ไซยาไนด์เป็นสารพิษที่เกิดจากลินามาริน ซึ่งเป็นไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ประเภทหนึ่งที่สะสมอยู่ภายในแวคคิวโอลของเซลล์ของมันสำปะหลัง เมื่อเซลล์ถูกทำลายไซยาไนด์จะถูกสร้างขึ้น จากการไฮโดรไลซ์ลินารินด้วยเอนไซม์ลินามาเรสซึ่งอยู่ภายในผนังเซลล์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระในเนื้อเยื่อต่างๆของมันสำปะหลัง 7 พันธุ์โดยใช้เทคนิคเชิงเอนไซม์ ขั้นตอนแรกทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม, น้ำหนักของตัวอย่าง, วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของลินามารินเพื่อให้สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระจากมันสำปะหลังที่อายุ 12 เดือน พบว่าตัวอย่างจากใบอ่อนมันสำปะหลังน้ำหนัก 0.1 กรัม และเปลือกของหัวมันสำปะหลังน้ำหนัก 0.3 กรัม นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนเติมลงในสารละลายที่ใช้สกัด pH 5.0 แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50°C ที่เวลา 60 นาทีนั้น สามารถวัดปริมาณไซยาไนด์อิสระได้สูงสุด อย่างไรก็ตามยังพบอีกว่าปริมาณไซยาไนด์อิสระจากการเตรียมตัวอย่างใบอ่อนโดยการใช้มีดหั่นละเอียดกับการบดตัวอย่างใบอ่อนด้วยไนโตรเจนเหลวนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการใช้มีดหั่นใบอ่อนให้ละเอียดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในกรณีที่ไม่มีไนโตรเจนเหลว ผลการศึกษาปริมาณไซยาไนด์อิสระในเนื้อเยื่อต่างๆได้แก่ ใบยอด, ใบอ่อน, ใบโตเต็มที่, ใบแก่, ก้านใบอ่อน, ก้านใบโตเต็มที่, ก้านใบแก่, เปลือก และเนื้อของหัวมันสำปะหลัง จากพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 7 พันธุ์ได้แก่ ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 9 ระยอง 7 ระยอง 3 ระยอง 2 และพันธุ์ห้านาทีที่มีอายุ 1, 4, 8 และ 12 เดือน พบว่าปริมาณไซยาไนด์อิสระที่วัดได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ มีความแปรปรวนสูง มีเพียงปริมาณไซยาไนด์อิสระในเนื้อของหัวมันสำปะหลังที่อายุ 12 เดือนเท่านั้นที่สามารถใช้จำแนกชนิดมันสำปะหลังตามปริมาณไซยาไนด์ได้โดยกลุ่มมันสำปะหลังชนิดที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงได้แก่ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 9 ระยอง 3 และกลุ่มมันสำปะหลังชนิดที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำได้แก่ระยอง 7 ระยอง 2 และห้านาที ซึ่งจะเห็นว่าต้องปลูกมันสำปะหลังเป็นระยะเวลานานถึง 12 เดือนจึงสามารถวัดปริมาณไซยาไนด์เพื่อจำแนกพันธุ์ตามปริมาณไซยาไนด์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณไซยาไนด์กับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไซยาไนด์ของมันสำปะหลังซึ่งได้แก่ยีน CYP79D1 CYP79D2 และลินามาเรส โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ หรือเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน CYP79D1 CYP79D2 และลินามาเรส จากตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลังที่อายุ 12 และ 1 เดือน จำนวน 7 พันธุ์ ได้แก่ระยอง 60 ระยอง 3 ระยอง 72 ระยอง 9 ระยอง 7 ระยอง 2 และพันธุ์ห้านาที ตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลังที่อายุ 1 เดือนมีระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามสอดคล้องกับปริมาณไซยาไนด์อิสระที่พบในเนื้อของหัวมันสำปะหลังอายุ 12 เดือน ในขณะที่การแสดงออกของยีนทั้งสามไม่สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์อิสระ ดังนั้นเทคนิค RT-PCR สามารถนำมาใช้ในการจำแนกมันสำปะหลังตามปริมาณไซยาไนด์ที่แตกต่างกันได้ โดยศึกษาการแสดงออกของยีน CYP79D1 CYP79D2 และลินามาเรส จากตัวอย่างใบอ่อนที่อายุเพียง 1 เดือน ซึ่งทำให้สามารถลดระยะเวลา และพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังได้

Cyanide in cassava tissues is a product from hydrolysis of linamarin which is stored in the vacuoles. Hydrolysis of linamarin is catalyzed by linamarase, an enzyme located ubiquitously in the cell wall. Cyanide can be determined directly in term of free cyanide by enzymatic method. The first objective of this research was to determine the amount of free cyanide in different tissues of 7 cultivars of cassava. The optimal condition for the determination of free cyanide content including varying amount of plant materials, different lengths of incubation time and three methods of preparation of plant materials were investigated. Tissues of cassava were sampled from freshly harvested 12-month-old cassava. The optimal conditions for the determination of free cyanide content involved grinding young leaves (0.1 g) and cassava peel (0.3 g) in liquid nitrogen before adding the extraction buffer (pH 5.0) and incubating at 50°C for 60 minutes. In addition, the free cyanide content from the samples prepared by cutting into fine pieces and that prepared by grinding using liquid nitrogen were not significantly different. Therefore, sample preparation by cutting is an alternative method in case that liquid nitrogen is not available. Free cyanide content in nine different tissues (shoot apex, young leaves, mature leaves, old leaves, young petioles, mature petioles, old petioles, peels and pulp of roots) of seven cultivars of cassava (Rayong 60 Rayong 72 Rayong 9 Rayong 7 Rayong 3 Rayong 2 and Hanatee) was determined. The results showed a wide variation of free cyanide content in different tissues of cassava. Based on the free cyanide content in the root pulp of 12-month-old cassava. Rayong 60 Rayong 72 Rayong 9 and Rayong 3 were classified as high-cyanide cultivars and Rayong 7 Rayong 2 and Hanatee were classified as low-cyanide cultivars. Therefore, classification of cassava based on cyanide content can only be perform when the plants are 12 months old. The second objective of this project was to employ molecular techniques. This study the relationship between the level of expression of genes involved in cyanide synthesis and the the relationship between the level of expression of genes involved in cyanide synthesis and the cyanide content. The expression of CYP79D1, CYP79D2, and linamarase were studied RNA extracted from young leaves of 1- and 12- month-old cassava by using reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that level of the expression of the genes in young leaves of 1-month-old plants, was correlated with free cyanide content in roots of 12 month old plants. However, the expression of the genes in young leaves of 12-month-old plant was not correlated with free cyanide content in roots of 12-month-old plants. Therefore, analysis of gene expression of CYP79D1, CYP79D2 and linamarase in young leaves of 1-month-old plant using RT-PCR technique, can be used to classify cassavas according to their cyanide content, thus, saving time and cultivating area in cassava plant selection.