

Aldona Adamczyk, Anna Sadakierska-Chudy, Jerzy Janoszka, Apoloniusz Rymkiewicz,  
Tadeusz Dobosz

## Halucynogenne grzyby – łysiczki (*Psilocybe*). Część II. Identyfikacja *Psilocybe semilanceata* przy pomocy techniki PCR

### Hallucinogenic fungi (*Psilocybe*).

### Part II. Identification of *Psilocybe semilanceata* by PCR

Z Katedry Medycyny Sądowej i Zakładu Technik Molekularnych Akademii Medycznej we Wrocławiu  
Kierownik: dr hab. T. Dobosz

Łysiczka lancetowata *Psilocybe semilanceata* należąca do rodzaju *Psilocybe*, jest grzybem halucynogennym, często występującym w trawie i mchach na terenach o dużej ilości opadów. Szacuje się, że aż 8 gatunków należących do *Psilocybe* zawiera psychoaktywne alkaloidy takie jak psylocyбина i psylocyna, które mogą powodować halucynacje wzrokowe, słuchowe oraz znaczne zmiany w percepcji czasu i przestrzeni. W związku z trudnościami związanymi z identyfikacją tych grzybów w innej postaci niż świeży owocnik, podjęto próbę opracowania metody opartej na technice PCR, która pomogłaby w walce z niebezpiecznym zjawiskiem odurzania się młodzieży psylocybiną. Wykrywanie specyficznej dla *P. semilanceata* sekwencji DNA dało satysfakcjonujące rezultaty, w przyszłości test ten może znaleźć powszechne zastosowanie w medycynie sądowej.

*Psilocybe semilanceata* belongs to the genus of *Psilocybe*; it is a hallucinogenic fungus, frequently found in regions with high rainfall, in the grass and moss. There are estimated to be as many as eight *Psilocybe* hallucinogenic species containing psychoactive alkaloids, such as psilocybin and psilocin, which may cause visual, auditory and other hallucinations, as well as profound changes in the perception of time and space. Since identification of *P. semilanceata* in a form different than a fresh mushroom is almost impossible, the authors made an attempt at developing a method of fungi identification based on the PCR technique, which could be helpful in a fight against dangerous consumption of these hallucinogens by the youth. Detection of the specific DNA sequence for *P. semilanceata* brought good results; the test may be commonly employed in forensic practice in the future.

Słowa kluczowe: Psilocybe, grzyby halucynogenne, łysiczka lancetowata, PCR  
Key words: Psilocybe, hallucinogenic fungi, Psilocybe semilanceata, PCR

### WSTĘP

Grzyby halucynogenne cieszą się coraz większą popularnością wśród osób zażywających środki odurzające. Sprzyja temu fakt, iż można je zdobyć bez większego wysiłku – bądź podczas „grzybobrania” w okresie jesiennym, bądź korzystając z Internetu, praktycznie przez cały rok. Dostępność materiałów pozwalających na założenie domowej hodowli sprawia, że problem staje się niezależnym od pory roku. Zainteresowanie wymiaru sprawiedliwości problemem spożywania grzybów halucynogennych wydaje się nie być wystarczające, zważywszy na zwiększającą się skalę zjawiska. W pracy tej, będącej kontynuacją naszego artykułu z 2005 roku [1] przedstawiono metodę, która pozwala na molekularną identyfikację najpopularniejszego gatunku grzyba halucynogennego w Polsce, w każdej formie i każdym stadium rozwojowym.

### MATERIAŁ I METODY

#### Grzyby użyte do badań

Badania obejmowały materiał genetyczny wyizolowany z łysiczki lancetowatej (*Psilocybe semilanceata*) oraz innych gatunków grzybów, które

zostały użyte w celu udowodnienia specyficzności stosowanej metody.

Owocniki łysiczki w formie zasuszonej pochodziły ze zbiorów z roku 2004 oraz sprzed kilkudziesięciu lat (próby oznaczono jako „nowa” i „stara”)

Pozostałe gatunki wykorzystane podczas opracowywania metody to:

*Conocybe* sp. (stożkogłówka);

*Xerocomus chrysenteron* (podgrzybek złocisty);

*Xerocomus subtomentosus* (podgrzybek zajęczek);

*Agaricus* (pieczarka);

*Suillus bovinus* (maślak sitarz);

*Tricholoma flavovirens* (gąska zielonka);

*Boletus edulis* (borowik szlachetny);

*Amanita pantherina* (muchomor plamisty);

*Saccharomyces cerevisiae* (drożdże piekarskie);

*Epidermophyton floccosum* (dermatofit);

*Trichophyton mentagrophytes* (dermatofit).

Sprawdzenie specyficzności metody przeprowadzono zarówno na grzybach o małym stopniu pokrewieństwa w stosunku do łysiczek, czyli na drożdżach i dermatofitach (nie będących grzybami leśnymi, wywołują one zakażenia grzybicze u człowieka). Z drugiej strony, wykorzystano gatunki o dużym podobieństwie genetycznym, należące do tego samego podtypu jak podgrzybki czy maślak oraz, według systematyki, jeszcze bliżej spokrewnione z łysiczką pieczarkę, gąskę zielonką, muchomora plamistego i stożkogłówkę, które różnią się na poziomie rodziny.

Warto także zauważyć, iż poza podobieństwem taksonomicznym w wyborze materiału badawczego posłużono się również kryterium morfologicznym. Poddano analizie materiał genetyczny stożkogłówki, która jest bardzo podobna do łysiczki, przez co grzyby te bywają mylone przez zbieraczy. Co ważne, niektóre gatunki z rodzaju *Conocybe* także zawierają pewne ilości psylocybiny.

### Izolacja DNA

Izolacja zarówno z *Psilocybe semilanceata* jak i z pozostałych gatunków grzybów była prowadzona przy użyciu protokołu z wykorzystaniem CTAB, opisanego po raz pierwszy przez Murray'a i Thomsona w 1980 roku [3]. Procedura została zmodyfikowana i jej wykonanie przebiegało według następującego schematu:

1. Rozcierano w ciekłym azocie 2-3 g świeżego grzyba (lub grzybni) i przenoszono około 100 mg materiału do probówki Eppendorfa;

2. Dodawano 500  $\mu$ l buforu do lizy (skład: 100 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 1% SDS; 100  $\mu$ g/ml proteinazy K; 1%  $\beta$ -merkaptopetano) i inkubowano 1 godzinę w 60°C;
3. Dodawano 200  $\mu$ l 5M NaCl oraz 0,1 objętości odczynnika CTAB (skład: 10% CTAB w wodzie, w/v) i inkubowano w 65°C przez 20 minut;
4. Schładzano na lodzie i dodawano równą objętość mieszaniny chloroform: alkohol izoamylowy (24:1) – mieszano przez czterokrotne odwracanie (worteksowanie);
5. Inkubowano w temperaturze 0°C przez 30 minut, wirowano w 4°C przez 10 minut na obrotach ok. 12 000 rpm;
6. Przenoszono fazę wodną do nowej probówki i dodano 1 objętość izopropanolu;
7. Inkubowano 20 minut w 20°C, następnie wirowano 10 minut w 4°C na obrotach ok. 12 000 rpm;
8. Usuwano supernatant i dwukrotnie przemywano osad 70% etanolem;
9. Osad osuszano na powietrzu i zawieszano w 100  $\mu$ l TE z RNazą A.

Po przeprowadzeniu izolacji DNA przeprowadzono elektroforezę w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydydy (0,5  $\mu$ g/ml) co pozwoliło stwierdzić pozytywny wynik izolacji (obecności materiału genetycznego). Zbadano także stężenie uzyskanego DNA przy użyciu spektrofotometru PHARMACIA GENEQUANT. Uzyskane stężenie mieściło się w zakresie od 6 do 14  $\mu$ g/ $\mu$ l w zależności od gatunku grzyba.

### Amplifikacja DNA

Uzyskanie specyficznych starterów było z założenia najważniejszą częścią pracy. Aby zaprojektować potrzebne sekwencje oligonukleotydów przejrano dane dostępne w banku genów na stronie <http://ncbi.nlm.nih.gov>, a także skorzystano z wyników pracy Nugent i Saville [2].

Praca projektowa polegała na odnalezieniu fragmentu DNA, który teoretycznie nie występuje w najbliższej spokrewnionych gatunkach rodzaju *Psilocybe*, a następnie wykluczenie istnienia tej sekwencji także i w innych, mniej spokrewnionych gatunkach.

Na podstawie wykonanych studiów zaproponowano następujące startery do genu *ITS-1*:

**PSYL2R:** 5' – TCA TTA TTG AAT GAA CTT GGC TC – 3'  
**PSYL2F:** 5' – AGC TTG TGAA AGC AAT CCT CTT – 3'.

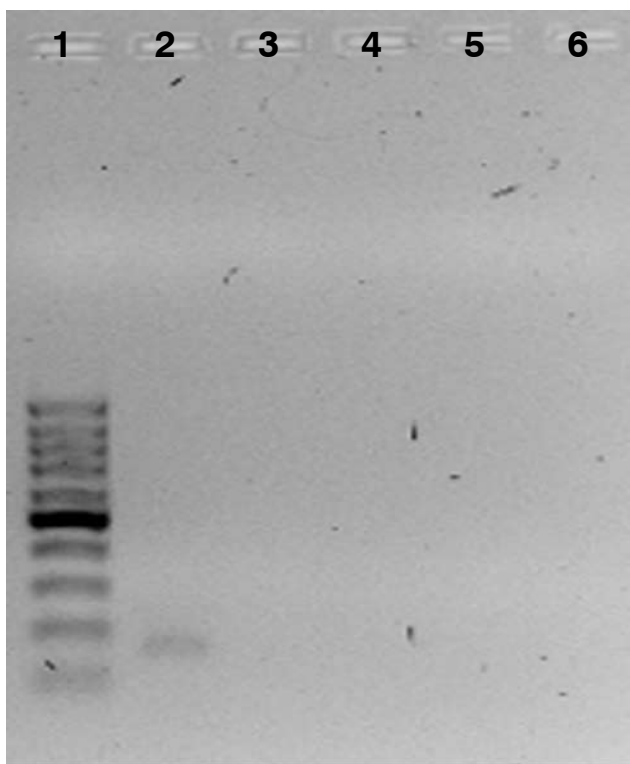
Reakcja PCR przebiegała według schematu:

- ⇒ wstępna denaturacja: 95°C – 2 minuty
  - ⇒ denaturacja: 95°C – 40 sekund
  - ⇒ przyłączanie starterów: 57°C – 30 sekund
  - ⇒ elongacja: 72°C – 50 sekund
  - ⇒ dodatkowa elongacja: 72 °C – 5 minut
- } 35 cykli

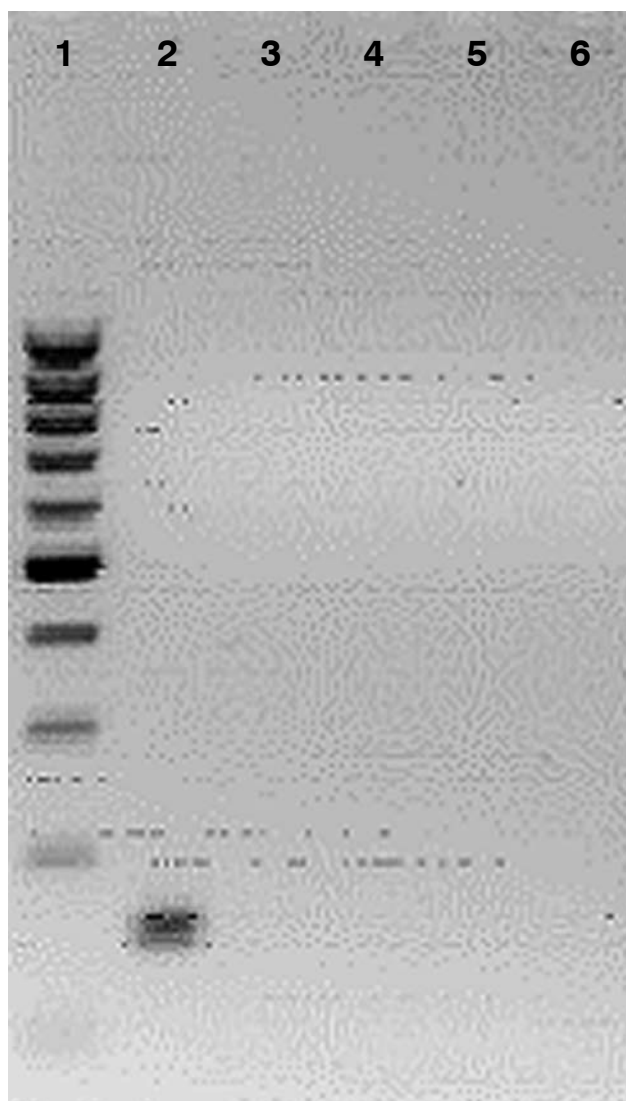
Proces amplifikacji prowadzono w objętości **25 µl**, a skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

Odczynnik	Ilość w µl	Stężenie końcowe
bufor do PCR 10x	2,5	1x
mix dNTP (20 mM)	0,3	0,24 mM
starter PSY2F (20 µM)	0,3	0,24 µM
starter PSY2R (20 µM)	0,3	0,24 µM
polimeraza DNA (2U/ µl)	0,5	1 U
matryca DNA (1µg/µl)	1	
woda	20,1	

Ryc. 1. Obraz elektroforezy po reakcji PCR: 1. Marker; 2. Łysiczka lancetowata; 3. Muchomor sromotnikowy; 4. Borowik szlachetny; 5. Gąska zielona; 6. Stożkogłówka.



Ryc. 2. Obraz elektroforezy po reakcji PCR: 1. marker; 2. Łysiczka lancetowata; 3. Podgrzybek zajęczek; 4. Podgrzybek złoty; 5. Drożdże; 6. Pieczarka.



Reakcja PCR powinna dać produkt o wielkości 153 pz, który uwidoczniono podczas elektroforezy w żelu agarozowym. Proces był prowadzony w buforze 1 x TBE przy napięciu 100 V przez 60 minut.

Do produktów reakcji PCR (8  $\mu$ l) dodawano barwnika (1,2  $\mu$ l) Loading Dye Solution firmy Fermentas, a jako odnośnika dla określenia ciężkości DNA używano markera (6 $\mu$ l) GeneRuler™ 100bp Ladder Plus.

## WYNIKI

Wizualizacja wyników PCR podczas elektroforezy (ryc. 1, 2) nie pozostawia wątpliwości, że uzyskany produkt jest jedynie efektem amplifikacji DNA łysiczki lancetowatej. Oznacza to, że wykorzystane startery nie rozpoznają sekwencji DNA pozostałych wykorzystanych do badań gatunków grzybów, o różnym stopniu pokrewieństwa z *P. semilanceata*. Uzyskany obraz pozwala na wyciągnięcie wniosku, iż prowadzone badania wg protokołu przytoczonego powyżej są specyficzne dla grzyba halucynogennego i cel założony w pracy został osiągnięty.

## DYSKUSJA

Jak wiadomo, każdy organizm żyjący na ziemi ma swój niepowtarzalny kod genetyczny zapisany w DNA. Daje to ogromne możliwości do opracowywania metod identyfikacji organizmów na poziomie molekularnym. Rozpoznanie łysiczki lancetowatej w postaci grzybni lub sproszkowanego, suchego materiału jest praktycznie niemożliwe bez użycia metod biologii molekularnej, bazujących na identyfikacji niepowtarzalnego DNA tego grzyba. Opracowana metoda jest prosta w wykonaniu i dotychczasowe próby wykazały jej niezawodność w jednoznacznym rozpoznaniu łysiczki lancetowatej. Powszechne jej użycie mogłoby doprowadzić do polepszenia walki z wciąż narastającym problemem. Uzyskanie dopracowanego protokołu umożliwiającego obiektywną ocenę posiadanego materiału jest nieocenioną pomocą w walce z osobami po-

siadającymi substancje nielegalne, których forma uniemożliwia ich identyfikację drogą oglądania tego materiału. Świetnym przykładem jest grzybnia *P. semilanceata*, uzyskana drogą uprawy domowej według wskazówek dostępnych w Internecie. Badania przedstawione w tej pracy nie obejmowały DNA innych gatunków *Psilocybe*, ale pozostaje faktem, że jedynie *P. semilanceata* występuje powszechnie w polskich lasach i na łąkach, a występowanie w naszym kraju pozostałych gatunków jest nie do końca potwierdzone, a nawet, jeśli one występują, to dość rzadko. W związku z tym, z powodu braku możliwości zdobycia próbek innych gatunków tego rodzaju, w tej pracy poddano analizie tylko gatunek *Psilocybe semilanceata*. Przedstawione wyniki jasno wskazują, iż opracowane startery pozwalają na identyfikację łysiczki lancetowatej, co pozwoli na podjęcie skuteczniejszej walki z rosnącym zagrożeniem związanym ze spożyciem tych grzybów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Janoszka J., Rymkiewicz A., Dobosz T.: Halucynogenne grzyby – łysiczki (*Psilocybe*). Część I. Charakterystyka, skutki zażycia, rozpoznawanie. Arch. Med. Sąd. Krym. 2005, 55: 215-219.
2. Nugent K. G., Saville B. J.: Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach. Forensic Sci. Int. 2004, 140: 147-157.
3. Murray M. G., Thompson W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 1980, 8: 4321-4325.

Adres do korespondencji:

Dr hab. Tadeusz Dobosz  
Zakład Technik Molekularnych  
Katedry Medycyny Sądowej AM  
Curie-Skłodowskiej 52  
50-369 Wrocław