

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์

ประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (Mapping population)

ประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (mapping population) สำหรับวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ ใช้สายพันธุ์แท้ (recombinant inbred line ; RIL) โดยใช้ประชากรจำนวน 1 ประชากร จำนวน 92 สายพันธุ์ พันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการสร้างคู่ผสมเดี่ยวเพื่อสร้างประชากร คือ พันธุ์ AGS292 กับสายพันธุ์ (G8891 x G7945) หรือ K3 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีองค์ประกอบของโปรตีนในเมล็ดสูง เมล็ดมีขนาดเล็ก ซึ่งประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซมได้มาจากโครงการวิจัยถั่วเหลืองฝักสด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาลักษณะทางการเกษตร

ปลูกทดสอบประชากรและพันธุ์พ่อแม่ เพื่อศึกษาลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design ; RCBD) เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดเมล็ดและลักษณะวันออกดอกแรก ใน 3 ถั่ว

การปลูกในฤดูแล้งปี 2555 เริ่มทำการทดลองเดือนพฤศจิกายน ปี 2554 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี 2555 และฤดูฝนปี 2555 เริ่มทำการทดลองเดือนกรกฎาคม ปี 2555 ถึงเดือนตุลาคม ปี 2555 โดยปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำ 2 ต้น/กระถาง ที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

การปลูกในฤดูแล้งปี 2556 ทำการทดลองเดือนธันวาคม ปี 2555 ถึงเดือนมีนาคม ปี 2556 จำนวน 2 ซ้ำ โดยปลูกในแปลงทดลอง 1 แถว/สายพันธุ์ แปลงยาว 2 เมตร ระยะห่างระหว่างแถว 50 ซม. ระยะห่างระหว่างต้น 20 ซม. จำนวน 2 ต้น/หลุม

การให้ปุ๋ย แบ่งการใส่ปุ๋ยต้นถั่วเหลืองฝักสดเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะที่ต้นถั่วเหลืองฝักสดมีอายุ 21 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในอัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ ระยะที่ 2 ระยะที่ต้นถั่วเหลืองฝักสดมีอายุ 35 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ผสมกับปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในอัตราอย่างละ 25 กิโลกรัม/ไร่ ระยะที่ 3 ระยะที่ต้นถั่วเหลืองฝักสดมีอายุ 49 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ผสมกับปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในอัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ ให้ปุ๋ยโดยการโรยปุ๋ยข้างแถวปลูกแล้วพรวนดินกลบ

การป้องกันโรคและแมลง ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงทุก 7-10 วัน หรือพ่นเมื่อมีโรคและแมลงระบาดภายในแปลงปลูก

การบันทึกข้อมูล

1. วันออกดอกแรก (days to 1st flowering, R₁)
2. น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด (100 dry seed weight)

การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker analysis)

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชมาล้างด้วยน้ำเปล่า และล้างซ้ำอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นแล้วซับใบพืชให้แห้งด้วยกระดาษชำระ นำใบอ่อนของพืชมาตัดเป็นเส้นฝอยลงในโถงโดยไม่เอาเส้นกลางใบ บดใบอ่อนของพืชโดยเติมสารละลาย 2X CTAB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป บดให้ละเอียด แล้วเทตัวอย่างที่บดละเอียดดีแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยเทให้ได้ตัวอย่างในปริมาตร 2 ใน 3 ของหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าหลอดทุก 10 นาทีหลังการบ่ม จากนั้นทำการเติม Chloroform isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ให้มีปริมาตรที่เต็มหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่นแล้วพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2-3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที และเตรียมหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรใส่ Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดที่นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงดูดเอาสารละลายที่อยู่นั่นบนสุดของหลอดทดลอง ใส่ลงไปหลอดที่เตรียม Isopropanol ไว้ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่นแล้วพลิกหลอด

กลับไปมาเป็นเวลา 2-3 นาที จะเห็นเส้นดีเอ็นเอเป็นเส้นแวนลอยอยู่ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง แล้วจึงเทสารละลายออกจากหลอดทดลอง ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรงลวด เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วให้เติม 75% ethanol with 10 mM ammonium acetate ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใช้วิธีดีดีเอ็นเอที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลองให้หลุดออก ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเพียงเล็กน้อย เทสารละลายออกจากหลอดทดลอง โดยต้องระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดไปกับสารละลาย ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรงลวด เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วให้เติม 75% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใช้วิธีดีดีเอ็นเอที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลองให้หลุดออก ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด 3 นาที เทสารละลายออกจากหลอดทดลอง ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรงลวดให้ดีเอ็นเอแห้ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือมากกว่า เติม TE Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ดีเอ็นเอละลายดีหลอดทดลองเบาๆทุก 1 ชั่วโมง เก็บรักษาดีเอ็นเอตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดไว้ 1 ไมโครลิตร กับ TE-dye ปริมาณ 9 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1% โดยใช้ผง Agarose gel 0.3 g ผสมกับ 0.5X TAE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผิดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับ TE-dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 500 300 และ 100 นาโนกรัม ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ในการทำ Electrophoresis ใช้แถบสีน้ำเงินของ Bromophenol blue เป็นตัวสังเกต โดยให้แถบเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตร เมื่อเสร็จแล้วนำ Agarose gel ไปแช่ใน TAE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่เติม Ethidium bromide เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดขึ้น บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อนำมาประเมินความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับ

การทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ TE-dye ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1% นิดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับ TE-dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 14 12 และ 10 นาโนกรัม ตรวจสอบความเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอโดยวิธี Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมควรมีความหนาใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ถ้าแถบดีเอ็นเอตัวอย่างยังมีความหนาและความชัดเจนกว่าแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นจนกว่าจะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสม นำดีเอ็นเอที่ทำการปรับความเข้มข้นแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทำปฏิกิริยา PCR

โดยการเตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบของสารละลาย ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 3 ไมโครลิตร (30 นาโนกรัม) Forward primer 1.25 ไมโครลิตร (0.25 ไมโครโมลลาร์) Reverse primer (0.25 ไมโครโมลลาร์) Master mix (*Taq* DNA polymerase, dNTPs, $MgCl_2$, 10 X Buffer) และน้ำกลั่น 7 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบด้วยการหมุนเหวี่ยงแล้วนำมาผสมด้วย Vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ระยะแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ ต่อด้วยระยะ Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ต่อด้วยระยะ Extention ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 32 รอบ ระยะสุดท้ายให้ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Electrophoresis โดยการนำผลผลิต (PCR products) มาวิเคราะห์บนอะกาโรสเจล (Agarose gel) ความเข้มข้น 3% ด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที และนำอะกาโรสเจลไปแช่ใน TAE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เติม Ethidium bromide บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อหาความแตกต่าง

(polymorphism) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) บันทึกผลโดยให้สายพันธุ์ที่มีอัลลีลที่เหมือนแม่เป็นอัลลีล A และอัลลีลที่เหมือนพ่อเป็นอัลลีล B

ใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ใน 20 กลุ่มลิงเกจ (linkage group) ที่มีการทำแผนที่ไว้โดย Cregan et al. (1999) โดยทำการสุ่มคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ในแต่ละกลุ่มลิงเกจ ให้กระจายทั่วทั้งจีโนม บางส่วนของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ได้มีการวิเคราะห์หาขนาดของอัลลีล (allele size) ของสายพันธุ์พ่อแม่ไว้แล้ว โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (DNA sequencer) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง (locus) ในพันธุ์พ่อแม่ก็จะนำไปใช้วิเคราะห์ความเชื่อมโยงของลักษณะต่างๆในประชากรสายพันธุ์แท้ (RIL population)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอประชากรสายพันธุ์แท้

ส่งตัวอย่างประชากรสายพันธุ์แท้ จำนวน 92 สายพันธุ์ และพันธุ์พ่อแม่ไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ เอสเอสอาร์ที่แสดงความแตกต่างในพันธุ์พ่อแม่จำนวน 244 เครื่องหมาย บน 20 กลุ่มลิงเกจ (ตาราง 1) ได้แก่ กลุ่มลิงเกจ A1 จำนวน 7 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ A2 จำนวน 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ B1 จำนวน 14 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ B2 จำนวน 16 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ C1 จำนวน 15 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ C2 จำนวน 10 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ D1a จำนวน 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ D1b จำนวน 12 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ D2 จำนวน 13 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ E จำนวน 11 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ F จำนวน 11 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ G จำนวน 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ H จำนวน 7 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ I จำนวน 7 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ J จำนวน 36 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ K จำนวน 12 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ L จำนวน 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ M จำนวน 13 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ N จำนวน 14 เครื่องหมาย กลุ่มลิงเกจ O จำนวน 15 เครื่องหมาย

ตาราง 1 แสดงกลุ่มลิงเกจ จำนวนเครื่องหมายโมเดลแบบเอสเอสอาร์ ที่วิเคราะห์ลายพิมพ์
ดีเอ็นเอของประชากรสายพันธุ์แท้ ที่มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

กลุ่ม ลิงเกจ	จำนวน เครื่องหมาย	เครื่องหมาย			
A1	7	Sat_217	Satt511	Satt236	Satt276
		Sat_407	GMES3048	Sat_171	
A2	8	Satt341	Satt187	Sat_138	Sat_294
		GMENOD2B	Sat_392	Satt493	Satt589
B1	14	Satt197	Sat_247	Sat_128	Satt444
		BE801538	BE806308	CSSR18	Sat_156
		Satt583	GMES0591	GMES0959	Satt197_1
		Satt251	GMES6195		
B2	16	Satt063	Satt474	Satt318	Satt467
		Satt726	Sat_424	Sct_064	GMES1809
		GMES5296	GMES6350	Sat_287	CSSR28
		Satt063_1	Satt534	Sat_009	Satt687
C1	15	Satt670	Satt690	SOYGPATR	Sat_311
		GMES6334	Satt646	GMES0136	GMES0780
		Sat_140	Satt194	AW277661	GMES2745
		Sct_186	Satt578	SC1008	

ตาราง 1 (ต่อ)

กลุ่ม ลิงเกจ	จำนวน เครื่องหมาย	เครื่องหมาย			
C2	10	Satt307	Satt227	Satt316	Satt322
		GMAC7L	Sat_402	Satt643	Satt357
		Satt371	Satt227_1		
D1a	8	Satt436	Sat_414	Satt184	Satt147
		Satt531	Satt408	Satt179	Sat_332
D1b	12	Satt546	Sat_069	Satt350	Satt141
		Satt506	Satt604	Sat_135	Satt412
		Satt282	Sat_096	Satt189	Satt542
D2	13	Sat_284	Sct_192	Satt310	Satt458
		Satt486	Sat_296	GMES4739	Sat_292
		Sat_022	sat_220	Satt186	Satt372
		Satt672			
E	11	Satt553	Satt230	Satt045	Satt212
		Sat_172	Satt384	Satt231	Satt720
		Satt411	Satt483	GMES1367	
F	11	Satt269	Satt516	Satt663	GMRUBP
		Satt335	Satt030	Sat_074	Satt657
		Satt343	Satt425	Satt160	

ตาราง 1 (ต่อ)

กลุ่ม ลิงเกจ	จำนวน เครื่องหมาย	เครื่องหมาย			
G	8	Satt517	Satt138	AF162283	Satt394
		Sat_064	Satt038	Sat_403	Sat_117
H	7	Satt568	Satt181	Satt434	Satt253
		GMES2920	Sat_401	GMES0917	
I	7	Sat_105	Satt354	Satt330	Satt239
		Sat_219	SI003	Satt367	
J	36	SJ053	SJ055	SJ030	Satt380
		SJ075	SJ080	SJ081	SJ091
		Satt622	Satt215	Sct_046	Satt183
		Sat_394	Satt132	Satt596	GMES5027
		GMES0069	GMES5332	Satt249	GMES3817
		GMES4751	Sat_339	Satt654	GMES6898
		Sct_001	GMES6655	GMES6224	*FT3a
		Satt132_1	SJ078	SJ101	Satt431
		GMES1619	Sat_255	Sat_366	*FT2a
K	12	Satt247	Satt242	Satt046	Satt518
		GMES1135	CSSR102	Satt417	Satt617
		Satt102	Sat_167	GMES0633	Satt260

ตาราง 1 (ต่อ)

กลุ่ม	จำนวน				
ลิงเกจ	เครื่องหมาย	เครื่องหมาย			
L	8	Satt229	Satt166	Satt373	Sat_150
		Satt284	Satt523	Satt229_1	Sat_245
M	13	Satt463	Satt567	Satt540	Sat_330
		Satt336	Satt220	Sat_389	Satt201
		Satt551	Sat_316	Satt697	Satt210
		Sat_258			
N	14	Satt387	Satt584	Satt660	GMES0105
		Sat_208	Satt549	Sat_033	Sat_266
		Satt009	Satt387_1	Satt257	Satt631
		Satt641	Satt152		
O	15	Satt477	Sat_321	Sat_108	Satt262
		Satt487	GMES2487	GMES0051	Sat_318
		Sat_242	Satt123	Sat_282	Satt500
		Satt153	Satt259	Sat_291	

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรม (heritability, h^2)

วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการกระจายตัวของลักษณะในประชากร และประเมินค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow-sense heritability, h^2) เนื่องจากประชากรที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็นประชากรสายพันธุ์แท้ที่อยู่ในสภาพ homozygous แล้ว ซึ่งแสดงถึงอัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของยีนแบบบวกสะสม (additive genetic variance, σ_g^2) ซึ่งไม่มีความแปรปรวนเนื่องจากการข่มของยีน (dominant genetic variation, σ_d^2) ซึ่งสามารถประเมินค่าได้จากสมการ Fehr (1987) ดังนี้

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{[\sigma_g^2 + (\sigma_{ge}^2/e) + (\sigma_e^2/r)]}$$

โดยกำหนดให้ σ_g^2 = ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

σ_{ge}^2 = ความแปรปรวนของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อม

σ_e^2 = ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

r = จำนวนซ้ำ

e = จำนวนของสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

การสืบค้นความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจทางการเกษตร วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างลักษณะกับเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี Single Factor - Analysis of Variance (SF – ANOVA) และการวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (Multiple – locus regression) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความเชื่อมโยงอย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะ

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินงาน

เวลา	เริ่มดำเนินการ เดือนพฤศจิกายน 2554
	สิ้นสุด เดือนมีนาคม 2556
สถานที่	มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่