บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณภาพและคัดเลือกลูกผสมที่เกิดจากการผสมแบบโมโน-โมโนระหว่างเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 กับลูกผสม KDCM4 (A4)

อุปกรณ์

1. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon = เส้นใยขั้นที่ 1) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวของทั้งเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 และเห็ดลูกผสม KDCM4(A4) อย่างละ 16 สายพันธุ์
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ บีกเกอร์ ฯลฯ
4. ขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพารา (น้ำหนักสดที่ความชื้น 70%)
5. รำละเอียด
6. แมกนีเซียมซัลเฟต
7. ปูนขาว
8. ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6.5 นิ้ว x 13 นิ้ว
9. คอขวดพลาสติก
10. หม้อนึ่งความดัน
11. หม้อนึ่งลูกทุ่ง

วิธีการ

1.1. การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryons)

1. การเก็บสปอร์ นำดอกเห็ดนางรมชนิดสีเทาพันธุ์ CM5 และเห็ดลูกผสม KDCM4(A4) ตัดก้านดอกเห็ดออกให้ก้านติดดอกเล็กน้อย จากนั้นทำความสะอาดโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้ทั่วดอกเห็ด วางดอกเห็ดลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาด 15 x 14.5 เซนติเมตร โดยมีกระดาษชิ้นเล็ก ๆ เป็นรูปวงกลมกระจายอยู่ในจาน ดังภาพที่ 3 จานเลี้ยงเชื้อและกระดาษนั้นต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาจานโดยแง้มฝาจานไว้เล็กน้อย เพื่อไม่ให้ความชื้นมากเกินไป ทิ้งไว้ประมาณ 12 - 24 ชั่วโมง สปอร์เห็ดก็จะตกลงสู่กระดาษชิ้นเล็ก ๆ นั้น โดยเห็ดทั้งสองชนิดจะปฏิบัติแยกจากกัน

ภาพที่ 3 การดักสปอร์ดอกเห็ด

2. การลดความหนาแน่นของสปอร์ ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน จิ้มลงไปบนกระดาษที่มีสปอร์อยู่ ใส่กระดาษลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. ใส่ 2-3 ชิ้น เขย่าให้สปอร์หลุดจากกระดาษกระจายทั่วไปในน้ำ จากนั้นใช้ปิเปตดูดเอาน้ำละลายสปอร์มา 1 มล. ใส่ลงไปในหลอดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 ซี.ซี. เขย่าให้เข้ากัน ทำอย่างนี้อีกติดต่อกัน 3 ครั้ง รวมเป็น 4 ครั้ง ซึ่งเรียกการปฏิบัตินี้ว่า การลดความหนาแน่นของสปอร์ (อานนท์, 2530)

3. การเพาะสปอร์ ใช้ปลายเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วง หรือหลูป (loop) จุ่มลงในหลอดที่มีน้ำละลายสปอร์ครั้งสุดท้ายอยู่ น้ำละลายสปอร์จะติดที่ปลายหลูป จากนั้นนำปลายหลูปไปลากไปมาบนอาหารวุ้น พีดีเอ (potato detose agar) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง วิธีการนี้ทำในสภาพปลอดเชื้ออาหารวุ้นพีดีเอเตรียมจาก

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
ผงวุ้นทำขนม	13 - 15 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

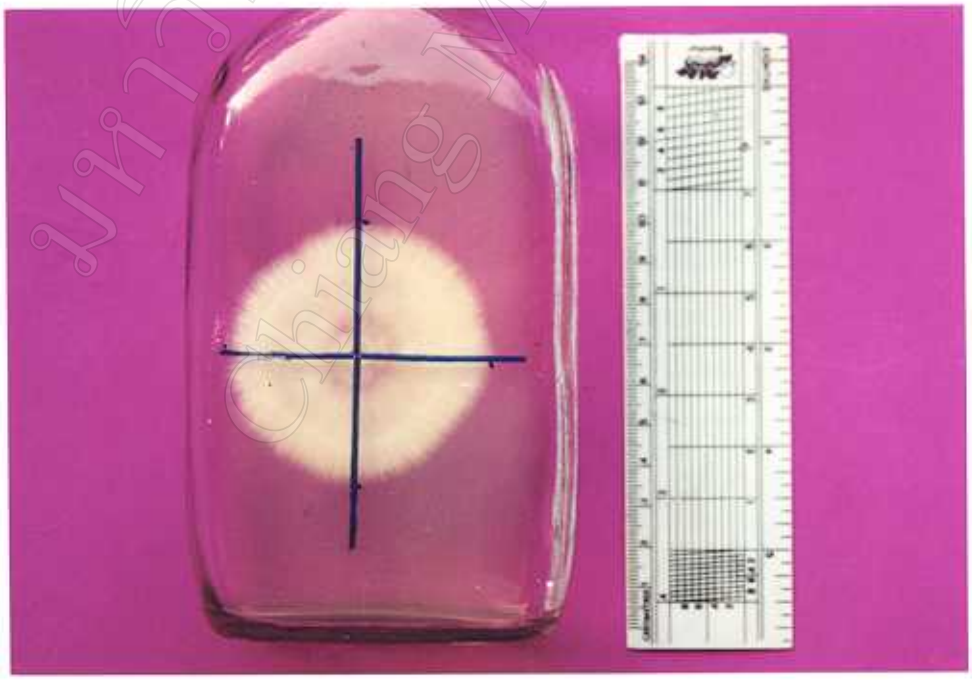
4. การแยกเส้นใยที่งอกจากสปอร์ ทิ้งไว้ประมาณ 4 - 5 วัน สปอร์จะเริ่มงอก นำสปอร์ที่งอกมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเออยู่ เพื่อให้เส้นใยเจริญเติบโตโดยเลี้ยง 2 สปอร์

ต่อ 1 หลอด ให้วางห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร ในเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 ส่วนเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) 3 สปอร์ต่อ 1 หลอด โดยวางห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร

5. การตรวจสอบเส้นใย ประมาณ 3 วัน ตรวจสอบเส้นใยที่งอกนั้นเกิดจากสปอร์เดี่ยว (monokaryons) โดยการนำเส้นใยมาย้อมสี phloxineบี ผสมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 2%

ตรวจสอบการเกิดข้อยึดระหว่างเซล ภายใต้กล้องจุทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อยึดระหว่างเซล แสดงว่าอาจเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryons) ซึ่งจากหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอที่เลี้ยงเส้นใยทั้งหมดของเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 120 หลอดหรือ 240 สปอร์ พบเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล 42 สายเชื้อ (strain) และเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) ทั้งหมด 60 หลอด หรือ 180 สปอร์ พบเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล 22 สายเชื้อ (strain)

6. การแยกเส้นใยไปเพาะในขวด ตัดเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลเพื่อนำไปวัดการเจริญของเส้นใย โดยการนำไปเพาะเลี้ยงในขวดแบนขนาดบรรจุ 375 มล. (ภาพที่ 4) การวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 จะวัดถึงวันที่ 9 และเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) จะวัดถึงวันที่ 6 นับจากวันเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล บางสายเชื้อของเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 จะเจริญเต็มขวดในวันที่ 9 และบางสายเชื้อของเห็ดลูกผสม KDCM4(A4)จะเจริญเต็มขวดในวันที่ 6 นับจากวันเลี้ยงเชื้อ

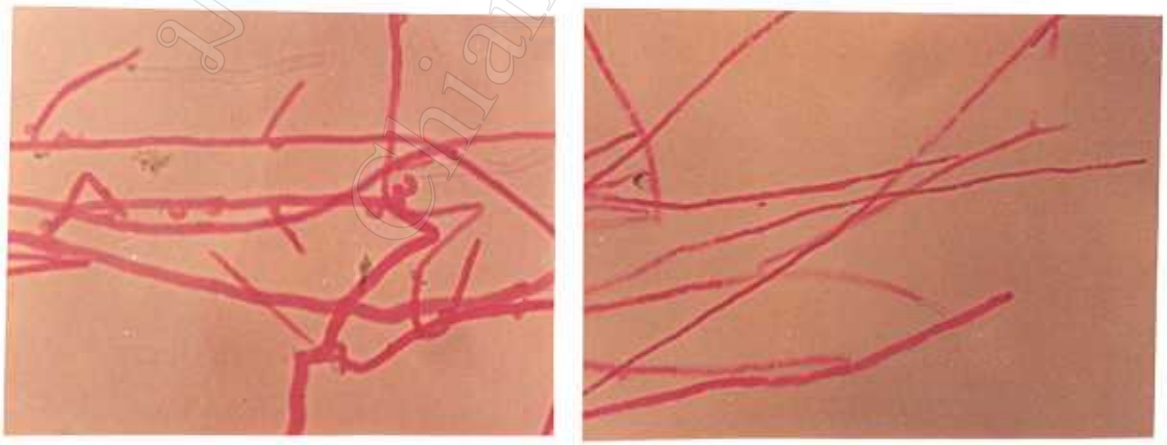


ภาพที่ 4 การวัดการเจริญของเส้นใย

7 .การวัดและการจำแนกการเจริญเติบโตของเส้นใย วัดการเจริญของเส้นใยในแต่ละขวดโดยวัด 4 จุด แล้วมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละขวด จากนั้นจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของการเจริญทั้ง 42 สายเชื้อ ในเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 และทั้ง 22 สายเชื้อในเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) หาค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation = SD) โดยคิดคำนวณแยกเห็ดทั้งสองชนิดออกจากกัน ซึ่งสามารถแบ่งการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ A คือเส้นใยเจริญเร็วมาก B คือเส้นใยเจริญเร็ว C คือเส้นใยเจริญช้า และ D คือเส้นใยเจริญช้ามาก เลือกมากลุ่มละ 4 สายเชื้อ ทั้งเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 และเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) สำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสม KDCM4(A4) ก็แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มเช่นกันได้แก่ E คือเส้นใยเจริญเร็วมาก(เหมือน A) F คือเส้นใยเจริญเร็ว G คือเส้นใยเจริญช้า และ H คือเส้นใยเจริญช้ามาก

1.2 วิธีการผสมพันธุ์

1. การผสมพันธุ์ ผสมพันธุ์เห็ดนางรมสีเทา พันธุ์ C M 5 ทั้ง 16 สายเชื้อ กับเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) ทั้ง 16 สายเชื้อ ได้คู่ผสมทั้งหมด 256 คู่ โดยผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น พีดีเอ วางคู่ผสมห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นประมาณ 5-7 วัน ก็สามารถตรวจสอบการผสมที่เข้าคู่กันได้โดยการตรวจหาข้อยึดระหว่างเซล เส้นใยที่ใช้ตรวจเอาจากบริเวณจุดต่อเชื่อมประสานระหว่างเส้นใย 2 สายเชื้อ ถ้าตรวจพบข้อยึดระหว่างเซล (ภาพที่ 5) แสดงว่าคู่ผสมนั้นเข้าคู่กันได้ ซึ่งส่วนใหญ่ผสมเข้าคู่กันสมบูรณ์ ได้สายพันธุ์ลูกผสมที่มีข้อยึดระหว่างเซลทั้งหมด 107 สายพันธุ์



ภาพที่ 5 ข้อยึดระหว่างเซลของเส้นใย ภาพขวามือเส้นใยไม่มีข้อยึดระหว่างเซล ภาพซ้ายมือเส้นใยที่มีข้อยึดระหว่างเซล

2. ตัดเส้นใยที่มีข้อยึดระหว่างเซลนี้ไปเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นพีดีเอ ต่อมาอีก 5 วัน จึงตัดเส้นใยลูกผสมของแต่ละสายพันธุ์ไปทำหัวเชื้อโดยเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง

1.3 การทดสอบคุณภาพและคัดเลือกลูกผสม

นำสายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมด 107 สายพันธุ์ ไปเพาะลงถุงที่บรรจุวัสดุเพาะ 1 สายพันธุ์ ต่อ 5 ถุง รวมทั้งหมด 535 ถุง

อุปกรณ์

1. ขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพารา (น้ำหนักสดที่ความชื้น 70%)
2. รำละเอียด
3. แมกนีเซียมซัลเฟต
4. ปูนขาว
5. ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6.5 นิ้ว x 13 นิ้ว
6. คอขวดพลาสติก
7. หม้อนึ่งความดัน
8. หม้อนึ่งลูกทุ่ง
9. หัวเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ C M 5 กับลูกผสม KDCM4 (A4) จำนวน 107 สายพันธุ์

วิธีการ

1. การผสมวัสดุเพาะเห็ด ผสมขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพาราอย่างละ 205 กิโลกรัม ใส่รำละเอียด 41 กิโลกรัม ปูนขาว 4.1 กิโลกรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.820 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันส่วนผสมต่างๆ ได้มาจากสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเห็ดนางรมของโรงปฏิบัติเห็ด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีดังนี้

ขี้เลื่อย	100 กิโลกรัม
รำละเอียด	10 กิโลกรัม
ปูนขาว	1 กิโลกรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	200 กรัม

จากนั้นเติมน้ำลงไปในส่วนผสมเพื่อปรับความชื้นให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมคลุกเคล้าให้ความชื้นกระจายสม่ำเสมอ

D = (100 - A) B/100-C

A = เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ต้องการ

B = น้ำหนักขี้เลื่อยที่ต้องการใช้ (ผสมแล้ว)

C = ความชื้นที่มีอยู่ในขี้เลื่อยเดิม

D = ขี้เลื่อยที่ต้องใช้

2. นำส่วนผสมบรรจุในถุงพลาสติก ขนาด 6.5 นิ้ว x 13 นิ้ว โดยใส่ถุงละ 850 กรัม จากนั้นอัดส่วนผสมด้วยเครื่องอัด พร้อมกับสวมคอขวดใช้ยางรัด หุ้มด้วยกระดาษใช้ยางรัด

3. ทำเครื่องหมายแต่ละสายพันธุ์ลูกผสมที่ข้างถุง

4. จากนั้นนำถุงวัสดุเพาะทั้งหมดไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่งซึ่งเป็นถังน้ำ 200 ลิตร นึ่งประมาณ 3 ชั่วโมง นับจากน้ำเดือด

5. เมื่อครบเวลาเอาถุงวัสดุเพาะออกจากถัง ทิ้งไว้ให้เย็น

6. ต่อเชื้อโดยใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์C.M.5 กับเห็ดลูกผสม KDCM4 (A4) ที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง ใส่ลงไปในถุงวัสดุเพาะ ประมาณ 5-10 เมล็ด วิธีการนี้ทำในห้องต่อเชื้อ

7. ย้ายถุงวัสดุเพาะไปบ่มในห้องบ่มเชื้อจนกว่าเชื้อจะเดินเต็มถุง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 วัน

8. เมื่อเชื้อเดินเต็มถุงแล้วย้ายถุงเพาะไปห้องเปิดดอกเห็ด

9. ภายใน 14 วัน เห็ดเริ่มเกิดดอก ให้บันทึกข้อมูล

11. พิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่ลักษณะดอกปกติ คุณภาพดี ดอกหนา เนื้อเปราะไว้ 9 สายพันธุ์

10. นำดอกเห็ดที่คัดเลือกและไปตัดเนื้อเยื่อเพื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นพีดีเอ

การบันทึกข้อมูล

1. คุณภาพของดอก ได้แก่ ลักษณะดอกปกติ รูปร่าง ความหนา ความเปราะ สีของดอก

2. จำนวนถุงวัสดุเพาะต่อสายพันธุ์ที่ดอกปกติ

3. จำนวนวันที่ออกดอกนับจากวันต่อเชื้อ (วัน)

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง 3 มีนาคม 2539 - 22 เมษายน 2539

การทดลองที่ 2 ทดสอบความสามารถในการให้ผลผลิตในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันของเห็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F1)

ทดสอบ 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน คือช่วง 30 เมษายน - 21 กรกฎาคม 2539 และ 2 มิถุนายน - 23 สิงหาคม 2539

2.1 การทดสอบในฤดูกาลที่ 1 (30 เมษายน - 21 กรกฎาคม 2539)

นำสายพันธุ์เห็ดลูกผสมที่ผ่านการทดสอบคุณภาพจำนวน 9 สายพันธุ์ จากการทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์ (RCBD) ประกอบด้วย 9 สายพันธุ์ จำนวน 6 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองใช้ถุงเห็ด 5 ถุง จำนวนทั้งหมด 270 ถุง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบบเดียวกับการทดลองที่ 1 หัวข้อ 1.3 และใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมที่ผ่านการทดสอบคุณภาพจำนวน 9 สายพันธุ์

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักสดของดอกเห็ด (กรัม)

2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรม statistix vertion 3.5 ของ NH analylical software โดยการวิเคราะห์ test of AOV assumtion analysis of variance ANOVA CV. และ LSD.

2.2 การทดสอบในฤดูกาลที่ 2 (2 มิถุนายน - 23 สิงหาคม 2539)

เพาะห่างจากชุดที่ 1 เป็นเวลา 1 เดือน วางแผนการทดลองเหมือนการเพาะฤดูกาลที่ 1

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการเพาะในฤดูกาลที่ 1

การบันทึกผล

เหมือนการเพาะในฤดูกาลที่ 1

เมื่อเสร็จการทดสอบการเพาะในฤดูกาลที่ 1 และการเพาะฤดูกาลที่ 2 แล้วนำผลผลิตทั้งสองฤดูกาลมาหาค่าเฉลี่ยและเรียงลำดับผลผลิตทั้ง 9 สายพันธุ์ ตั้งชื่อใหม่ว่า Q1 - Q9 คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด (Q1) จากผลผลิตเฉลี่ยของการเพาะทั้งสองฤดูกาล และเลือกเอาอันดับที่ 1 (Q1) ถึงอันดับที่ 6 (Q6) เพื่อใช้ในการทดลองที่ 3

การทดลองที่ 3 ศึกษาคุณภาพของผลผลิตและการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 2(F2)

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

3.1 การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryons)

จากสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดในการทดลองที่ 2 จำนวน 1 สายพันธุ์ (Q1) เก็บและคัดเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่งอกจากสปอร์ วิธีการต่างๆ เหมือนการเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของการทดลองที่ 1 แต่จากสปอร์ทั้งหมด 120 หลอด หรือ 240 สปอร์ พบเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล 50 สายเชื้อ (strain) วัดการเจริญของเส้นใยเหล่านี้ในขวดอาหารจะวัดถึงวันที่ 7 นับจากวันเลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีบางสายเชื้อเจริญเต็มขวดในวันที่ 7 จากนั้นแบ่งการเจริญของเส้ยใยออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ R คือเส้นใยเจริญเร็วมาก S คือเส้นใยเจริญเร็ว T คือเส้นใยเจริญช้า และ U คือเส้นใยเจริญช้ามาก คัดในแต่ละกลุ่ม 5 สายเชื้อ รวมเป็น 20 สายเชื้อ ซึ่งเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon)

3.2 วิธีการผสมพันธุ์

1. ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating โดยนำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 20 สายเชื้อที่คัดเลือกไว้จากข้างต้น นำมาผสมกับสายพันธุ์ที่เส้นใยเป็นนิวเคลียสคู่ (dikaryon) อันเป็นพันธุ์เริ่มต้น 5 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ KD1, KD2, KDCM2, KDCM3, KDCM4(A4) และสายพันธุ์ลูกผสมจากการทดลองที่ 2 อีก 6 สายพันธุ์ คือ Q1 - Q6 รวมสายพันธุ์ที่เส้นใยเป็นนิวเคลียสคู่ 11 สายพันธุ์ ซึ่งจะได้คู่ผสมทั้งหมด 220 คู่ โดยทำการผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น พีดีเอ วางคู่ผสมห่างกัน 3 เซนติเมตร โดยวางสายพันธุ์ที่มีนิวเคลียสคู่ไว้ด้านในชิดก้นหลอดทดลอง วางเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยวทางด้านปากหลอดทดลอง จากนั้นประมาณ 5-7 วัน ก็สามารถตรวจสอบความสามารถในการผสมกันได้ โดยการตรวจการเกิดข้อยึดระหว่างเซลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจเส้นใยบริเวณที่ถัดจากจุดประสานระหว่างเส้นใย 2 สายพันธุ์ เข้ามาทางด้านกลุ่มเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว ถ้าตรวจพบข้อยึดระหว่างเซล แสดงว่าคู่ผสมนั้นผสมกันได้ (ภาพที่ 5) ได้สายพันธุ์ลูกผสม 197 สายพันธุ์

2.ตัดเส้นใยที่มีข้อยึดระหว่างเซลนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นพีดีเอ ประมาณ 5 วัน ตัดเส้นใยที่มีข้อยึดระหว่างเซลของแต่ละสายพันธุ์ไปทำหัวเชื้อโดยเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง

3.3 การทดสอบคุณภาพและคัดเลือกลูกผสม

สายพันธุ์ทั้งหมด 197 สายพันธุ์ นำไปเพาะลงถุงวัสดุเพาะ 1 สายพันธุ์ต่อ 3 ถุง จำนวนทั้งหมด 591 ถุง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบบเดียวกับการทดลองที่ 1 หัวข้อ 1.3 โดยใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 กับเห็ดนางรมสีขาว CM1 และเห็ดนางรมสีเทา CM5 ซึ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (RCBD) ประกอบด้วย 11 สายพันธุ์ จำนวน 6 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองใช้ถุงเห็ด 8 ถุง จำนวนทั้งหมด 528 ถุง

อุปกรณ์และวิธีการ

แบบเดียวกับการทดลองที่ 1 หัวข้อ 1.3 โดยใช้หัวเชื้อสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 กับเห็ดนางรมสีขาว CM1 และเห็ดนางรมสีเทา CM5 ที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างและเมื่อเชื้อเดินเต็มถุงเพาะแล้วย้ายไปห้องเปิดดอกที่ติดตั้งอุปกรณ์ตรวจวัดอุณหภูมิและความชื้น

การบันทึกข้อมูล

แบบเดียวกับการทดลองที่ 2

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University