

บทที่ 3

อุปกรณ์และการวิจัย

1. การเก็บรวบรวม และ การเตรียมเส้นใยจากเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 เก็บรวบรวมเชื้อรา *F. oxysporum*

รวบรวมเชื้อรา *F. oxysporum* จากแหล่งต่าง ๆ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันต่างประเทศ โดยเชื้อราที่รวบรวมได้ทั้งหมดก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปได้ผ่านการทำ single spore isolation และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) เพื่อตรวจสอบลักษณะของโคโลนีของแต่ละสายพันธุ์

1.2 การเตรียมเส้นใยจากเชื้อรา

เมื่อได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนแล้วจึงนำบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อ *F. oxysporum* ที่เลี้ยงบน PDA ย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Broth (PDB) ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน โดยไม่ต้องเขย่าจากนั้นจึงทำการเก็บรวบรวมเส้นใยของเชื้อราโดยวิธีการกรองบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วย buchner funnel โดยวางกระดาษกรองลงบนกรวยกรองจากนั้นเทอาหาร PDB ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ลงบนกระดาษกรอง ล้างเส้นใย (หลายๆ ครั้ง) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งมาแล้ว เมื่อกรองจนเส้นใยแห้งติดกระดาษกรองใช้ forceps ลอกเส้นใยของเชื้อรามาใส่สีกัด คีเอ็นเอได้ทันที หรือเก็บใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัด คีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป (สามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน)

2. การสกัดคีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum*

2.1 สกัดคีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

การสกัดจะอาศัยหลักการที่สำคัญในการสกัดคีเอ็นเอจากพืชดัดแปลงมาจากวิธีของ Roger และ Bendich (1988) โดยใช้ buffer 2X CTAB (1.4M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0) ในการสกัด กล่าวคือในขั้นแรกจะต้องทำให้เซลล์เชื้อราแตก เพื่อให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมา ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้โดยการบดรวมกับไนโตรเจนเหลว หรือน้ำแข็งแห้ง หลังจากนั้นจะทำการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยสารซักฟอก CTAB (ภาคผนวก) เพื่อให้คีเอ็นเอถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลาย buffer ที่มีสาร EDTA (ภาคผนวก) ที่จะช่วยป้องกันคีเอ็นเอไม่ให้ถูกทำลายด้วย endogenous nucleus ซึ่ง EDTA นี้เป็นสาร chelating agent ที่จะเข้าจับกับ

Mg²⁺ ที่เป็น cofactor ของ เอนไซม์ nuclease และมีผลทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้ จากนั้นจึงสกัดโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้ chloroform หรือ phenol จากหลักการดังกล่าวนี้ สามารถสรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ดังต่อไปนี้

1. ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเชื้อราที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ
2. นำเส้นใยใส่โกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติม liquid nitrogen เพื่อให้เซลล์ของเส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดให้เป็นผง
3. ตั้งโกร่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อตัวอย่างเริ่มหลอมละลายเติม 2x CTAB buffer
4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน (เส้นใยของเชื้อราที่บดละเอียดแล้วกับ buffer) ถ่ายใส่หลอด centrifuge นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-30 นาที
5. เติม Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม buffer 10% CTAB ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นเติม Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมของเหลวส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน ซึ่งขั้นนี้ดีเอ็นเอจะตกตะกอน
9. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
10. เทของเหลวส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 70% ETOH (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)
11. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
12. เทของเหลวส่วนบนทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูทิ้งไว้ให้แห้ง
13. เติม TE buffer เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายยาก หรือ ไม่ละลายให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดูดสารละลาย DNA ที่สกัดได้ใส่หลอด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปตรวจสอบต่อไป

2.2 ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

2.2.1 การเตรียมแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel)

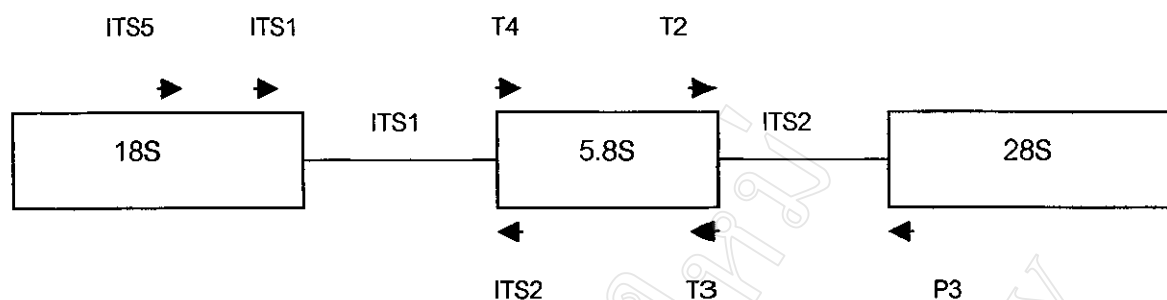
1. เตรียมอะกาโรสเข้มข้นเจล 1% โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายใน microwave จนผงอะกาโรสละลายจนหมด
2. ปล่อยให้อะกาโรสเย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) แล้วจึงเทลงในถาดเจล ให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงใส่หัวที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจลเพื่อให้เกิดช่องเล็ก (well) เพื่อใส่ตัวอย่าง
3. เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วดึงหัวออกแล้วนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

2.2.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำแผ่นอะกาโรสที่เตรียมไว้วางลงในกล่องอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบเต็ม 1X TAE buffer ลงในกล่องให้ท่วมแผ่นอะกาโรส (ผิวอะกาโรสอยู่ได้ 1X TAE buffer ประมาณ 1-3 มิลลิเมตร) ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากันโดยใช้ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับ DNA 5 ไมโครลิตรแล้วใช้ micropipet ค่อยๆใส่ลงในช่องตัวอย่างของอะกาโรสที่เตรียมไว้ ปิดฝากล่อง เปิดสวิตช์เครื่องดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายของแผ่นอะกาโรสจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นอะกาโรสเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยย้อมสี ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV transilluminator แถบดีเอ็นเอจะเรืองแสงเป็นแถบสว่าง

3. ทำการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี PCR

ใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ primer 2 ชนิดคือ ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') และ P3 (5'GCCGCTTCATCGCCGTTAC3') ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2. แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Hirata and Takamatsu, 1996)

3.1 เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction Mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว	37.8
10X PCR buffer	5
dNTP mix (2.5 mM)	4
Primer ITS5 (20 pmol/μl)	1
Primer P3 (20 pmol/μl)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase	0.2
ปริมาตรรวม	50

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว เติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของ reaction mixture นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไป incubate ในเครื่อง thermal cycler รุ่น PC-700 (ASTEC) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
 primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
 ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ
 หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล
 ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ต่อไป

3.2 ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนในการตรวจสอบทำเหมือนกับในข้อ 2.2 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของอะกาโรส
 เจลเป็น 1.5% เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.75 กรัม ผสม 1X buffer TAE 50 มิลลิลิตร นำไป
 หลอมละลายและตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม ethidium
 bromide 50 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นจึงนำไปเทลงถาดเจลต่อไป

3.3 การแยกผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนำไปตรวจสอบภายใต้
 แสง UV จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500-600 คู่เบส จากนั้นจึงทำการตัดเจลใน
 ส่วนที่มีการเรืองแสง (ขนาดประมาณ 500 คู่เบส) แล้วนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้
 JET SORB kit (Genomed) ดำเนินตามคู่มือที่แนบมา กับ kit ดังต่อไปนี้

3.3.1 การเตรียมเจล

ชั่งน้ำหนักเจลและสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3
 (w/v) จากนั้นผสม Jetsorb ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายเจลออกและให้ดีเอ็นเอเกาะติดกับอนุภาคของ
 Jetsorb แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสาร
 ละลายส่วนบนทิ้งไป จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยสารละลาย A1 buffer ปริมาตร 300
 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศา
 เซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง

3.3.2 ล้างตะกอนด้วย low salt buffer

เติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อได้ตะกอนแล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วทำการล้างตะกอนอีกครั้งด้วย A2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นแยกให้ตกตะกอนอีกครั้ง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง

3.3.3 การแยกดีเอ็นเอออกจาก Jetsorb

เติมสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ไว้ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการหาลำดับเบสในขั้นต่อไป

4. วิเคราะห์หาลำดับเบส

หาลำดับการเรียงตัวของเบส ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ PRISM Dye Terminator cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan ซึ่งใช้ primer 4 ชนิดคือ ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') P3, T3 (5'ACGCTCGAACAGGCATGCCG3') และ T4 (5'TCAACAACGGATCTCTTGGC3') ซึ่ง primer ทั้ง 4 จะใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตามตำแหน่งต่างๆดังแสดงในภาพที่ 2

4.1 การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปตรวจหาลำดับเบส

- ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Reagent Mix A	2
Reagent Mix B	2
DNA (0.2-2.0 µg)	(15) ^a
Primer (5 pmol)	(1) ^b
H ₂ O	(0) ^c

ปริมาตรรวม

หมายเหตุ : a คือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 150 นาโนกรัม ต่อ 1 ไมโครลิตร

b คือ ความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 5 พิโคโมล ต่อ 1 ไมโครลิตร

c คือ ปริมาตรของน้ำที่ใช้ หลังจากเติมส่วนผสมอื่นๆ ทั้งหมดแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตร

โดยเริ่มจากการผสมส่วนผสมทุกอย่างแล้วเติม light mineral oil ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดทับส่วนบนของสารละลายเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไป incubate เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

ในขั้นตอนที่ 2 นี้ ทำซ้ำจำนวน 25 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วดูดสารละลายทั้งหมด (ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ย้ายไปใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วทำการล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% EtOH (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวบนทิ้งนำตะกอนไป dry-up ใน vacuum จนกระทั่งตะกอนแห้ง แล้วเก็บตะกอนเพื่อนำไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป

4.2 การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

ทำการประกอบชุดแผ่นกระจกเตรียมไว้แล้วทำการเตรียมสารละลายโพลีอะครีลาไมด์ โดยเริ่มจากการชั่ง urea 25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเจล Lang Ranger ® (polyacrylamide gel) ปริมาตร 5.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (อาจใช้ hot plate ช่วยในการละลาย) หลังจากนั้นเติม 10X TBE (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำสารละลายไป incubate ในเครื่อง vacuum ประมาณ 17 นาที เพื่อให้สารละลายไม่เกิดฟองอากาศ จากนั้นเติม 10% APS (ภาคผนวก) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม TEMED (ภาคผนวก) ปริมาตร 21.5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้เทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นกระจกที่ได้ไปล้างทำความสะอาด แล้วนำแผ่นกระจกนี้ไป

ประกอบเข้าเครื่อง Applied Biosystem 373A sequencer เติม running buffer (1X TBE) ลงใน chamber เตรียมพร้อมเพื่อตรวจหาลำดับเบส

4.3 ตรวจหาลำดับเบส

นำตะกอนดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 มาละลายด้วย loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไป incubate ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสโดยการหยดลงในเจลที่เตรียมไว้สำหรับการตรวจหาลำดับเบส ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทช์เครื่องเพื่อให้เครื่องทำงาน โดยเครื่องจะทำงานประมาณ 14 ชั่วโมง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติโดยเซตเครื่องตามคู่มือที่ติดมากับเครื่องและข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะถูกบันทึกไว้ในคอมพิวเตอร์

5. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS และ 5.8S rDNA ของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 11 formae spaciales โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC (Software Development) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 formae spaciales และค่า genetic distance โดยใช้เชื้อรา *F. solani* เป็น out group ด้วยโปรแกรม PAUP version 3.11 ซึ่งวิเคราะห์แบบ parsimony โดยใช้ Heuristic Methods ในการหา optimal tree และคำนวณ bootstrap frequency ในการสนับสนุน tree ที่หามาได้