บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างราวีเอไมโคไรซ่าจากแหล่งต่างๆของประเทศ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืชจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ ถุงเพาะชำกล้าไม้ และตัวอย่างรากพืช จากแปลงปลูกเก็บตัวอย่างดินและรากพืชโดยสุ่มหลายๆจุด ที่ระดับความลึก 0-30 เซนติเมตร บดเม็ดดินแต่ละตัวอย่างที่สุ่มได้ให้แตกแล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอ แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างดังกล่าวประมาณตัวอย่างละ1กิโลกรัมใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำมาศึกษาสมบัติของดินโดยทำการวิเคราะห์ที่ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตรวจหาราวีเอไมโคไรซ่าต่อไป เก็บรวบรวมตัวอย่างดินและรากพืชรวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่างจากพืช 13 ชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด หอมแดง หญ้ารูซี หม่อน สัก มะขามสะตอ หางนกยูง ย้อย มะละกอ ใน 7 จังหวัดได้แก่ ลพบุรี นครสวรรค์ ยโสธร ขอนแก่น เพชรบุรี นครราชสีมา กรุงเทพฯ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

2. การศึกษาชนิดของราวีเอไมโคไรซ่าในตัวอย่างดินและรากพืชเพื่อตรวจหาชนิดของราวีเอไมโคไรซ่าจากตัวอย่างที่เก็บได้ ดังนี้

2.1 การตรวจหาสปอร์ราวีเอไมโคไรซ่าจากดินตัวอย่าง

แยกสปอร์จากดินตัวอย่างโดยวิธี wet sieving and decanting technique ของ Gerdemann และ Nicolson (1963)(ภาคผนวก 1) โดยนำดินตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 250 กรัม ใส่ในน้ำ 1 ลิตร คนเบาๆไปทางเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เศษดิน ดินทรายตกตะกอน เทส่วนที่เป็นน้ำของสารละลายดินผ่านตะแกรงร่อนดินขนาด 425, 250, 100 และ 45 ไมครอน ตามลำดับ นำตะกอนที่ติดบนตะแกรงชั้นต่างๆ ไปคัดแยกด้วยวิธี sucrose centrifugation โดย ดัดแปลงวิธีของ Smith และ Skipper (1979) (ภาคผนวก 2)

โดยล้างตะกอนด้วยน้ำและเทใส่ centrifuge tube นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง เติมสารละลายน้ำตาล ความเข้มข้น 454 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ทำเป็น suspension นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เทของเหลวส่วนบนช้าๆลงบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอนล้างด้วยน้ำ แล้วนำไปตรวจหาและคัดแยกสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic microscope สปอร์ที่คัดแยกได้เก็บรวบรวมไว้ที่ 5 องศาเซลเซียสใน Ringer's solution(ภาคผนวก 3) เพื่อศึกษาลักษณะและเก็บไว้เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

2.2 การตรวจหาราวีเอไมโคไรซ่าในรากพืช

ล้างดินออกจากรากพืชให้สะอาด นำไปย้อมสีตามวิธีของ Phillips และ Hayman (1970)(ภาคผนวก 4) โดยต้มรากใน 10% โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15-60 นาที เพื่อให้ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลพืชหลุดออก ล้างน้ำสะอาด 3-4 ครั้ง แล้วแช่ในสีย้อม lactophenol trypan blue (ภาคผนวก 5) นาน 3-24 ชั่วโมง คัดรากที่ย้อมสีแล้วยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตรแช่ในlactophenol เพื่อล้างสีส่วนเกินออก เลือกชิ้นรากแบบสุ่มจำนวน 100 ชิ้น วางเรียงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass ตรวจเวสิเคิล (vesicle) และอาร์บัสคูล (arbuscule) ซึ่งติดสีน้ำเงินเข้มด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40-100 เท่า คำนวณเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากจากจำนวนชิ้นรากที่ตรวจพบการติดเชื้อ กับจำนวนรากที่ตรวจทั้งหมด (slide method)

2.3 การศึกษาลักษณะของราวีเอไมโคไรซ่าที่แยกได้

นำสปอร์ที่แยกได้ จากข้อ 2.1 วางบนสไลด์หยด lactophenol ปิดด้วย cover glass ศึกษารูปร่างลักษณะภายนอกและภายในของสปอร์ จำแนกราวีเอไมโคไรซ่าตั้งกล่าวตาม Trappe และ Schenck (1982); Trappe (1982) ; Hall (1984) และ Schenck (1987) ในภาคผนวก 6 สปอร์ส่วนหนึ่ง mount ด้วย Polyvinyl lactic acid (ภาคผนวก 7) เก็บเป็น specimen เพื่อศึกษาในโอกาสต่อไป

3.วิเคราะห์สมบัติของดินตัวอย่าง ได้แก่ วัด pH ของดิน ใช้อัตราส่วนของดิน:น้ำ = 1:2.5 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมในดิน (ทัศนีย์ อัตตะนันทน์, จงรักษ์ จันทร์เจริญสุข และ สุรเดช จินดากานนท์, 2532) (ภาคผนวก 12)

4. การเพิ่มปริมาณราวีเอไมโคไรซ่า

เพิ่มปริมาณราวีเอไมโคไรซ่าแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้โดย inoculate ราวีเอไมโคไรซ่าลงบนข้าวฟ่างลาย (Sorghum bicolor) โดย

4.1 เตรียมกล้าข้าวฟ่าง

4.1.1 เตรียมวัสดุสำหรับกล้า เตรียมทรายละเอียดโดยทำความสะอาดด้วยน้ำประปาด้วยการแช่ทรายดังกล่าวในน้ำประปา และเปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่ทราย 5-6 ครั้ง แล้วนำทรายเปียกไปอบไอน้ำฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง อบไอน้ำฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง บรรจุทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วลงในถาดพลาสติกที่เช็ดด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ ให้ชั้นของทรายมีความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร

4.1.2 เตรียมเมล็ดพืชสำหรับเพาะกล้า นำเมล็ดข้าวฟ่างลายล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ด โดยแช่ใน 5% clorox นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน 70% เอทิลแอลกอฮอล์ นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง (ขวัญใจ ชองชันปอนด์, 2535)

4.1.3 เพาะเมล็ดข้าวฟ่างที่ได้เตรียมในข้อ 4.1.2 ลงในถาดบรรจุทราย กลบเมล็ดข้าวฟ่างด้วยทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รดด้วยน้ำสะอาดปราศจากเชื้อ จนกล้าข้าวฟ่างอายุ 7 วัน จึงนำไป inoculate ด้วยราวีเอไมโคไรซ่า

4.2 เตรียมวัสดุสำหรับเพาะราวีเอไมโคไรซ่า

เตรียมดินที่ใช้ปลูก นำดินจากบริเวณศูนย์เพาะชำกล้าไม้ อ.เมือง จ.นครราชสีมา ซึ่งมี pH 5.58 มีไนโตรเจน 0.12% ฟอสฟอรัส 0.03% และโปแตสเซียม 0.07% นำมาคลุกผสมกับทรายที่ล้างน้ำจนสะอาดแล้ว ในอัตรา ดิน:ทราย = 1:1 แล้วนำไปอบไอน้ำฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง อบไอน้ำ 3 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมง

เตรียมภาชนะสำหรับบรรจุดินปลูก โดยใช้กระถางดินเผา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ล้างน้ำและนำไปอบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง บรรจุทรายผสมดินซึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในกระถางที่เตรียมไว้ โดยใส่ดินปลูกไว้ให้สูงจากกันกระถางประมาณ 5 เซนติเมตร

4.3 เตรียมสปอร์ราวีเอไมโคไรซา

สปอร์ราวีเอไมโคไรซาแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 1.2 นำมาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวสปอร์ด้วยสารละลาย 2% Chloramin T และสารละลายสเตรปโตมัยซิน 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามวิธี spore surface disinfestation method (Linda, 1982) ในภาคผนวกที่ 8

4.4 การ inoculate สปอร์ราวีเอไมโคไรซา ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวของสปอร์ลงบนพืชที่เตรียมไว้ แยกได้ 2 วิธี คือ

4.4.1 การ inoculate สปอร์ราวีเอไมโคไรซาที่แยกได้จากดินและได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวลงในพืชดังนี้ โดยการนำกล้าข้าวฟ่าง อายุ 7 วัน ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 นำมาวางบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อ โดยการนึ่งอบไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 30 นาทีแล้ว inoculate สปอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 4.3 ลงบนรากข้าวฟ่างดังกล่าว ห่อกระดาษกรองซึ่ง inoculate สปอร์ลงบนรากข้าวฟ่างเป็นรูปกรวยแล้ววางลงในกระถาง ซึ่งบรรจุดินปลูกที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 4.2 กลบด้วยดินผสมทรายให้ปุ๋ย Johnson's nutrient solution วันเว้นวันตามวิธีในภาคผนวก 11 เป็นระยะเวลา 3 เดือน

4.4.2 การ inoculate ราวีเอไมโคไรซาโดยใช้รากพืช

ในกรณีที่ไม่สามารถหาสปอร์ราวีเอไมโคไรซาจากดินได้ แต่ตรวจพบราวีเอไมโคไรซาในรากพืช นำรากพืชที่ตรวจพบโครงสร้างของราวีเอไมโคไรซา นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาโดยให้น้ำประปาไหลชะดินออกจากรากพืชจนหมด แล้วจึงนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวรากด้วย 10% Chloramin T นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง (Feldmann และ Idczak, 1992) ตามภาคผนวก 9 inoculate รากพืชที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนทรายผสมดินที่บรรจุในกระถางที่เตรียมแล้วในข้อ 4.2 กลบด้วยดินที่ใช้ปลูกบางๆ จากนั้นวางเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมแล้วในข้อ 4.1.2 กลบเมล็ดด้วยดินปลูกที่ผ่านการอบไอน้ำฆ่าเชื้อ ใส่ปุ๋ย Johnson's nutrient solution ตามวิธีในภาคผนวก 11 เป็นเวลา 12 สัปดาห์

เมื่อข้าวฟ่างอายุ 12 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างรากและตรวจการติดเชื้อในราก สุ่มตัวอย่างดินที่ใช้ปลูกนำไปตรวจนับสปอร์ในดิน รากข้าวฟ่างและดินที่ใช้ปลูกใช้เป็น inoculum สำหรับคัดเลือกชนิดของราวีเอไมโคไรซาที่เหมาะสมกับข้าวโพดและเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์สำหรับศึกษาปริมาณที่เหมาะสม ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของราวีเอไมโคไรซาต่อไป สำหรับต้น

ที่ใช้รากพืชแทนสปอร์ นำดินที่ใช้ปลูกมาคัดแยกสปอร์และเติมปริมาณในข้าวฟ่างซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ตามขั้นตอน 4.4.1

5. การคัดเลือกราวีเอไมโคไรซ่าที่เหมาะกับข้าวโพดพันธุ์คาร์กิลล์ 922

เลือกราวีเอไมโคไรซ่าจากการทดลองในข้อ 4 ซึ่งพบปริมาณการติดเชื้อในข้าวฟ่างมากกว่า 40% และไม่พบการปนเปื้อนโดยราอื่น นำมาทดสอบการติดเชื้อในรากข้าวโพดพันธุ์คาร์กิลล์ 922 โดย

5.1 การเตรียมภาชนะและดินที่ใช้ปลูก

เตรียมกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว เช็ดด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ ใส่ทรายผสมดินในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งเตรียมเหมือนข้อ 4.2 ลงในกระถาง ความสูงของดินที่ใช้ปลูกประมาณ 1/3 กระถาง

5.2 ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์คาร์กิลล์ 922 เปอร์เซนต์การงอก 93% จากบริษัท คาร์กิลล์ เมล็ดพันธุ์ จำกัด นำเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโพดเช่นเดียวกับเมล็ดข้าวฟ่าง

5.3 inoculate โดยใช้ ดินปลูกและรากข้าวฟ่างที่เตรียมจากข้อ 4 ประมาณ 50 กรัม โรยบนผิวหน้าดินที่ใช้ปลูกในกระถางที่เตรียมไว้จากข้อ 5.1 โรยทับด้วยดินที่ใช้ปลูกอีกชั้นให้มีความหนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร ก่อนวางเมล็ดข้าวโพด ที่เตรียมในข้อ 5.2 แล้วกลบด้วยดินผสมทราย ให้ปุ๋ย Johnson's nutrient solution ตามวิธีในภาคผนวก 11 เป็นเวลา 8 สัปดาห์

5.4 สุ่มตัวอย่างราก ติดตามหาระยะเวลาที่พบการติดเชื้อครั้งแรกในรากข้าวโพด และตรวจวัดเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากทุกสัปดาห์ โดยย้อมสีรากและตรวจนับ โดยวิธี slide method ตามวิธีในข้อ 2.2

คัดเลือกราวีเอไมโคไรซ่าสายพันธุ์ที่พบการติดเชื้อในรากรวดเร็ว และมีเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากค่อนข้างสูง นำผลการทดลองในตารางที่ 4 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 4 ซ้ำ

6. การหาปริมาณ inoculum ที่เหมาะสมจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วในข้อ 4

นำราวีเอไมโคไรซ่าที่คัดเลือกแล้ว 4 สายพันธุ์ คือ Glomus sp.สายพันธุ์ 9 Glomus sp.สายพันธุ์ 12 Gigaspora sp.สายพันธุ์ 3 และ Acaulospora sp.สายพันธุ์ 2 ซึ่งมีจำนวนสปอร์ต่อดิน 100 กรัม เท่ากับ 280, 470, 60 และ 320 สปอร์ นำมาทดลองหาปริมาณ inoculum ที่เหมาะสมที่ทำให้มีการติดเชื้อในรากข้าวโพดพันธุ์คาร์กิลล์ 922 โดย

6.1 เตรียมกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ทำการอบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่กระถาง

6.2 เตรียมดินที่ใช้ปลูก โดยใช้ทรายละเอียดที่ล้างสะอาดแล้วคลุกผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 2:1 ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ใส่ดินปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในกระถางที่ฆ่าเชื้อเตรียมไว้แล้ว

6.3 เตรียมเมล็ดข้าวโพดพันธุ์คาร์กิลล์ 922 ตามวิธีในข้อ 4.1.2 คลุกเคล้าเมล็ดด้วยเบนเลทเพื่อทำลายและป้องกันราที่จะก่อให้เกิดโรคก่อน inoculate

6.4 Inoculate ใส่ราวีเอไมโคไรซ่า 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Glomus sp. สายพันธุ์ 9 Glomus sp.สายพันธุ์ 12 Gigaspora sp.สายพันธุ์ 3 และ Acaulospora sp. สายพันธุ์ 2 และแต่ละสายพันธุ์ใช้ปริมาตร 25, 50, 100 และ 200 กรัมตามลำดับ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้ inoculum หนัก 200 กรัม และผ่านการฆ่าเชื้อออบไอน้ำ ใส่ปุ๋ย Johnson's nutrient solution ตามวิธีในภาคผนวก 11 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้ 1% เบนเลททุก 2 สัปดาห์ เพื่อป้องกันราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ตรวจปริมาณการติดเชื้อในรากตามข้อ 4 แต่ละสายพันธุ์วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 ซ้ำ คัดเลือกอัตราที่มีการใช้ inoculum น้อย แต่มีเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากสูง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของราวีเอไมโคไรซ่าชนิดต่างๆ ต่อการเจริญของข้าวโพด

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของราวีเอไมโคไรซ่าต่อการเจริญของข้าวโพด

เตรียมกระถาง ดินปลูก เมล็ดข้าวโพด เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 6 inoculum ใช้ในปริมาณที่ดีที่สุดจากผลการทดลองในข้อ 6 ซึ่งแสดงในตารางที่ 5 โดยโรย inoculum เป็นชั้นทับดินปลูกที่ใส่ไว้ในกระถางแล้วประมาณ 2 ลิตร ปลูกข้าวโพดบน inoculum กระถางละ 2 ต้น เพิ่มดินปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกระถางละ 5 ลิตร ใส่ปุ๋ย

Johnson's nutrient solution ตามวิธีในภาคผนวก 11 จนข้าวโพดมีฝักและอายุได้ 70 วัน พ่นยาฆ่าแมลงเซฟวิน 85 ทุก 1 เดือน และให้เบนเลททุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 5 ซ้ำ 5 วิธีการคือ โดยการใส่เชื้อ Glomus sp. สายพันธุ์ 9 Glomus sp.สายพันธุ์ 12 Gigaspora sp.สายพันธุ์ 3 และ Acaulospora sp. สายพันธุ์ 2 โดยแต่ละสายพันธุ์ใช้ inoculum 50 100 200 และ 50 กรัม ตามลำดับ เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม ซึ่งใช้ inoculum 200 กรัม ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ตรวจวัดผลการทดลอง โดยบันทึกความสูงของต้นทุก 10 วัน วัดเปอร์เซนต์การติดเชื้อในรากเป็นระยะโดยย้อมสีตามวิธีของ Phillips และ Hayman(1970) และวัดด้วยวิธี slide method ตามวิธีในข้อ 2.2 บันทึกน้ำหนักแห้งของต้น ราก เมื่ออายุครบ 70 วัน โดยใช้ Kjeldahl method (ภาคผนวก 12) ฟอสฟอรัสใช้ Vanadomolybdo phosphoric yellow color method (ภาคผนวก 12) และโปแตสเซียม วิเคราะห์และวัดค่าด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer (ภาคผนวก 12) โดยทำการวิเคราะห์ที่ ฝ่ายวิเคราะห์อาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และกองวิเคราะห์ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

8. ศึกษาโครงสร้างและลักษณะของสปอร์ เวสิเคิล และ อาร์บัสคูลของราวีเอไมโคไรซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดายี่ห้อ Nikon รุ่น Optiphot บันทึกภาพด้วยฟิล์มสไลด์และฟิล์มเนกาทีฟยี่ห้อ Kodak และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสองกราดยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-T220A มี accelerrating 20 kv ถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ Mamiya ฟิล์มเนกาทีฟยี่ห้อ Kodak การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสองกราด (ศิริเพ็ญ เวชชการัฆย์, อรัญญา ตันติปัญจพร และ วิรัช ธรรมวิบูลย์, 2535) แสดงในภาคผนวก 13