บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

ทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และแปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน สิงหาคม 2544 ถึงเดือน กรกฎาคม 2546 การศึกษาประกอบด้วย 3 การทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> วัดปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจากลักษณะทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาบางประการในประชากรรุ่นลูกของเชื้อพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 ของเกษตรหนึ่งรายจากจังหวัดกาญจนบุรี

ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย มีรายละเอียดดังนี้

<u>การทดลองที่ 1.1</u> วัดปริมาณความแปรปรวนของลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาบางประการในประชากรรุ่นลูกของเชื้อพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 ของเกษตร ที่มีประชากรของข้าววัชพืชระบาดในนา

เมล็ดพันธุ์ข้าว

ใช้ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 จากแปลงของเกษตรกรที่เกิดปัญหาข้าววัชพืชระบาดในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี โดยมีเมล็ดพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 พันธุ์คัดจากศูนย์วิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

วิธีการทดลอง

ทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และแปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน สิงหาคม 2544 ถึงเดือน มกราคม 2545 นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาเพาะกล้าในแปลงโดยการหว่านเมล็ดข้าวทั้งหมด เมื่อถึงระยะ 30 วันหลังหว่านกล้าสุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นกล้าแยกต้นจำนวน 20 ต้น โดยเก็บตัวอย่างใบในซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำตัวอย่างใบแห้งที่ได้เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) จากนั้นนำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค Microsatellite marker โดยใช้ไพร์เมอร์ RM 1 (รายละเอียดของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้แสดงไว้ในการทดลองที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนต้นกล้าที่เหลือ ย้ายปักดำในแปลงนา ใช้ระยะปลูก 25x25 ซม.^{2} ปลูกในพื้นที่ขนาด 20x30 ม.^{2} ปักดำ 1 ต้น/หลุม เก็บข้อมูลโดยการสุ่มเป็นพื้นที่ขนาด 1x1.25 ม.^{2} จำนวนทั้งหมด 13 จุด แต่ละจุดจะมีต้นข้าว 20 ต้น โดยมีข้าวพันธุ์คัดจากสถาบันวิจัยข้าว เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกลักษณะแยกแต่ละต้น โดยแบ่งการบันทึกเป็น 2 ประเภท โดยบันทึกตามแบบบันทึกที่ปรับปรุงจากแบบบันทึกลักษณะข้าวป่าศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (สงกรานต์, 2538) คือ

<u>ลักษณะทางคุณภาพ</u>

ในระยะออกรวงบันทึกลักษณะ

สีของยอดดอก 1 = ขาว 2 = ฟาง 3 = น้ำตาล 4 = แดง 5 = ชมพู 6 = ม่วง 7 = ดำ X = สีอื่น ๆ

สีของข้อต่อใบ 1 = เขียวอ่อน 2 = เขียว X = สีอื่น ๆ

สีของกาบใบ 1 = เขียว 2 = เขียวเส้นม่วง 3 = ม่วงอ่อน 4 = ม่วง X = สีอื่น ๆ

สีของแผ่นใบ 1 = เขียวจาง 2 = เขียว 3 = เขียวเข้ม 4 = ม่วงที่ปลาย 5 = ม่วงที่ริม 6 = ม่วงผสมเขียว 7 = ม่วงทั้งใบ X = สีอื่น ๆ

สีของปล้อง 1 = เขียว 2 = เหลืองอ่อน 3 = เขียวเส้นม่วง 4 = ม่วง X = สีอื่น ๆ

สีของเขี้ยวใบ 1 = เขียว 2 = เส้นม่วง 3 = ม่วง X = สีอื่น ๆ

สีของลิ้นใบ 1 = ขาว 2 = เส้นม่วง 3 = ม่วง X = สีอื่น ๆ

สีของยอดเกสรตัวเมีย 1 = ขาว 2 = เขียวอ่อน 3 = เหลือง 4 = ม่วงอ่อน 5 = ม่วงดำ X = สีอื่น ๆ

ทรงกอ 1 = กอตั้ง 3 = กอแบะ 5 = กอแผ่ 7 = กอแผ่มาก 9 = แผ่เป็นแนวนอน

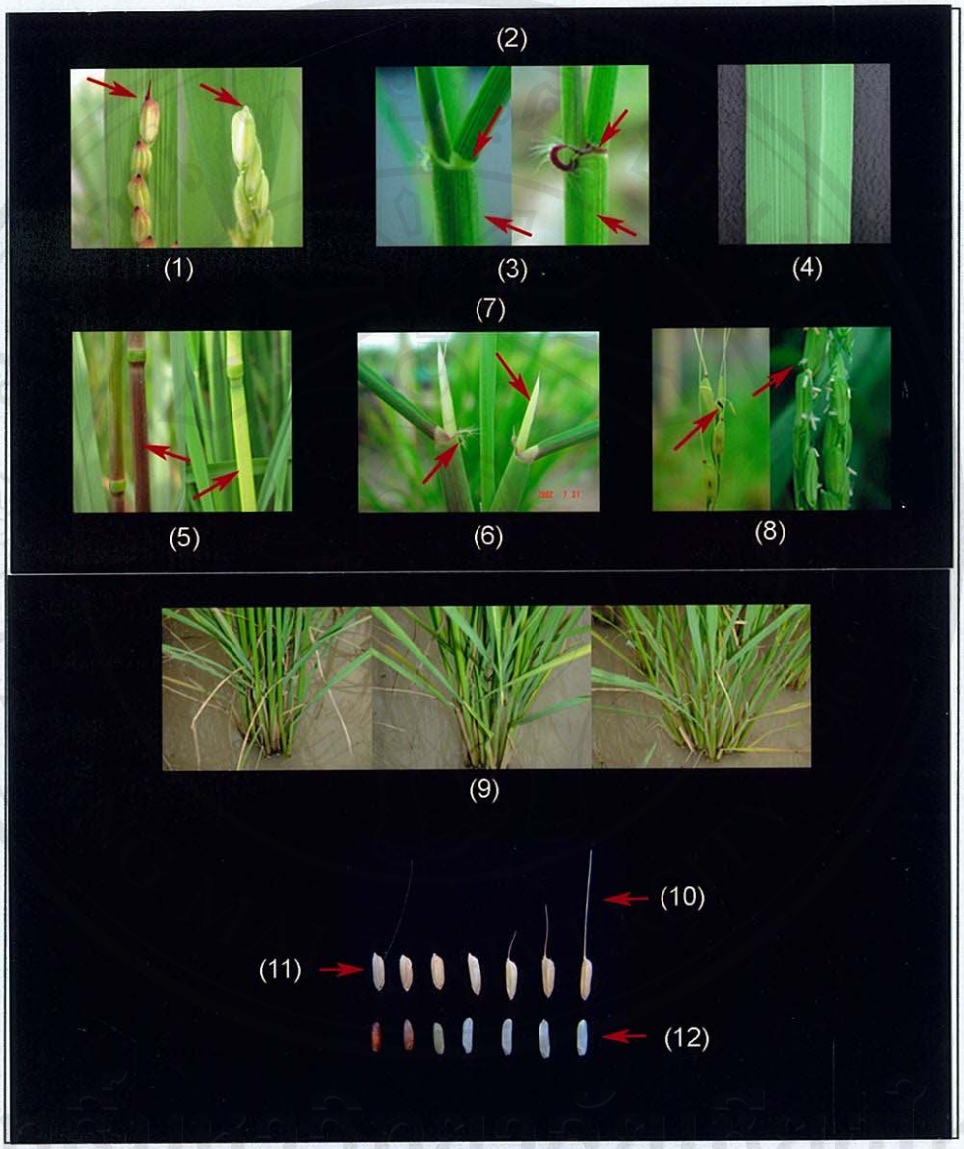
หางข้าว 1 = ไม่มี 2 = มี

ในระยะเก็บเกี่ยวบันทึกลักษณะ

สีของเปลือกเมล็ด 0 = ฟาง 1 = เหลือง 2 = ฟางกระน้ำตาล 3 = ฟางขีดน้ำตาล 4 = น้ำตาล 5 = ม่วงอ่อน 6 = ฟางกระม่วง 7 = ฟางขีดดำ 8 = ม่วง 9 = ดำ X = สีอื่น ๆ

สีของเยื่อหุ้มเมล็ด 1 = ขาว 2 = น้ำตาลอ่อน 3 = น้ำตาลมัน 4 = น้ำตาลเข้ม 5 = แดง 6 = ม่วงอ่อน 7 = ม่วงดำ X = สีอื่น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ตัวอย่างภาพของลักษณะทางคุณภาพที่ใช้ในการประเมิน โดย (1) = สียอดดอก (2) = สีข้อต่อใบ (3) = สีกาบใบ (4) = สีแผ่นใบ (5) = สีปล้อง (6) = สีเขี้ยวใบ (7) = สีลิ้นใบ (8) = สียอดเกสรตัวเมีย (9) = ทรงกอ (10) = หางข้าว (11) = สีเปลือกเมล็ด (12) = สีเยื่อหุ้มเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะทางปริมาณ

ในระยะออกรวงบันทึกลักษณะ อายุออกดอก (วัน) และในระยะเก็บเกี่ยวบันทึกลักษณะความสูงถึงคอรวง (เซนติเมตร) จำนวนรวง/ต้น และแต่ละต้นสุ่มวัด 2 รวง/ต้น โดยวัดความยาวรวง (เซนติเมตร) จำนวนระแง้ต่อรวง และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด หลังจากนั้นนำไปนวดรวมทั้งต้น ชั่งน้ำหนักเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม) และวัดขนาดเมล็ด โดยแยกเป็นความกว้าง ความยาวและความหนาของเมล็ดข้าวเปลือก (มิลลิเมตร) แล้วแยกเมล็ดแต่ละต้นจากแต่ละจุดเพื่อนำไปปลูกทดสอบรุ่นลูกในงานทดลองที่ 1.2

การวิเคราะห์ข้อมูล

แต่ละตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ผลหา ช่วงของการกระจายตัว (range) ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าความแปรปรวน (variance) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, %) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างกับพันธ์ตรวจสอบโดยวิธี t-test

สำหรับการพิจารณาความหลากหลายในประชากรใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and weaver, 1949 อ้างโดย Power and McSorley, 2000)

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i$$

โดยที่ s คือ จำนวนชนิดที่พบ

p_i คือ สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบว่า ค่า H' เท่ากับศูนย์ แสดงว่าทุกต้นในประชากรเหมือนกันทั้งหมด มีค่าสูงขึ้นแสดงตัวอย่างนั้นว่ามีความหลากหลายสูงขึ้น

ข้อมูลในระดับโมเลกุล ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพิจารณารูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละต้นที่เก็บมาเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของข้าวสุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 พันธุ์คัดจากศูนย์วิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร และแถบดีเอ็นเอของข้าวป่าที่อยู่ในธรรมชาติของจังหวัดกาญจนบุรี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 1.2</u> การทดสอบรุ่นลูก (progeny test) ของสายพันธุ์ข้าวจากการทดลองที่ 1.1

วิธีการทดลอง

ทดลองที่แปลงทดลองศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนเมษายน 2545 ถึงเดือนกรกฎาคม 2545 สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวที่เก็บเกี่ยวแยกเมล็ดแต่ละต้นจากแต่ละจุดในงานทดลองที่ 1.1 จำนวน 103 ตัวอย่าง มาปลูกแบบต้นต่อแถว โดยเพาะแยกเมล็ดของแต่ละต้น ในตะกร้าขนาด 20 x 40 ซม.^{2} เมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ย้ายปักดำในแปลง ต้นกล้าจากต้นพ่อแม่แต่ละต้นจะปักดำแบบ 1 ต้นต่อหลุม จำนวน 1 แถว แถวละ 15 ต้น ใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 25 ซม. และระยะระหว่างแถว 25 ซม. จำนวน 2 ซ้ำ โดยมีข้าวพันธุ์ดีจากสถาบันวิจัยข้าว เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

การบันทึกข้อมูล

โดยแต่ละแถวบันทึกอายุออกดอกเมื่อมีจำนวนต้นข้าวภายในแถวออกดอกแล้ว 50% ของจำนวนต้นข้าวทั้งหมดภายในแถว ส่วนลักษณะอื่น ๆ นั้นในแต่ละแถวจะสุ่มวัดจำนวน 5 ต้น บันทึกลักษณะต่าง ๆ และวิเคราะห์ข้อมูลเหมือนในการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ข้อมูล

แต่ละตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ผลหา ช่วงของการกระจายตัว (range) ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าความแปรปรวน (variance) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, %) และค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์กับพันธ์ตรวจสอบโดยวิธี t-test

<u>การทดลองที่ 2</u> วัดปริมาณความหลากหลายในเชื้อพันธุ์ข้าวของเกษตรกรจำนวน 16 ตัวอย่าง ที่ปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 และมีประชากรข้าววัชพืชระบาดในแปลง จากจังหวัดกาญจนบุรี ในฤดูนาปี 2545 และนาปรัง 2545/46 แบ่งเป็น

เมล็ดพันธุ์ข้าว (นาปี 45)

1. พันธุ์ชัยนาท 1 (CNT 1) จากเกษตรกรจำนวน 4 ราย
2. พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR 1) จากเกษตรกรจำนวน 2 ราย

เมล็ดพันธุ์ข้าว (นาปรัง 46)

1. พันธุ์ชัยนาท 1 (CNT 1) จากเกษตรกรจำนวน 4 ราย
2. พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR 1) จากเกษตรกรจำนวน 6 ราย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งที่มาของเชื้อพันธุ์ และรายชื่อเกษตรกรเจ้าของเชื้อพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 ฤดูที่เก็บเชื้อพันธุ์ และรายชื่อเกษตรกรเจ้าของเชื้อพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการทดลองที่ 2 จำนวน 16 ตัวอย่าง

พันธุ์และฤดูที่เก็บ	รายชื่อเกษตรกร
<u>จากฤดูนาปี 2545</u>	
สุพรรณบุรี 1	
เกษตรกร 1	นายสน บุญคุ้ม
เกษตรกร 2	นางละเมียด สุจริต
ชัยนาท 1	
เกษตรกร 3	นายสำรวย เสมทับ
เกษตรกร 4	บุญยง พุทธา
เกษตรกร 5	นายสมจิตร รักสาย
เกษตรกร 6	นายบุญมา อารมณ์
<u>จากฤดูนาปรัง 2545/46</u>	
สุพรรณบุรี 1	
เกษตรกร 7	นายสำรวย เสมทับ
เกษตรกร 8	นายสน บุญคุ้ม
เกษตรกร 9	นางมาลัย รุ่งเรื่อง
เกษตรกร 10	นางละเมียด สุจริต
เกษตรกร 11	นายผลัด เสมทับ
เกษตรกร 12	นายประเสริฐ แจ่มวงษ์
ชัยนาท 1	
เกษตรกร 13	นายบุญมา อารมณ์
เกษตรกร 14	นายบุญยง พุทธา
เกษตรกร 15	นางวิชวน ปิมศาล
เกษตรกร 16	นายวิเชียร จันทร์สุข

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

ทดลองที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนเมษายน 2546 ถึงเดือน ธันวาคม 2546 แยกเพาะเมล็ดพันธุ์ของแต่ละเกษตรกรในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 ซม. เมื่อต้นกล้าอายุ 25 – 30 วัน ย้ายปักดำในกระถางซีเมนต์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 50 X 70 X 40 ซม.^{3} ปักดำทีละต้น ใช้ระยะปลูก 10 X 7 ซม.^{2} จำนวน 50 ต้นใน 1 กระถาง จำนวน 2 กระถาง รวมทั้งหมด100 ต้นโดยมีพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 และสุพรรณบุรี 1 พันธุ์คัดจากสถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกลักษณะที่เกิดความหลากหลาย คือ ในระยะออกดอก บันทึกอายุออกดอก (วัน) เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกลักษณะ ความสูงถึงคอรวงที่ระยะเก็บเกี่ยว (ซม.) สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด และการมีหางข้าว

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์เช่นเดียวกับงานทดลองแรก

<u>การทดลองที่ 3</u> ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของข้าวชนิดต่างๆ ที่พบภายในแปลงของเกษตรกรหนึ่งรายจากจังหวัดกาญจนบุรี ในระดับโมเลกุลโดยอาศัยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล Microsatellite marker

เมล็ดพันธุ์ข้าว

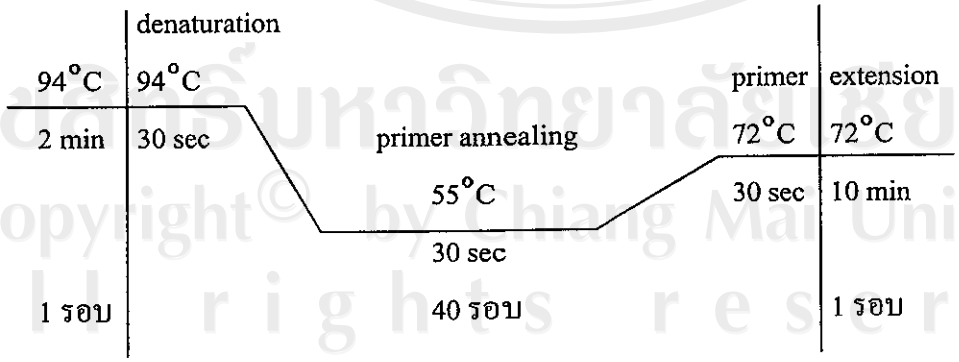
จำแนกประเภทของเมล็ดที่เก็บจากต้นข้าวในแปลงมาทดสอบ เป็น 4 ประเภท ได้แก่

1. ข้าวมีลักษณะเหมือนปลูก คือ ข้าวที่ไม่มีหาง เมื่อสุกแก่มีสีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีฟาง สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว และไม่มีการร่วงของเมล็ดร่วง (ตรงตามลักษณะพันธุ์ข้าวที่ปลูก)
2. ข้าวชนิดมีหางเหมือนข้าวป่าแต่เมล็ดไม่ร่วง คือ ข้าวที่มีหาง เมื่อสุกแก่มีสีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีฟาง สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาวหรือแดง และไม่มีการร่วงของเมล็ด
3. ข้าวชนิดมีหางเหมือนข้าวป่าและเมล็ดร่วง คือ ข้าวที่มีหางเมล็ด เมื่อสุกแก่สีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีดำหรือฟาง สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีแดง และมีการร่วงของเมล็ด
4. ข้าวแดง คือ ข้าวที่ไม่มีหางเมล็ด และเมื่อสุกแก่มีสีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางเข้ม เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีแดง และไม่มีการร่วงของเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

ทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และแปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มีนาคม 2547 ถึงเดือน กรกฎาคม 2547 นำเมล็ดข้าวประเภทละ 100 เมล็ด มาแยกเพาะในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร เมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือน ในแต่ละประเภทแยกสุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นกล้าแยกต้น ประเภทที่เป็นข้าวปลูกเก็บจำนวน 57 ต้น ส่วนข้าวประเภทอื่นเก็บประเภทละ 7 ต้น โดยเก็บตัวอย่างใบในซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำตัวอย่างใบแห้งที่ได้เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) บดตัวอย่างใบแห้งให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ โดย extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย double deionized water, 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl และ 0.4%, β-mercaptoethanol แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค Microsatellite marker โดยใช้ไพร์เมอร์ RM 1 เทคนิค PCR ทำโดยการใส่สารผสมปริมาตรประมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยdouble deionized water 15.0 ไมโครลิตร, 10X buffer 2.0 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 1.0 ไมโครลิตร, 25 mM dNTP 0.16 ไมโครลิตร, 100 µM primer, 5 unit Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร, DNA template 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่จะนำเข้าเครื่อง PCR เพื่อทำตามเงื่อนไขดังนี้



ภาพ 2 เงื่อนไขของการทำ PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 3.5% agarose gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 µl/TBE buffer 100 ml เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลในระดับโมเลกุล ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพิจารณาการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละต้นที่เก็บมาเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของข้าวสุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 พันธุ์คัดจากศูนย์วิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร และแถบดีเอ็นเอของข้าวป่าที่อยู่ในธรรมชาติของจังหวัดกาญจนบุรี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved