



METHODS USED IN SPECIES IDENTIFICATION OF HALLUCINOGENIC AND OTHER POISONOUS MUSHROOMS IN FORENSIC INVESTIGATIONS

Aleksandra ZUBER¹, Marek KOWALCZYK¹, Andrzej SEKUŁA¹, Piotr MLECZKO², Tomasz KUPIEC¹

¹ *Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

² *Institute of Botany, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

Abstract

In forensic practice, mushroom poisonings – both accidental and those resulting from crimes and suicide attempts – are a frequently encountered type of case. In recent years, there has also been an increased interest in hallucinogenic mushrooms. Under the Act on Counteracting Drug Addiction dated July 29, 2005, possession of and trade in wild mushrooms which contain narcotic substances is a crime. Therefore, precise identification of species of fungi that contain illegal and toxic substances is very important for the purposes of judicial proceedings. Morphological analysis, a standard method for fungi species identification, does not always yield satisfactory results. Due to the reliability, speed and decreasing cost of DNA analysis, genetic methods are an interesting alternative for determining the species of biological material. Markers frequently employed in species identification of fungi are internal transcribed spacers regions (ITS1 and ITS2). The objective of a project that is being implemented at the Institute of Forensic Research is the preparation of an ITS1 and ITS2 regions sequence database of the analyzed fungal species and the validation of methods for DNA sequence analysis of these regions in the case of processed samples.

Key words

Species identification; ITS1; ITS2; Hallucinogenic mushrooms; Poisonous mushrooms; Poisoning.

Received 24 March 2011; accepted 5 April 2011

1. Introduction

Gathering and eating wild mushroom species is a popular pastime in Poland, constituting an important element of national food culture. A lack of basic knowledge on morphological features of edible mushrooms is a cause of frequent poisonings, which may affect not only individuals, but also entire families [11, 21, 36, 42, 43]. Apart from accidental mushroom poisoning, in forensic practice one also deals with intentional poisonings resulting from crimes and suicidal attempts.

On the basis of their toxic effect, poisonous mushrooms may be divided into several basic groups: hepa-

totoxic, nephrotoxic, neurotoxic, neuropsychotropic, hallucinogenic, gastroenterotoxic, affecting the immune system, and inhibiting ethyl alcohol metabolism, as well as triggering muscarinic cholinergic syndrome and rhabdomyolysis. Poisonous mushrooms also encompass hallucinogenic fungi [7]. The most dangerous consequences for humans are from eating fungal species belonging to the group of hepatotoxic mushrooms, such as the death cap (*Amanita phalloides*), the fool's mushroom (*Amanita verna*) or the European destroying angel (*Amanita virosa*). Toxins found in these fungi, and in particular α -amanitin, cause severe, often fatal liver damage.

In recent years, a particular increase in interest in hallucinogenic fungi – so-called “magic mushrooms” – which contain narcotic substances has been noted. Their popularity is associated with their low cost and easy availability. Approximately 80 species of mushrooms containing substances showing narcotic properties have been described to date; these are predominantly species belonging to the *Psilocybe*, *Panaeolus* and *Gymnopilus* genera, as well as some species from the *Inocybe*, *Conocybe*, *Stropharia* and *Pluteus* genera and several toadstool species, including the fly agaric (*Amanita muscaria*) and the panther cap (*Amanita pantherina*). Psychotropic substances contained in fungi include such tryptamine derivatives as psilocybin, baeocystin and norbaeocystin (species belonging to the *Psilocybe* genus) and derivatives of 3-hydroxyisoxanole (ibotenic acid, muscimol), as well as muscarine and bufotenin, which have been detected in the *Amanita* genus fungi [14, 29]. Research has shown that 10–18 mg of psilocybin has a potent hallucinogenic effect [15]. The psychoactive effect of psilocin, the primary metabolite of psilocybin, is explained by its affinity to serotonin receptors [2]. Cases of fatal poisoning with toxic mushrooms from the *Galerina* and *Conocybe* genera, including *Conocybe blatteria*, which have been mistaken for hallucinogenic fungi, have also been observed [19]. In accordance with the Act on Counteracting Drug Addiction dated July 29, 2005, possession of and trade in wild mushrooms which contain narcotic substances is a crime punishable by imprisonment. Thus, precise identification of species of fungi that contain illegal and toxic substances is of particular importance for the purposes of judicial proceedings.

Traditional methods of classifying an examined sample into a given taxon, such as morphological or biochemical analysis or palynological or sporological examination are of low universal value and often do not provide unambiguous results [39]. The reliability, speed and steadily dropping cost of DNA analyses result in genetic methods being increasingly often employed to determine species of biological material [4, 6, 8, 16, 17, 23, 25, 34]. The analysis of the fragment of the cytochrome b encoding gene located in mitochondrial DNA has for many years been successfully employed in species identification of vertebrates for forensic purposes [3, 6].

In 2003, Hebert proposed the method of “DNA barcoding”, which consists in using the sequence of the mitochondrial region that encodes the enzyme cytochrome C oxidase I (COI) for species identification [16]. According to Lim [24], COI analysis should allow identification of more than 95% of animal species

presently inhabiting the earth. However, in the case of fungi, the COI gene allows correct identification of only 20–70% of species [24]. This is why a search is in progress for new, improved markers, which would be able to discriminate between fungal species to a greater degree.

An alternative to the COI gene is two polymorphic non-coding internal transcribed spacers – ITS1 and ITS2 [12, 46]. The analysis of DNA sequences of these fragments has been successfully employed in taxonomical studies of animals [16, 17], plants [44, 45] and fungi [23, 31]. The ITS region consists of two non-coding nuclear DNA regions (ITS1, ITS2) that separate three ribosomal RNA genes (rRNA): 18S, 5.8S and 28S. On the terminals of this complex, there are external transcribed spacer (ETS) regions: ETS1 and ETS2, situated respectively within the 5' and 3' terminal region (Figure 1). In fungal genomes, non-coding regions and nuclear ribosomal RNA genes (nrRNA) occur as numerous (60–220) tandem repeats. A large number of nrRNA gene copies allow their amplification even in markedly degraded material. The high sensitivity of the analysis of ITS1 and ITS2 DNA sequences makes the regions a reliable marker in forensic examinations [23].

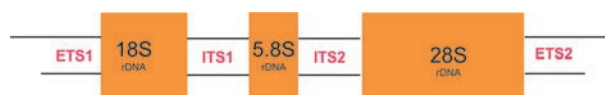


Fig. 1. A diagram of the entire ITS region used in genomic identification of species in the Kingdom Fungi. Reading from the left, the sequence contains external transcribed spacer 1 (ETS1), ribosomal RNA gene 18S (18S rRNA), internal transcribed spacer 1 (ITS1), ribosomal RNA gene 5.8S (5.8S rRNA), internal transcribed spacer 2 (ITS2), ribosomal RNA gene 28S (28S rRNA), and finally external transcribed spacer 2 (ETS2).

2. Species identification of fungi

2.1. Morphological analysis

A standard method of species identification of fungi is morphological analysis, which includes macroscopic and microscopic examinations. Macroscopic analysis consists in determining the colour, size and characteristic structures of mushrooms. The prolonged and laborious microscopic examination is predominantly based on a comparison of the appearance of spores, which does not always yield satisfactory results. Particular difficulties are encountered in cases of mushroom poisoning. Secured remnants of food,

which have usually previously been thermally processed, and gastric contents obtained through lavage, are materials that are often markedly degraded. Even an experienced mycologist may face problems when performing a morphological analysis of such samples. Microscopic examinations of powdered fragments of hallucinogenic mushrooms may also pose numerous problems. It may also happen that morphological features, in particular spores, are similar in fungi belonging to both poisonous and non-toxic species. In a microscopic preparation, the spores of the death cap (*Amanita phalloides*) may be mistaken for fat droplets, which are abundant in gastric contents. Identification problems may also be posed by spores of species that are closely related, such as the death cap, the destroying angel and the fool's mushroom [20]. Very precise species identification in case of hallucinogenic mushrooms, especially for forensic purposes, since among representatives of the same genus are species that both contain and do not contain psychoactive substances. Here, an example is the *Psilocybe* genus: *P. semilanceata* and *P. cubensis* produce substances with hallucinogenic effects, while *P. montana* and *P. merdaria* do not produce such substances [19, 32].

2.2. Toxicological examinations

In cases of mushroom poisoning, mycological analysis usually does not allow an unequivocal determination of the species affiliation of the mushroom which is the source of poisoning; in such situations, toxicological examinations are often performed [20]. Such examinations include two stages. In the first stage, screening methods are employed and then their results are confirmed by more specific techniques. Clinical laboratories frequently use immunoenzymatic methods, which do not require performance of complex procedures for extracting active substances from biological materials, such as blood or urine. Oftentimes, relatively simple methods based on thin layer chromatography (TLC) are employed [5]. Specific methods that allow identification and quantification of toxic substances originating from mushrooms include, for example, high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Instrumental analyses of this type require the use of appropriate methods of toxic substance isolation from biological materials. In the case of amanitins, toxin extraction must be performed using the immunoaffinity extraction (IAE) technique [41].

A significant effect on the content of psychoactive substances in the investigated samples is exerted by physical and chemical factors. Materials to be analyzed for forensic and clinical purposes are usually processed by cooking or drying, and sometimes they are diluted with abundant gastric or intestinal contents, which also markedly hinder instrument analyses. In the case of dried mushrooms, toxic substances may be completely lost due to inappropriate or prolonged storage. An example of this is psilocybin, which quickly decomposes at room temperature and in low concentration aqueous solutions [20]. Inappropriate storage conditions may thus make identification of some psychoactive substances impossible when employing toxicological methods.

2.3. Genetic studies

An interesting alternative to morphological and toxicological analyses seems to be fungal species identification based on genetic studies. A method of DNA analysis commonly employed in identification of various species of plants [8, 38, 40], animals [4, 22] and fungi [13, 26] is the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) technique [47]. The method makes use of single, usually short primers that are complementary to numerous sequences in the entire genome. Following gel electrophoresis, the products of PCR reaction yield a characteristic band pattern. RAPD is employed in polymorphism identification and in determination of genetic interspecies distance, but the method often fails in identification of closely related fungal species and its results are poorly reproducible [26, 47].

Another method of DNA analysis that is used in molecular systematics at the species level, also in the case of fungi, is the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique [28], which is based on employing selective restriction enzymes to cleave DNA prior to amplification. Following PCR and gel electrophoresis, a characteristic band pattern is produced, which is similar to the RAPD band ladder. Both methods – RAPD and AFLP – allow detection of the presence of polymorphisms, but do not enable them to be ascribed to any specific locus [26].

As was mentioned in the Introduction, the ITS1 and ITS2 regions are commonly employed markers used in fungi species identification. ITS fragments are extremely useful in species identification due to the presence of length and sequence polymorphisms. Studies carried out to date have demonstrated that the ITS regions yield excellent results in molecular systematics at the species level, as well as in the deter-

mination of intraspecies geographical variation. These fragments are present in many copies, so they can be amplified even in markedly degraded material, which is of great significance in studies performed for forensic purposes [23]. The effectiveness of ITS regions polymorphisms analyses in species identification for forensic purposes has been confirmed on several occasions. Lee et al. [23] developed a method allowing for differentiating between hallucinogenic mushrooms from the *Panaeolus* and *Psilocybe* genera based on length polymorphisms in amplification products in these regions. Similar investigations were carried out by Adamczyk et al. [1], who successfully employed specific primers allowing amplification of the ITS1 region in hallucinogenic mushrooms from the *Psilocybe semilanceata* species.

It appears, however, that methods based on DNA sequencing that allow complete information to be obtained on the polymorphism of the investigated *locus* are more reliable. Lee et al. [23] demonstrated that based on differences in length of PCR products, hallucinogenic mushrooms from the *Panaeolus* and *Psilocybe* genera can be distinguished. In order to render their results more precise, however, the above authors employed the sequencing method [23]. Attempts were also made at using primers specific for a given fungal species. Lee et al. [23] tested primers complementary to ITS sequences specific for representatives of hallucinogenic mushrooms from the *Panaeolus* and *Psilocybe* genera encountered in Scotland. Similar studies on mushrooms growing in North America and containing psychoactive substances turned out to be a failure [32]. The investigators demonstrated that in the case of closely related species belonging to the *Panaeolus* and *Psilocybe* genera, high polymorphism of sequences in the ITS1 region made their unambiguous differentiation impossible. When the authors employed an additional region of the nuclear large subunit (nLSU) in ribosomal DNA sequences [10, 30], which was characterized by a lower degree of polymorphism, they were able to determine the species of those representatives of hallucinogenic mushrooms indigenous to North America, the identification of which had been ambiguous in the case of analyzing sequence polymorphism of the ITS1 fragment. Pursuant to the thus obtained results, the analysis of the ITS1 and nLSU regions was proposed as a reliable method, having application in molecular systematics of fungi for forensic purposes [32]. Maruyama and coworkers [33] conducted studies on hallucinogenic mushrooms available on the Japanese market based on methods of ITS regions sequencing. The thus obtained sequences were compared to ITS regions sequences available in

the GenBank, DDBJ and EMBL databases using the BLAST program. The degree of similarity of the compared sequences provided a basis for species identification of mushrooms. At the same time, sequences obtained from unknown samples were compared with the database of DNA sequences compiled by the authors.

The fundamental genetic method in determination of fungal species is DNA sequencing. The use of the high resolution melting technique (HRM), or in other words high-resolution analysis of the amplicon melting curve, also seems promising [27]. The method employs real time PCR (RT-PCR). Based on the course of the DNA denaturation curve, HRM allows detection of the presence of polymorphisms and identification of DNA fragments of varying length and sequences. Yet another method was proposed by Maruyama et al. [34]; in their research on species identification of fungi, they used real time PCR with TaqMan probes, employing conservative fragments of nLSU sequences. Appropriately designed fluorescence-labeled DNA probes enabled a specific signal to be obtained and made it possible to unequivocally determine the fungal species.

The methodology employed in species identification of various poisonous mushrooms, just as in the case of mushrooms from the *Panaeolus* and *Psilocybe* genera, consists mostly in the analysis of sequences in the ITS [35] and nLSU [10] regions. Iturradde et al. [18] proposed application of the analysis of sequences in the ITS1 and ITS2 regions to determine species of mushrooms from the *Amanita* genus for clinical purposes.

An interesting marker employed in mushrooms species identification is the intergenic spacer regions (IGS1 and IGS2) [9, 37]. In the majority of fungi belonging to the Basidiomycota phylum and in some ascomycetes, these regions contain the coding 5S RNA fragment (Figure 2). The non-coding DNA fragments, more than 2000 bp long, demonstrate high polymorphism, which is also observed on the intraspecies level. This phenomenon was made use of in analysis of intraspecies variability of mushrooms originating from various geographical regions [37]. PCR primers allowing amplification of the IGS1 and IGS2 regions were used to verify whether *Amanita phalloides* was an indigenous North American species. To this end, the diversity of European and American representatives of the species was compared, allowing the researchers to determine the European origin of American *Amanita phalloides* populations [37].



Fig. 2. A diagram of the entire IGS region used in genomic identification of species in the Kingdom Fungi. Reading from the left, the sequence contains intergenic spacer 1 (IGS1), ribosomal RNA gene 5S (5S rDNA) and intergenic spacer 2 (IGS2).

3. Research project – development of a fungal DNA sequence database for forensic purposes

Undoubtedly, species identification of fungi for forensic purposes is gaining increasing importance. It seems that genetic studies will be a good complement to morphological and toxicological methods and in many instances, they may replace the latter methods.

The research project being implemented at the Institute of Forensic Research in collaboration with the Jagiellonian University is aimed at developing a database for forensic purposes. The database will include DNA sequences of various poisonous mushroom species, including hallucinogenic mushrooms, and fungi that do not produce toxic substances. The study makes use of analysis of DNA sequences in the ITS1 and ITS2 regions. The analyses concern selected species of poisonous mushrooms (such as representatives of the *Amanita*, *Galerina*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Entoloma* and *Hypholoma* genera), including groups of mushrooms that contain psychoactive substances (*Panaeolus*, *Psilocybe*, *Conocybe*, *Inocybe* and *Gymnopilus*). In addition to fungi native to Poland, samples of hallucinogenic mushrooms available through illegal trade are analysed, which may include foreign fungal species. The investigations also encompass species that do not produce toxic substances, but whose morphology is similar to that of representatives of poisonous mushrooms, including hallucinogenic mushrooms.

The study encompasses samples from the collection of the Jagiellonian University Institute of Botany herbarium in the form of dried mushrooms, as well as materials collected by the Department of Toxicology, Institute of Forensic Research, in the form of spores, serving as comparative material. The project also includes an analysis of dried hallucinogenic mushrooms and samples of clinical materials in the form of gastric washings and vomited matter.

Analyses of the ITS1 and ITS2 regions carried out to date have produced promising results. A comparison of the determined DNA sequence with sequences

in the GenBank database (NCBI) have allowed us to obtain DNA sequence similarity of 92–100%. The observed high interspecies variability has allowed identification of closely related species.

In the case of dried mushroom samples, where previous investigations had demonstrated the presence of psilocybin, the present authors have obtained DNA sequences of the ITS regions that are 99–100% consistent with the sequences of *Psilocybe semilanceata* originating from the GenBank database. In samples where no psilocybin presence has been detected, agreement with sequences originating from other fungi, e.g. *Agrocybe pediades* has been ascertained.

The present authors have noted difficulties associated with analyzing materials secured from gastric contents, where molds or fungi that colonize the human gastrointestinal tract, such as *Candida albicans*, are frequently encountered. In the majority of clinical samples examined to date, when standard primer pairs have been employed (ITS1 + ITS2 and ITS3 + ITS4) [46], the authors have obtained mixtures of PCR products or a single product with a sequence matching the *Candida albicans* species. The use of the ITS4B primer, specific for the Basidiomycota [12], has allowed elimination of the effect of gastrointestinal microflora on the results of the analysis, since the source of contamination is usually members of the Ascomycota. These data have not yet been published.

The implemented project aims at developing a database of DNA sequences in the ITS1 and ITS2 regions of the analyzed fungal species. Such a database will be helpful in rapid and reliable identification of secured mushroom samples, both for medical (diagnosis of mushroom poisoning) and forensic purposes (illegal trade in hallucinogenic mushrooms, poisonings). A significant element of the investigation is the validation of the method of genetic analysis of DNA sequences in the ITS1 and ITS2 regions in the case of mushrooms processed using various techniques. These are materials such as dried mushrooms, mushroom fragments originating from cooked dishes, food remnants (vomited matter, gastric contents, feces), which will allow practical implementation of the method in forensic examinations.

Acknowledgements

The project was financed by the Ministry of Science and Higher Education (grant no. N N404 202439).

References

- Adamczyk A., Sadakierska-Chudy A., Janoszka J. [i in.], Halucynogenne grzyby – lyszczki (*Psilocybe*). Część II. Identyfikacja *Psilocybe semilanceata* przy pomocy techniki PCR, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2007, 57, 285–288.
- Aghajanian G. K., Marek G. J., Serotonin and hallucinogens, *Neuropsychopharmacology* 1999, 21, 16–23.
- Babik W., Branicki W., Sandera M. [et al.], Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*, *Molecular Ecology* 2004, 13, 1469–1480.
- Benecke M., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice, *Forensic Science International* 1998, 98, 157–168.
- Beug M., Bigwood J., Quantitative analysis of psilocybin and psilocyn in *Psilocybe baeocystis* by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography* 1981, 207, 379–385.
- Branicki W., Kupiec T., Pawłowski R., Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification, *Journal of Forensic Sciences* 2003, 48, 83–87.
- Burda P., Ciszowski K., Grzyby trujące, [w:] *Zarys toksykologii klinicznej*, Pach J. [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009.
- Chengxin F., Yingxiong Q., Hanghui K., RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant, *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 2003, 44, 13–18.
- Coetzee M. P. A., Wingfield B. D., Coutinho T. A. [et al.], Identification of the casual agent of Armillaria root rot of *Pinus* species in South Africa, *Mycologia* 2000, 92, 777–785.
- Drehmel D., Moncalvo J. M., Vilgalys R., Molecular phylogeny of *Amanita* based on large-subunit ribosomal DNA sequences: implications for taxonomy and character evolution, *Mycologia* 1999, 91, 610–618.
- Eren S. H., Demirel Y., Ugurlu S. [et al.], Mushroom poisoning: retrospective analysis of 294 cases, *Clinics* 2010, 65, 491–496.
- Gardes M., Bruns T. D., ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular Ecology* 1993, 2, 113–118.
- Godet M., Munaut F., Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*, *FEMS Microbiology Letters* 2010, 304, 157–168.
- Hallen H. E., Adams G. C., Eicher A., Amatoxins and phallotoxins in indigenous and introduced South African *Amanita* species, *South African Journal of Botany* 2002, 68, 322–326.
- Hasler F., Bourquin D., Brenneisen R. [et al.], Renal extraction profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: a controlled study in man, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 30, 331–339.
- Hebert P. D., Penton E. H., Burns J. M. [et al.], Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004, 101, 14812–14817.
- Hoste H., Chilton N. B., Gasser R. B. [et al.], Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae), *International Journal of Parasitology* 1995, 25, 75–80.
- Iturralde M. J., Ballesteros S., Ramon M. F. [et al.], DNA Profiling: a promising tool for mushroom poisoning diagnosis, Abstracts of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists XXIV International Congress, *Clinical Toxicology* 2004, 42, 395–564.
- Janoszka J., Rymkiewicz A., Dobosz T., Halucynogenne grzyby – lyszczki (*Psilocybe*). Część I. Charakterystyka, skutki zażycia, rozpoznawanie, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2005, 55, 215–219.
- Kała M., Diagnostyka laboratoryjna w rozpoznawaniu, monitorowaniu, przebiegu i rokowaniu zatruc grzybami, *Badanie i Diagnoza* 2003, 9, 33–40.
- Kamińska B., Przypadek zatrucia śmiertelnego po spożyciu piestrzenicy kasztanowatej, *Problemy Higieny* 1996, 53, 190–191.
- Koh M. C., Lim C. H., Chua S. B. [et al.], Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species, *Meat Science* 1988, 48, 275–285.
- Lee J. C., Cole M., Linacre A., Identification of members of genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test. A preliminary test for hallucinogenic fungi, *Forensic Science International* 2000, 112, 123–133.
- Lim B. K., Barcoding life: demystifying the project that aims to classify the world's 32 million species using only a short strand of DNA, ten ROM biologists report, Royal Ontario Museum Magazine 2009, Spring. Retrieved January 14, 2011 [http://www.highbeam.com/doc/1G1-195681210.html].
- Linacre A., Thorpe J., Detection and identification of *Cannabis* by DNA, *Forensic Science International* 1988, 91, 71–76.
- Linacre A., Cole M., Lee J. C., Identifying the presence of “magic mushrooms” by DNA profiling, *Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society* 2002, 42, 50–54.
- Maeta K., Ochi T., Tokimoto K., Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR, *Applied and Environmental Microbiology* 2008, 74, 3306–3309.
- Majer D., Mithen R., Lewis B. [et al.], The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi, *Mycological Research* 1996, 100, 1107–1111.

29. Marciniak B., Ferenc T., Kusowska J. [et al.], Poisoning with selected mushrooms with neurotropic and hallucinogenic effect, *Medycyna Pracy* 2010, 61, 583–595.
30. Moncalvo J. M., Drehtel D., Vilgalys R., Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000, 16, 48–63.
31. Nilson R. H., Kristiansson E., Ryberg M. [et al.], Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification, *Evolutionary Bioinformatics* 2008, 4, 193–201.
32. Nugent K. G., Saville B. J., Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach, *Forensic Science International* 2004, 140, 147–157.
33. Maruyama T., Shirota O., Kawahara N. [et al.], Discrimination of psychoactive fungi (commonly called “magic mushrooms”) based on the DNA sequence of the internal transcribed spacer region, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2003, 44, 44–48.
34. Maruyama T., Kawahara N., Yokoyama K. [et al.], Phylogenetic relationship of psychoactive fungi based on rRNA gene for a large subunit and their identification using the TaqMan assay (II), *Forensic Science International* 2006, 163, 51–58.
35. Oda T., Tanaka C., Tsuda M., Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*, *Mycological Research* 2004, 108, 885–896.
36. Pawłowska J., Pawlak J., Kamiński A. [et al.], *Amanita phalloides* poisoning as an indication for liver transplantation in three family members, *Wiadomości Lekarskie* 2006, 59, 131–134.
37. Pringle A., Adams R. I., Cross H. B. [et al.], The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America, *Molecular Ecology* 2009, 18, 817–833.
38. Raina S. N., Rani V., Kojima T. [et al.], RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species, *Genome* 2001, 44, 763–772.
39. Rakeman J. L., Bui U., Lefe K. [et al.], Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds, *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43, 3324–3333.
40. Rani V., Parida A., Raina S. N., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh, *Plant Cell Reports* 1995, 14, 459–462.
41. Schmitt C. J., Weber A. A., Maurer H. H., Immunoaffinity extraction of α - and β -amanitin of their sensitive detection in body fluids by atmospheric pressure ionization electrospray (API-ES) LC-MS, Proceedings of the 35th Meeting of TIAFT, Centre of Behavioural and Forensic Toxicology, Padova 1997.
42. Sienkiewicz E., Rodzinne zatrucie czubajką czerwienią, *Problemy Higieny* 1996, 53, 192–194.
43. Strugała B., Tuszewska B., Wieland A., Zatrucia grzybami w Polsce w latach 1992–1994, *Problemy Higieny* 1996, 53, 185–189.
44. Sukrong S., Zhu S., Ruangrunsi N. [et al.], Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2007, 30, 1284–1288.
45. Uzuhashi S., Tojo M., Kobayashi S. [et al.], *Pythium apinafurcum*: its morphology, molecular phylogeny, and infectivity for plants, *Myoscience* 2009, 50, 281–290.
46. White T. J., Bruns T., Lee S. [et al.], Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, [in]: PCR protocols: A guide to methods and applications, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. [et al., eds.], Academic Press, New York 1990.
47. Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J. [et al.], DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acid Research* 1990, 18, 6531–6535.

Corresponding author

Dr Marek Kowalczyk
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: mkowalczyk@ies.krakow.pl

WSPÓŁCZESNE METODY IDENTYFIKACJI GATUNKOWEJ GRZYBÓW HALUCYNOGENNYCH I INNYCH GRZYBÓW TRUJĄCYCH STOSOWANE W BADANIACH SĄDOWYCH

1. Wstęp

Zbieranie i spożywanie dziko rosnących gatunków grzybów jest ważnym elementem zwyczajów żywieniowych w Polsce. Brak podstawowej wiedzy na temat cech morfologicznych grzybów jadalnych jest przyczyną częstych zatruc, które mogą dotyczyć nie tylko pojedynczych osób, lecz także całych rodzin [11, 21, 36, 42, 43]. Oprócz przypadkowych zatruc grzybami w praktyce sądowej spotyka się również zamierzone zatrucia będące wynikiem przestępstw oraz prób samobójczych.

Grzyby trujące ze względu na rodzaj działania toksycznego na organizm dzieli się na kilka podstawowych grup: hepatotoksyczne, nefrotoksyczne, neurotoksyczne, ośrodkowe psychotropowe, halucynogenne, gastroenterotoksyczne, oddziałujące na układ immunologiczny, blokujące metabolizm alkoholu etylowego, wywołujące zespół cholinergiczny muskarynowy oraz rabdomiolizę. Do grzybów trujących zalicza się również grzyby halucynogenne [7]. Najniebezpieczniejsze dla człowieka są skutki spożycia gatunków należących do grupy grzybów hepatotoksycznych, takich jak muchomor sromotnikowy (*Amanita phalloides*), muchomor wiosenny (*Amanita verna*) czy muchomor jadowity (*Amanita virosa*). Toksyne występujące w tych grzybach, a w szczególności α -amanityna, powodują ciężkie uszkodzenia wątroby, które często prowadzą do śmierci.

W ostatnich latach obserwuje się szczególnie wzrost zainteresowania grzybami halucynogennymi, tak zwanymi „magicznymi grzybkami” (ang. magic mushrooms) zawierającymi substancje narkotyczne. Spowodowane jest to ich niskim kosztem oraz łatwym dostępem. Opisało już około 80 gatunków grzybów zawierających substancje o działaniu narkotycznym, są to głównie gatunki z rodzajów *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Gymnopilus*, a także niektóre gatunki z rodzajów *Inocybe*, *Conocybe*, *Stropharia*, *Pluteus* oraz kilka gatunków muchomorów, m.in. muchomor czerwony (*Amanita muscaria*) i muchomor plamisty (*Amanita pantherina*). Substancje o działaniu psychotropowym zawarte w grzybach to m.in. pochodne tryptaminy, takie jak: psylocybina, baeocystyna i norbaeocystyna (gatunki z rodzaju *Psilocybe*) oraz pochodne 3-hydroksyzoksanolu (kwas ibotenowy, muscimol), a także muskaryna i bufoteina, które zostały wykryte w grzybach z rodzaju *Amanita* [14, 29]. Przeprowadzone badania wskazują, że 10–18 mg psylocybiny wywołuje silne działanie halucynogenne [15]. Działanie psychoaktywne psylocyny, pierwszego metabolitu psylocybiny,

tłumaczy się jej powinowactwem do receptorów serotoninowych [2]. Odnotowano także przypadki śmiertelnych zatruc grzybami trującymi z rodzaju helmówka (*Galerina*) i stożkogłówka (*Conocybe*), m.in. *Conocybe blatteria*, które są mylone z grzybami halucynogennymi [19]. Zgodnie z obowiązującą Ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii, posiadanie i handel grzybami, które zawierają substancje narkotyczne, jest przestępstwem zagrożonym karą pozbawienia wolności. W związku z tym precyzyjna identyfikacja gatunkowa grzybów zawierających substancje nielegalne nabiera szczególnego znaczenia dla celów postępowania sądowego.

Tradycyjne sposoby przyporządkowania badanej próbki do określonego taksonu, takie jak analiza morfologiczna, biochemiczna czy badania palinologiczne oraz sporologiczne, są mało uniwersalne i często nie dają jednoznacznych wyników [39]. Wiarygodność, wysokie tempo i coraz niższy koszt analiz DNA powoduje, że metody genetyczne coraz częściej wykorzystuje się w celu określenia przynależności gatunkowej materiału biologicznego [4, 6, 8, 16, 17, 23, 25, 34]. Analiza fragmentu mitochondrialnego genu kodującego cytochrom b jest od wielu lat z powodzeniem stosowana do identyfikacji gatunkowej zwierząt kręgowych w badaniach sądowych [3, 6].

W 2003 r. Hebert zaproponował metodę DNA *barcoding* (ang. barcode – kod paskowy), która polega na zastosowaniu sekwencji mitochondrialnego regionu kodującego enzym – oksydazę cytochromową (ang. cytochrome C oxidase I, COI) do identyfikacji gatunkowej [16]. Według Lim [24] analiza COI powinna umożliwić identyfikację ponad 95% gatunków zwierząt obecnie żyjących na Ziemi. Jednak w przypadku grzybów, gen COI pozwala na prawidłową identyfikację zaledwie 20–70% gatunków [24]. Dlatego też poszukuje się nowych, lepszych markerów, które w większym stopniu różnicowałyby gatunki grzybów.

Alternatywą dla genu COI są dwa polimorficzne niekodujące regiony jądrowego DNA (ang. internal transcribed spacers – ITS1 i ITS2) [12, 46]. Analiza sekwencji DNA tych fragmentów z powodzeniem stosowana jest w badaniach taksonomicznych zwierząt [16, 17], roślin [44, 45] i grzybów [23, 31]. Region ITS jest złożony z dwóch obszarów niekodującego jądrowego DNA (ITS1, ITS2), rozdzielających trzy geny kodujące rybosomalny RNA (rRNA): 18S, 5.8S i 28S. Na końcach tego kompleksu występują regiony *external transcribed*

spacer (ETS): ETS1 i ETS2 odpowiednio na końcu 5' i 3' (rycina 1). Regiony niekodujące oraz geny jądrowe rybosomalnego RNA (nrRNA) w genomach grzybów występują w wielu (60–220) tandemowych powtórzeniach. Duża liczba kopii genów nrRNA pozwala na ich amplifikację nawet w silnie zdegradowanym materiale. Wysoka czułość analizy sekwencji DNA regionów ITS1 i ITS2 sprawia, że regiony te są skutecznym markerem w badaniach sądowych [23].

2. Identyfikacja gatunkowa grzybów

2.1. Analiza morfologiczna

Standardową metodą identyfikacji gatunkowej grzybów jest analiza morfologiczna, w której skład wchodzi obserwacje makro- i mikroskopowe. Analiza makroskopowa polega na określeniu koloru, rozmiaru i charakterystycznych struktur grzybów. Długotrwała i pracochłonna obserwacja mikroskopowa opiera się głównie na porównywaniu wyglądu zarodników, co nie zawsze daje zadowalające rezultaty. Szczególne trudności napotyka się w przypadkach dotyczących zatruc grzybami. Zabezpieczone resztki pokarmu, który zazwyczaj uległ obróbce termicznej oraz popłuczyny z treści żołądka, to materiał często silnie zdegradowany. Nawet doświadczony mikolog może napotkać problemy z analizą morfologiczną takich próbek. Obserwacje mikroskopowe w przypadku sproszkowanych elementów grzybów halucynogennych także mogą sprawiać wiele problemów. Zdarza się, że cechy morfologiczne, szczególnie zarodniki, są podobne u grzybów należących do gatunków trujących, jak i nietoksycznych. W preparacie mikroskopowym zarodniki muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*) mogą zostać pomyłone z kroplami tłuszczu, które licznie występują w treści pokarmowej. Trudności identyfikacyjne mogą sprawiać także zarodniki gatunków blisko spokrewnionych, m.in. muchomora sromotnikowego, jadowitego czy wiosennego [20]. Także w przypadku ustalania przynależności systematycznej grzybów halucynogennych, zwłaszcza dla celów sądowych, niezbędne jest dokładne określenie gatunku, ponieważ wśród przedstawicieli tego samego rodzaju występują gatunki zawierające i niezawierające substancji psychoaktywnych. Przykładem może być rodzaj *Psilocybe*: *P. semilanceata* i *P. cubensis* wytwarzają substancje o działaniu halucynogennym, a *P. montana* i *P. merdaria* substancji tych nie produkują [19, 32].

2.2. Badania toksykologiczne

W przypadkach zatruc grzybami analiza mikologiczna zazwyczaj nie pozwala na jednoznaczne określenie przynależności gatunkowej grzyba będącego źródłem

zatrucia i wtedy często przeprowadza się badania toksykologiczne [20]. Składają się one z dwóch etapów. W pierwszej fazie badań wykorzystuje się metody przesiewowe, których wyniki są potwierdzane bardziej specyficznymi technikami. W laboratoriach klinicznych często stosuje się metody immunoenzymatyczne, które nie wymagają zastosowania skomplikowanych procedur ekstrakcji substancji czynnej z materiału biologicznego, takiego jak krew czy mocz. Często stosowane są stosunkowo proste metody z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [5]. Do specyficznych metod, które pozwalają na identyfikację i ocenę ilościową substancji toksycznych pochodzących z grzybów, należy m.in. wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową (HPLC-DAD), chromatografia cieczowa z detekcją masową (LC-MS) oraz chromatografia gazowa z detekcją masową (GC-MS). Analizy instrumentalne tego typu wymagają zastosowania odpowiednich metod izolacji substancji toksycznej z materiału biologicznego. W przypadku amanityn do ekstrakcji toksyn konieczne jest zastosowanie techniki immunopowinowactwa (IAE) [41].

Istotny wpływ na zawartość substancji psychoaktywnych w badanych próbkach mają czynniki fizyczne i chemiczne. Materiał do analiz do celów sądowych i klinicznych jest zazwyczaj przetworzony przez gotowanie czy suszenie, a czasem rozcieńczony obfitą treścią żołądkową lub jelitową, co w dużym stopniu utrudnia także badania instrumentalne. W przypadku suszu grzybowego może nastąpić całkowity zanik substancji toksycznych w wyniku niewłaściwego lub długotrwałego przechowywania. Przykładem może tu być psylocybina, która szybko ulega rozkładowi w temperaturze pokojowej oraz w roztworach wodnych o niskim stężeniu [20]. Nieodpowiednie warunki przechowywania mogą więc uniemożliwić identyfikację niektórych substancji psychoaktywnych metodami toksykologicznymi.

2.3. Badania genetyczne

Ciekawą alternatywą dla analiz morfologicznych i toksykologicznych wydaje się identyfikacja gatunkowa grzybów oparta na badaniach genetycznych. Jedną z metod analizy DNA stosowaną powszechnie do identyfikacji różnych gatunków roślin [8, 38, 40], zwierząt [4, 22] i grzybów [13, 26] jest technika *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) [47]. W metodzie tej wykorzystuje się pojedyncze, zazwyczaj krótkie startery komplementarne do wielu sekwencji w całym genomie. Produkty reakcji PCR po elektroforezie żelowej dają charakterystyczny wzór prążków. Metoda RAPD znajduje zastosowanie w identyfikacji polimorfizmów i ustalaniu genetycznego dystansu między gatunkami, jednak często nie sprawdza się w przypadku identyfikacji blisko spo-

krewnionych gatunków grzybów, a jej wyniki są mało powtarzalne [26, 47].

Inną metodą analizy DNA znajdującą zastosowanie w systematyce molekularnej na poziomie gatunku, także w przypadku grzybów, jest technika *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) [28]. Polega ona na zastosowaniu selektywnych enzymów restrykcyjnych do cięcia DNA przed reakcją amplifikacji. Po przeprowadzeniu reakcji PCR i elektroforezy żelowej otrzymuje się charakterystyczny wzór prążków podobny do wyniku drabiny RAPD. Metody RAPD i AFLP pozwalają na wykrywanie obecności polimorfizmów, lecz nie pozwalają na ich przypisanie do żadnego specyficznego *locus* [26].

Jak wspomniano we wstępie, często stosowanym markerem wykorzystywanym do identyfikacji gatunkowej grzybów są regiony ITS1 i ITS2. Fragmenty ITS są bardzo użyteczne ze względu na obecność polimorfizmów długości oraz sekwencji. Dotychczasowe badania pokazały, że regiony ITS doskonale sprawdzają się w systematyce molekularnej na poziomie gatunku, a także w określaniu wewnątrzgatunkowego zróżnicowania geograficznego. Fragmenty te występują w licznych kopiach, więc ich amplifikacja jest możliwa nawet w silnie zdegradowanym materiale, co jest bardzo istotne w badaniach do celów sądowych [23]. Skuteczność analizy polimorfizmu regionów ITS do identyfikacji gatunkowej grzybów do celów sądowych została kilkakrotnie potwierdzona. Lee i in. [23] opracowali metodę pozwalającą na różnicowanie grzybów halucynogennych z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe* na podstawie polimorfizmu długości produktów amplifikacji tych regionów. Podobne badania przeprowadził Adamczyk i in. [1], którzy z powodzeniem zastosowali specyficzne startery umożliwiające amplifikację regionu ITS1 grzybów halucynogennych z gatunku *Psilocybe semilanceata*.

Jak się jednak wydaje, bardziej wiarygodne są metody oparte na sekwencjonowaniu DNA pozwalające na uzyskanie kompletnej informacji na temat polimorfizmu badanego *locus*. Lee i in. [23] wykazali, że na podstawie różnic w długościach produktów PCR można zróżnicować przedstawicieli grzybów halucynogennych z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe*. W celu doprecyzowania wyników autorzy posłużyli się jednak metodą sekwencjonowania [23]. Podejmowano także próby zastosowania starterów specyficznych dla danego rodzaju grzyba. Lee i in. [23] przetestowali startery komplementarne do sekwencji ITS specyficzne dla przedstawicieli grzybów halucynogennych z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe* występujących na terenie Szkocji. Podobne badania dotyczące grzybów rosnących w Ameryce Północnej i zawierających substancje psychoaktywne zakończyły się niepowodzeniem [32]. Wykazano, że wysoki polimorfizm sekwencji regionu ITS1 w przypadkach blisko spokrewnionych gatunków z rodzajów *Panaeolus* i *Psilocybe* uniemożliwia ich jednoznaczne zróżnicowanie. Zastosowanie dodatko-

wego regionu jądrowego DNA dla dużej podjednostki rybosomu nLSU (ang. nuclear large sub-unit) [10, 30] charakteryzującego się mniejszym stopniem polimorfizmu pozwoliło na ustalenie przynależności gatunkowej tych przedstawicieli grzybów halucynogennych występujących w Ameryce Północnej, których identyfikacja była niejednoznaczna w przypadku analizy polimorfizmu sekwencji fragmentu ITS1. W związku z otrzymanymi wynikami zaproponowano analizę regionów ITS1 oraz nLSU jako wiarygodną metodę mającą zastosowanie w systematyce molekularnej grzybów do celów sądowych [32]. Maruyama i współpracownicy [33] prowadzili badania nad grzybami halucynogennymi dostępnymi na rynku japońskim, opierające się na metodach sekwencjonowania regionów ITS. Uzyskane w ten sposób sekwencje porównywano do sekwencji regionów ITS dostępnych w bazach danych GenBank, DDBJ oraz EMBL przy użyciu programu BLAST. Stopień podobieństwa porównywanych sekwencji stanowił podstawę identyfikacji gatunkowej grzybów. Jednocześnie porównywano sekwencje uzyskane z nieznanymi próbek z własną bazą danych sekwencji DNA.

Podstawową metodą genetyczną w analizie przynależności gatunkowej grzybów jest sekwencjonowanie DNA. Obiecujące wydaje się także zastosowanie techniki HRM (ang. high resolution melting), czyli wysokorozdzielczej analizy krzywej topnienia amplikonu [27]. Metoda ta wykorzystuje technikę PCR w czasie rzeczywistym RT-PCR. Metoda HRM na podstawie przebiegu krzywej denaturacji DNA pozwala na wykrycie obecności polimorfizmów oraz identyfikację fragmentów DNA o różnej długości i sekwencji. Jeszcze inną metodę zaproponowali Maruyama i in. [34], którzy w swoich badaniach nad identyfikacją gatunkową grzybów zastosowali technikę PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) z użyciem sond typu TaqMan, wykorzystując konserwatywne fragmenty sekwencji regionu nLSU. Odpowiednio zaprojektowane sondy DNA znakowane fluorescencyjnie umożliwiły uzyskanie specyficznego sygnału i pozwoliły na jednoznaczne określenie przynależności gatunkowej grzybów.

Metodyka używana w identyfikacji gatunkowej różnych grzybów trujących, tak jak w przypadku grzybów z rodzaju *Panaeolus* i *Psilocybe*, polega przede wszystkim na analizie sekwencji regionów ITS [35] oraz nLSU [10]. Iturradale i in. [18] zaproponowali zastosowanie analizy sekwencji regionu ITS1 i ITS2 do ustalania przynależności gatunkowej grzybów z rodzaju *Amanita* do celów klinicznych.

Interesującym markerem stosowanym w identyfikacji gatunkowej grzybów są regiony *intergenic spacer* (IGS1 i IGS2) [9, 37]. U większości grzybów z gromady podstawczaków i niektórych workowców zawierają kodujący fragment 5S RNA (rycina 2). Te obszary niekodującego DNA o długości powyżej 2000 par zasad wykazu-

ją wysoki polimorfizm obserwowany także na poziomie wewnątrzgatunkowym. Zostało to wykorzystane w analizie zróżnicowania wewnątrzgatunkowego przedstawicieli grzybów pochodzących z różnych obszarów geograficznych [37]. Startery reakcji PCR pozwalające na amplifikację regionów IGS1 i IGS2 wykorzystano między innymi do sprawdzenia, czy *Amanita phalloides* jest gatunkiem rodzimym Ameryki Północnej. W tym celu porównano różnorodność europejskich i amerykańskich przedstawicieli tego gatunku, co umożliwiło określenie europejskiego pochodzenia amerykańskich populacji *Amanita phalloides* [37].

3. Projekt badawczy – przygotowanie bazy danych sekwencji DNA grzybów do celów sądowych

Bez wątplenia identyfikacja gatunkowa grzybów do celów sądowych nabiera coraz większego znaczenia. Wydaje się, że badania genetyczne będą dobrym uzupełnieniem metod morfologicznych i toksykologicznych, a w wielu przypadkach mogą je zastąpić.

Projekt badawczy realizowany w Instytucie Ekspertyz Sądowych we współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim ma na celu przygotowanie bazy danych do celów sądowych. Baza ta zawierać będzie sekwencje DNA różnych gatunków grzybów trujących, w tym halucynogennych oraz niewytwarzających substancji toksycznych. Badania polegają na zastosowaniu metody analizy sekwencji DNA regionów ITS1 i ITS2. Analizy dotyczą wybranych gatunków grzybów trujących (m.in. przedstawicieli rodzajów *Amanita*, *Galerina*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Entoloma*, *Hypholoma*), w tym z grupy grzybów zawierających substancje psychoaktywne (*Panaeolus*, *Psilocybe*, *Conocybe*, *Inocybe*, *Gymnopilus*). Oprócz przedstawicieli grzybów występujących na terenie Polski analizowane są próbki grzybów halucynogennych dostępnych w nielegalnym handlu, które mogą zawierać gatunki zagraniczne. Badania obejmują również gatunki niewytwarzające substancji toksycznych, lecz o morfologii podobnej do przedstawicieli grzybów trujących, w tym także halucynogennych.

W badaniach wykorzystywane są m.in. zasoby herbarium Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w postaci suszonych owocników oraz materiał zgromadzony w Zakładzie Toksykologii Instytutu Ekspertyz Sądowych w postaci zarodników grzybów służących jako materiał porównawczy. Projekt uwzględnia również analizę suszonych grzybów halucynogennych oraz próbek materiału klinicznego w postaci popłuczyn z żołądka i wymiocin.

Przeprowadzone dotychczas badania regionów ITS1 i ITS2 dały obiecujące wyniki. Porównanie oznaczonej sekwencji DNA z sekwencjami zgromadzonymi w bazie

danych GenBank (NCBI) pozwoliło na uzyskanie podobieństw sekwencji DNA w 92–100%. Zaobserwowana duża zmienność międzygatunkowa pozwoliła na identyfikację blisko spokrewnionych gatunków.

W przypadku próbek suszu grzybowego, w których podczas uprzednich badań stwierdzono obecność psylocyliny, uzyskano sekwencje DNA regionów ITS zgodne w 99–100% z dostępnymi w bazie danych GenBank sekwencjami *Psilocybe semilanceata*. W próbkach, w których nie została wykryta obecność psylocyliny, uzyskano zgodność z sekwencjami innych gatunków grzybów, na przykład *Agrocybe pediades*.

W badaniach zwrócono uwagę na komplikacje związane z analizą materiału zabezpieczonego z treści żołądkowej, w którym często występują pleśnie lub grzyby zasiedlające przewód pokarmowy człowieka, m.in. *Candida albicans*. W większości zbadanych dotąd próbek klinicznych, stosując standardowe pary starterów (ITS1 + ITS2 oraz ITS3 + ITS4) [46], uzyskano mieszaniny produktów PCR lub pojedynczy produkt o sekwencji zgodnej z gatunkiem *Candida albicans*. Zastosowanie startera ITS4B, specyficznego dla grzybów podstawkowych (Basidiomycota) [12], pozwoliło na eliminację wpływu mikroflory przewodu pokarmowego na wyniki analizy, ponieważ źródłem kontaminacji są zazwyczaj przedstawiciele grzybów workowych (Ascomycota). Dane te nie zostały jeszcze opublikowane.

Realizowany projekt ma na celu stworzenie bazy danych sekwencji DNA regionów ITS1 i ITS2 analizowanych gatunków grzybów. Baza taka będzie pomocna w szybkiej i wiarygodnej identyfikacji zabezpieczonych próbek grzybów do celów medycznych (diagnostyka zatruc grzybami) oraz sądowych (nielegalny handel grzybami halucynogennymi, zatrucia). Istotnym elementem badań jest walidacja metody genetycznej analizy sekwencji DNA regionów ITS1 i ITS2 w przypadku grzybów przetworzonych w różny sposób. Jest to m.in. susz grzybowy, fragmenty grzybów z potraw, resztki pokarmowe (wymiociny, treść żołądkowa, kał), co pozwoli na praktyczne zastosowanie tej metody w badaniach sądowych.

Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr N N404 202439).