

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Institute of Geochemistry, Mineralogy and Mineral Resources**

Doktorský studijní program: Aplikovaná geologie
Ph.D. study program: Applied Geology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Interakce velkých hub a stopových prvků v půdách
Interactions of macrofungi and trace elements in soils

Jaroslava Cejpková

Školitel/Supervisor: RNDr. Jan Borovička, Ph.D. (ÚJF a GIÚ AV ČR)

Praha, 2016

ABSTRAKT

Tato disertační práce navazuje na mou diplomovou práci, ve které jsem se zaměřila především na problematiku obsahu a stanovení uranu v plodnicích velkých hub (výsledky byly publikovány, Příloha 1). Závěr práce, tedy že plodnice hub neakumulují uran, mě vedl k úvaze, že prvky jako uran mohou být akumulovány v ektomykorhizách, protože některé publikované práce naznačovaly významnou roli hub v environmentální geochemii uranu. Proto jsem se rozhodla na mou diplomovou práci navázat a zabývat se obsahem stopových prvků v ektomykorhizách obecně. Vzhledem k tomu, že jsem měla možnosti využít řadu analytických metod, podílela jsem se i na jiných studiích z oboru geomykologie.

V reakci na poplašné zprávy šířící se v českých médiích jsem se zaměřila na obsah a distribuci radiocesiumu v plodnicích hříbu hnědého. Jak je patrné z Přílohy 2, plodnice hříbu hnědého v České republice nepředstavují pro konzumenty zdravotní riziko.

Pomocí molekulárních metod (PCR se specifickými primery) jsme zkoumali distribuci mycelia saprotrofní houby pečárky Bernardovy v půdním profilu na lokalitě v Praze (Příloha 3). Naše výsledky ukázaly, že mycelium tohoto druhu zasahuje i do hloubky 30 cm a že izotopické složení olova v plodnicích tohoto druhu naznačuje transport tohoto kovu z hloubky minimálně okolo 13-17 cm.

Hlavní část mé práce byla věnována studiu stopových prvků v ektomykorhizách. Jako hlavní analytickou metodu jsem použila neutronovou aktivační analýzu. Vzorky ektomykorhiz, jemných kořenů a půdních vzorků byly sbírány především v okolí Příbrami, která je znečištěna činností kovohutě. Téměř všechny vzorky ektomykorhiz se podařilo identifikovat do druhu pomocí molekulárních metod (sekvenace DNA). Výsledky z této části výzkumu lze nalézt v Přílohách 4 a 5. Podobně jako je tomu u plodnic, akumulace prvků v ektomykorhizách záleží na druhu prvku a druhu houby, koncentrace prvků se vyznačují mimořádnou variabilitou. Dále jsme kvantifikovali biomasu houby v ektomykorhizách hříbu hnědého a muchomůrky červené pomocí metody qRT-PCR.

Hlavní cíle této práce byly naplněny a podařilo se rozšířit naše znalosti z oboru geomykologie. Největším přínosem této práce bylo: 1) zjištění koncentrací 14 prvků v ektomykorhizách z kontaminovaných lokalit; 2) zjištění distribuce mycelia saprotrofní pečárky Bernardovy v půdním profilu; a 3) determinace koncentrace houbové biomasy v ektomykorhizách dvou druhů makromycetů.

ABSTRACT

This PhD thesis follows my master's thesis, which I focused on the problem of uranium determination and content in macrofungal fruit-bodies (the results have been published, Appendix 1). Macrofungi apparently do not accumulate uranium in fruit-bodies but as other studies suggested major roles of fungi in environmental geochemistry of uranium, I hypothesized possible accumulation of uranium and other elements in ectomycorrhizae. I therefore decided to continue the research and focus on investigation of trace elements in ectomycorrhizae. As I had opportunity to use a variety of analytical methods, I also participated in other studies in the field geomycology and the results are included in this thesis.

In response to alarmist reports in Czech media, I focused on activity and distribution of radiocaesium in fruit-bodies of *Boletus badius*. As demonstrated in Appendix 2, the fruit-bodies of this species do not represent a health risk for mushroom consumers.

Distribution of mycelium of saprotrophic *Agaricus bernardii* in a soil profile in Prague was investigated by use of molecular methods (PCR with specific primers). The results have shown that the mycelium reaches the depth of 30 cm. Lead isotopic composition of fruit-bodies suggests lead can be accumulated from soil depth of 13-17 cm (Appendix 3).

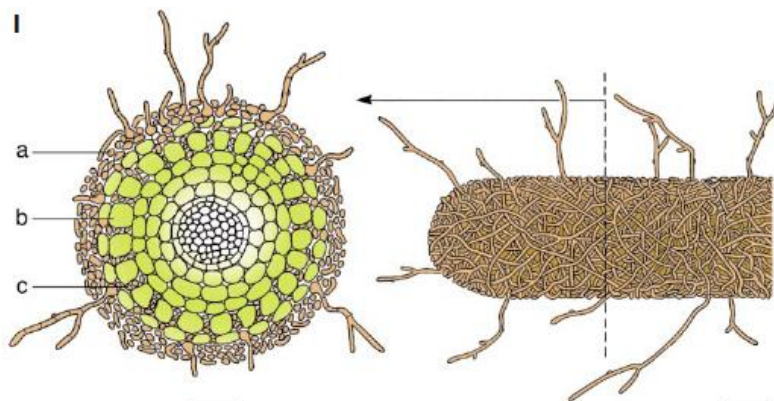
However, the main aim of my thesis was investigation of trace elements in ectomycorrhizae with instrumental neutron activation analysis as the principal analytical method. Ectomycorrhizal roots, fine roots and organic soil samples were collected mainly in the smelter-polluted area in the region of Příbram (Central Bohemia, Czech Republic). Almost all samples of ectomycorrhizae were identified at species level by molecular methods (DNA sequencing). The results of this research are presented in Appendix 4 and Appendix 5. Similarly as observed in the fruit-bodies, trace element accumulation in ectomycorrhizae depends on particular element and fungal species; very high concentration variability was observed. Furthermore, fungal biomass was quantified in ectomycorrhizae of *Boletus badius* and *Amanita muscaria* by use of qRT-PCR.

The aims of thesis were fulfilled and the knowledge of the field of geomycology deepened. The greatest outputs of this study were: 1) determination of 14 elements in ectomycorrhizae from polluted sites; 2) identification of distribution of mycelium of saprotrophic *Agaricus bernardii* in a soil profile; and 3) determination of fungal biomass concentration in ectomycorrhizae of two macromycete species.

1. ÚVOD

Bylo opakovaně prokázáno, že houby zasahují do biogeochemických cyklů celé řady prvků v půdách (Gadd 2004, 2007). Velké houby se aktivně zapojují do zvětrávacích procesů především dvěma způsoby: biomechanicky (hyfy pronikají do minerálních zrn) a biochemicky (hyfy produkují řadu organických kyselin a enzymů, které reagují s půdními složkami). V důsledku této aktivity, mohou houby zvyšovat mobilitu a biodostupnost chemických prvků, včetně toxických kovů. Houby jsou známé i svou schopností hromadit prvky ve svých plodnicích, a některé z nich dokonce hyperakumulovat (Falandysz et Borovička 2013).

Ektomykorhizní houby žijící v mutualistické symbióze s cévnatými rostlinami patří mezi jednu z nejdůležitějších ekologických skupin hub, které se podílejí na zvětrávacích procesech. Role ektomykorhizních hub spočívá v příjmu minerálních látek, vody a jejich transportu do rostlin. Rostliny naopak dodávají produkty fotosyntézy. Tato výměna se děje ve speciálním společném orgánu, který nazýváme ektomykorhiza, a který se skládá jak z rostlinné, tak i houbové biomasy (Obr. 1, Landeweert et al. 2001). Ektomykorhizy jsou přítomné na jemných kořenech rostlin.



Obrázek 1. Ektomykorhiza se skládá z rostlinné a houbové biomasy (Landeweert et al. 2001). Houba formuje (a) houbový plášť okolo kořenové špičky a proniká mezibuněčným prostorem mezi (b) kortikálními buňkami, kde vytváří tzv. Hartigovu síť (c).

Opakovaně bylo prokázáno, že ektomykorhizní symbióza zlepšuje růst rostlin a chrání je před toxicitou těžkých kovů (Schützendübel et Polle 2002, Adriaensen et al. 2006). Některé studie (Berthelsen et al. 1995; Krupa et Kozdrój 2004, 2007) odhalily akumulaci některých prvků v ektomykorhizách. Podle autorů těchto studií tak ektomykorhizy mohou představovat bariéru proti pronikání těžkých kovů do rostlin. Pouze několik málo studií se však zabývalo obsahy prvků v ektomykorhizách.

Tato disertační práce se zaměřila na některé aspekty geomykologie, které nejsou doposud zcela objasněné. Především se zabývala akumulací uranu v plodnicích hub a ektomykorhizách, distribucí mycelia saprotrofních hub v půdním profilu a akumulací prvků v ektomykorhizách.

2. DISTRIBUCE MYCELIA V PŮDNÍM PROFILU

Hlavní část kořenového systému bylinné vegetace a stromů se nachází v humusové vrstvě a ve vyšším minerálním horizontu (Makkonen et Helmisaari 1998), i přesto však můžeme kořeny nacházet i hlouběji (Jackson et al. 1996).

2.1 Distribuce mycelia ektomykorhizních hub v půdním profilu

Cairney et al. (2005) ukázali, že determinace plodnic není vhodným indikátorem pro studium diversity ektomykorhizních hub na lokalitách a k pozorování přírodních procesů je třeba přímých metod. Řada současných studií se zaměřuje na kvantifikaci ektomykorhizního mycelia v půdě za použití molekulárních metod na principu PCR (Hortal et al. 2008). Ektomykorhizní mycelium představuje 30-80 % mikrobiální biomasy v půdě (De la Varga et al. 2011) a může přežít i 11 let (Landeweert et al. 2003). Ačkoliv je ektomykorhizní mycelium přítomné v celém půdním profilu, mnoho studií se zaměřuje pouze na vrchní organických horizont. Rosling et al. (2003) a Rosling et Rosenstock (2008) našli nejvyšší hustotu ektomykorhizního mycelia v organickém horizontu podzolu, s hloubkou tato hustota klesala.

2.2 Distribuce saprotrofního mycelia v půdním profilu

Obecně se předpokládá, že saprotrofní houby kolonizují organických horizont, ale pouze několik málo studií se zabývalo vertikální distribucí saprotrofního mycelia v půdním profilu (Robinson et al. 2009). Již v roce 1917 publikovali Shantz a Piemeisel práci, ze které je dle obrazové dokumentace patrné, že mycelium saprotrofního druhu pečárky označované jako *Agaricus tabularis* zasahuje hluboko do půdního profilu. V naší práci (Borovička et al. 2014) jsme využili molekulárně genetické metody (qRT-PCR se specifickými primery) k detekci saprotrofního mycelia pečárky Bernardovy - *Agaricus bernardii* v půdním profilu v Praze. Přítomnost mycelia byla potvrzena v celém studovaném půdním profilu (0-30 cm). Nejvyšší hustota byla nalezena v hloubce 4-6 cm.

3. AKUMULUJÍ HOUBY URAN?

V laboratorních podmínkách bylo ukázáno, že houby jsou schopné rozpouštět U oxidy a kovový U a akumulovat je v myceliu (Gadd et Fomina 2011). Nicméně naše znalosti o interakci hub a U v životním prostředí jsou stále limitované, a navíc doposud byla publikovaná nejednoznačná data o obsahu U v plodnicích hub. Několik autorů (Falandysz et al. 2001, Johanson et al. 2004, Řanda et al. 2005) publikovalo velmi nízké koncentrace U v plodnicích hub (v jednotkách až desítkách $\mu\text{g kg}^{-1}$), zatímco Campos et al. (2009) publikovali vyšší koncentrace (v jednotkách mg kg^{-1}).

3.1 Obsah uranu v plodnicích hub z čistých lokalit

Koncentrace U (a také Pb, REE a Th) byly zkoumány v houbách z různých míst (s rozdílným geologickým podložím) a byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (IPC-MS). Naše data ukázala, že U je v houbách akumulován ve velmi nízkých koncentracích, obvykle pod $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Borovička et al. 2011). Nepozorovali jsme žádné rozdíly mezi saprotrofními a ektomykorhizními houbami. Zdá se tedy, že data

publikovaná ve studii Campos et al. (2009) jsou chybná, pravděpodobně kvůli použití nevhodné analytické metody.

3.2 Obsah uranu v plodnicích hub z kontaminované lokality

Koncentrace U v plodnicích hub, ektomykorhizách, jemných kořenech a půdních vzorků z kontaminované lokality v blízkosti Příbrami (střední Čechy, Česká republika) byly analyzovány pomocí ICP-MS a instrumentální neutronové aktivační analýzy (INAA). Chemická frakcionace kovů v půdách byla zkoumána pomocí sekvenční extrakce BCR. Naše data (Kubrová et al. 2014) ukázala, že obsah U v plodnicích je zvýšený (vyšší než ve vzorcích z čistých lokalit), ale i přesto koncentrace nepřesáhly 3 mg kg^{-1} , což indikuje velmi nízký příjem U (ve srovnání s jeho obsahem v půdě). Naopak Ag bylo v plodnicích silně akumulováno, což je zvláště zajímavé, protože šlo o kov s nejnižší mobilitou a nejnižší celkovou koncentrací mezi zkoumanými prvky. Zdá se, že akumulace zkoumaných prvků (Ag, Pb, Th a U) v houbách tedy primárně nezávisí na celkové koncentraci nebo chemické formě prvků v půdách. Uran se v ektomykorhizách a jemných kořenech neakumuluje, koncentrace byly prakticky identické.

4. STOPOVÉ PRVKY V EKTOMYKORHIZÁCH

O obsahu stopových prvků v ektomykorhizách máme velmi málo údajů. Berthelsen et al. (1995) objevili, že se v ektomykorhizách silně akumuluje Cu a bylo navrženo (Krupa et al. 2004, 2007), že ektomykorhiza formuje efektivní bariéru proti pronikání těžkých kovů do rostliny, a houby tak chrání své mykorhizní partnery před toxicitou těžkých kovů.

4.1 Stopové prvky v ektomykorhizách ze Lhoty u Příbramě

Vzorky ektomykorhiz, jemných kořenů a půdní vzorky ze Lhoty u Příbramě byly analyzovány pomocí INAA a epitermální neutronové aktivační analýzy (ENAA). Tato lokalita je známá vysokými koncentracemi Ag, As, Cd, Cu, Pb, Sb a Zn v půdách (Ettler et al. 2004, 2007). Koncentrace prvků v ektomykorhizách byla porovnána s obsahy těchto prvků v jemných kořenech a půdách (celková koncentrace i výluh kyselinou dusičnou).

Jak shrnuje náš rukopis (Cejpková et al. 2016), Ag, Cd a Cl jsou prvky, které jsou významně akumulovány v ektomykorhizách. Naopak As, Sb a V nejsou akumulovány. Hřib hnědý - *Boletus badius* se ukázal jako nejefektivnější akumulátor řady prvků ze zkoumaných druhů hub.

4.2 Kvantifikace mycelia hříbu hnědého a muchomůrky červené v ektomykorhize

Ke kvantifikaci houbové biomasy jsme využili metodu qRT-PCR se dvěma páry specifických primerů (Cejpková et al. 2016). Zaznamenali jsme velmi rozdílné koncentrace, ale medián byl u obou studovaných druhů blízko 5 %. Na rozdíl od některých prací (Antibus et al. 1993, Zeppa et al. 2000) byly námi zjištěné koncentrace houbové biomasy velmi nízké. Důvody pro tyto rozdíly jsou nejasné, ale lze předpokládat, že jsou způsobeny environmentálními faktory. V hříbu hnědém a muchomůrce červené (Obr. 2) byly odhaleny zvýšené koncentrace kovů (Ag, Cd, Cu, Zn) v ektomykorhizách. S ohledem na stanovený podíl houbové biomasy (Cejpková et al. 2016) byla vypočtena předpokládaná koncentrace kovu v houbové biomase ektomykorhizy. Průměrná koncentrace Zn vypočtená v hříbu

hnědém se shoduje s publikovaným obsahem $2\,600\text{ mg kg}^{-1}$ v houbovém plášti ektomykorhizy klouzka obecného (Turnau et al. 2001). Tyto výsledky naznačují aktivní roli ektomykorhizních hub v interakci s rostlinami a půdním prostředím a indikují i vysokou akumulaci schopnost ektomykorhizního mycelia.



Obrázek 2. Plodnice (vlevo) a ektomykorhizy (vpravo) muchomůrky červené. Foto: Jaroslava Cejpková.

5. DISTRIBUCE AKTIVITY RADIOCESIA V HŘIBU HNĚDÉM - *BOLETUS BADIUS*

V roce 2011 přinesla česká média klamavé zprávy¹, že pokožka klobouku hříbu hnědého je radioaktivní a měla by být před konzumací oloupána. Houby jsou schopné akumulovat radiocesium a radioaktivita hub na našem území byla v minulosti často zkoumána (Řanda et al. 1987, 1988a-b, 1989; Horyna et Řanda 1988). Bylo zjištěno, že nejsilnějšími akumulátory radiocesia jsou ektomykorhizní houby a druhy jako je lakovka ametystová – *Laccaria amethystina*, čechratka podvinutá – *Paxillus involutus* a hřib hnědý. Nicméně běžná konzumace hub by neměla představovat zdravotní riziko (Řanda et al. 1988b). V naší práci (Borovička et al. 2012) jsme se snažili vyvrátit poplašné zprávy a měřili jsme distribuci aktivity radiocesia v 10 plodnicích hříbu hnědého (pokožka klobouku, dužnina klobouku, hymenium a třeň). Nejvyšší aktivita radiocesia byla nalezena v dužnině klobouku a nejnižší ve třeni. Naměřená aktivita byla 10 krát nižší než hodnoty uváděné z 80. let 20. století. Hygienický limit pro houby (vyhláška č. 307/2002 Sb.) přesažen nebyl, a proto není důvod k obavám.

¹ <http://www.hoax.cz/hoax/radioaktivni-houby/> [cit. 1. 10. 2015]

http://hobby.idnes.cz/jiri-baier-myty-o-houbach-0xw-/houby.aspx?c=A120808_163946_houby_mce [cit. 1. 10. 2015]

<http://prehravac.rozhlas.cz/audio/2459460> [cit. 1. 10. 2015]

6. ZÁVĚRY

- Houby hrají důležitou roli v biogeochemických cyklech celé řady prvků, přispívají k zvětrávacím procesům v půdě a jsou důležitými symbionty cévnatých rostlin.
- Současné studie naznačují aktivní roli hub v biogeochemickém cyklu U. Nicméně, data získaná v naší studii v přirozených podmínkách tento předpoklad nepotvrdily. Houby z kontaminované lokality obsahují vyšší koncentrace U než ty, které pochází z čistých lokalit, ale na druhé straně U není akumulován ani v ektomykorhizách, ani v jemných kořenech.
- Bylo prokázáno, že pečárka Bernardova může kolonizovat i hlubší půdní horizonty a dosáhnout hloubky až 30 cm pod povrchem.
- Stanovili jsme obsahy celé řady prvků v ektomykorhizních kořenech a výsledky pro mnohé z nich (Ag, As, Cl, Co, Rb, Se, Sb, Th, U a V) nebyly doposud publikovány v žádné předešlé studii.
- Navzdory faktu, že jsme získali originální poznatky o interakci hub a stopových prvků, zůstává řada dosud nezodpovězených otázek. Není např. doposud jasné, zda prvky, které akumulují ektomykorhizy, jsou uloženy v jejich houbové či rostlinné části. K vyřešení tohoto problému by mohla přispět aplikace metody mikro PIXE, která precizní mapování distribuce prvků ve tkáních umožňuje.

7. LITERATURA

Seznam citací je uveden na konci anglické verze autoreferátu v kapitole 7 (References).

1. INTRODUCTION

It has been repeatedly demonstrated that macrofungi significantly interfere in biogeochemical cycles of chemical elements in soils (Gadd 2004, 2007). Macrofungi contribute to weathering processes mainly in two different ways: biomechanical weathering (fungal hyphae penetrate in mineral grains) and biochemical weathering (hyphal production of a wide range of organic acids and enzymes, which react with soil constituents). In consequence, this action of fungi may result in increase of mobility and bioavailability of chemical elements, including toxic heavy metals. Furthermore, macrofungi are known for their ability to take up a wide range of elements and accumulate them in their fruit-bodies (Falandysz and Borovička 2013).

Ectomycorrhizal fungi, living in mutualistic symbiosis with vascular plants, belong to the most important ecological groups of fungi which are involved in mineral weathering processes. The role of ectomycorrhizal fungi lays in uptake of mineral nutrients and water and their transport to host plants. Plants donate products of photosynthesis. This exchange takes place in mutual organs called ectomycorrhizae composed of both plant and fungal biomass (Fig. 1, Landeweert et al. 2001). Ectomycorrhizae are formed on the fine plant roots.

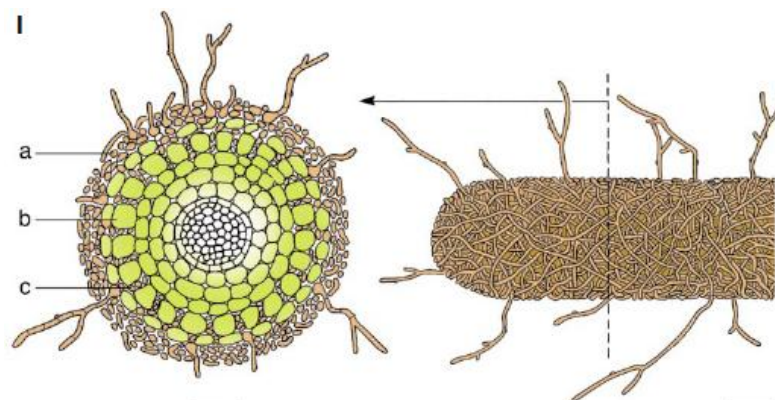


Figure 1. Ectomycorrhiza consists of plant biomass and fungal biomass (Landeweert et al. 2001). The fungus forms (a) a mantle of fungal hyphae around the root tip and penetrates the intercellular space between (b) cortical cells, forming (c) a ‘Hartig net‘.

It has been repeatedly demonstrated that ectomycorrhizal symbiosis enhances plant growth and protects plants against heavy metal toxicity (Schützendübel et Polle 2002, Adriaensen et al. 2006). Some studies (Berthelsen et al. 1995; Krupa and Kozdrój 2004, 2007) have revealed accumulation of some elements in ectomycorrhizae. According to the authors, ectomycorrhizae may form a barrier against heavy metal toxicity and protect their host plants. Only a few data have been published on concentrations of elements in ectomycorrhizae.

This PhD thesis has focused on some aspects of geomycology that are not clearly understood. Especially, PhD thesis has focused on accumulation of uranium in macrofungi and their ectomycorrhizae, mycelium distribution of saprotrophic fungi in the soil profile and element accumulation in ectomycorrhizae.

2. DISTRIBUTION OF MYCELIUM IN THE SOIL PROFILE

The major part of root system of understory vegetation and trees is found in the hummus layer and in the upper mineral soil (Makkonen et Helmisaari 1998), but it could be found even deeper (Jackson et al. 1996).

2.1 Distribution of ectomycorrhizal mycelium in the soil profile

According to Cairney et al. (2005), collections of fruit-bodies are poor indicators of below-ground ectomycorrhizal diversity and observations of nature processes need more direct analysis. Most recent environmental studies focused on quantification of ectomycorrhizal mycelium in soils have used molecular methods based on PCR analysis (Hortal et al. 2008). Ectomycorrhizal mycelia represent 30 to 80 % of microbial biomass in soil (De la Varga et al. 2011) and can survive even 11 years (Landeweert et al 2003). Although the ectomycorrhizal mycelium is present in the whole soil profile, most studies have focused on distribution in the upper organic horizons. Rosling et al. (2003) and Rosling et Rosenstock (2008) have shown that the highest density of ectomycorrhizae in a podsol soil profile was located in the organic horizon and decreases with depth.

2.2 Distribution of saprotrophic mycelium in the soil profile

It is believed that saprotrophic fungi colonize the organic horizon, but there are only very few studies dealing with the vertical distribution of mycelia of those fungi in soils (Robinson et al. 2009). Already in 1917, Shantz and Piemeisel published a visual documentation showing mycelium of (probably) *Agaricus tabularis* reaching deep into the soil profile at Colorado grasslands. In our work (Borovička et al. 2014), we used molecular methods (qRT-PCR with specific primers) to detect mycelium of saprotrophic *Agaricus bernardii* in the soil profile at a locality in Prague. The presence of the target species was confirmed in the whole studied soil profile (0-30 cm depth). The highest density was found at a depth of 4-6 cm.

3. DO MACROFUNGI ACCUMULATE URANIUM?

It has been demonstrated in *in vitro* experiments that fungi are able to solubilize U oxides and metallic U and accumulate it within their mycelia (Gadd et Fomina 2011). However our knowledge of environmental interactions between fungi and U is limited and, moreover, ambiguous data on U content in fruit-bodies has been published. Several authors (Falandysz et al. 2001, Johanson et al. 2004, Řanda et al. 2005) reported rather low concentrations of uranium in fruit-bodies (units to tends of $\mu\text{g kg}^{-1}$) whereas Campos et al. (2009) published much higher concentrations (units of mg kg^{-1}).

3.1 Uranium content in fruit-bodies from pristine sites

Concentration of U (and Pb, REE a Th) in macrofungi from of various origin (sites of differing bedrock geochemistry) were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Our data showed that U concentrations in fruit-bodies are generally below $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Borovička et al. 2011). No significant difference between concentration in ectomycorrhizal and saprotrophic species was observed. It appears that the data published by Campos et al. (2009) are erroneous; probably due to the use of inappropriate analytical method.

3.2 Uranium content in fruit-bodies from U-polluted site in Příbram mining district

Concentration of U in macrofungi, ectomycorrhizae, fine roots and soil samples from polluted area in the former Příbram mining district (Central Bohemia, Czech Republic) were analysed by ICP-MS and instrumental neutron activation analysis (INAA). Chemical fractionation of metals in soils was investigated by the BCR sequential extraction. Our data (Kubrová et al. 2014) showed that U content in fruit-bodies is elevated (higher than that in samples from unpolluted sites), but concentrations did not exceed 3 mg kg^{-1} , which indicates (when compared with U soil levels) rather low uptake rate. In contrast, Ag was highly accumulated in fruit-bodies. This is particularly interesting as Ag was the element with the lowest total/mobile soil concentrations of the investigated elements. It appears that accumulation of the investigated elements (Ag, Pb, Th, and U) in macrofungi does not primarily depend on the total content and chemical fractionation of those elements in soils. In ectomycorrhizae, U concentrations were practically identical with those in the fine roots and U was not accumulated.

4. TRACE ELEMENTS IN ECTOMYCORRHIZAE

There is a lack of data on concentrations of metals in ectomycorrhizae. Berthelsen et al. (1995) discovered that Cu is highly accumulated in ectomycorrhizae and it has been suggested (Krupa and Kozdrój 2004, 2007) that ectomycorrhizae form an effective biological barrier for heavy metals and thus protect the host plants against metal toxicity.

4.1 Trace elements in ectomycorrhizae from smelter-polluted area at Lhota near Příbram

Ectomycorrhizae, fine roots, and organic soils from the smelter-polluted area at Lhota near Příbram were analysed by INAA and epithermal neutron activation analysis (ENAA). This locality is known for high concentrations of Ag, As, Cd, Cu, Pb, Sb, and Zn in soils (Ettler et al. 2004, 2007). Element concentrations in ectomycorrhizae were compared with those in the fine roots and soils (total content and nitric acid extractable fraction). As summarized in our manuscript (Cejpková et al. 2016), Cd, Cl, and Ag were markedly accumulated in ectomycorrhizae and *vice versa*, As, Sb, and V were not accumulated. *Boletus badius* was shown to be the most efficient accumulator of the investigated species.

4.2 Quantification of *Boletus badius* and *Amanita muscaria* biomass in ectomycorrhizae

We used qRT-PCR with specific primers for each species for quantification of fungal biomass (Cejpková et al. 2016) in ectomycorrhizae. In both species, we detected considerably varying concentration but median values were close to 5%. In contrast to others (Antibus et Sinsabaugh 1993, Zeppa et al. 2000), our concentration ranges of fungal biomass in both species were rather low. The reasons for this discrepancy are unclear but can be possibly explained by environmental factors. *Boletus badius* and *Amanita muscaria* (Fig. 2) have revealed increased concentrations of Ag, Cd, Cu and Zn in their ectomycorrhizae. Expected concentrations of metals in mycobionts (as shown in Cejpková et al. 2016) were calculated considering the mean proportion of the fungus in ectomycorrhizae. The mean Zn concentration calculated for *Boletus badius* are in good agreement with $2\,600 \text{ mg Zn kg}^{-1}$

reported in the fungal mantle of *Suillus luteus* ectomycorrhizae from metal-polluted site (Turnau et al. 2001). These results suggest active role of ectomycorrhizal fungi in soil-fungal-plant interactions and indicate a high element accumulation capacity of ectomycorrhizal mycelia.



Figure 2. Fruit-body (left) and ectomycorrhizae (right) of *Amanita muscaria*. Foto: Jaroslava Cejpková

5. DISTRIBUTION OF RADIOCAESIUM ACTIVITY IN *BOLETUS BADIUS*

In 2011, Czech media have published deceptive reports² that the cap skin of *Boletus badius* is highly radioactive and should be peeled before consumption. Fungi are able to accumulate radiocaesium and radioactivity of mushrooms in our country was thoroughly investigated in the past (Řanda et al. 1987, 1988a-b, 1989; Horyna et Řanda 1988). It was found that the strongest accumulators of radiocaesium are ectomycorrhizal species like *Laccaria amethystina*, *Paxillus involutus*, and *Boletus badius*. However, common consumption of mushrooms should not represent a health risk (Řanda et al. 1988b). In our work (Borovička et al. 2012) we tried to disprove the misleading recent reports and analysed distribution of radiocaesium in 10 fruit-bodies of *Boletus badius* (cap skin, cap flesh, hymenium, and stipe). The highest activity of radiocaesium was found in the cap flesh and the lowest in the stipe. The measured activity was about 10 times lower than that reported in the 1980's. The detected values do not exceed public health limits (regulation number 307/2002 Sb.) and, therefore, there is no need to worry.

² <http://www.hoax.cz/hoax/radioaktivni-houby/> [1. 10. 2015]

http://hobby.idnes.cz/jiri-baier-myty-o-houbach-0xw-/houby.aspx?c=A120808_163946_houby_mce [1. 10. 2015]

<http://prehravac.rozhlas.cz/audio/2459460> [1. 10. 2015]

6. CONCLUSIONS

- Fungi play important roles in biogeochemical cycling of a number of elements, contribute to weathering processes in soils and they are important symbionts of vascular plants.
- Recent studies have indicated an active role of fungi in biogeochemical cycling of U. However, the data obtained in our field study does not indicate major role of macrofungi in the biochemical fate of U. Fungi from U-polluted area contained higher uranium levels than those from pristine sites but, on the other hand, U was accumulated neither in ectomycorrhizae nor in fine roots.
- It was shown in *Agaricus bernardii*, that saprotrophic fungi may colonize rather deep soil horizons and may reach even the depth of 30 cm.
- We have determined concentrations of a number of elements in ectomycorrhizal roots; results for a number of them (Ag, As, Cl, Co, Rb, Se, Sb, Th, U, and V) have not yet been published before to our knowledge.
- Despite the fact that we have obtained many pieces of original information on interactions of fungi and trace elements, many unanswered questions still remain. For example, it is not clear whether the elements taken up by ectomycorrhizae accumulate in the fungal or plant biomass. To solve this problem, application of micro PIXE analysis would allow accurate mapping of element distribution within the tissues.

7. REFERENCES

- Adriaensen K., Vangronsveld J., Colpaert J.V. (2006): Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 16 (8): 553-558.
- Antibus R.K., Sinsabaugh R.L. (1993): The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. *Mycorrhiza* 3: 137-144.
- Berthelsen B.O., Olsen R.A., Steinnes E. (1995): Ectomycorrhizal heavy metal accumulation as a contributing factor to heavy metal levels in organic surface soils. *The Science of the Total Environment* 170: 141-149.
- Borovička J., Kubrová J., Rohovec J., Řanda Z., Dunn C.E. (2011): Uranium, thorium and rare earth elements in macrofungi: what are genuine concentrations? *Biometals* 24: 837-845.
- Borovička J., Kubrová J., Řanda Z. (2012): K radioaktivitě hříbu hnědého. *Mykologický sborník* 89 (4): 92-98.
- Borovička J., Mihaljevič M., Gryndler M., Kubrová J., Žigová A., Hršelová H., Řanda Z. (2014): Lead isotopic signatures of saprotrophic macrofungi of various origins: Tracing for lead sources and possible applications in geomycology. *Applied Geochemistry* 43: 114-120.
- Cairney J.W.G. (2005): Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycological Research* 109 (1): 7-20.
- Campos J.A., Tejera N.A., Sánchez C.J. (2009): Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals* 22 (5): 835-841.

- Cejpková J., Gryndler M., Hršelová H., Kotrba P., Řanda Z., Synková I., Borovička J. (2016): Bioaccumulation of heavy metals, metalloids, and chlorine in ectomycorrhizae from smelter-polluted area. *Soli Biology & Biochemistry: Under Review* (January 2016)
- De la Varga H., Águeda B., Martínez-Peña F., Parladé J., Pera J. (2011): Quantification of extraradical soil mycelium and ectomycorrhizas of *Boletus edulis* in a Scots pine forest with variable sporocarp productivity. *Mycorrhiza* 22 (1): 59-68.
- Ettler V., Mihaljevič M., Komárek M. (2004): ICP-MS measurements of lead isotopic ratios in soils heavily contaminated by lead smelting: tracing the sources of pollution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2): 311–317.
- Ettler V., Mihaljevič M., Šebek O., Nechutný Z. (2007): Antimony availability in highly polluted soils and sediments – a comparison of single extractions. *Chemosphere* 68 (3): 455-463.
- Falandysz J., Szymczyk K., Ichihashi H., Bielawski L., Gucia M., Frankowska A., Yamasaki S.-I. (2001): ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible Wild mushrooms growing in Poland. *Food Additives and Contaminants* 18 (1): 503-513.
- Falandysz J., Borovička J. (2013): Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2): 477-501.
- Gadd G.M. (2004): Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18 (2): 60-70.
- Gadd G.M. (2007): Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111 (1): 3-49.
- Gadd G.M., Fomina M. (2011): Uranium and Fungi. *Geomicrobiology Journal* 28 (5-6): 471-482.
- Hortal S., Pera J., Parladé J. (2008): Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18 (2): 69-77.
- Horyna J., Řanda Z. (1988): Uptake of radiocesium and alkali metals by mushrooms. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 127 (2): 107-120.
- Jackson R.B., Canadell J., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Sala O.E., Schulze E.-D. (1996): A global analysis of root distributions for terrestrial biomes. *Oecologia* 108 (3): 389–411.
- Johanson K.J., Nikolova I., Tailor A.F.S., Vinichuk M.M. (2004): Uptake of elements by fungi in the Forsmark area. *Svensk Kärnbränslehantering AB*: 76 p.
- Kubrová J., Žigová A., Řanda Z., Rohovec J., Gryndler M., Krausová I., Dunn C.E., Kotrba P., Borovička J. (2014): On the possible role of macrofungi in the biogeochemical fate of uranium in polluted forest soils. *Journal of Hazardous Materials* 280: 79-88.
- Krupa P., Kozdrój J. (2004): Accumulation of heavy metals by ectomycorrhizal fungi colonizing birch trees growing in an industrial desert soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 427–430.
- Krupa P., Kozdrój J. (2007): Ectomycorrhizal Fungi and Associated Bacteria Provide Protection Against Heavy Metals in Inoculated Pine (*Pinus Sylvestris* L.) Seedlings. *Water Air Soil Pollution* 182: 83–90.
- Landeweert R., Hoffland E., Finlay R. D., Kuyper T. W., van Breemen N. (2001): Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16 (5): 248-254.
- Landeweert R., Veenman Ch., Kuyper T.W., Fritze H., Wernars K., Smit E. (2003): Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 45 (3): 283-292.

- Makkonen K., Helmisaari H.-S. (1998): Seasonal and yearly variations of fine-root biomass and necromass in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stand. *Forest Ecology and Management* 102 (2-3): 283-290.
- Robinson C.H., Szaro T.M., Izzo A.D., Anderson I.C., Parkin P.I., Bruns T.D. (2009): Spatial distribution of fungal communities in a coastal grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry* 41 (2): 414-416.
- Rosling A., Rosenstock N. (2008): Ectomycorrhizal fungi in mineral soil. *Mineralogical Magazine* 72 (1): 127-130.
- Rosling A., Landeweert R., Lindahl B.D., Larsson K.-H., Kuyper T.W., Taylor A.F.S., Finlay R.D. (2003): Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159 (3): 775-783.
- Řanda Z., Benada J., Horyna J., Kobera P., Klán J. (1987): Radiocesium v houbách v letech 1971-1986 v ČSR. *Jaderná energie* 33 (11): 429-430.
- Řanda Z., Benada J., Singer M., Horyna J. (1988a): Jsou houby radioaktivní? *Mykologický sborník* 65 (1): 6-9.
- Řanda Z., Benada J., Singer M., Horyna J. (1988b): Jsou houby radioaktivní? (pokračování) *Mykologický sborník* 65 (2): 36-40.
- Řanda Z., Benada J., Horyna J., Singer J. (1989): Radioaktivita hub v ČSR v roce 1988. *Mykologický sborník* 66 (4): 119-123.
- Řanda Z., Soukal L., Mizera J. (2005): Possibilities of short term thermal and epithermal neutron activation for analysis of macromycetes (mushrooms). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 264 (1): 67-76.
- Shantz H.L., Piemeisel R.L. (1917): Fungus fairy rings in Eastern Colorado and their effect on vegetation. *Journal of Agricultural Research* 11 (5): 191-245.
- Schützendübel A., Polle A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1351-1365.
- Turnau K., Przybyłowicz W.J., Mesjasz-Przybyłowicz J. (2001): Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas – as revealed by micro-PIXE analysis. *Nuclear Instrumental and Methods in Physics Research Section B: Beam Interaction with Materials and Atoms* 181: 649-658.
- Zeppa S., Vallorani L., Potenza L., Bernardini F., Pieretti B., Guescini M., Giomaro G., Stocchi V. (2000): Estimation of fungal biomass and transcript levels in *Tillia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Letters* 188: 119-124.

Vyhláška č. 307/2002 Sb., Státního úřadu pro jadernou bezpečnost ze dne 13.června 2002 o radiační ochraně. [cit. 18. 8. 2015]. Dostupné z <https://portal.gov.cz/app/zakony/zakon.jsp?page=0&nr=307~2F2002&rpp=15#seznam>

CURRICULUM VITAE

Jaroslava Cejpková

*29. 4. 1987, Prague

Maiden name: Kubrová

2006-2009: Environmental Protection, Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, (Bachelor's dissertation - Practical conservation of fungi in the Czech Republic), "Bc. = BSc." 9/2009

2009-2011: Environmental Protection, Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, (Master's thesis – Uranium content of macrofungi), "Mgr. = MSc." 9/2011

2011-present: Applied Geology; Institute of Geochemistry, Mineralogy and Mineral Resources; Charles University; Faculty of Science, Charles University, Doctoral study programme

SELECTED PUBLICATIONS

Journal indexed by Thomson Scientific (WOS), with Impact Factor

Borovička J., **Kubrová J.**, Rohovec J., Řanda Z., Dunn C. E. (2011): Uranium, thorium and rare earth elements in macrofungi: what are genuine concentrations? *Biometals* 24: 837-845.

TC: 10. Mleczek et al. (2016) in *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 33 (1): 86-94.

Falandysz et al. (2015) in *J. Environ. Sci. Heal. A.* 50 (9): 941-945.

Migaszewski Z., Galuzska A. (2015) in *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 45 (5): 429-471.

Kubrová et al. (2014) in *J. Hazard. Mat.* 280: 79-88.

Guillen J. et Baeza A. (2014) in *Food Chem.* 154: 14-25.

Hu S. et al. (2014) in *Anal. Lett.* 47 (8): 1400-1408.

Borovička et al. (2014) *Appl. Geochem.* 43: 114-120.

El-Taher A. et Alharbi A. (2013) in *Appl. Radiat. Isotopes* 82: 67-71.

Falandysz J. et Borovička J. (2013) in *Appl. Microbiol. Biot.* 79 (2): 477-501.

Guillén J. et al. (2012) in *Appl. Radiat. Isotopes* 70 (4): 650-655.

Borovička J., Mihaljevič M., Gryndler M., **Kubrová J.**, Žigová A., Hršelová H., Řanda Z. (2014): Lead isotopic signatures of saprotrophic macrofungi of various origins: Tracing for lead sources and possible applications in geomycology. *Applied Geochemistry* 43: 114-120.

TC: 2. Ďurišová J. et al. (2015) in *Geostand. Geoanal. Res.* 39 (2): 209-220.

Kubrová J. et al. (2014) in *J. Hazard. Mat.* 280: 79-88.

Kubrová J., Žigová A., Řanda Z., Rohovec J., Gryndler M., Krausová I., Dunn C. E., Kotrba P., Borovička J. (2014): On the possible role of macrofungi in the biogeochemical fate of uranium in polluted forest soils. *Journal of Hazardous Materials* 280: 79-88.

- TC: 1. Falandysz J. (2016) in *Environ. Sci. Pollut. Res.*, doi 10.1007/s11356-015-5971-8

Manuscript

Cejpková J., Gryndler M., Hršelová H., Kotrba P., Řanda Z., Synková I., Borovička J., Bioaccumulation of heavy metals, metalloids, and chlorine in ectomycorrhizae from smelter-polluted area. *Soli Biology & Biochemistry: Under Review* (January 2016)

Conference Abstracts (no Impact Factor)

Kubrová J., Borovička J. (2012): Vliv těžby uranových rud na obsahy uranu v plodnicích hub. In: Dziková L., Šimíček D., Kumpan T. [eds.] – Studentská geologická konference 2012, sborník abstraktů, Brno, 24. - 25. 5. 2012, Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav geologických věd, ISBN 978-80-210-5856-9, 32 p.

Kubrová J., Borovička J. (2013): Trace elements in ectomycorrhizae: their determination by INAA. In: Drápalová R., Knížek M., Švecová K., Žaludková K. [eds.] – 4th International Students Geological Conference, Conference Proceedings, Brno, 19. - 21. 4. 2013, Masaryk University, Department of Geological Sciences, ISBN 978-80-210-6206-1, 91 p.

Kubrová J., Borovička J. (2013): Stopové prvky v plodnicích velkých hub a ektomykorhizách. In: Harabiš F., Solský M. [eds.] – Kostelecké inspirování 2013, sborník abstraktů, Kostelec n./Černými Lesy 21. - 22. 11. 2013, Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra ekologie, Fakulta životního prostředí, ISBN 978-80-213-2415-2, 34 p.

Kubrová J., Borovička J. (2014): Do macrofungi accumulate uranium? In: Merkel B. J., Arab A. [eds.] – Uranium - Past and Future Challenges, Proceedings of the 7th International Conference on Uranium Mining and Hydrogeology, Institute for Geology TU Bergakademie Freiberg, Germany, ISBN 978-3-319-11058-5, 369-376 p.

Workshop Abstract (no Impact Factor)

Kubrová J., Borovička J. (2015): Využití INAA ke stanovení stopových prvků v ektomykorhizách. In: Mizera J. [ed.] – Přednášky semináře Radioanalytické metody IAA 14, 25. 6. 2014, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, ISBN 978-80-905704-4-3, 17-20 p.

Other publications

Kubrová J. (2012): Houby nejsou “na houby” aneb Proč a jak chránit houby. *Mykologický sborník* 89: 48-50.

Borovička J., **Kubrová J.**, Mikšík M. (2012): Nové nálezy muchomůrky Vittadiniho – *Amanita Vittadini* v České republice. *Mykologický sborník* 89: 87-92.

Borovička J., **Kubrová J.**, Řanda Z. (2012): K radioaktivitě hříbu hnědého. *Mykologický sborník* 89: 92-98.

Kubrová J. (2013): Mykologicky významná chráněná území v České republice. *Mykologický sborník* 90: 1-4.

Kubrová J. (2014): Mykorhizní houby a jejich funkce v přírodě (přehledný článek). *Mykologický sborník* 91: 90-96.