# บทที่ 3
# วิธีการศึกษาวิจัย

## 1. พื้นที่ศึกษา

เลือกพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย การดำเนินการเก็บตัวอย่างแมลงเก็บระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2551 และ 2552 โดยพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างแบ่งตามรายภาคตามรายงานผลการศึกษาภูมิสารสนเทศพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2549/50 (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2550)

## 2. การเก็บตัวอย่างแมลง

การเก็บตัวอย่างแมลงแบ่งเป็น 2 ระยะ ได้แก่ เก็บตัวอย่างในระยะตัวหนอนและเก็บในระยะตัวเต็มวัยซึ่งรายละเอียดการเก็บมีดังนี้

### 2.1 ตัวหนอน

#### 2.1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างหนอนด้วงหนวดยาวตามแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ โดยเน้นเก็บจากพื้นที่ปลูกอ้อยที่มีสภาพดินเป็นดินร่วนปนทรายหรือดินทราย เนื่องจากการตรวจเอกสารพบว่าด้วงหนวดยาวจะระบาดในสภาพดินเหล่านี้ (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2544) วิธีการเก็บตัวหนอนจะเลือกเก็บจากแปลงอ้อยตอหรือเหง้าอ้อยที่แสดงอาการการเข้าทำลายของหนอนด้วง โดยต้นอ้อยที่ถูกตัวหนอนเข้าทำลายกาบใบและใบอ้อยแห้งมากผิดปกติ ตั้งแต่ใบล่างขึ้นไปจนแห้งตายไปทั้งต้นหรือทั้งกออ้อย (ภาพที่ 3.1ก) จากนั้น ใช้จอบขุดรอบๆ ต้นอ้อย เพื่อดึงเหง้าอ้อยขึ้นมา เพื่อหาตัวหนอนที่กินเนื้อเยื่อบริเวณรากอ้อยดังภาพที่ 3.1ข และ 3.1ค นำตัวหนอนที่เก็บได้ใส่ในกล่องพลาสติกที่มีดินบรรจุ บันทึกสถานที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างเหล่านั้นกลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อจำแนกชนิดและบรรยายลักษณะแมลงในลำดับต่อไป

**ตารางที่ 3.1** แหล่งที่เก็บตัวอย่างและวันที่เก็บตัวอย่าง

| แหล่งที่ | แหล่งที่เก็บ | วันที่เก็บ |
|---|---|---|
| 1 | อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี | 15 พ.ค. 52 |
| 2 | อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น | 7 พ.ค. 51 |
| 3 | อ.คูเมือง จ.บุรีรัมย์ | 20 มิ.ย. 52 |
| 4 | อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม | 15 พ.ค. 51 |
| 5 | อ.เมือง จ.กาฬสินธุ์ | 15 พ.ค. 51 |
| 6 | อ.เกษตรสมบูรณ์ จ.ชัยภูมิ | 11 พ.ค. 52 |
| 7 | อ.บึงสามัคคี จ.กำแพงเพชร | 22 เม.ย. 51 |
| 8 | อ.เมือง จ.นครสวรรค์ | 21 เม.ย. 51 |

**ตารางที่ 3.2** พิกัดของแหล่งที่เก็บตัวอย่างด้วงหนวดยาวอ้อย

| แหล่งที่เก็บ | พิกัด | |
|---|---|---|
| | องศาเหนือ | องศาตะวันออก |
| อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี | 17"01'39.59 | 101"58'37.65 |
| อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น | 16"42'21.07 | 101"59'48.56 |
| อ.คูเมือง จ.บุรีรัมย์ | 15"23'17.40 | 103"06'66.75 |
| อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม | 16"11'41.91 | 102"59'03.01 |
| อ.เมือง จ.กาฬสินธุ์ | 16"33'14.11 | 105"38'10.56 |
| อ.เกษตรสมบูรณ์ จ.ชัยภูมิ | 16"27'59.37 | 101"53'03.80 |
| อ.บึงสามัคคี จ.กำแพงเพชร | 16"11'20.22 | 19"58'33.37 |
| อ.เมือง จ.นครสวรรค์ | 15"41'46.15 | 100"49'19.94 |

**ภาพที่ 3.1** การเก็บตัวอย่างด้วงหนวดยาวอ้อย; ก. อาการต้นอ้อยที่ถูกหนอนด้วงหนวดยาวทำลายและการขุดกออ้อย ข. และ ค. ตัวหนอนที่อยู่ภายในเหง้าอ้อย ง. การตั้งกับดักแสงไฟเพื่อเก็บตัวเต็มวัย

**2.1.2 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ**

นำตัวหนอนที่ได้จากข้อ 2.1.1 ตรวจดูลักษณะภายนอก วัดขนาดลำตัวของตัวหนอนแต่ละตัวอย่าง บันทึกรูปร่างลักษณะ สีสันและรายละเอียดอื่นๆ ที่ตรวจพบ เช่น โครงสร้างส่วนหัว ส่วนปาก พื้นผิวผนังลำตัว ลวดลายที่เกิดบริเวณส่วนอก ส่วนท้องและเส้นขนที่ปกคลุม ภายใต้กล้องสเตอริโอ บันทึกภาพหรือวาดภาพลักษณะต่างๆ ที่พบในตัวหนอนด้วงหนวดยาวแต่ละแหล่ง กรณีที่ศึกษารายละเอียดของส่วนปาก เช่น กราม ฟัน ริมฝีปากบนและริมฝีปากล่าง เพื่อความชัดเจนในการศึกษารายละเอียดโครงสร้าง ได้ทำการดึงชิ้นส่วนต่างๆ นำมาแช่ในน้ำสะอาด เพื่อล้างส่วนของดินที่ติดมา จากนั้นนำอวัยวะต่างๆ มาศึกษารายละเอียดภายใต้กล้องสเตอริโอ แต่ละตัวอย่างที่ศึกษาแล้วจะแยกดองในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ พร้อมบันทึกรหัสประจำตัวเพื่อความสะดวกในการจัดเก็บฐานข้อมูลและใช้สำหรับการบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน

**2.1.3 วิธีการจัดจำแนกและการบรรยายลักษณะ**

จากการตรวจเอกสารพบมีรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานของหนอนด้วงหนวดยาวชนิดนี้น้อยมาก เอกสารทางวิชาการที่ใช้ประกอบการบรรยายลักษณะตัวหนอน ได้แก่ Craighead (1923), Morelli et al., (2002, 2005, 2006) รายละเอียดการวัดส่วนประกอบต่างๆ ลำตัวของตัวหนอนและการบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน มีรายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 3.2 และภาพที่ 3.3 ดังนี้

BL คือ ความยาวของลำตัวตั้งแต่กรามจนถึงปลายส่วนท้อง

HL คือ ความยาวส่วนหัววัดจากกรามถึงฐานกะโหลก

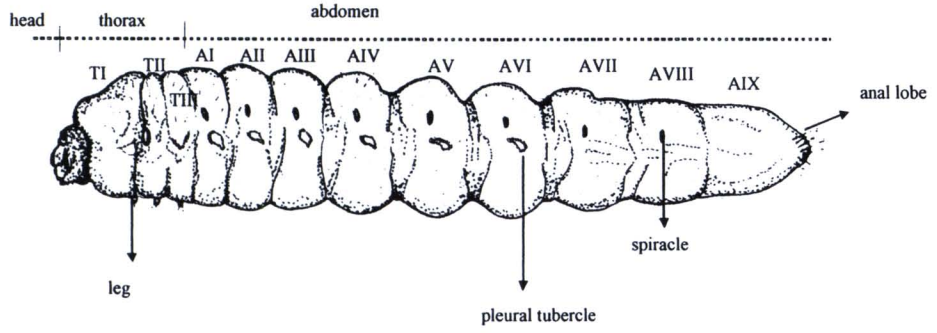
HW คือ ความกว้างส่วนหัวบริเวณส่วนที่กว้างที่สุด

CI คือ อัตราส่วนระหว่างความกว้างต่อความยาวของหัว

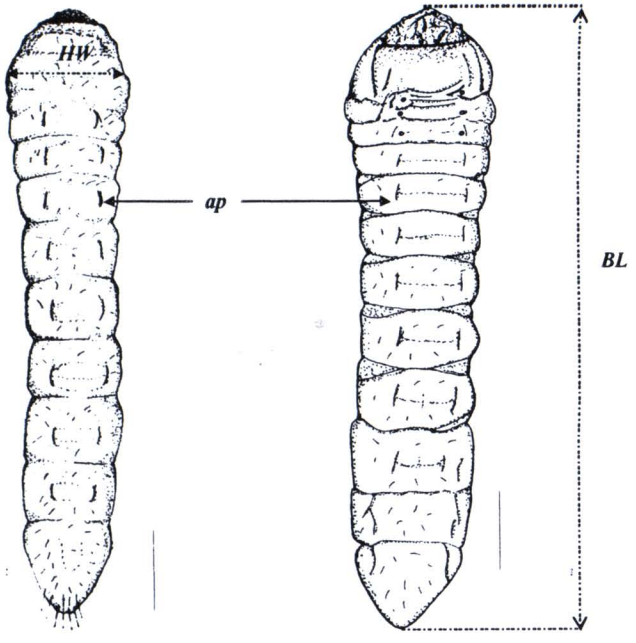
นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจัดทำอนุกรมวิธานหนอนด้วงหนวดยาวชนิดนี้ โดยบรรยายลักษณะสัณฐานภายนอกของหนอนด้วง พร้อมเปรียบเทียบลักษณะตัวหนอนที่เก็บได้ในแต่ละแหล่ง

**2.2 ตัวเต็มวัย**

เก็บโดยการตั้งกับดักแสงไฟในแปลงอ้อย (ภาพที่ 3.1ง) ตั้งแต่ช่วงเวลา 18.00 น – 21.00 น. ตัวอย่างแมลงที่ได้นำมาจัดรูปร่างหรือดองเก็บไว้ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์และติดป้ายบันทึกข้อมูล

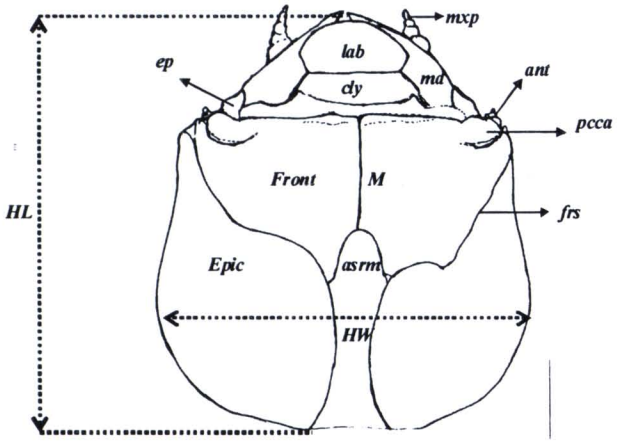



ก. ด้านข้างลำตัว

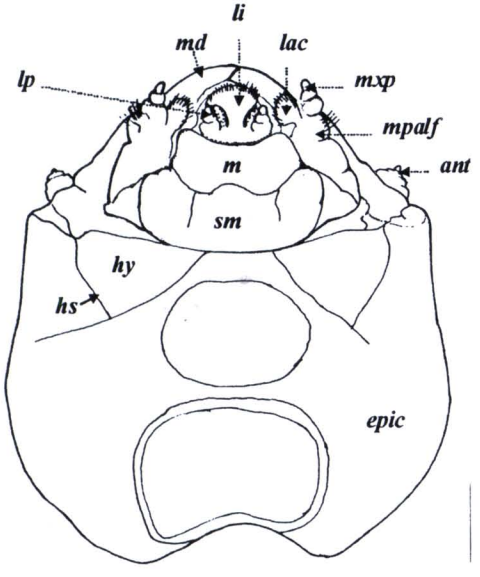



ข. ตัวหนอนด้านสันหลัง ค. ตัวหนอนด้านล่าง

**ภาพที่ 3.2** ลักษณะตัวหนอนของด้วงหนวดยาวอ้อย ap, ampullae. Scale bars = 0.5 mm.




ก. ส่วนหัวด้านสันหลัง




ข. ส่วนหัวด้านล่าง

**ภาพที่ 3.3** แสดงรายละเอียดของโครงสร้างส่วนหัว. *ant*, antennae; *cly*, clypeus; *ep*, epistoma; *epic*, epicranium; *frs*, frontal suture; *hs*, hypostomal suture; *hy*, hypostoma; *lab*, labrum; *lac*, lacinia; *li*, ligula; *lp*, labial palpi; *lpal*, labial palpifer; *M*, median suture; *m*, mentum; *md* , mandible; *mpalf*, maxillary palpifer; *mxp*, maxillary palpus; *pcca*, postcondylar carina; *sm*, submentum; *HW*, head width; *HL*, head length. Scale bars = 0.5 mm.

## 3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตัวเต็มวัย

### 3.1 การตรวจจำแนกลักษณะโครงสร้างภายนอก

ตัวเต็มวัยของด้วงหนวดยาวที่เก็บจากแปลงอ้อย นำมาศึกษาจำแนกชนิดภายใต้กล้องสเตอริโอ เพื่อค้นหาลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของด้วงหนวดยาวอ้อย โดยการบันทึกรูปร่าง สีสันและรายละเอียดอื่นๆ เช่น การวัดอัตราส่วนต่างๆ ของลำตัวแมลง เป็นต้น นอกจากนั้น การศึกษาจะเปรียบเทียบลักษณะความแตกต่างตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ข้อมูลรายละเอียดส่วนต่างๆ ของแมลงจะทำการบันทึกด้วยกล้องถ่ายรูปและวาดภาพ ทำการบรรยายลักษณะ (description) เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกระหว่างเพศผู้และเพศเมีย

### 3.2 การศึกษาลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ (Terminalia character)

หลังจากศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นทำการผ่าแมลง เพื่อตรวจดูลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ตามวิธีการของ Thongphak and Wang (2007) ดังนี้ กรณีที่ตัวอย่างแมลงแห้งทำการต้มแมลงในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส เพื่อให้แมลงเกิดการอ่อนตัว หลังจากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัดและปากคีบ (forceps) ค่อยๆ เปิดปล้องท้องส่วนท้ายด้านบน จากนั้นดึงส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ที่ตั้งอยู่ปลายส่วนท้องปล้องสุดท้ายออกมา นำอวัยวะสืบพันธุ์ที่ดึงออกไปแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อที่ติดกับอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นนำอวัยวะสืบพันธุ์มาล้างในน้ำกลั่นหลายๆ รอบจนสะอาด ไม่มีเนื้อเยื่อปน นำอวัยวะสืบพันธุ์มาแยกชิ้นส่วนต่างๆ เช่น aedeagus และ internal sac, $8^{th}$ tergite, $8^{th}$ sternite, paramere เป็นต้น นำแต่ละชิ้นส่วนมาทำสไลด์และทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพและวาดภาพลักษณะต่างๆ ที่พบ หลังการศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะทำเป็นสไลด์ถาวรในสาร Euparal อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเก็บในหลอดทดลอง (vial) ซึ่งบรรจุสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ กรีเซอรีน (glycerien) ผสม 95% alcohol

### 3.2 การจำแนกและการบรรยายลักษณะ

เนื่องจากไม่สามารถระบุแหล่งที่เก็บ Holotype ของด้วงหนวดยาวอ้อยกลุ่มนี้ได้ ดังนั้น การวิเคราะห์จำแนกชนิดของด้วงหนวดยาวอ้อยทำโดยการนำตัวอย่างที่ได้เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในห้องพิพิธภัณฑ์แมลง มหาวิทยาลัยขอนแก่นและพิพิธภัณฑ์แมลง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อความถูกต้องมากที่สุดในการจำแนกและได้รับการยืนยันความถูกต้องของการจำแนกระดับชนิดจากผู้เชี่ยวชาญด้วงหนวดยาวในต่างประเทศและศึกษาจากเอกสารทางวิชาการดั้งเดิมที่มีการบรรยายแมลงต้นแบบ (Type specimen) ของด้วงหนวดยาวกลุ่มนี้ ได้แก่ Thomson (1860), Gahan

(1906) และ Guérin-Méneville (1844) นอกจากนี้ยังมีเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องที่ใช้ประกอบการจำแนกได้แก่ Gressitt (1951)

รายละเอียดการวัดส่วนประกอบต่างๆ ลำตัวของตัวเต็มวัยด้วงหนวดยาว ดังภาพที่ 3.4 โดยใช้วิธีการของ Thongphak and Wang (2007) และการบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน มีรายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 3.5

BL คือ ความยาวทั้งหมดของลำตัววัดตั้งแต่กรามถึงปลายปีกคู่หน้า

SW คือ ความกว้างของลำตัวคือวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด ระหว่างโคนปีกทั้งสองข้าง

PL คือ ความยาวของ pronotum วัดจากขอบบนถึงขอบล่างของ pronotum

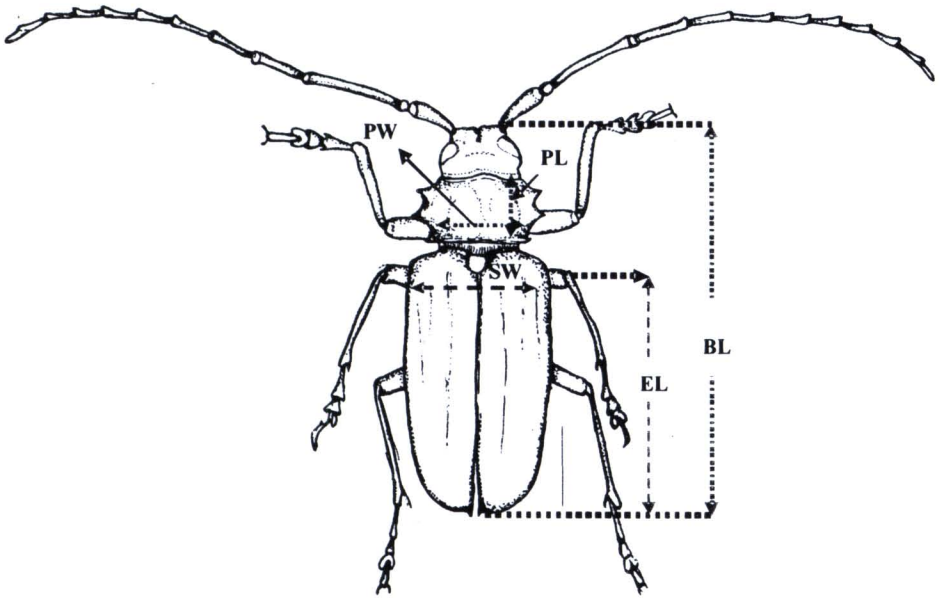
PW คือ ความกว้างของ pronotum วัดระหว่างขอบล่างของ pronotum

DUE คือ ความยาวระหว่างขอบตารวม ด้านบนหนวด

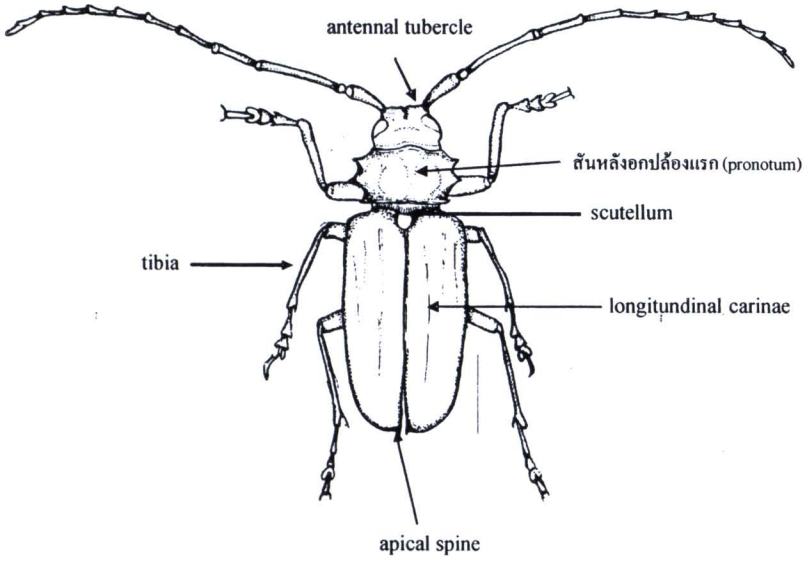
DLE คือ ความยาวระหว่างขอบตารวมด้านล่าง ด้านใต้หนวด

DVE คือ ความยาวระหว่างขอบตารวมด้านล่าง

EL คือ ความยาวของปีกวัดจากโคนปีกถึงปลายปีก

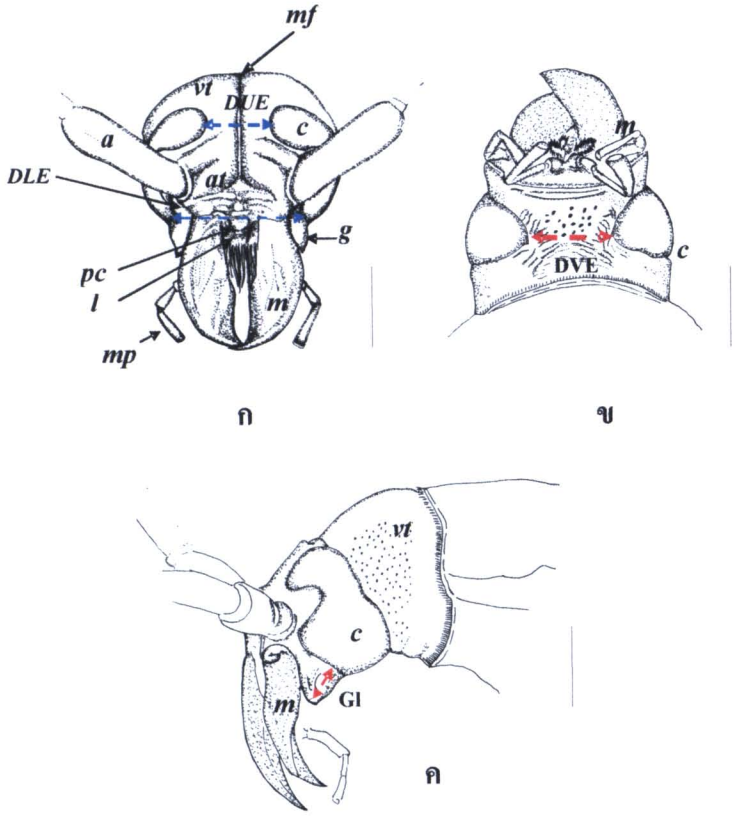



ก

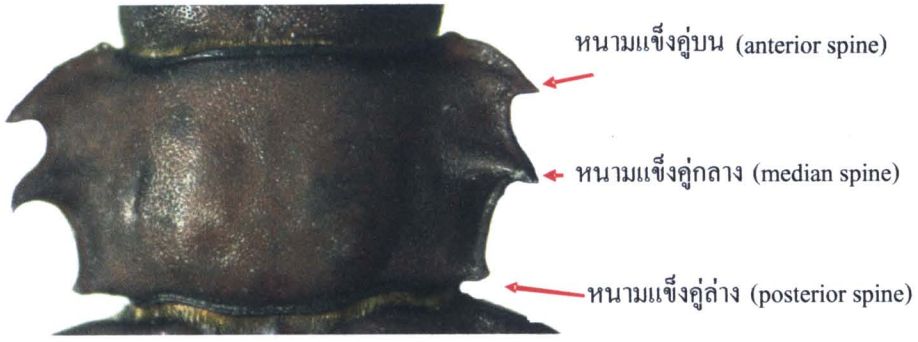



ข

**ภาพที่ 3.4** ลักษณะทั่วไปของด้วงหนวดยาว *Dorysthenes granulosus.* ก. แสดงรายละเอียดการวัดส่วนต่างๆ ข. แสดงรายละเอียดโครงสร้างลำตัว PW, pronotum width; PL, pronotum length; SW, shoulder width; EL, elytral width. Scale bars = 0.5 mm.




**ภาพที่ 3.5** แสดงรายละเอียดโครงสร้างส่วนหัวของด้วงหนวดยาวตัวเต็มวัยเพศผู้ ก. ด้านหน้า ข. ด้านล่าง ค. ด้านข้าง. a, antennae; at, antennal tubercle; vt, vertex; pc, postclypeus; l, labrum; g, genae; m, mandible; mp, maxillary palp; mf, median frontal groove; c, compound eye; DUE, distance between upper lobe of eye; DLE, distance between lower lobe of eye; DVE, distance between ventral lobe of eye; GL, genal length. Scale bars = 0.5 mm.




**ภาพที่ 3.6** แสดงรายละเอียดสันหลังอกปล้องแรก (pronotum)

## 4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของด้วงหนวดยาว

### 4.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Taxa)

ตัวอย่างด้วงหนวดยาวที่ได้รับการจำแนกชนิด วิเคราะห์ชนิด โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างของด้วงหนวดยาว 2 ชนิด จากแปลงปลูกอ้อยทั้งหมด 5 แหล่ง ซึ่งแต่ละแหล่งใช้จำนวนตัวอย่างละ 2 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างด้วงหนวดยาว *Dorysthenes walkeri* ที่เลือกเป็นตัวอย่างแมลงนอกกลุ่ม (Outgroup) ในการศึกษาครั้งนี้

### 4.2 การสกัด DNA

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของแมลงดัดแปลงวิธีการของ Reineke et al. (1998) รายละเอียดดังนี้ นำส่วนขาหลังของตัวเต็มวัย 1 ขา ใส่ในโกร่ง พร้อมเติม TE buffer or extraction buffer 500 µl แล้วบดให้ละเอียด (ยกเว้นตัวอย่างแมลงจากนครสวรรค์และกำแพงเพชร ที่ใช้ส่วนขาของตัวหนอนในการศึกษา) ดูดส่วนที่เป็นสารละลายใส่ใน tube เติม proteinase K 4 mg/ml 4 µl นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเขย่าทุกครึ่งชั่วโมง นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ สกัดดีเอ็นเอโดยเติม phenol : chloroform อัตราส่วน 1:1 และผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วทิ้งไว้ 3-5 นาที นำมาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติม chloroform : iso-amyl alcohol (24:1) ปริมาณ 1 เท่าของสารละลาย นำมาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมสารละลาย 3M sodium aceatate ปริมาณ 1/10 เท่า ของปริมาตรที่มีอยู่ในหลอด และเติม absolute ethanol ปริมาณ 2 เท่า จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายในหลอดทิ้ง ล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ alcohol ประมาณ 500 µl นำมาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทออก (ทำซ้ำขั้นตอนการล้างอีกครั้ง) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ดังในตารางภาคผนวกที่ 1)

**4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction, PCR)**

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.2 มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเรียงลำดับเบส (DNA sequencing) โดยเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COI บนไมโตรคอนเดรีย ที่ใช้ทดสอบด้วยเครื่อง PCR thermoclycer (BIO-RAD รุ่น Mycycler thermal cycler) โดยเทคนิค PCR อาศัยหลักการเพิ่มและลดอุณหภูมิต่อเนื่องซ้ำๆ กันหลายรอบ โดยสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกริยา (ดังในตารางภาคผนวกที่ 2)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ LCO 1490 (Forward) และ HCO 2198 (Reverse) (Folmer et. al. 1994) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Forward primer:

LCO 1490 (F) 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' ที่ตำแหน่ง ยีน 1490 bp

Reverse primer :

HCO 2198 (R) 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3' ที่ตำแหน่ง ยีน 2198 bp

ในการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของ COI gene บนไมโตรคอนเดรียนำมาทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดเวลา อุณหภูมิและจำนวนรอบแต่ละขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขบวนการ Denaturation, Annealing, Extension จำนวน 35 รอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้ Denaturation 94 °C เป็นเวลา 1 นาที Annealing 45 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ Extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product บน 2% agarose gel electrophoresis ผลของ PCR product ที่ต้องการคือ 708 bp จากนั้นนำ PCR product ที่เหลือส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## 5. การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ทำการจัดเรียงเทียบ (alignment) นิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม ClustalX (Thomson et. al., 1997) ไฟล์ที่ได้ใช้เป็น input file สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum pasimony คือการหารูปแบบ phylogenetic tree ที่ดีที่สุดมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างน้อยที่สุด โดยวิธี Heuristic search แบบ stepwise-addition จำนวน 100 ครั้ง จากนั้นเลือก consensus tree ที่ 50% majority rule วิเคราะห์หาค่า bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ