Streszczenie

Obecnie opisanych jest kilka tysięcy związków chemicznych naturalnie występujących w roślinach i grzybach, z których największą grupę stanowią alkaloidy. W czystej postaci alkaloidy są toksyczne, a przyjmowanie dużych ich dawek zwykle prowadzi do poważnych zatruć, także o skutkach śmiertelnych. Właśnie, dlatego zażywanie tych środków od zawsze podlegało kontroli, niegdyś w formie przyjętych zwyczajów kulturowych, dziś w postaci regulacji prawnych. Grzyby o działaniu neurotropowym nazywane „magicznymi grzybkami”, uchodzą za dość tani, naturalny i łatwo dostępny sposób na osiągnięcie doznań narkotycznych. Zjawisko narkomanii pociąga za sobą cały szereg implikacji, stanowiąc problem w kontekście prawnym, społecznym, jak i klinicznym.

Grzyby halucynogenne ze względu na ich łatwy dostęp i niski koszt cieszą się dużą popularnością wśród osób odurzających się. W Polsce, zgodnie z obowiązującą Ustawą z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii (z późn. zm.), posiadanie i handel grzybami, które zawierają substancje psychotropowe jest nielegalne. Dlatego, z punktu widzenia postępowania sądowego, prawidłowa identyfikacja taksonomiczna grzybów zawierających substancje odurzające nabiera istotnego znaczenia.

Specyficzne gatunkowo sekwencje w DNA stanowią jeden z najbardziej wiarygodnych znaczników biologicznych i mogą zostać z powodzeniem wykorzystane do identyfikacji grzybów na różnych poziomach zróżnicowania taksonomicznego. Grzyby to słabo poznana grupa, zarówno pod względem różnorodności gatunkowej, jak i wiedzy na temat sekwencji nukleotydowych taksonów już poznanych. Poprzez określenie sekwencji regionów hiperzmiennych możliwa jest pewna identyfikacja nawet bardzo blisko spokrewnionych gatunków. Opracowanie testów do identyfikacji biologicznej wydaje się być słusznym kierunkiem badań, których wyniki mogą znaleźć bezpośrednie zastosowanie w praktyce laboratorium genetyki sądowej. Z tego względu opracowanie testu do szybkiego i bezpośredniego wykrycia grzybów zawierających substancje narkotyczne opartego na detekcji fragmentu DNA stało się głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej. Identyfikacji specyficznych gatunkowo fragmentów DNA dokonano na podstawie analiz sekwencji wewnętrznych regionów niekodujących – ITS (ang. *internal transcribed spacer*) oraz wewnętrznej kodującej podjednostki rybosomalnego DNA 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2).

Rezultatem powstałej rozprawy doktorskiej jest opracowany test opierający się na technice multipleks PCR do szybkiej identyfikacji następujących gatunków grzybów: *Psilocybe semilanceata* (Fr.) P. Kumm.), *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer, *Psilocybe subcubensis* Guzmán oraz *Amanita muscaria* (L.: Fr.) Pers. Opracowano również proces izolacji DNA, który pozwala na uzyskanie materiału genetycznego nadającego się do bezpośrednich analiz z bardzo niewielkiej ilości materiału. Ponadto, uzyskano również szereg sekwencji nukleotydowych, uznanych za specyficzne gatunkowo, które zostaną umieszone w banku sekwencji GenBank, w tym kilka, które zostaną zdeponowane w bazie po raz pierwszy.

Abstract

At the moment, there are several thousands of described compounds naturally occurring in plants and fungi, and the largest group are alkaloids. Pure alkaloids are toxic, and taking large doses usually leads to severe poisoning, the effects may be lethal. That is why the use of such substances has always been subject to the control, once in the form of accepted cultural practices and today – in the form of legal regulations. Mushrooms characterised by neurotrophic effect called "magic mushrooms" are considered to be quite n inexpensive, natural and easily accessible way to achieve narcotic sensations. The phenomenon of drug addiction involves a whole range of implications, constituting a problem in the legal, social, and clinical context.

Psychedelic mushrooms, as easily accessible and inexpensive, are very popular amongst the people who take drugs. In Poland, in accordance with the Act of 29 July 2005 on prevention of drug addiction (as amended), possession of and trade in mushrooms, which contain psychotropic substances, is illegal. Therefore, from the point of view of legal proceedings, the correct taxonomic identification of mushrooms containing intoxicating substances is gaining importance.

Species-specific DNA sequences constitute one of the most reliable markers of the organism and can be successfully used to identify fungi on different levels of taxonomic differentiation. Fungi are poorly known group of organisms, both in terms of species diversity, as well as knowledge of the sequence of already known nucleotide taxa. By defining a sequence of hypervariable regions, it is possible to clearly identify even very closely related fungi taxa. The development of tests for biological identification seems to be a legitimate research direction, the results of which can be directly applied in the forensic genetics laboratory. For this reason, the development of a test for the rapid and direct detection of fungi containing narcotic substances based on the detection of DNA fragment has become the main objective of this doctoral thesis. Identification of the species-specific DNA fragment was conducted on the basis of the analyses of internal non-coding regions ITS (*internal transcribed spacer*) and internal coding sub-unit of ribosomal DNA 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2).

The result of the developed doctoral thesis is a test based on technique of multiplex PCR for rapid identification of fungi of *Psilocybe semilanceata* (Fr.) P. Kumm.), *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer, *Psilocybe subcubensis* Guzmán and *Amanita muscaria* (L.: Fr.) Pers. species. Also the process of DNA isolation has been optimised, which allows for obtaining genetic material suitable for direct analyses using very small portions of material. Also a series of nucleotide sequences has been achieved, considered to be species-specific, which will be placed in the GenBank sequence database, including a few that will be placed in the database for the first time.