอร์แม่ เบอร์ตัวสัตว์ พันธุ์ เพศ ขนาดครอก และ น้ำหนักแรกเกิด

3.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียนรุ่นพ่อแม่และรุ่นลูก รวม 67 ตัว โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ (jugular vein) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ยาว 1 หรือ 1½ นิ้ว ดูดเก็บเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือด ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.5 M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลับหลอดเบาๆให้สารและเลือดเข้ากันและแช่ไว้ในน้ำแข็งหรือตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอปั่นเก็บเม็ดเลือดขาวและสกัด DNA ต่อไป

3.3 การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดแพะที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกระหว่างเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงให้ออกจากกัน จากนั้นทำการดูดเก็บเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ที่อยู่ชั้นกลางระหว่างพลาสมากับเม็ดเลือดแดงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร เพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Goodwin et al. (2007) มีขั้นตอนและวิธีการดังนี้ ดูดเม็ดเลือดขาวปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร เติม solution No.1 (5M GuHCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5M EDTA, 99% Silicon dioxide) ปริมาตร 470 ไมโครลิตร เพื่อทำลายเยื่อหุ้มของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ดีเอ็นเอไหลออกมาพันกับ silica gel ผสมให้เข้ากันโดยการ flip เบาๆ และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที (flip หลอดทุกๆ 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว จากนั้นเติม solution No.2 (70% Ethanol and 1M NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนให้สะอาดขึ้น นำไป vortex ประมาณ 5-10 วินาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว (หากตะกอนไม่ขาวสะอาดอาจล้างซ้ำอีกครั้งแต่ไม่ควรล้างเกิน 3 ครั้ง) จากนั้นเติม solution No.3 (95% Ethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเร็วขึ้น นำไป vortex ประมาณ 5-10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้

เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว จากนั้นผึ่งตะกอนทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 40 นาที หลังตะกอนแห้งแล้ว เติม TE buffer (10 mM tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือ ต้มข้ามคืน (overnight) จากนั้นนำมา vortex 5 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสของสารละลายดีเอ็นเอใส่ในหลอดใหม่ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจสอบ genomic DNA ต่อไป

3.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

ก่อนนำ genomic DNA มาใช้งานควรตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ genomic DNA โดยการนำ genomic DNA ที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ 1X loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมบนแผ่น 0.8% agarose gel ซึ่งเป็นตัวกลางในการแยกขนาดดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 0.5 TAE ผ่านสนามไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เทียบขนาด genomic DNA ที่ได้กับ λ DNA/*Hind* III เมื่อครบกำหนดเวลานำ 0.8% agarose gel ไปย้อมด้วย gel star (Gel star INC. NY) นาน 5 นาที และดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ด้วย Gel Documentation System (Lab Focus, INC) โดยแถบดีเอ็นเอมีความเข้มคมชัด แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ ไม่มีโปรตีนปนเปื้อน ส่วนแถบดีเอ็นเอไม่มีความเข้มและแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่ชัดเจน แสดงถึงปริมาณ genomic DNA ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยและมีโปรตีนปนเปื้อน หากมีการปนเปื้อนของโปรตีนจะต้องเริ่มขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนใหม่อีกครั้งเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาด เมื่อได้ genomic DNA ที่ต้องการแล้วก่อนนำไปเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอควรนำไปปรับปริมาตรเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ต่อไป

3.5 ตรวจหาอุณหภูมิ annealing ของ primer และการเพิ่มปริมาณ DNA

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ยีนที่เคยมีรายงานไว้แล้วว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดครอกในแกะ และและแพะ ก่อนใช้จึงต้องมีการตรวจหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับ primer ที่คัดเลือกมาเพื่อให้ primer สามารถเกาะบริเวณ DNA template เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ต้องการได้ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตำแหน่ง ลำดับเบสของไพรเมอร์ เอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนที่นำมาศึกษาลักษณะขนาดครอก

	Primer	Enzyme	References
BMPR-IB	5'-GTCGCTATGGGGAAGTTTGGATG-3'	*Ava* II	Chu et al. (2007)
	5'-CAAGATGTTTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'		
MP-15	5'-CACTGTCTTCTTGTTACTGTATTTCAATGAGAC-3'	*Hin*f I	Chu et al. (2007)
	5'-GATGCAATACTGCCTGCTTG-3'		

3.6 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วนยีนโดยใช้เทคนิค PCR ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดแพะที่มีความเข้ม 50 ng/μl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR-buffer with $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, dNTPs (1.0 mM/each) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, primer forward และ primer reward ดังตารางที่ 3.1 อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 5 U/μl Taq DNA Polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 ไมโครลิตร โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ รายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 45 วินาที primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ final extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนยีนแล้วทำการเก็บรักษา PCR-product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบชิ้นยีนที่ต้องการต่อไป

3.7 ตรวจสอบ PCR-product ด้วย agarose gel electrophoresis

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนยีนที่ต้องการแล้วทำการตรวจสอบ PCR-product ด้วย 2% agarose gel โดยใช้ PCR-product ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันกับ 1X loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตรหยอดลงหลุมบนแผ่น 2% agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่น 2% agarose gel ที่ได้ไปย้อมด้วย Gelstar (Gelstar INC.NY) นานประมาณ 5-10 นาที บันทึกภาพแถบ DNA ภายใต้แสง UV เมื่อได้ PCR-product แล้วเก็บรักษา PCR-product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

3.8 ย่อย PCR-product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนด้วยเทคนิค PCR-RFLP หลังจากได้ผลผลิตพีซีอาร์ จากนั้นย่อย PCR-product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของแต่ละยีนดังต่อไปนี้ ยีน *BMPR-IB* และ *MP-15* ย่อยด้วยเอนไซม์ *Ava* II *และ Hin*f I *ตามลำดับ* ด้วยอุณหภูมิ ที่เหมาะสมอุ่นทิ้งไว้ข้ามคืนใน water bath จากนั้นจึงตรวจรูปแบบ

จีโนไทป์ของยีนด้วย 2% agarose gel บันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใต้แสง UV และวิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์ที่เกิดขึ้น

3.9 วิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของแต่ละยีนกับลักษณะขนาดครอกใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏของลักษณะขนาดครอกโดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

3.9.1 วิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และอัลลีล

เพื่อตรวจสอบการกระจายตัวของรูปแบบจีโนไทป์ของแต่ละยีนในแพะ โดยนำข้อมูลการปรากฏรูปแบบจีโนไทป์ของแต่ละยีนมาคำนวณถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลตามวิธีการของ Falconer and Mackay (1996) โดยใช้สูตร

$$\mathrm{P}_i = \frac{\sum n_i}{N}$$

เมื่อ P_i = ความถี่จีโนไทป์ที่ i, n_i = จำนวนจีโนไทป์ที่ i และ N = จำนวนสัตว์ทั้งหมด

3.9.2 ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium

ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium เพื่อดูการกระจายตัวของแต่ละยีนด้วย Chi-square test (χ^2)

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

เมื่อ O_i = จำนวนสัตว์แต่ละจีโนไทป์ที่พบในประชากร, n = จำนวนจีโนไทป์ของแต่ละยีนที่พบ และ E_i = จำนวนสัตว์ที่คาดว่าจะพบตามกฎของ Hardy-Weinberg

3.10 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการทางสถิติ

3.10.1 โครงสร้างของข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย หมายเลขประจำตัวสัตว์ พันธุ์ หมายเลขประจำตัวพ่อพันธุ์ หมายเลขประจำตัวแม่พันธุ์ ขนาดครอกเมื่อแรกเกิด น้ำหนักแรกเกิด และเพศ

3.10.2 วิเคราะห์หาปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะขนาดครอก

ทดสอบอิทธิพลของปัจจัยคงที่ (fixed effect) ที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อค่าสังเกตของลักษณะที่ศึกษา ในโปรแกรม SAS (1998) ด้วยคำสั่ง PROC MIXED โดยใช้ข้อมูล พันธุ์ เพศ ลำดับการคลอด ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญต่อการเกิดลูกแฝดในแพะ มีรูปแบบโมเดลการวิเคราะห์ดังนี้

$Y_{ijk}lm = \mu + b_i + s_j + p_k + a_l + e_{ijklm}$ เมื่อ Y_{ijklm} คือค่าสังเกตขนาดครอก μ คือค่าเฉลี่ย b_i คืออิทธิพลเนื่องจากพันธุ์ s_j คืออิทธิพลเนื่องจากเพศ p_k คืออิทธิพลเนื่องจากลำดับการคลอด a_l คืออิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์ที่ n และ e_{ijklm} คือ ความคลาดเคลื่อน

3.10.3 วิเคราะห์หาปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะน้ำหนักแรกเกิด

ทดสอบอิทธิพลของปัจจัยคงที่ ที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อค่าสังเกตของลักษณะที่ศึกษา ในโปรแกรม SAS (1998) ด้วยคำสั่ง PROC MIXED ข้อมูลที่ใช้ได้แก่ พันธุ์ เพศ ขนาดครอกเมื่อแรกเกิด ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญต่อการน้ำหนักแรกเกิดในแพะ มีรูปแบบโมเดลการวิเคราะห์ดังนี้

$Y_{ijklm} = \mu + b_i + s_j + l_k + a_l + e_{ijklm}$ เมื่อ Y_{ijklm} คือค่าสังเกตขนาดครอก μ คือค่าเฉลี่ย b_i คืออิทธิพลเนื่องจากพันธุ์ s_j คืออิทธิพลเนื่องจากเพศ l_k คืออิทธิพลเนื่องจากขนาดครอก a_l คืออิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์ที่ n และ e_{ijklm} คือ ความคลาดเคลื่อน

3.10.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง genetic marker กับลักษณะขนาดครอก

1) วิธีการ General Linear Model (GLM)

เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ต่อลักษณะจำนวนลูกต่อครอกและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะด้วยวิธี least significant difference

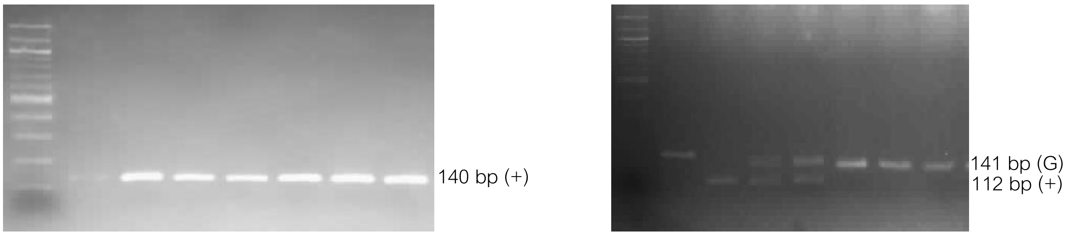
$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$ เมื่อ Y_{ij} คือค่าสังเกตขนาดครอก เมื่อ μ คือค่าเฉลี่ย G_i คืออิทธิพลของจีโนไทป์แต่ละยีน และ e_{ij} คือความคลาดเคลื่อน ซึ่งมีสมมติฐานคือ รูปแบบจีโนไทป์มีอิทธิพลต่อลักษณะขนาดครอกในแพะ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของยีน

BMPR–IB ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII* ดังแสดงในภาพที่ 4.1 สอดคล้องกับ Gazooei et al. (2013) ซึ่งศึกษาในแพะ Rayini แต่ต่างจาก Wilson et al. (2001) และ Chu et al. (2007) ศึกษาในแกะ Booroola และพบความหลากหลายของยีนดังกล่าว ผลที่ต่างกันอาจเพราะความหลากหลายของตำแหน่ง *BMPR–IB* ที่ศึกษาอาจจำเพาะกับแกะ ส่วน *BMP–15* พบว่าสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *HinfI* (ภาพที่ 2)



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.1 (ก) *BMPR–IB* ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII* และ (ข)*รูปแบบ BMP–15* ตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI*

ผลจากย่อย *BMPR–IB* ด้วยเอนไซม์ *AvaII* ต่างจากการรายงานของจาก Chu et al. (2007) รายงานว่าแกะ Small Tailed Han มีความถี่จีโนไทป์ BB สูงสุด ส่วนการย่อย *BMP–15* ด้วยเอนไซม์ *HinfI* พบว่าแพะลูกผสมที่ศึกษาส่วนมากมีรูปแบบ GG ต่างจาก Chu et al. (2007) และ Deldar–Tajangookeh et al. (2009) ซึ่งไม่พบรูปแบบ GG ในแกะ Small Tailed Han และแพะ Iranian ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสามารถสรุปความถี่จีโนไทป์ และอัลลีลในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย–แองโกลนูเบียน ได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1. ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของ *BMPR–IB* และ*BMP–15*

Loci	N	Genotype frequency			Gene frequency	
		++	B+	BB	+	B
BMPR–IB	67	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00
		++	G+	GG	+	G
BMP–15	65	0.05	0.06	0.89	0.08	0.92

จากตารางที่ 4.1 พบจีโนไทป์ของ *BMPR–IB* เพียงรูปแบบเดียว คือ ++ ส่วน *BMP–15* แม้ว่าพบ 3 จีโนไทป์ แต่ ++ และ G+ มีความถี่ต่ำ คือ 0.05 และ 0.06 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบสมดุล Hardy-Weinberg พบว่าทั้ง 2 ยีนไม่อยู่ภาวะสมดุล เพราะมีความแตกต่างกันระหว่างความถี่จีโนไทป์สูง ทั้งนี้อาจถูกกระทบจากการกลายยีน หรือการคัดเลือก

4.2 ปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะน้ำหนักแรกเกิด

จากการรวบรวมข้อมูลพันธุ์ประวัติแพะศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กฯ ตั้งแต่ปี 2550–2557 จำนวน 508 ข้อมูล เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยคงที่ (fixed effect) ต่อลักษณะน้ำหนักแรกเกิดในแพะ เนื่องจากภายในศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กฯมีแพะลูกผสมหลายระดับเลือด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักแรกเกิดในแพะ ได้แก่ พันธุ์ เพศ และขนาดครอก สามารถสรุปได้ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า least square means (Lsmean) ของพันธุ์ เพศ และขนาดครอก ต่อน้ำหนักแรกเกิดแพะ

	Lsmean[2]	P-value
พันธุ์[1]		0.003
25AN75TN	2.04BC	
50B25TN25AN	2.41A	
50TN50AN	2.14AB	
50TN50B	2.24AB	
TN	1.83C	
เพศ		0.0027
เมีย	2.007648B	
ผู้	2.254444A	
ขนาดครอก		0.007
1	2.368064A	
2	2.122543B	
3	1.902531B	

[1]AN คือ แองโกลนูเบียน, TN คือ พื้นเมืองไทย และ B คือ บอร์

[2] A,B ที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีความสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

จากตารางที่ 4.2 สามารถสรุปได้ว่าแพะลูกผสม 50B25TN25AN 50TN50AN และ 50TN50B มีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าแพะพื้นเมืองไทย (P<0.01) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า หากต้องการแพะลูกผสมพื้นเมืองไทยที่มีน้ำหนักแรกเกิดสูง ควรจะมีระดับเลือดของแพะพื้นเมืองไทยไม่เกิน 50%

อิทธิพลจากเนื่องจากเพศส่งผลให้แพะเพศผู้มีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าแพะเพศเมีย (P<0.01) และลูกแพะที่มีขนาดครอก 1 ตัว มีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าลูกแพะที่มีขนาดครอก 2 และ 3 (P<0.01) สอดคล้องกับ Meza-Herrera et al. (2014) ซึ่งรายงานว่าแพะที่มีขนาดครอก 1 ตัวมีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าลูกแพะที่มีขนาดครอก 2 และ 3 ตามลำดับ (P<0.01)

4.3 ปัจจัยคงที่ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะขนาดครอก

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อขนาดครอกในแพะ ได้แก่ พันธุ์ และเพศสามารถสรุปได้ตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า least square means (Lsmean) ของพันธุ์ และเพศ ต่อขนาดครอกของแพะ

	Lsmean[2]	P-value
พันธุ์[1]		0.0185
25AN75TN	1.87b	
50B25TN25AN	1.57b	
50TN50AN	1.59b	
50TN50B	1.94a	
TN	1.91a	
เพศ		0.0028
เมีย	1.92A	
ผู้	1.6B	

[1]AN คือ แองโกลนูเบียน, TN คือ พื้นเมืองไทย และ B คือ บอร์

[2] A,B ที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีความสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

a,b ที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีความสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

จากตารางที่ 4.3 สามารถสรุปได้ว่าแพะลูกผสม 50TN50B และแพะพื้นเมืองไทย มีอัตราการเกิดลูกแฝดได้สูงกว่าแพะลูกผสม 25AN75TN 50B25TN25AN และ50TN50AN (P<0.05) รวมทั้งลูกเพศเมียมีโอกาสเกิดเป็นลูกแฝดได้สูงกว่ากว่าแพะเพศผู้ (P<0.01) สอดคล้องกับ อภิชาติ และคณะ (2544) รายงานว่าแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน 50 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดครอก (1.69) ซึ่งต่ำกว่าแพะพื้นเมืองไทย (1.76)

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ต่อขนาดครอกมีรายงานว่า นูเบียน (Nubian) มีขนาดครอกสูงกว่า กรานาดา (Granadina) สูงกว่า ทอกเก็นเบอร์ก (Toggenburg) และสูงกว่า ซาเนน (Saanen) และ อัลไพน์ (Alpine) ตามลำดับ (P<0.01) (Meza-Herrera et al., 2014)

4.4 ความสัมพันธ์ของ genetic markers กับลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง เพศ ลำดับการคลอด และรูปแบบจีโนไทป์ต่อลักษณะขนาดครอก โดยไม่นำจีโนไทป์ของ *BMPR-IB* มาร่วมวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เนื่องจากเจอเพียง 1 จีโนไทป์ คือ ++ ซึ่งไม่สามารถย่อยด้วยเอนไซม์ *AvaII* ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกับลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียนกับยีน *BMP–15* สามารถแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า least square means (Lsmean) ของ เพศ ลำดับการคลอด และรูปแบบจีโนไทป์ของ *BMP–15* ต่อลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน

	Lsmean	P-value
เพศ		0.272
เมีย	1.48	
ผู้	1.21	
ลำดับการคลอด		0.904
1	1.43	
2	1.42	
3	1.49	
4	1.61	
5	1.42	
6	1.09	
7	0.94	
จีโนไทป์ *BMP–15*		0.3730
++	1.07	
G+	1.43	
GG	1.54	

จากตารางที่ 4.4 ไม่พบอิทธิพลของเพศและลำดับการคลอดต่อขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากปัจจัยดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อขนาดครอก หรืออาจเกิดเนื่องจากจำนวนบันทึกที่น้อย ซึ่งหากมีจำนวนบันทึกที่ละเอียด และหลายบันทึกอาจช่วยให้พบปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อต่อขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียนได้

การที่ *BMP–15* ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียนสอดคล้องกับการรายงานของ แสนศักดิ์ และคณะ (2550) ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรของ *BMP–15* กับลักษณะขนาดครอกในแพะพื้นเมืองภาคใต้ ทั้งนี้อาจเกิดจาก *BMP–15* ไม่มีอัลลีลที่มีอิทธิพลต่อขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน สอดคล้องกับบางการศึกษา

ในแกะซึ่งมีรายงานว่า *BMP–15* มีผลต่อการให้ลูก หรืออาจเกิดจากอิทธิพลของยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรมอื่น หรืออาจเกิดอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมและการจัดการ

บทที่ 5

บทสรุป

ไม่พบความหลากหลายของของยีน *BMPR-IB* และไม่พบอิทธิพลของ *BMP–15* ต่อขนาดครอกในแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย—แองโกลนูเบียน โดยขนาดครอกในแพะภายในศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กฯ ได้รับอิทธิพลจาก พันธุ์ และเพศ แต่ปัจจัยคงที่ดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อแพะลูกผสมพื้นเมืองไทย-แองโกลนูเบียน ดังนั้นอาจต้องหาเครื่องหมายพันธุกรรมอื่น หรือการจัดการสิ่งแวดล้อมควบคู่เพื่อเพิ่มขนาดครอก

เอกสารอ้างอิง

กองบำรุงพันธุ์สัตว์.2553.พันธุ์สัตว์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์.พิมพ์ครั้งที่ 1 . กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์ชุมนุนสหกรณ์การเกษตรแห้งประเทศไทย จำกัด. น. 39-44

เกรียงศักดิ์ ปัทมเรขา จิตผกา ธนปัญญารัชวงศ์ สมเกียรติ สายธนู และภูวดล สาลีเกษตร. 2539.รายงานการวิจัย เรื่อง อิทธิพลของโครงสร้างทางสังคมและสถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีต่อการกระจายและการยอมรับวิธีการปฏิบัติในการเลี้ยงแพะ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , สงขลา.

เถลิงศักดิ์ อังกุรเศรณี ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ และอภิชาติ หล่อเพชร. 2554. รายงานผลการวิจัย เรื่อง การประมาณค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะการให้ผลผลิตในแพะพื้นเมืองไทย ลูกผสมพื้นเมือง ลูกผสมพื้นเมืองไทยxแองโกลนูเบียน และลูกผสมพื้นเมืองไทยxแองโกลนูเบียนxบอร์ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมธาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชำรง ทองจำรูญ สมควร ทองปราง สุรศักดิ์ คชภักดี และสุรพล ชลดำรงกุล. 2544. อิทธิพลของลำดับครอกและอัตราการให้ลูกแฝดของแพะพันธุ์พื้นเมืองไทย พันธุ์แองโกลนูเบียน พันธุ์ซาเนน พันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน และพันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง-ซาเนน ที่เลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์ยะลา. ผลงานการวิจัยการผลิตแพะ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

มงคล เทพรัตน์ มนต์ชัย ดวงจินดา และสมเกียรติ สายธน. 2553. กลยุทธ์การปรับปรุงพันธุ์แพะของประเทศไทยเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน แก่นเกษตร. 38: 395-408.

สมเกียรติ สายธนู วินัย ประลมพ์กาญจน์ และสุรศักดิ์ คชภักดี. 2544. อัตราการคลอดลูกและอัตราการให้ลูกแฝดของแม่แพะพื้นเมืองไทยและลูกผสมแองโกลนูเบียน.ผลงานการวิจัยการผลิตแพะ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สมเกียรติ กลิ่นเกลี้ยง. 2548. การลงทุนทำฟาร์มเลี้ยงแพะเนื้อในอำเภอชะอำจังหวัดเพชรบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

แสนศักดิ์ นาคะวิสุทธิ์ กมล ฉวีวรรณ จิรพรรณ นพวงศ์ ณ อยุทธยา และสุวิทย์ อโนทัยสินทวี. 2550. การศึกษายีน BMP15 และการให้ลูกดกในแพะพื้นเมืองภาคใต้. วารสารวิชาการสำนักปรับปรุงพันธุ์สัตว์. 50:206-162.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ แกะรายเขตปศุสัตว์. http://ict.dld.go.th/th2/images/stories/stat_web/yearly/2558/7.goatsheep_region.pdf

อภิชาติ หล่อเพชร สุรศักดิ์ คชภักดี สุรพล ชลดำรงค์กุล และสมเกียรติ สายธนู. 2544. อัตราการคลอดลูกและอัตราการให้ลูกแฝดของแม่แพะพันธุ์พื้นเมืองไทยและ, ลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน. ผลงานการวิจัยการผลิตแพะ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Cheng, H. H., I. Levin, R. L. Vallejo, H. Khatib, J. J. Dodgson, L. B. Crittenden, and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with marker of high utility. Poult. Sci 74:1855-1874

Chu, M. X., Z. H. Liu, C. L. Jiao, Y. Q. He, L. Fang, S. C. Ye, G. H. Chen, and J. Y. Wang. 2007. Mutations in *BMPR-IB* and *BMP-15* genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). J. Anim. Sci. 85: 598–603.

Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. An introduction to forensic genetics. John Wiley and Sons Ltd, Oxford.

Crooijmans, R. P. M. A., A. B. F. Groen, A. J. Van Kampen, S. V. D. Beek, J. J Van der Poelj and M. A. M. Groenen. 1996a. Microsatllites polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pools blood sample. Poult. Sci. 75:904-909.

Deldar–Tajangookeh, H., A. Z. Shahneh, M. J. Zamiri, M. Daliri, H. Kohram, and A. Nejati–Javaremi. 2009. Study of BMP–15 gene polymorphism in Iranian goats. Afr. J. Biotechnol. 8: 2929–2932.

Gazooei, Y.M., A. Niazi, and M.J. Zamiri. 2013. Single nucleotide polymorphism analysis of the bone morphogenetic receptor IB and growth and differentiation factor 9 genes in Rayini goats (Capra hircus). J. Lives. Sci.Technol. 1: 45-50.

Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. An introduction to forensic genetics. John Wiley and Sons Ltd, Oxford.

Lima, I. M. T., I. R. Brito, R. Rossetto, A. B. G. Duarte, G. Q. Rodrigues, M. V. A. Saraiva, J. J. N. Costa, M. A. M. Donato, C. A. Peixoto, J. R. V. Silva, J. R. de Figueiredo, and A. P. R. Rodrigues. 2012. BMPRIB and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. Cell Tissue Res. 348:225–238.

Liu, B. H., 1998. Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press LLC, Florida.

Meza-Herrera, C.A., J.M. Serradilla, M.E. Munoz-Mejias, F. Baena-Manzano, and A. Menendez-Buxadera. 2014. Effect of breed and some environmental factors on bodyweights till weaning and litter size in five goat breeds in Mexico. Small Ruminant Research. 121: 215-219.

Nie, Q., M. Fang, L. Xie, M. Zhou, Z. Liang, Z. Luo, G. Wang, W. Bi, C. Liang, W. Zhang, and X. Zhang. 2008. The *PIT1* gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. BMC Genet. 9:20.

Wang, P., Q. Xu, X. Lan, Z. Li, M. Li, X Fang, M. Li, and H. Chen. 2011a. A novel EcoRII PCR-RFLP detecting genetic variation of goat *NF1-C2* gene and its association with milk yield. Archiv Tierzucht. 54:224-226.

Wang Y., L. Yuanxiao, Z. Nana, W. Zhanbin, and B. Junyan. 2011b. Polymorphism of exon 2 of BMP15 gene and its relationship with litter size of two Chinese goats. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 7: 905–911.

Wattanachant, C. 2008. Goat Production in Thailand. In Proceedings of the International Seminar on Production Increases in Meat and Dairy Goats by Incremental Improvements in Technology and Infrastructure for Small-scale Farmers in Asia held at Ciawi, Bogor, Indonesia in August 4-8, 2008, pp. 84-104.

Wilson, T., X. Wu, J. L. Juengel, I. K. Ross, J. M. Lumsden, E. A. Lord,K. G. Dodds, G. A. Walling, J. C. McEwan, A. R. O'Connell, K. P. McNatty,and G. W. Montgomery.2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK–6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. Biol. Reprod. 64: 1225–1235.