บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ก. <u>การศึกษาคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบ</u>

การศึกษาคาริโอไทป์ของโครโมโซมหอยนางรมสามารถศึกษาได้ดีในโครโมโซมระยะเมตาเฟส เนื่องจากในระยะนี้โครโมโซมจะหดสั้นและเห็นได้ชัดเจนกว่าในระยะอื่น ๆ (Longwell et al., 1967) จากการศึกษาโครโมโซมในหอยนางรมหลายชนิดในครอบครัว Ostreidae ซึ่งประกอบด้วยหอยนางรมชนิด *C.gigas*,*C.rhizophorae*, *C.virginica*, *O.edulis*, *O.lurida* และ *O.equestris* (Longwell et al., 1967; Ahmed and Sparks, quoted in Longwell et al., 1967) พบว่ามีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง(2n=20) จากการทดลองนี้พบว่าหอยนางรมปากจีบ *S.cucullata* มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง (2n=20)เช่นกัน ส่วนหอยนางรมชนิด *O.dendrostrea folium* มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 18 แท่ง (2n=18) (Ieyama, quoted in Insua and Thiriot-Quievreux, 1991) ดังนั้นหอยนางรมปากจีบจึงน่าจะมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับหอยนางรม *C.gigas* หรือ *C.rhizophorae* มากกว่า *O.dendrostrea folium* ข้อมูลทางด้านจำนวนโครโมโซมสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดการทางพันธุกรรม เช่นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างหอยนางรมปากจีบซึ่งมีขนาดเล็กกับหอยนางรมที่มีขนาดใหญ่กว่า โดยการใช้จำนวนโครโมโซมเป็นตัวเลือกชนิดของหอยนางรมที่มีขนาดใหญ่มาผสมข้ามพันธุ์กับหอยนางรมปากจีบ ซึ่งหอยนางรมชนิด *O. lurida* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับหอยนางรมปากจีบจึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการผสมข้ามพันธุ์มากกว่าหอยนางรมชนิด *O.dendrostrea folium* นอกจากนี้ยังสามารถใช้จำนวนโครโมโซมเป็นตัวตรวจสอบชนิดของพลอยด์ดีเป็นต้น

จากการศึกษาคาริโอไทป์ครั้งนี้พบโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 14 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 6 แท่ง แต่การศึกษาของ วิชุวรรณ ตั้งพงษ์ปราชญ์(2536) พบว่ามีโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 8 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 12 แท่ง ซึ่งจากการศึกษาของวิชุวรรณ ตั้งพงษ์ปราชญ์ ใช้ตัวอย่างในการทดลองน้อยเพียง 5 ตัวอย่าง และโครโมโซมมีลักษณะหดสั้น

จึงดูความแตกต่างระหว่างโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริกและซับเมตาเซนตริกได้ลำบาก ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้การจำแนกชนิดของโครโมโซมไม่ตรงกับการศึกษาครั้งนี้ ส่วนในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างในการศึกษา 10 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกรูปร่างและลักษณะของโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริกและซับเมตาเซนตริกได้ชัดเจน

โครโมโซมของหอยนางรมปากจีบดิพลอยด์มีขนาด 2.368-4.913 ไมครอน ส่วนในทริพลอยด์มีขนาด 2.540-5.584 ไมครอน โครโมโซมของดิพลอยด์และทริพลอยด์มีขนาดต่างกันเล็กน้อย เพราะในแต่ละเซลของหอยนางรมมีการแบ่งเซลไม่พร้อมกัน ดังนั้นหลังจากใช้โคลชิชินหยุดการแบ่งเซลไว้ที่ระยะเมตาเฟสแล้ว การหดตัวของโครโมโซมในแต่ละเซลจึงไม่เท่ากัน นอกจากนี้ระยะเวลาในการแช่โคลชิชินในตัวอย่างหอยนางรมแต่ละระยะก็มีผลต่อการหดตัวของโครโมโซมเช่นกัน เพราะการแช่ตัวอย่างในโคลชิชินนานเกินไปอาจจะทำให้เกิดโพลีพลอยด์ขึ้นได้ และทำให้โครโมโซมหดสั้นมากจนเกินไป โครโมโซมที่หดสั้นมากจะมีลักษณะคล้ายกันจนไม่สามารถนำมาศึกษาคาริโอไทป์ได้ หรือถ้าใช้เวลาในการแช่ตัวอย่างในโคลชิชินน้อยเกินไปโครโมโซมก็จะไม่หยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส หลังจากนำมาทำสไลด์จึงไม่สามารถมองเห็นโครโมโซม นับจำนวนและจำแนกชนิดของโครโมโซมได้ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างในสารละลายโคลชิชินที่เหมาะสมในหอยนางรมปากจีบคือ 0.05 เปอร์เซนต์ และแช่ตัวอย่างเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง สำหรับหอยนางรมระยะโทรโคฟอร์ และ 4-5 ชั่วโมง สำหรับลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน ตามลำดับ

ข. <u>ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์</u>

การพัฒนาการของไข่ภายหลังการปฏิสนธิจะเป็นตัวกำหนดระยะเวลาที่จะเริ่มเหนี่ยวนำทริพลอยด์ การเลือกใช้ระยะเวลาภายหลังจากปฏิสนธิ 15 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม เพราะจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าภายหลังการปฏิสนธิ 15 นาที มีปริมาณโพลาร์บอดีที่ 1 เกิดขึ้นประมาณ 1.75 เปอร์เซนต์ และเมื่อได้ทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ภายหลังการปฏิสนธิที่ 10 และ 15 นาที พบว่าที่เวลาภายหลังการปฏิสนธิ 10 นาที มีอัตราการรอดต่ำกว่าที่ 15 นาที แต่มีปริมาณของทริพลอยด์ไม่แตกต่างกัน การเริ่มเหนี่ยวนำที่ 10 นาที ภายหลังการปฏิสนธิมีอัตราการรอดต่ำนั้นอาจจะเกิดจากการเหนี่ยวนำที่เร็วเกินไปและไปรบกวนกระบวนการปฏิสนธิจึงทำให้ไซโกตที่ได้มีความผิดปกติและมีอัตราการรอดต่ำ การเหนี่ยวนำภายหลังการปฏิสนธิ 15 นาที เป็นการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส I เพราะยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 ซึ่งน่าจะมีความเหมาะสมกับการทดลองนี้

เพราะการเหนี่ยวนำในระยะไมโอซีส II มีโพลาร์บอดีที่ 2 เกิดไม่พร้อมกัน คือในบางเซลเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และบางเซลเกิดโพลาร์บอดีที่ 2 แล้ว แต่บางเซลยังไม่เกิดโพลาร์บอดีเลย การที่โพลาร์บอดีเกิดไม่พร้อมกันมีสาเหตุมาจากคุณภาพของเซลสืบพันธุ์ไม่สม่ำเสมอเพราะเซลสืบพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองได้จากการผ่าตัดและได้จากพ่อแม่พันธุ์หลายตัว เซลสืบพันธุ์ที่ได้จึงมีหลายระยะทำให้โพลาร์บอดีเกิดไม่พร้อมกัน และจากการศึกษาของ Yamamoto และคณะ (1988) พบว่าการเหนี่ยวนำในระยะไมโอซีส I ได้ปริมาณของทริพลอยด์สูงกว่าการเหนี่ยวนำที่ระยะไมโอซีส II

ลูกหอยที่ได้จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้ไซโตคาลาซินบีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาที ภายหลังการปฏิสนธิเป็นระยะเวลา 15 นาทีได้ผลผลิตของทริพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์ 45.34±8.02 เปอร์เซนต์ โดยมีทริพลอยด์ผสมกับดิพลอยด์ และหลังจากเลี้ยงลูกหอยจนมีอายุ 6 เดือน พบว่าผลผลิตของทริพลอยด์ลดลงเหลือ 3.55±0.32 เปอร์เซนต์ แสดงว่าหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์มีอัตราการรอดต่ำกว่าดิพลอยด์ ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Wada และคณะ (1989) คือปริมาณของทริพลอยด์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการใช้อุณหภูมิและไซโตคาลาซินบีจะลดลง เมื่อหอยนางรมมีอายุมากขึ้น

หอยนางรมทริพลอยด์อายุ 6 เดือน ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไซโตคาลาซินบีมีปริมาณของทริพลอยด์ 11.11±1.57 และ 13.33±2.72 เปอร์เซนต์ ในกลุ่มขนาดเล็กที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.21±0.02 กรัม และในกลุ่มขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.86±0.03 กรัม ตามลำดับ โดยปริมาณของทริพลอยด์ที่เกิดขึ้นในกลุ่มขนาดเล็กและขนาดใหญ่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$, ตารางที่ ค.1 ภาคผนวก ค) แสดงว่าหอยนางรมปากจีบอายุ 6 เดือน ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ มีการเติบโตไม่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Downing และ Allen (1987) ในหอยนางรม *C.gigas* คือเมื่อเลี้ยงหอยนางรมที่ถูกเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยไซโตคาลาซินบีและดิพลอยด์ในกลุ่มควบคุมที่ได้จากเซลสืบพันธุ์ชุดเดียวกันด้วยความหนาแน่นเท่ากัน พบว่าหอยนางรมที่ถูกเหนี่ยวนำทริพลอยด์มีการเติบโตไม่แตกต่างกันในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ การศึกษาของ Stanley และคณะ (1981) ในหอยนางรม *C.virginica* ก็พบว่าหอยนางรมทริพลอยด์มีการเติบโตใกล้เคียงกับดิพลอยด์ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ ถึงแม้ว่าทริพลอยด์จะมีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด ซึ่งทำให้เซลมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ทริพลอยด์กลับมีจำนวนเซลลดลง ดังนั้นหอยนางรมทริพลอยด์จึงมีขนาดใกล้เคียงกับดิพลอยด์ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Swarrup and Fankhauser, quoted in Valenti, 1975;

Purdom, quoted in Allen et al., 1989)

ถ้านำหอยนางรมทริพลอยด์อายุ 6 เดือน ที่ได้จากการทดลองนี้ไปเลี้ยงต่อจนถึงวัยเจริญพันธุ์น่าจะเห็นความแตกต่างระหว่างหอยนางรมดิพลอยด์และทริพลอยด์ชัดเจนขึ้น เพราะเมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์วางไข่หอยนางรมที่เป็นดิพลอยด์จะปล่อยเชลสืบพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาของไพโรจน์ พรหมานนท์ (2512) พบว่าหอยนางรมปากจีบมีปริมาณเนื้อโดยน้ำหนักลดลงมากหลังจากปล่อยเชลสืบพันธุ์เพราะ 55 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักตัวหอยนางรมเป็นส่วนของเชลสืบพันธุ์ ซึ่งเมื่อหอยนางรมปล่อยเชลสืบพันธุ์ไปแล้วปริมาณเนื้อโดยน้ำหนักจะลดลงมาก ส่วนหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์ซึ่งเป็นหมันหรือมีพัฒนาการของเชลสืบพันธุ์ได้น้อยกว่าปกติ เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์วางไข่จะไม่มีการปล่อยเชลสืบพันธุ์ เนื้อเยื่อของหอยนางรมจึงไม่ลดลง คุณภาพเนื้อก็จะคงที่ตลอดปี

จากการเลี้ยงหอยนางรมทริพลอยด์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำซึ่งมีผลผลิตของทริพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์ที่ได้เท่ากับ 45.34±8.02 เปอร์เซนต์ พบว่าหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์มีผลผลิตลดลงเหลือเพียง 3.55±0.32 เปอร์เซนต์เมื่ออายุ 6 เดือน และกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำทริพลอยด์มีอัตราการรอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3 เท่า ถึงแม้ว่าผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้ในการทดลองนี้ไม่สูงมากนัก เนื่องจากเป็นการทดลองครั้งแรกในหอยนางรมปากจีบแต่ในอนาคตน่าจะสามารถปรับปรุงให้มีผลผลิตของทริพลอยด์สูงขึ้นได้ และเนื่องจากธรรมชาติของหอยนางรมเป็นสัตว์น้ำที่มีอัตราการรอดต่ำอยู่แล้วหอยนางรมจึงมีไข่ในปริมาณมาก ดังนั้นในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์แต่ละครั้งจึงควรใช้ไข่ในปริมาณมากเพื่อชดเชยกับอัตรารอดต่ำ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าการผลิตทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบมีความเป็นไปได้แน่นอน

ถึงแม้การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยใช้ไซโตคาลาซินบี เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตทริพลอยด์ในหอยนางรมหลายชนิด และสามารถผลิตทริพลอยด์จนถึงอายุ 6 เดือนได้ แต่ไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงในบ้านเรา เพราะไซโตคาลาซินบีมีราคาแพงและความเป็นพิษสูงซึ่งอาจจะเป็นอันตรายต่อเกษตรกรซึ่งนำไปใช้โดยไม่ระมัดระวังได้ ส่วนการใช้ความดันนั้นเครื่องมือมีราคาแพงและสามารถเหนี่ยวนำได้ในปริมาณน้อย แต่การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้อุณหภูมิสามารถปฏิบัติการได้ง่าย ไม่มีความเป็นพิษ มีต้นทุนการผลิตต่ำ และสามารถกระทำได้ทีละมาก ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ปรับปรุงผลผลิตในการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในเมืองไทย จึงได้นำวิธีนี้มาใช้ในการทดลองนี้ แต่วิธีการใช้อุณหภูมิมีข้อเสียคือมีอัตราการรอดไม่สูงมากนัก (Yamamoto et al., 1988 ; Malison et al.,1993a)

ค. การเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ

การที่ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของผลผลิตทริพลอยด์ในการเหนี่ยวนำโดยการใช้อุณหภูมิสูงและการใช้คาเฟอีนซึ่งใช้สภาวะต่าง ๆ ในการเหนี่ยวนำเหมือนกันมีค่าค่อนข้างสูง แสดงว่าข้อมูลในการทดลอง 2 ครั้ง ของทั้ง 2 การทดลองมีความแตกต่างกันมากโดยพบความแตกต่างระหว่างการทดลอง 2 ครั้ง ประมาณ 0.96-19.28 เปอร์เซนต์ การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในการทดลองแต่ละครั้งใช้ไข่ต่างชุดและต่างช่วงเวลากัน แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ได้ผลผลิตของทริพลอยด์ที่มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน การทดลองของ Scarpa และคณะ (1994) ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) ก็พบความแตกต่างระหว่างผลผลิตของทริพลอยด์ในการทดลอง 2 ครั้ง เช่นกัน โดยพบว่าปริมาณของทริพลอยด์ในระหว่างการทดลอง 2 ครั้ง มีความแตกต่างกันประมาณ 4-20 เปอร์เซนต์ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากคุณภาพของไข่ที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งมีความสมบูรณ์เพศไม่เท่ากันและมาจากพ่อแม่พันธุ์ต่างชุดและต่างช่วงเวลากัน ในเมื่อความสมบูรณ์ของไข่ไม่เท่ากันนั้นจะทำให้การพัฒนาการของไข่ภายหลังการปฏิสนธิในแต่ละเซลไม่เท่ากัน ดังนั้นหลังจากเหนี่ยวนำทริพลอยด์แล้วจึงได้ผลผลิตของทริพลอยด์ไม่เท่ากัน

ในการเหนี่ยวนำโดยการใช้อุณหภูมิสูงและการเหนี่ยวนำโดยการใช้คาเฟอีนพบว่ามีผลผลิตของทริพลอยด์เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมประมาณ 0.96-1.09 เปอร์เซนต์ จากรายงานของ Okamoto และ Arimoto อ้างถึงใน Yamamoto และ Sugawara (1988) กล่าวว่ามีความเป็นไปได้ว่าในธรรมชาติมีหอยที่เป็นทริพลอยด์ ซึ่งการทดลองของ Yamamoto and Sugawara (1988) ในหอยนางรม *C.gigas* พบว่ามีหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมเช่นกัน และการทดลองของ Scarpa และคณะ (1994) ในหอยแมลงภู่ *Mytilus galloprovincialis* พบทริพลอยด์ในกลุ่มควบคุมสูงถึง 2.3 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้การพบทริพลอยด์ในกลุ่มควบคุมก็อาจจะเกิดจากความผิดพลาดในการนับจำนวนโครโมโซมหรือเป็นผลมาจากการยับยั้งการแบ่งเซลของโคลชิชินในขั้นตอนการหาโครโมโซม ซึ่งการแช่โคลชิชินเป็นเวลานานเกินไปก็อาจจะทำให้เกิดโพลีพลอยด์ขึ้นได้เช่นกัน แต่ในการทดลองนี้ได้ผลผลิตของทริพลอยด์ในกลุ่มควบคุมต่ำกว่าในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำทริพลอยด์มาก

การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบโดยการใช้อุณหภูมิสูง

จากผลการศึกษาพบว่าผลผลิตของทริพลอยด์แปรผันตามระดับของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ โดยการเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทริพลอยด์

สูงกว่าที่อุณหภูมิ 37.5 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำให้ผลผลิตของทริพลอยด์สูงขึ้น ส่วนการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ 37.5 เป็นเวลา 9 นาที และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที มีค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานสูงกว่าช่วงอื่น ๆ การที่ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ต่างกันมากนั้นอาจจะเกิดจากการสุ่มตัวอย่างไม่ดีหรือการใช้ไข่ที่มีพัฒนาการของไข่ก่อนนำมาเหนี่ยวนำทริพลอยด์ไม่เท่ากัน แต่ถ้าพิจารณาจากค่าต่ำสุดของผลผลิตทริพลอยด์ที่เหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ 37.5 และ 40 องศาเซลเซียสแล้ว พบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำทำให้ผลผลิตของทริพลอยด์ค่อย ๆ สูงขึ้นจนถึงระยะเวลาในการเหนี่ยวนำประมาณ 9 นาทีเท่านั้น หลังจากนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้มากกว่า 9 นาที จะได้ผลผลิตของทริพลอยด์ใกล้เคียงกับการใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 9 นาที

การเหนี่ยวนำด้วยการใช้อุณหภูมิได้ผลผลิตของทริพลอยด์สูงสุดเฉลี่ย 40.11±19.28 เปอร์เซนต์ และ 15.42±5.14 เปอร์เซนต์ ในระยะ D-shape (ซึ่งไม่ได้รายงานข้อมูลในระยะ D-shape ในผลการทดลองครั้งนี้) ส่วนผลผลิตของทริพลอยด์ในระยะ D-shape ในหอยตะโกรมกรามขาว *C. belcheri* ซึ่งเหนี่ยวนำโดยการใช้อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส เท่ากันมีผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้ในระยะ D-shape เฉลี่ยสูงสุดเพียง 4.63 เปอร์เซนต์ (Silapajarn, 1993) ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากหอยนางรมปากจีบอาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง จึงมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้มากว่าหอยตะโกรมกรามขาวซึ่งอาศัยอยู่ใต้น้ำตลอดเวลา ดังนั้นผลผลิตของทริพลอยด์ในหอยตะโกรมกรามขาวจึงต่ำกว่าในหอยนางรมปากจีบ

การเหนี่ยวนำในหอยนางรมปากจีบโดยการใช้คาเฟอีน

Durand และคณะ (1990) ได้นำคาเฟอีนมาใช้เหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยมุก *Pinctada fucata martensii* โดยใช้คาเฟอีนที่มีความเข้มข้น 1-13 มิลลิโมลาร์ร่วมกับอุณหภูมิ 31.5 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถทำให้เกิดทริพลอยด์ได้สูงสุด 35.8 เปอร์เซนต์ และมีอัตรารอด 13-50 เปอร์เซนต์ ในการทดลองนี้จึงได้นำคาเฟอีนมาทดลองใช้กับหอยนางรมปากจีบเพราะนอกจากคาเฟอีนมีราคาถูกแล้วยังมีความเป็นพิษต่ำกว่าไซโตคาลาซินบี ซึ่งการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิสูงน่าจะให้ผลผลิตของทริพลอยด์สูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง เพราะการแพร่ของสารผ่านเยื่อเซลจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในที่อุณหภูมิสูง (Bowler and Fuller, 1987) และจากการศึกษาของ (Sivets, 1963) กล่าวว่าที่อุณหภูมิสูง

คาเฟอีนสามารถละลายในน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นในที่อุณหภูมิสูงความสามารถในการแพร่ของคาเฟอีนผ่านเยื่อเซลจึงสูงขึ้น

จากผลการทดลองการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสูงได้ถูกนำมาใช้ประกอบการวางแผนการทดลองของการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยการใช้คาเฟอีน โดยในการเหนี่ยวนำด้วยการใช้อุณหภูมิสูงได้ผลผลิตของทริพลอยด์ต่ำสุดที่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 3 นาที และมีอัตราการรอดต่ำสุดที่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 15 นาที ในการทดลองนี้จึงเลือกระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที เพราะเป็นช่วงที่มีผลผลิตของทริพลอยด์ค่อนข้างสูง และมีความแตกต่างของระยะเวลาในการเหนี่ยวนำมากพอสมควร ส่วนการเหนี่ยวนำที่ 6 และ 9 หรือ 9 และ 12 นาที มีความแตกต่างของระยะเวลาในการเหนี่ยวนำน้อยอาจจะทำให้เห็นความแตกต่างของผลผลิตของทริพลอยด์อันเนื่องมาจากการเหนี่ยวนำไม่ชัดเจน ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 2 จึงใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29$\pm$1 องศาเซลเซียส และคาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที

จากผลการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 นาที การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่สูงกว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29$\pm$1 องศาเซลเซียส แสดงว่าผลผลิตของทริพลอยด์ที่สูงขึ้นของคาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส น่าจะเกิดจากการเพิ่มอุณหภูมิ เพราะอุณหภูมิสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายและการแพร่ผ่านเยื่อเซลของคาเฟอีน (Sivets, 1963; Bowler and Fuller, 1987)

การเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำจาก 6 เป็น 12 นาที ทำให้ผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำโดยการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29$\pm$1 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีผลผลิตของทริพลอยด์เพิ่มขึ้น แต่การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทริพลอยด์ลดลง การที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการยับยั้งทั้งการแบ่งนิวเคลียส และการแบ่งไซโตพลาสซึมในระหว่างการแบ่งเซล จึงทำให้กิจกรรมทั้งหมดของไซโกตหยุดลงในระหว่างการเหนี่ยวนำ ไซโกตจึงมีความอ่อนแอและหลังจากหยุดเหนี่ยวนำแล้วอาจจะมีไซโกตของหอยนางรมบางส่วนไม่สามารถมีพัฒนาการต่อ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตของทริพลอยด์ลดลง นอกจากนี้การใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำนานก็น่าจะเพิ่มความรุนแรงในการยับยั้งเช่นกัน ดังนั้นการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิสูงและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำนานจึงทำให้ผลผลิตของ

ทริพลอยด์ลดลง

เนื่องจากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบโดยการใช้อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ได้ผลดีกว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส และการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิสูงจึงได้นำลูกหอยนางรมที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที ไปเลี้ยงต่อจนมีอายุ 6 เดือน แต่พบว่าหอยนางรมที่รอดตายเป็นดิพลอยด์ทั้งหมด การที่เป็นเช่นนี้เพราะในระหว่างการเหนี่ยวนำนั้นอุณหภูมิจะยับยั้งการแบ่งเซลทั้งการแบ่งนิวเคลียสและการแบ่งไซโตพลาสซึมจึงทำให้กิจกรรมทั้งหมดของไซโกตหยุดลง ไซโกตจึงมีความอ่อนแอ และประกอบกับการใช้อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส อาจจะเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไปจนทำให้ลูกหอยเกิดความผิดปกติและเป็นสาเหตุของการตาย ดังนั้นจึงไม่พบหอยนางรมทริพลอยด์ที่อายุ 6 เดือนเลย