

УДК 581.557

## ИЗОТОПНАЯ СПЕЦИФИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА GENTIANACEAE ВЫСОКОГОРИЙ ГОЛАРКТИКИ

© 2025 г. В. Г. Онипченко<sup>a, b, c, \*</sup>, Н. Г. Лавренов<sup>a</sup>, Чень Ван<sup>d</sup>, Янь У<sup>d</sup>, А. В. Тиунов<sup>e</sup>,  
А. А. Клюкина<sup>f</sup>, С. М. Цуриков<sup>e</sup>, М. Ю. Ганин<sup>g</sup>, А. А. Ахметжанова<sup>a</sup>,  
Ю. В. Софронов<sup>a</sup>, Т. Г. Елумеева<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия*

*119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

<sup>b</sup> *Тебердинский национальный парк, Россия*

*369210 КЧР, Теберда, Бадукский пер., д. 1*

<sup>c</sup> *Карачаево-Черкесский государственный университет им. У. Д. Алиева,*

*Россия 369202 Карачаевск, ул. Ленина, д. 29*

<sup>d</sup> *Институт биологии г. Чэнду Китайской академии наук,*

*КНР 610041 Чэнду, Жэньминьняньлу, 9*

<sup>e</sup> *Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,*

*Россия 119071 Москва, Ленинский просп., д. 33*

<sup>f</sup> *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,*

*Россия 117312 Москва, просп. 60-летия октября, 7/2*

<sup>g</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение “Всероссийский государственный центр качества  
и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов” ВГНКИ,*

*Россия 123022 Москва, Звенигородское шоссе, д. 5*

*\*e-mail: vonipchenko@mail.ru*

Поступила в редакцию 28.12.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2025 г.

Частичная микогетеротрофия (миксотрофия, получение органических веществ из микоризных грибов) широко распространена у микоризных цветковых растений. Мы предположили, что альпийские представители семейства Gentianaceae (горечавковые), имеющие в своем составе полностью микогетеротрофные виды с арбускулярной микоризой, могут в значительной мере быть миксотрофами. Изучен изотопный ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$ ) и элементный (С и N) состав листьев и корней 13 пар видов высокогорных растений (виды Gentianaceae и произрастающие рядом референсные растения – двудольные с арбускулярной микоризой) трех горных систем Голарктики (Альпы, Кавказ и Тибет). Вопреки нашей гипотезе, органическое вещество листьев и корней горечавковых не было обогащено дейтерием ( $^2\text{H}$ ) по сравнению с референсными растениями, что указывает на отсутствие или низкую значимость микогетеротрофии у изученных видов. Листья и корни горечавковых имели более высокие значения  $\delta^{15}\text{N}$  и  $\delta^{18}\text{O}$ , но более низкие  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^2\text{H}$  по сравнению с листьями и корнями референсных растений. Листья и корни горечавковых содержали больше С, однако содержание N в листьях было больше, а в корнях меньше, чем в соответствующих органах референсных растений. Мы предположили, что такие результаты могут быть объяснены более интенсивной азотфиксацией прокариот листового микробиома, обеспечивающей лучшее азотное питание листьев и их более интенсивный фотосинтез и транспирацию.

**Ключевые слова:** альпийские сообщества, изотопный состав, содержание азота, содержание углерода, семейство Gentianaceae

**DOI:** 10.31857/S0367059725020026 **EDN:** TZPHTM

Семейство Gentianaceae насчитывает около 1850 видов и широко распространено на всех континентах, кроме Антарктиды, его представители тяготеют к высокогорным областям [1]. Семейство включает 25 полностью микогетеротрофных видов четырех родов (*Voyria*, *Voyriella*, *Exacum* и *Exochaenium*) [2, 3]. Поэтому предполагалось, что и другие представители этого семейства могут быть частично микогетеротрофны (миксотрофны), что было показано для ряда видов с применением изотопного анализа: *Bartonia virginica* и *Obolaria virginica* [4], возможно также для *Curtia tenuifolia* и *Neurotheca* [5, 6], *Pterygocalyx volubilis* [7]. Однако анализ изотопного состава углерода и азота листьев 9 видов высокогорных горечавковых Тибета и Кавказа показал повышенное содержание в них  $^{15}\text{N}$ , но не  $^{13}\text{C}$ , по сравнению с рядом растущими референсными растениями из других семейств двудольных [8]. Поэтому специфические особенности изотопного состава горечавковых и механизмов его формирования остаются неясными. Арбускулярная микориза горечавковых имеет свои особенности [9, 10]. Она относится к *Paris*-типу: грибные гифы распространяются от клетки к клетке, а не по межклетникам, зеленые растения факультативно симбиотрофны, т.е. могут развиваться без грибов. Для многих растений с этим типом микоризы известна частичная микогетеротрофия [11], в частности для однолетника *Gentiana zollingeri* в Японии показана начальная микогетеротрофия – развитие подземных структур при питании симбиотическим грибом в течение нескольких месяцев до появления зеленых генеративных надземных побегов [12, 13].

Важным индикатором (частичной) микогетеротрофии растений с арбускулярной микоризой (АМ) выступает содержание в органическом веществе растений дейтерия ( $^2\text{H}$ ) – стабильного тяжелого изотопа водорода [14]. Изучение 13 видов полностью микогетеротрофных растений с АМ показало обогащение  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^2\text{H}$ , но не  $^{18}\text{O}$ , органического вещества листьев по сравнению с соседними автотрофными растениями [14]. В нашей предшествующей работе [8] мы поставили две задачи для дальнейшего изучения специфики изотопного состава растений семейства Gentianaceae: 1) определить изотопный состав углерода и азота не только в листьях, но и в корнях растений в связи с возможными процессами фракционирования изотопов углерода и азота при транспорте между корнями и побегами; 2) оценить содержание дейтерия ( $^2\text{H}$ ) в горечавках для проверки гипотезы о частичной микогетеротрофии этих растений [8]. Решению этих задач и посвящена настоящая работа, в которой проведен анализ изотопного

и элементного состава 13 видов высокогорных представителей Gentianaceae из трех горных регионов (Кавказ, Альпы и Тибет).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Объекты и районы исследований.** Листья и корни высокогорных представителей семейства Gentianaceae были собраны в альпийских сообществах Южного Тироля (Италия), Северного Кавказа (Карачаево-Черкесская Республика, Россия) и Восточного Тибета (Сычуань, Китай) (табл. 1). Всего было собрано 13 видов, каждый вид горечавковых (G-растение) проанализирован в 5-кратной повторности в паре с обитающим совместно (расстояние не более 1 м) референсным видом травянистых растений (R-растение). Референсные растения выбирали на основании совместного обитания в точках отбора образцов с изучаемым видом горечавковых растений, принадлежности к собственно двудольным растениям и к таксонам, образующим арбускулярную микоризу, также характерную и для горечавковых.

Перед анализом все образцы листьев и корней растений были высушены в сушильном шкафу при температуре  $55\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 72 ч и размолоты на шаровой мельнице Retsch MM200 (Retsch GmbH, Германия). Взвешивание проводили на весах Mettler Toledo MX5 с точностью до 2 мкг. Для анализа изотопного состава углерода и азота образцы массой 1000–1200 мкг заворачивали в оловянные капсулы. Анализ проводили с помощью изотопного масс-спектрометра в центре коллективного пользования ИПЭЭ РАН (г. Москва) на комплексе, состоящем из изотопного масс-спектрометра Delta V Plus и элементного анализатора Flash EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, USA). Изотопный состав азота и углерода выражали в тысячных долях ( $\delta$ , ‰) отклонения от международного стандарта ( $\text{N}_2$  атмосферы и  $\text{vPDB}$ ) по формуле:  $\delta^{13}\text{C}$  или  $\delta^{15}\text{N} = (R_{\text{образец}}/R_{\text{стандарт}} - 1) \times 1000$ , где  $R$  – отношение изотопов  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  или  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Аналитическая погрешность ( $SD$ ,  $n = 8$ ) определения изотопного состава не превышала 0.2‰. Одновременно во всех пробах было измерено массовое содержание углерода и азота (%N, %C).

Содержание  $^2\text{H}$  и  $^{18}\text{O}$  измеряли только для растений Альп и Кавказа. Для анализа был использован масс-спектрометр DELTA V Advantage в комбинации с элементным анализатором Flash HT (Thermo Fisher Scientific, США). Пробы массой около 300 мкг были завернуты в серебряные капсулы. Референтные материалы или лабораторные стандарты анализировали до и после каждой серии, а также

Таблица 1. Список изученных видов горечавковых и референсных видов и места их сборов

№ вида	Сем. Gentianaceae	Референсный вид	Место сборов
1	<i>Gentiana acaulis</i> L.	<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch.	Альпы, Южный Тироль, альпийские луга: 46.4–46.7° с.ш., 11.3–11.8° в.д., 1790–2300 м над ур.м.
2	<i>Gentianella germanica</i> (Willd.) Börner	<i>Campanula scheuchzeri</i> Vill.	
3	<i>Gentiana verna</i> L.	<i>Campanula scheuchzeri</i> Vill.	
4	<i>Gentiana nivalis</i> L.	<i>Campanula scheuchzeri</i> Vill.	
5	<i>Lomatogonium carinthiacum</i> (Wulfen) A. Braun	<i>Campanula scheuchzeri</i> Vill.	
6	<i>Gentianella campestris</i> (L.) Börner	<i>Campanula scheuchzeri</i> Vill.	
7	<i>Gentiana cruciata</i> L.	<i>Plantago media</i> L.	
8	<i>Gentianella caucasea</i> (Lodd. ex Sims) Holub	<i>Leontodon hispidus</i> L.	Кавказ, Карачаево-Черкесская Республика, близ аула Уччулан, сухие луга: 43.3° с.ш., 42.0–42.3° в.д., 1800–2050 м над ур.м.
9	<i>Gentianopsis paludosa</i> (Hook. f.) Ma	<i>Cremanthodium lineare</i> Maxim.	Восточный Тибет, Китай, Sichuan, Axi township, Zoige, влажный луг: 33.7° с.ш., 103.0° в.д., 3480 м над ур.м.
10	<i>Gentiana straminea</i> Maxim.	<i>Saussurea tatsienensis</i> Franch.	
11	<i>Gentiana dolichocalyx</i> T.N. Ho	<i>Leontopodium wilsonii</i> Beauv.	
12	<i>Gentiana syringea</i> T.N. Ho	<i>Saussurea semilyrata</i> Bureau et Franch.	
13	<i>Halenia elliptica</i> D. Don	<i>Pedicularis plicata</i> Maxim.	

после каждых пяти исследуемых проб. Изотопный состав водорода и кислорода ( $\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$ ) выражали в тысячных долях отклонения от международного стандарта (VSMOW). Аналитическая погрешность ( $SD$ ,  $n = 6$ ) определения изотопного состава в стандартных материалах не превышала 2‰.

**Статистический анализ.** Чтобы оценить влияние принадлежности к семейству Gentianaceae (G- или R-растение) и органа (листья или корни) на элементный и изотопный состав растений, был проведен двухфакторный дисперсионный анализ с учетом взаимодействия между факторами. Так как в парах G- и R-растений возможна изменчивость, связанная с принадлежностью к конкретному виду и особенностями условий произрастания данной пары видов, то использовали дисперсионный анализ с иерархической структурой (nested ANOVA), где в качестве источника случайной ошибки указывали номер пары G- и R-растений. Содержание углерода, азота,  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  анализировали у всех 13 пар видов, а  $\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$  – только у 4 пар, где из-за меньшего объема образцов референсного вида *Campanula scheuchzeri* пары видов с его участием (см. табл. 1, № 2–6) были объединены. Анализ данных проведен в статистической среде R [15].

Чтобы оценить, в каком направлении и насколько согласованно изменяются изученные признаки в отдельных парах G- и R-растений, были использованы подходы метаанализа: расчет средней разности (Mean Difference, величина эффекта), оценка значимости методом обратной дисперсии, модель

случайных эффектов [16]. Значимыми считали величины эффекта, 95%-ный доверительный интервал которых не включал ноль. Расчеты проведены в пакете “meta” [17].

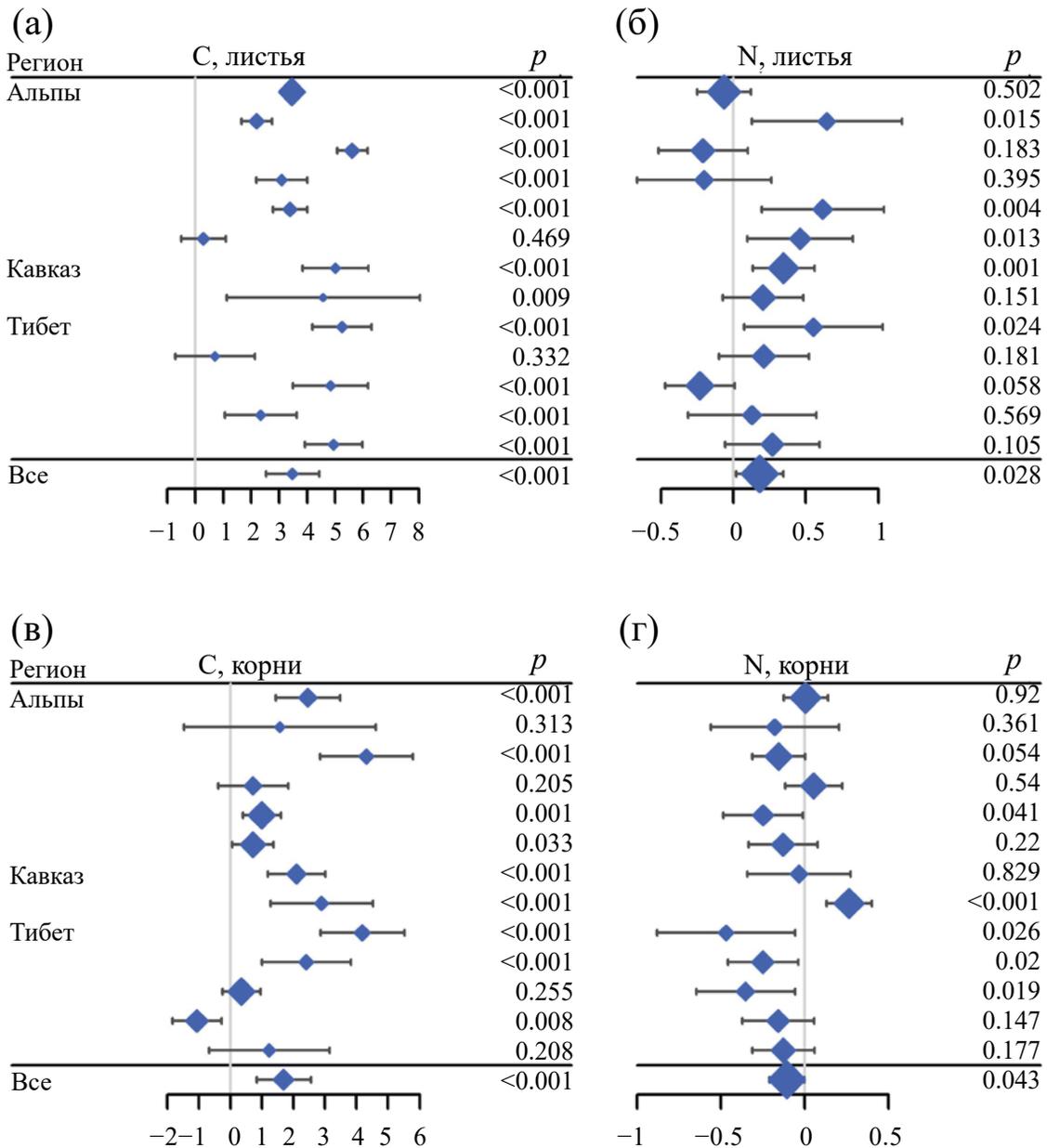
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Углерод.** На содержание углерода значимо влияла принадлежность к группе (G- или R-растение), а между корнями и листьями в целом различий не было (табл. 2, 3). По этому показателю G-растения значимо превосходили R-растения во всех изученных регионах как для листьев ( $46.8 \pm 0.2\%$  и  $43.3 \pm 0.2\%$  соответственно), так и для корней ( $45.8 \pm 0.2\%$  и  $44.0 \pm 0.2\%$  соответственно) (рис. 1): у G-растений листья содержали больше C, чем корни, а у R-растений – наоборот. По содержанию  $^{13}\text{C}$  наблюдалась обратная картина: оно было выше у R-растений как в корнях, так и в листьях (рис. 2), но листья содержали значимо меньше  $^{13}\text{C}$  в сравнении с корнями.

**Азот.** Листья всех растений содержали больше азота, чем корни. В целом не отмечено значимых различий по содержанию N между G- и R-растениями, но отмечено значимое взаимодействие между факторами ( $p < 0.001$ , табл. 2), показывающее, что у G-растений в листьях азота больше, а в корнях меньше, чем у R-растений (см. рис. 1). Величина  $\delta^{15}\text{N}$  и в корнях, и в листьях значимо выше у G-растений по сравнению с R-растениями (см. рис. 2). Интересно также отметить, что разница в содержании  $^{15}\text{N}$  между

**Таблица 2.** Содержание углерода и азота (%), а также изотопный состав углерода, азота, водорода и кислорода (‰) в листьях и корнях горечавковых и референсных видов растений ( $n = 64$  – для C,  $\delta^{13}\text{C}$ , N,  $\delta^{15}\text{N}$ ;  $n = 29$ –40 – для  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ; G/R – принадлежность к группе горечавковых (G) или референсных (R) растений)

Орган	G/R	Среднее $\pm$ ошибка					
		C	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
Листья	G	46.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1	-28.9 $\pm$ 0.2	-1.8 $\pm$ 0.3	-112.2 $\pm$ 1.5	21.5 $\pm$ 0.3
Листья	R	43.3 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	-28.1 $\pm$ 0.2	-3.2 $\pm$ 0.3	-105.8 $\pm$ 1.5	20.8 $\pm$ 0.2
Корни	G	45.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	-28.4 $\pm$ 0.2	-1.9 $\pm$ 0.3	-100.5 $\pm$ 2.0	20.3 $\pm$ 0.1
Корни	R	44.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.13	-27.5 $\pm$ 0.2	-2.7 $\pm$ 0.3	-88.6 $\pm$ 1.9	19.8 $\pm$ 0.2



**Рис. 1.** Средняя разность между G- и R-растениями по содержанию углерода C и азота N в листьях и корнях (результаты метаанализа). Здесь и на рис. 2 и 3:  $p$  – уровень значимости по методу обратной дисперсии для отдельных пар видов и по модели случайных эффектов для всех пар (Все); порядок видов сверху вниз соответствует порядку видов в табл. 1; размер символов пропорционален величине обратной дисперсии, усы показывают 95%-ный доверительный интервал, а положительная разность показывает, что величина признака у растения из группы G больше, чем у растения из группы R.

корнями и листьями незначима у G-растений ( $-0.08 \pm 0.15\text{‰}$ ), но значимо отличается от 0 для R-растений ( $0.47 \pm 0.17\text{‰}$ ), а также различается между этими двумя группами растений (по *t*-критерию  $p = 0.022$  при  $n = 128$ ).

**$\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$ .** Изотопный состав водорода и кислорода определен только в образцах из Альп и Кавказа. По содержанию дейтерия ( $^2\text{H}$ ) корни значимо превышали листья, а у G-растений были меньшие величины  $\delta^2\text{H}$ , чем у R-растений ( $-109.1 \pm 1.1\text{‰}$  и  $-94.2 \pm 1.6\text{‰}$  соответственно для G- и R-растений) (см. табл. 1 и рис. 3). Напротив, листья в обеих группах содержали несколько больше  $^{18}\text{O}$ , причем G-растения содержали значимо больше  $^{18}\text{O}$ , чем R-растения ( $\delta^{18}\text{O}$   $21.2 \pm 0.2$  и  $20.1 \pm 0.1$  соответственно,  $p < 0.0001$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

**Углерод.** Содержание углерода в сухом веществе в корнях горечавковых было ниже, а в листьях выше, чем у референсных R-растений. Полученные нами величины немного превышают среднемировые данные по травянистым растениям: корни  $-42.5 \pm 5.1\%$  C, листья  $-44.7\% \pm 3.5\%$  C [18]. Альпийские растения развиваются при более низких температурах, чем низкогорные, поэтому наши данные не подтверждают тенденции снижения содержания углерода в условиях более низких температур [18]. Содержание углерода определяется структурой клеток и их оболочек, наличием запасных веществ и другими свойствами,

оно положительно связано с количеством лигнина в тканях и энергосодержанием растительной биомассы, т.е. с содержанием его менее окисленных форм. Относительно обогащены углеродом белки и многие вторичные метаболиты (например, гентиопикросит содержит около 54% C), количество которых в листьях горечавок может быть выше (судя по повышенному проценту азота), чем у R-растений. Это может служить вероятным объяснением повышенного содержания углерода в листьях горечавок в сравнении с другими растениями.

В пределах одного типа фотосинтеза количество изотопа  $^{13}\text{C}$  зависит от многих факторов, в том числе от гетеротрофии (обычно приводит к повышению содержания  $^{13}\text{C}$ ) и характера водного режима, когда при недостатке влаги и большем закрытии устьиц возрастает содержание  $^{13}\text{C}$  [19, 20]. Листья растений обычно обеднены  $^{13}\text{C}$  по сравнению с другими органами [21], что подтверждается и нашими данными. Как листья, так и корни горечавковых значимо обеднены  $^{13}\text{C}$  по сравнению с R-растениями. Причины этого не совсем понятны, но мы можем предположить, что лучшее развитие корневой системы и специфическая микоризация G-растений приводят к относительно лучшему обеспечению водой и меньшему водному стрессу [22, 23].

**Азот.** Нами получен интересный результат по общему содержанию азота: оно выше в листьях, но ниже в корнях у G-растений по сравнению

**Таблица 3.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа с условием взаимодействия между факторами и иерархической структурой (G/R – принадлежность к группе горечавковых (G) или референсных (R) растений; \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ )

Признак	Фактор	df	F	p
%C	Группа G/R	1	226.377	<0.001***
	Орган лист/корень	1	0.486	0.486
	Группа: Орган	1	24.688	<0.001***
%N	Группа G/R	1	0.826	0.364
	Орган лист/корень	1	628.225	<0.001***
	Группа: Орган	1	17.676	<0.001***
$\delta^{13}\text{C}$	Группа G/R	1	43.089	<0.001***
	Орган лист/корень	1	19.204	<0.001***
	Группа: Орган	1	0.039	0.843
$\delta^{15}\text{N}$	Группа G/R	1	39.635	<0.001***
	Орган лист/корень	1	1.316	0.252
	Группа: Орган	1	2.721	0.100
$\delta^2\text{H}$	Группа G/R	1	110.21	<0.001***
	Орган лист/корень	1	48.89	<0.001***
	Группа: Орган	1	1.83	0.179
$\delta^{18}\text{O}$	Группа G/R	1	33.547	<0.001***
	Орган лист/корень	1	10.232	0.002**
	Группа: Орган	1	1.362	0.245

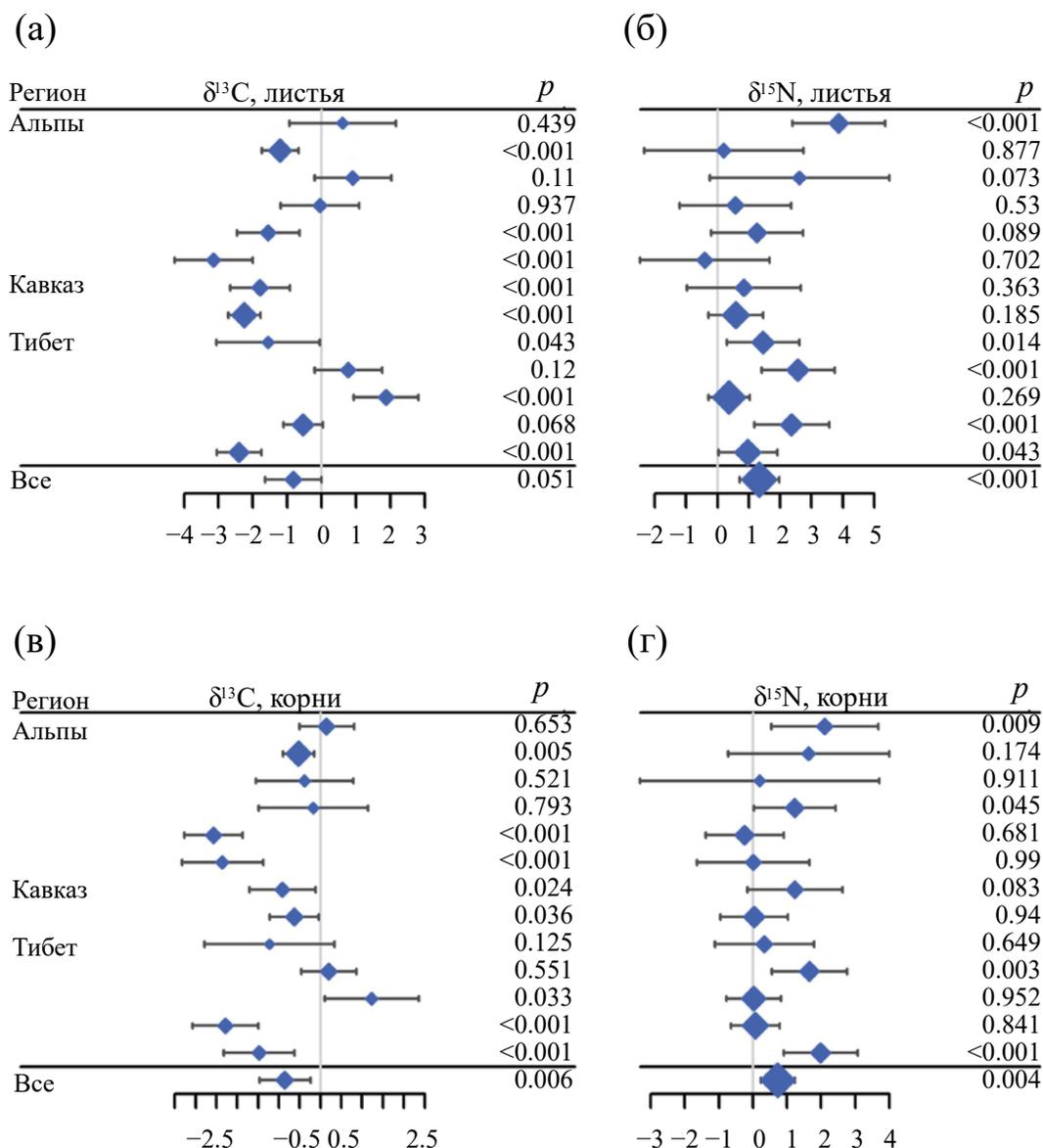


Рис. 2. Средняя разность между G- и R-растениями по величинам  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  в листьях и корнях (результаты метаанализа).

с R-видами, а содержание тяжелого изотопа  $^{15}\text{N}$  выше у G-растений и в корнях, и в листьях. Это подтверждает наши предыдущие данные по другим видам горечавковых [8]. Ранее одной из возможных причин обогащения горечавок  $^{15}\text{N}$  мы рассматривали их частичную микогетеротрофию, которая может сопровождаться повышением содержания  $^{15}\text{N}$  при отсутствии обогащения  $^{13}\text{C}$  [24, 25]. Как более надежный индикатор частичной микогетеротрофии рассматривается обогащение органического вещества дейтерием  $^2\text{H}$  [14]. Однако отсутствие обогащения  $^2\text{H}$  в нашем случае не подтвердило частичную микогетеротрофию изученных видов горечавковых. Поэтому необходимо искать

альтернативные причины обогащения листьев G-растений как общим азотом, так и  $^{15}\text{N}$ .

При транспорте соединений азота по ксилеме обычно наблюдается его фракционирование с относительным обеднением  $^{15}\text{N}$  в листьях по сравнению с корнями [26–28]. Такая типичная картина характерна для R-растений, у которых листья значимо обеднены  $^{15}\text{N}$  по сравнению с корнями. Однако для G-растений мы наблюдаем принципиально другую картину – листья и корни очень близки по содержанию  $^{15}\text{N}$ . Это наводит на мысль о том, что листья могут иметь в значительной степени независимый от корней источник азота – например

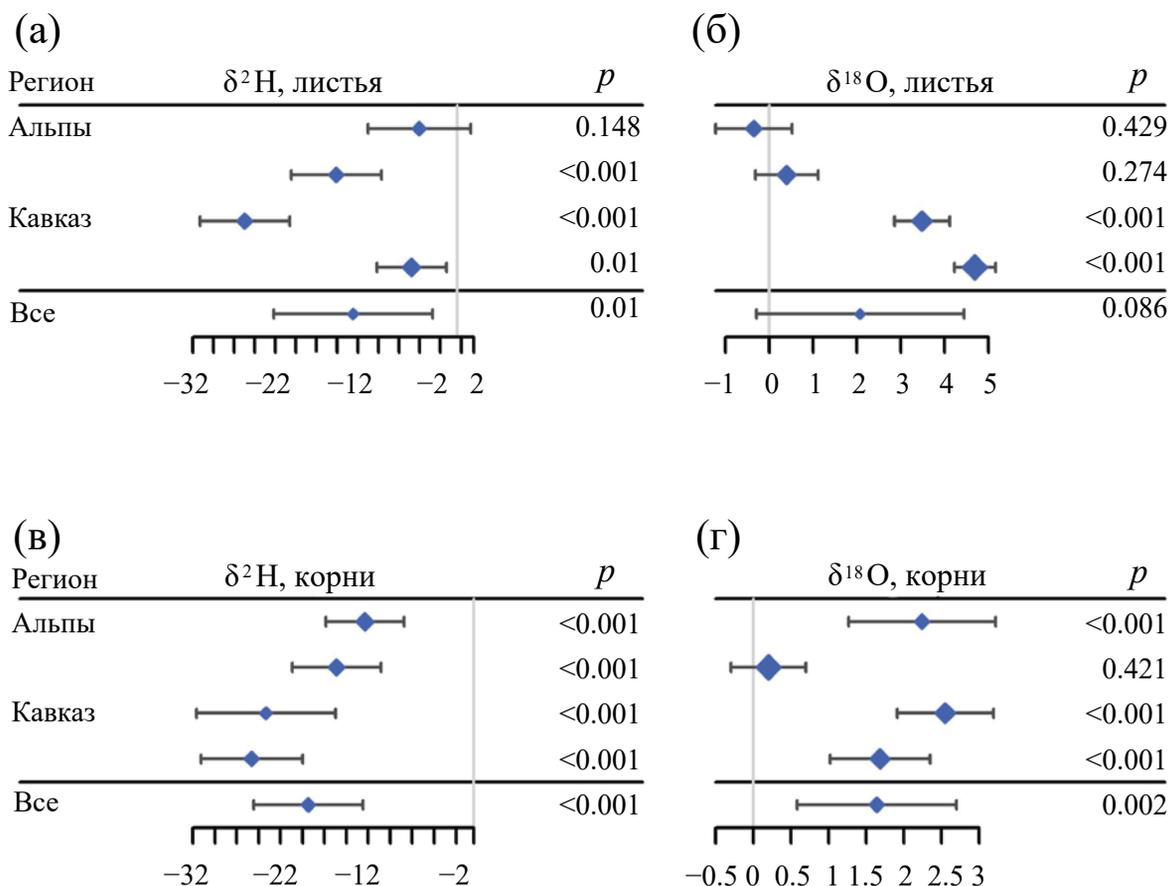


Рис. 3. Средняя разность между G- и R-растениями по величинам  $\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$  в листьях и корнях (результаты метаанализа). Пары с референсным видом *Campanula scheuchzeri* объединены в одну группу.

активная фиксация атмосферного азота эндофитными бактериями в листьях у горечавок.

Бактериальная азотфиксация в листьях отмечена у многих растений [29–31]. При детальном исследовании лекарственных видов *Gentiana* в Китае было показано доминирование среди бактериальных эндофитов Proteobacteria (60–93%), причем в листьях наиболее обильны были представители порядка Nurfhomicrobiales (*Methylobacterium-Methylorubrum*), в котором широко представлены азотфиксирующие таксоны [32, 33]. При изучении микробиомов листьев *Gentiana pyrenaica* (неопубликованные данные А.А. Ключиной) на Кавказе показана высокая встречаемость представителей Alphaproteobacteria (*Acidiphilum*, *Allorhizobium*, *Aureimonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*), Gammaproteobacteria (*Rhizobacter*, *Luteibacter*), а также Actinobacteriota (*Klenkia*, *Quadrisphaera*, *Nocardioides*, *Actynomycetospora*), потенциально способных фиксировать атмосферный азот. Эти данные согласуются с высказанным нами предположением об относительно более интенсивной азотфиксации листовых эндофитов

у горечавковых. Бактериальные эндофиты листьев стимулируют синтез многих вторичных метаболитов, в том числе азотсодержащих, выполняющих как защитные функции для растений, так и используемых человеком в медицине [34]. Безусловно, вопрос о роли эндофитных бактерий в азотном балансе растений нуждается в будущих детальном исследовании на более широком спектре видов.

**Водород и кислород.** Содержание дейтерия в G-растениях было ниже, чем в R-растениях, как в листьях, так и в корнях. Обратная картина наблюдалась для тяжелого изотопа кислорода  $^{18}\text{O}$ . Таким образом, наше изначальное предположение о существенной частичной микогетеротрофии не подтвердилось, поскольку ее чертой должно являться повышенное содержание  $^2\text{H}$  [14]. Более высокое содержание  $^{18}\text{O}$  в листьях горечавковых может быть обусловлено более интенсивной по сравнению с R-растениями транспирацией и фотосинтезом на фоне поступления в листья фиксированного на месте азота, что согласуется и с обеднением  $^{13}\text{C}$  в листьях (см. выше, [19, 20]).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследования растений семейства горечавковые в высокогорных экосистемах не выявили обогащения дейтерием и соответственно ощути-мую долю микогетеротрофии у изученных растений этого семейства, что не подтвердило исходную гипотезу о широком распространении миксотрофии у альпийских горечавок. Вместе с тем изученные представители горечавковых показали ряд отличий как в изотопном составе, так и в содержании С и N в листьях и корнях. Так, листья горечавковых содержат больше С и N, имеют более высокие величины  $\delta^{15}\text{N}$  и  $\delta^{18}\text{O}$ , но пониженные величины  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^2\text{H}$  по сравнению с листьями референсных растений других семейств двудольных растений. Корни горечавковых содержат больше С, но меньше N, чем корни референсных растений. Мы предполагаем, что такие результаты могут быть объяснены более интенсивной азотфиксацией прокариот листового микробиома, обеспечивающей лучшее азотное питание листьев и их более интенсивный фотосинтез и транспирацию. Это предположение нуждается в будущих деталь-ных исследованиях.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mabberley D.J.* Mabberley's plant-book. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge UP, 2017. 1102 p.
2. *Merckx V.S.F.T., Freudenstein J.V., Kissling J.* et al. Taxonomy and classification // *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi*. N.Y.: Springer, 2013. P. 19–101.
3. *Brada J.G.B., de Novais C.B., Diniz P.P.* et al. Association of mycoheterotrophic Gentianaceae with specific *Glomus* lineages // *Mycorrhiza*. 2023. V. 33. № 4. P. 249–256.
4. *Cameron D.D., Bolin J.F.* Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in the Gentianaceae: *Bartonia virginica* and *Obolaria virginica* as case studies // *Am. J. Bot.* 2010. V. 97. P. 1272–1277.
5. *Struwe L., Kadereit J.W., Klackenberg J.* et al. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification // *Gentianaceae – systematics and natural history*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. P. 21–301.
6. *Molina J., Struwe L.* Utility of secondary structure in phylogenetic reconstructions using nrDNA ITS sequences – an example from Potalieae (Gentianaceae: Asteridae) // *Systematic Bot.* 2009. V. 34. P. 414–428.
7. *Suetsugu K., Matsubayashi J., Ogawa N.O.* et al. Isotopic evidence of arbuscular mycorrhizal cheating in a grassland gentian species // *Oecologia*. 2020. V. 192. № 4. P. 929–937
8. *Онипченко В.Г., Лавренов Н.Г., Тиунов А.В.* и др. Миксотрофны ли альпийские растения из семейства Gentianaceae? // *Журн. общ. биол.* 2021. Т. 82. № 1. С. 57–67. [*Onipchenko V.G., Lavrenov N.G., Tiunov A.V.* et al. Are alpine Gentianaceae plants mixotrophic? // *Biol. Bull. Rev.* 2021. V. 11. № 5. P. 429–437.]
9. *Jacquelinet-Jeanmougin J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S.* Endomycorrhizas in the Gentianaceae. II. Ultrastructural aspects of symbiont relationships in *Gentiana lutea* // *Symbiosis*. 1987. V. 3. P. 269–286.
10. *Sýkorová Z.* The role of arbuscular mycorrhiza in the growth and development of plants in the family Gentianaceae // *The Gentianaceae. Vol.1: Characterization and ecology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. P. 303–316.
11. *Giesemann P.P., Rasmussen H.N., Liebel H.T.* et al. Descreet heterotrophs: green plants that receive fungal carbon through *Paris*-type arbuscular mycorrhizal // *New Phytologist*. 2020. V. 226. № 4. P. 960–966.
12. *Yamato M., Suzuki T., Matsumoto M.* et al. Mycoheterotrophic seedling growth of *Gentiana zollingeri*, a photosynthetic Gentianaceae plant species, in symbioses with arbuscular mycorrhizal fungi // *J. Plant Res.* 2021. V. 134. № 5. P. 921–931.
13. *Yamato M., Yagita M., Kusakabe R.* et al. Impact of mycoheterotrophy on growth of *Gentiana zollingeri* (Gentianaceae), as suggested by size variation, morphology, and  $^{13}\text{C}$  abundance of flowering shoots // *J. Plant Res.* 2023. V. 136. № 6. P. 853–863.
14. *Gomes S.I.F., Merckx V.S.F.T., Kehl J.* et al. Mycoheterotrophic plants living on arbuscular mycorrhizal fungi are generally enriched in  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$  isotopes // *J. Ecol.* 2020. V. 108. № 4. P. 1250–1261.
15. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. URL <https://www.R-project.org/>.
16. *Schwarzer G., Carpenter J.R., Rücker G.* Meta-analysis with R. Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2015. 252 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21416-0>

17. *Balduzzi S., Rucker G., Schwarzer G.* How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial // *Evidence-Based Mental Health*. 2019. V. 22. P. 153–160.
18. *Ma S., He F., Tian D.* et al. Variation and determinants of carbon content in plants: a global synthesis // *Biogeosciences*. 2018. V. 15. P. 693–702.
19. *Farquhar G.D., O'Leary M.H., Berry J.A.* On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves // *Austral. J. Plant Physiol.* 1982. V. 9. № 2. P. 121–137.
20. *Huck C., Körner C., Hiltbrunner E.* Plant species dominance shifts across erosion edge-meadow transects in the Swiss Alps // *Oecologia*. 2013. V. 171. № 3. P. 693–703.
21. *Ghashghaie J., Badeck F.W.* Opposite carbon isotope discrimination during dark respiration in leaves versus roots – review // *New Phytol.* 2014. V. 201. № 3. P. 751–769.
22. *Jayne B., Quigley M.* Influence of arbuscular mycorrhiza on growth and reproductive response of plants under water deficit: a meta-analysis // *Mycorrhiza*. 2014. V. 24. № 2. P. 109–119.
23. *Auge R.M., Toler H.D., Saxton A.M.* Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis // *Mycorrhiza*. 2015. V. 25. № 1. P. 13–24.
24. *Courty P.-E., Walder F., Boller T.* et al. Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis // *Plant Physiol.* 2010. V. 156. № 2. P. 952–961.
25. *Hynson N.A., Bidartondo M.I., Read D.J.* Are there geographical mosaics of mycorrhizal specificity and partial mycoheterotrophy? A case study in *Moneses uniflora* // *New Phytol.* 2015. V. 208. № 4. P. 1003–1007.
26. *Wanek W., Arndt S.K.* Difference in  $\delta^{15}\text{N}$  signature between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation to plant N // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. № 371. P. 1109–1118.
27. *Yoneyama T., Ito O., Engelaar W.M.H.G.* Uptake, metabolism and distribution of nitrogen in crop plants traced by enriched and natural  $^{15}\text{N}$ : Progress over the last 30 years // *Phytochemistry Rev.* 2003. V. 2. P. 121–132.
28. *Cui J., Lamade E., Fourel F.* et al.  $\delta^{15}\text{N}$  values in plants are determined by both nitrate assimilation and circulation // *New Phytol.* 2020. V. 226. № 6. P. 1696–1707.
29. *Hurek T., Handley L., Reinhold-Hurek B.* et al. Does *Azoarcus* sp. fix nitrogen with monocots? // *Biological nitrogen fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer, 1998. P. 407.
30. *Montañez A., Abreu C., Gill P.R.* et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution and identification of associated culturable diazotrophs // *Biol. Fertility Soils*. 2009. V. 45. № 3. P. 253–263.
31. *Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S.* et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 807–838.
32. *Hou Q., Chen D., Wang Y.-P.* et al. Analysis of endophyte diversity of *Gentiana officinalis* among different tissue types and ages and their association with four medicinal secondary metabolites // *Peer J*. 2022. V. 10. Art. e13949. P. 1–18.
33. *Hou Q., Chen D., Wang Y.-P.* et al. Analysis of endophyte diversity of two *Gentiana* plants species and the association with secondary metabolite // *BMC Microbiology*. 2022. V. 22. № 90. P. 1–10.
34. *Wu X., Yang Y., Zhang H.* Microbial fortification of pharmacological metabolites in medical plants // *Computational Structural Biotechnol. J.* 2023. V. 21. P. 5066–5072.

## ISOTOPE SPECIFICITY OF GENTIANACEAE SPECIES IN HOLARCTIC HIGH MOUNTAINS

V. G. Onipchenko<sup>a, b, c, \*</sup>, N. G. Lavrenov<sup>a</sup>, Qian Wang<sup>d</sup>, Yan Wu<sup>d</sup>, A. V. Tiunov<sup>e</sup>,  
A. A. Klyukina<sup>f</sup>, S. M. Tsurikov<sup>e</sup>, M. Yu. Ganin<sup>g</sup>, A. A. Akhmetzhanova<sup>a</sup>,  
Yu. V. Sofronov<sup>a</sup>, T. G. Elumeeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Moscow State University, Russia 119234 Moscow

<sup>b</sup>Teberdinsky National Park, Russia 369210 Teberda

<sup>c</sup>Karachay-Cherkess State University named after U.D. Aliyev, Russia 369202 Karachayevsk

<sup>d</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, China 610041 Chengdu

<sup>e</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Russia 119071 Moscow

<sup>f</sup>Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Russia 117312 Moscow

<sup>g</sup>Federal State Budgetary Institution «The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality»,  
Russia 123022 Moscow

\*e-mail: vonipchenko@mail.ru

**Abstract** – Partial mycoheterotrophy (mixotrophy, supply of organic substances through mycorrhizal fungi) is widely spread in mycorrhizal angiosperms. We suggested that alpine species of Gentianaceae, which includes fully mycoheterotrophic species with arbuscular mycorrhiza, can be mixotrophic to a large extent. We studied isotopic ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^2\text{H}$ , and  $\delta^{18}\text{O}$ ) and elemental (C and N) composition of leaves and roots for 13 pairs of alpine species (species of Gentianaceae and neighboring reference species – dycots with arbuscular mycorrhizas) in the three Holarctic mountain systems (the Alps, the Caucasus and Tibet). In contrary to our hypothesis, the organic matter of Gentianaceae leaves and roots was not enriched in  $^2\text{H}$  comparing with reference plants, which indicates the lack or low significance of mycoheterotrophy in the studies species. Leaves and roots of Gentianaceae had higher values of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , but lower values of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^2\text{H}$  comparing with leaves and roots of reference plants. Leaves and roots of Gentianaceae contained more C, but N content in the leaves of Gentianaceae was higher and in the roots lower, than in the corresponding organs of reference plants. We suggested, that such the results may be explained by more intensive nitrogen fixation of procariots in the leaf microbioms, which supply better leaf nitrogen nutrition and their more intensive photosynthesis and transpiration.

**Keywords:** alpine communities, isotope composition, nitrogen content, carbon content, Gentianaceae family