Юхненко М. Д.[1], *Андріанова Т. В.*[1,2],
Дражнікова А. В.[1], *Коновальчук В. К.*[3]
[1]Національний авіаційний університет, Київ
[2]Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ
[3]Національний університет біоресурсів і
природокористування України, Київ

Функціональний стан *Vaccinium vitis-idaea* на різних стадіях вегетації та її рівень мікоризації

Абстракт. Здійснено дослідження рослин *Vaccinium vitis-idaea*, зібраних на різних стадіях вегетації у Житомирській і Закарпатській областях України у 2021 році. Проведено оцінку якісного стану рослин брусниці на основі радіологічного аналізу, визначення вологості і кислотності екстрактів листя, вмісту танінів, якісного і кількісного вмісту аскорбінової кислоти і арбутину, ступеня мікоризації коренів. Встановлено, що як лікарська сировина, рослини у період першого плодоношення мають найбільший вміст аскорбінової кислоти (69,1 мг/100 г), а в період цвітіння — арбутину (7,2–8,1 %). Найвищий ступінь мікоризації коренів і розвитку в них гіф спостерігався у другий період плодоношення брусниці. У цей період зменшувався вміст вільних кислот, аскорбінової кислоти та арбутину у рослинах, вологість матеріалу.

Ключові слова: біологічно активні речовини; брусниця; арбутин; ерикоїдна мікориза; гриби; Україна.

Вступ. Біологічно активні речовини рослин є природним джерелом лікарських засобів. Порівняно із синтетичними препаратами природні біологічно активні речовини у терапевтичних дозах мають низьку токсичність, викликають менше побічних ефектів, а завдяки різноманітному складу компонентів багатосторонньо впливають на організм [1].

Види роду *Vaccinium* L. родини Ericaceae здавна використовують як харчові та лікарські рослини. Їх плоди багаті на різні біологічно активні речовини. Види *V. oxycoccos* L., *V. uliginosum* L. і *V. vitis-idaea* L. містять глюкозу і фруктозу, органічні кислоти (бензойну, винну, гліоксилову, лимонну, оцтову, піровиноградну, саліцилову, щавлеву, яблучну), які сприяють виведенню солей сечової кислоти. Наявні у плодах пектини можуть утворювати нерозчинні комплексні хелати з важкими металами, допомагаючи у їх виведенні з організму при лікуванні радіаційного впливу s регуляції функцій кишечника, та мають антибактеріальну дію.

До фенольних сполук, відомих у видів *Vaccinium*, належать антоціани, лейкоантоціани, катехіни, флавоноли і фенольні кислоти. Крім того, плоди насичені вітамінами С, В, Е, К1 і провітаміном А, а *V. uliginosum* містить нікотинову кислоту і її похідні, що зміцнюють кровоносні капіляри та мають протиалергійну дію. Відомо також, що всі частини рослин *V. vitis-idaea* продукують тритерпеноїди (олеїнову та урсолову кислоти), які мають аналогічний вплив до гормону надниркових залоз, а також значні кількості арбутину, дубильних речовин і бетаїну, який

проявляє антиатеросклеротичний, ліпотропний і противиразковий ефекти [2–4]. Як фенольний глікозид арбутин блокує фермент тирозиназу, що бере участь у синтезі меланіну, тому часто застосовується як природний освітлювач шкіри, а також як протизапальний засіб. Завдяки наявності біологічно активних речовин і можливості їх різноманітного застосування, дослідження видів Vaccinium як лікарської сировини, залишається актуальними.

Особливо перспективним є вивчення брусниці — *V. vitis-idaea*, коли вся рослина може використовуватись в якості джерела біологічно активних речовин, а препарати і косметичні продукти з цієї рослини досить нечисленні. В Україні брусниця зростає на південній межі свого ареалу на Поліссі і у Карпатах, зрідка — на півночі Лісостепу у хвойних та мішаних лісах. Найвища продуктивність брусниці спостерігається на 10 % масивів у межах ареалу виду, проте частина з них у Поліссі забруднена радіонуклідами [2]. Зміни кліматичних умов також впливають на скорочення площ зростання і якість матеріалу. Проте придатні для заготівлі рослин *V. vitis-idaea* ділянки і на сьогодні наявні на території Волинської, Закарпатської, Івано-Франківської, Львівської, Тернопільської, Чернівецької, та, частково, Рівненської областей [3].

Слід також згадати, що брусниця росте на природно кислих ґрунтах з оптимальним pH 4,0–5,5 і високим вмістом органічних речовин, достатньою кількістю вологи у ґрунті. Здатність рости на кислих ґрунтах обумовлена формуванням рослиною симбіотичних асоціацій з мікоризоутворюючими грибами. Рослини роду *Vaccinium* можуть мати від одного до кількох видів асоційованих мікоризних грибів, які належать до ерикоїдних мікориз [5–6]. Ерикоїдні мікоризи належать до ендомікориз, які характеризуються проникненням гіфів грибів у клітини кореня і утворює в них скупчення гіф у вигляді клубків. У цих взаємовідносинах беруть участь до 150 видів різних грибів. При мікоризації посилюється поглинання поживних речовин, рослини отримують від грибів додаткову воду і мінерали, що іноді важко засвоюються із ґрунту, а грибний організм натомість отримує органічні речовини [5–7].

Метою даної роботи було вивчення рослин брусниці *V. vitis-idaea* з українських природних місцезростань, зібраних на різних стадіях вегетації, та аналіз стану рослин, як джерел біологічно активних речовин.

Матеріали та методи дослідження. Проаналізовано зразки вегетативних частин рослин *Vaccinium vitis-idaea* з двох дослідних ділянок, розташованих у різних регіонах України. Перша ділянка знаходилась в Українських Карпатах — у Рахівському районі Закарпатської області, друга — на Поліссі, поблизу с. Поташня Радомишльського району Житомирської області. В якості контрольного зразку використовували матеріал зібраний з екологічно чистої першої ділянки на Закарпатті, відібраний 18.06.2021 року. Інші зразки брусниці було зібрано для аналізу на другій ділянці, розташованій у Рівненській області, у різні фази вегетації (бутонізації, цвітіння та плодоношення) відповідно 15.06,

20.06, 04.09 та 13.11.2021 року.

Аналіз зразків матеріалу брусниці згідно нижче зазначених методів проводили за різними показниками:

- радіаційне забруднення матеріалу визначали спектрофотометрично на гамма-спектрофотометрі SEG-001M у лабоаторії ветеринарно-санітарної експертизи (Бк);
- вологість сировини оцінювали відповідно до ГОСТ 24027.2-80 після витримування у сушильній шафі [8];
- вміст вільних кислот визначали відповідно методам оцінки якості рослинної продукції, а саме титруванням з NaOH [9];
- дубильні речовини визначали стандартним методом за якісною реакцією осадження желатину, представленим у Державній Фармакопеї України [10];
- вміст масової частки аскорбінової кислоти встановлювали відповідно ГОСТ 24556 на основі індофенольного методу з реактивом Тильманса [11];
- кількість арбутину у пробі оцінювали йодометричним методом, шляхом титрування до появи синього забарвлення [12];
- рівень мікоризації коренів виявляли після освітлювання їх 10 % КОН на водяній бані при 90°С та фарбування, з подальшим висвітлюванням 50 % розчином гліцерину для мікроскопіювання препаратів під світловим мікроскопом [13].

Усі випробування проводили за прийнятими методами Державної Фармакопеї України [10]. Стандартна процедура виділення та аналізу речовин була заснована на екстракціях необхідних біологічно активних речовин. Лікарську рослинну сировину попередньо подрібнювали у ступці і просіювали через сито з порами розміром 1 мм діам. Подрібнену сировину поміщали у колбу з шліфом, додавали екстрагент та проводили екстрагування шляхом нагрівання на водяній бані.

Вміст біологічно активних речовин визначали титрометричними методами аналізів. Кожний аналіз проводили із п'ятикратною повторністю.

Результати досліджень та їх обговорення. Листя *V. vitis-idaea* вважають значно багатшим на біологічно активні сполуки, ніж плоди. Екстракти листя рослини широко використовують не тільки у лікувальних цілях, але і в косметичних добавках [14]. У зв'язку з цим всі дослідження вегетативних частин рослин брусниці відповідають інтересам біотехнологічних виробництв.

Результати проведених аналізів рослин *V. vitis-idaea* українського походження наведено у табл. 1.

Отримані дані свідчать, що зібраний у Закарпатській області рослинний матеріал був значно кращої якості, — з більшим вмістом аскорбінової кислоти та арбутину, нижчим рівнем радіаційного забруднення (50,5 Бк/кг), ніж зібраний у той же період бутонізації матеріал із Житомирської області. Ці зразки мали також трохи нижчий вміст вільних кислот. Тому показники карпатських зразків брали у якості контролю, припускаючи, що зразки із цього ж регіону будуть зберігати більш високі параметри й у інші вегетаційні періоди.

Зразки брусниці зібрані у Житомирській області проаналізовано на трьох стадіях вегетації.

Аналітичну пробу сировини зважували в бюксах та висушували у сушильній шафі, нагрітій до 100–105°С, проводячи її виміри до постійної маси. Зібрані перед цвітінням та у період цвітіння зразки листя виявились найбільш насиченими вологою (табл. 1, рис. 1). Отримання значень даного параметру було потрібно також не тільки для якісної оцінки досліджених рослин, але і для проведення інших перерахунків на суху масу матеріалу.

Якісний аналіз на наявність дубильних речовин проводили для кожного зразка, у результаті якого у всіх пробах було отримано пластівцевоподібний осад або каламут, який зникав при додаванні надлишку желатини, що свідчило про присутність дубильних речовин і високу якість сировини брусниці. Позитивна реакція на таніни, що належать

Рис. 1. Вологість листя *Vaccinium vitis-idaea* на різних стадіях вегетації

Табл. 1. Порівняльна характеристика досліджених зразків *Vaccinium vitis-idaea*, зібраних у різні періоди вегетації 2021 року

Параметр	Період вегетації				
	Закарпатська обл., бутонізація	Житомирська обл., бутонізація	Житомирська обл., цвітіння	Житомирська обл., перше плодоношення	Житомирська обл., друге плодоношення
Рівень радіації	50,5 Бк/кг	79,2 Бк/кг	82,3 Бк/кг	139,0 Бк/кг	107,1 Бк/кг
Вологість листя	39,2±0,5 %	44,4±0,7 %	42,7±0,9 %	19,6±0,4 %	18,7±0,3 %
Масова частка аскорбінової кислоти	38,6±4,1 мг/100 г	33,8±3,2 мг/100 г	35,7±2,9 мг/100 г	69,1±5,3 мг/100 г	25,2±1,2 мг/100 г
Вміст вільних кислот	0,36±0,09 %	0,39±0,05 %	0,44±0,10 %	0,59±0,20 %	0,32±0,10 %
Вміст арбутину	8,1±0,8 %	7,2±0,7 %	6,6±0,7 %	6,4±0,6 %	5,7±0,3 %
Ступінь мікоризації	–	–	–	2–4 %	8–14 %

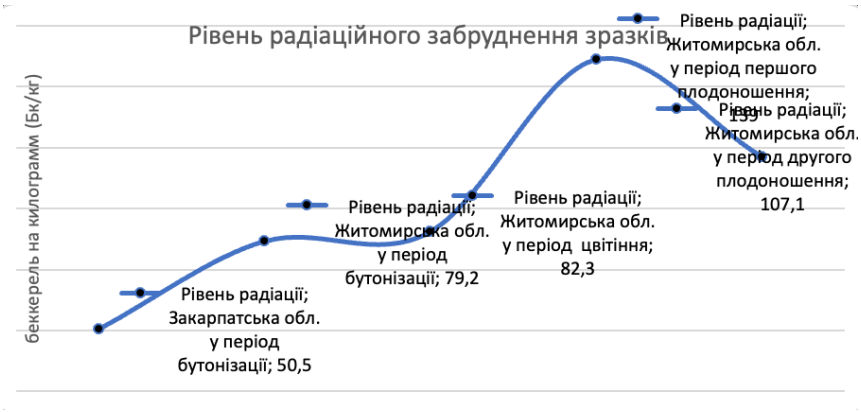
до дубильних речовин, свідчить про наявність у рослини антиоксидантних властивостей, які мають тонізуючий і оздоровлюючий вплив на організм людини. Таніни утворюють стійкі хімічні сполуки з чужорідними для організму білками, металами, алкалоїдами, кислотами, згодом активно їх виводячи.

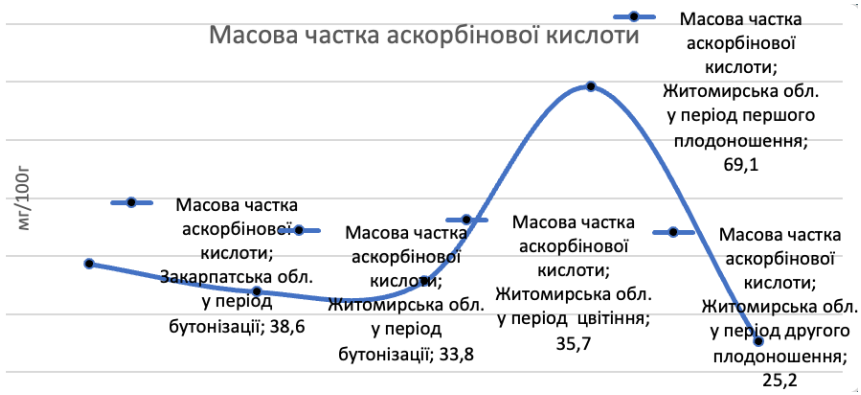
При подальшому вивченні порівняльний аналіз різних зразків брусниці виявив накопичення радіаційного забруднення рослин у період плодоношення, проте показники у беккерелях не перевищували встановленої норми для лікарських дикорослих рослин, яка становить 500 Бк/кг. Накопичення радіаційного забруднення рослинного матеріалу корелювало з іншими показниками (табл. 1, рис. 2), що свідчить про наявність у верхніх шарах ґрунту слабкого забруднення, а також необхідності контролю цього параметру при використанні даного типу сировини у виробництвах.

Згідно отриманих результатів також встановлено, що протягом вегетації у рослинах *V. vitis-idaea* накопичуються аскорбінова кислота і вільні кислоти. Найвищий вміст аскорбінової кислоти — 69,1 мг/100 г, та вільних кислот — 0,59±0,20 %, виявлено у пробах відібраних під час першого плодоношення брусниці на початку вересня 2021 року (табл. 1, рис. 2). Рівень синтезу аскорбінової кислоти є середнім за значеннями і відповідає даним інших досліджень [15], згідно яких вміст даної кислоти в брусниці коливається від 50 до 150 мг/100 г, залежно від сорту та погодних умов. Під час другого плодоношення спостерігалось різке зниження вмісту аскорбінової кислоти, та вільних кислот у рослині. Оскільки відомо, що кліматичні фактори та генетичні особливості рослини мають великий вплив і на синтез аскорбінової кислоти [15], можна припустити, що заморозки та негода пізньої осені 2021 року, саме вплинули на метаболізм *V. vitis-idaea*, пригнічуючи накопичення цієї кислоти. Отже, для отримання високоякісної сировини з найвищим вмістом аскорбінової кислоти і зменшення ризику втрат, заготівлю матеріалу доцільно проводити під час першого дозрівання брусниці у серпні–вересні.

Подальший йодометричний аналіз свідчить, що найвищий вміст арбутину мають зразки періоду бутонізації і цвітіння рослин, зібрані у Закарпатській та Житомирській областях — 8,1 та 7,2 %, відповідно (табл. 1, рис. 3). Метод йодометричного титрування арбутину показав невисоку похибку, на відміну від фармакопейного методу, який має ряд недоліків, як то: низьку специфічність, що виражається у завищенні результатів, оскільки після осадження поліфенольних сполук ацетатом свинцю основними речовинами в екстракції залишаються сполуки, які легко окислюються йодом (катехіни, аскорбінова кислота), що може призводити до помилки; а також трудомісткість і зсув точки еквівалентності при титруванні.

За даними інших дослідників листя *V. vitis-idaea* зазвичай містить до 9 % арбутину [15]. Отримані результати титрування свідчать, що





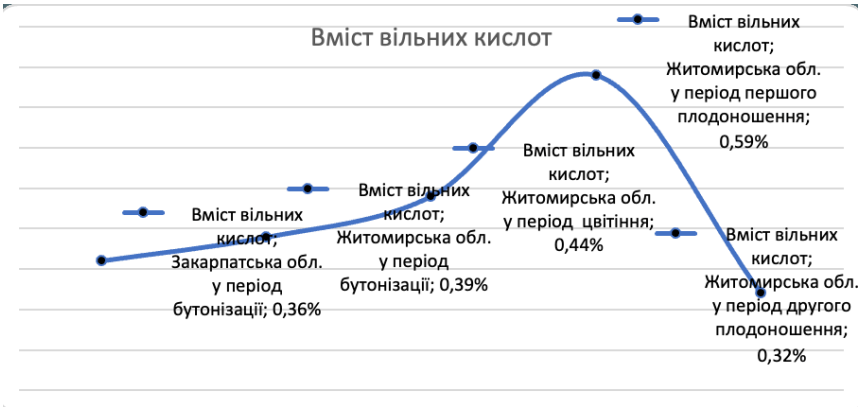


Рис. 2. Кореляційна залежність вмісту аскорбінової кислоти, вільних кислот та радіаційного забруднення листя брусниці на різних стадіях вегетації

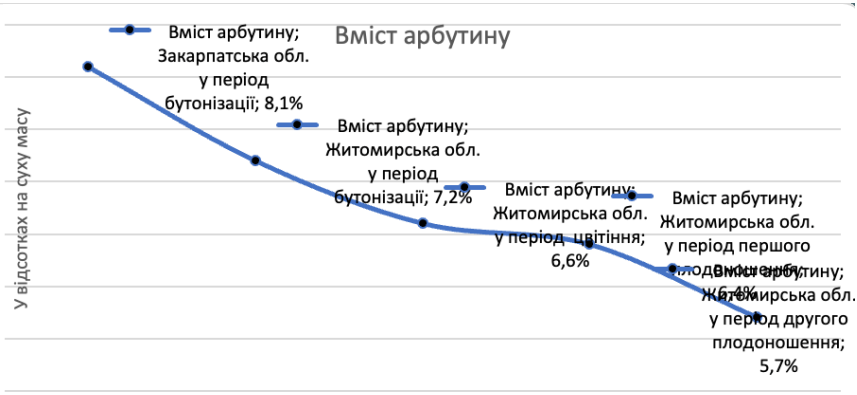


Рис. 3. Вміст арбутину у листі *Vaccinium vitis-idaea* на разних стадіях вегетації

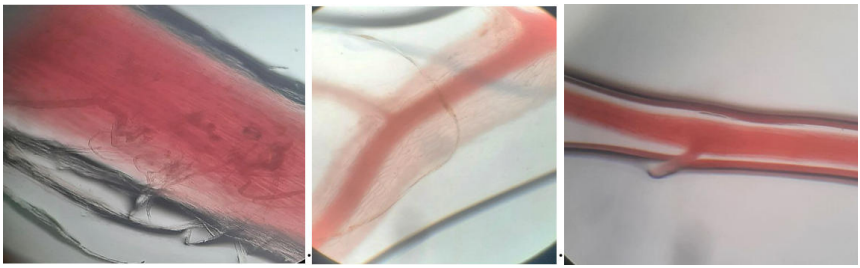


Рис. 4. Гіфи грибів у коренях *V. vitis-idaea*, зібраних наприкінці літа 2021 року

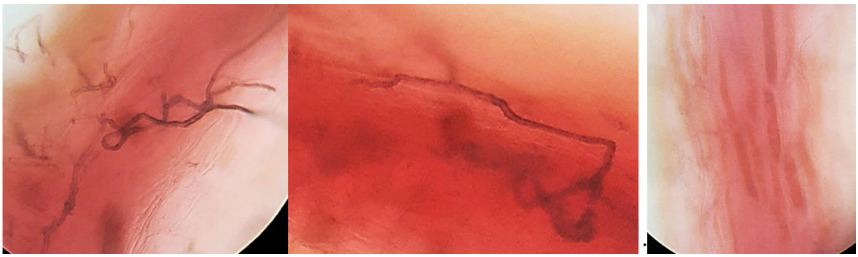


Рис. 5. Гіфи грибів у коренях *V. vitis-idaea*, зібраних у листопаді 2021 року

чиста, зібрана в природних умовах брусниця українського походження має потенціал для використання у промислових цілях для отримання арбутину, а також, що рослинний матеріал з високим вмістом арбутину можна зібрати на ранніх етапах вегетації рослин.

Також було проведенно дослідження ступеню мікоризації коренів брусниці. Рослини *V. vitis-idaea*, як і інші представники родини Ericaceae, утворюють симбіотичні асоціації з мікоризними грибами, які підсилюють вилучення мінералів із субстрату. Оцінка ступеня розвитку мікоризних грибів у кореневій системі брусниці може допомогти у розробці технологічного покращення якості рослинної сировини на

основі підвищення накопичення біологічно активних речовин. Під час дослідження у забарвлених зразках коренів виявлено наявність гіф грибів, що формують ерикоїдну мікоризу, на рівні 2–4 % у період першого плодоношення брусниці (рис. 4), і 8–14 % у період другого плодоношення (рис. 5). Показано накопичення цих грибів наприкінці вегетаційного сезону, що певною мірою корелює з метаболізмом біологічно активних речовин.

Ряд мікоризоутворюючих грибів асоціюється з видами рослин *Vaccinium*, такі як: *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Chaetomium globosum* Kunze, *Gaeumannomyces caricis* J. Walker, *Hyaloscypha hepaticicola* (Grelet & Croz.) Baral, Huhtinen & J. R. De Sloover, *Oidiodendron maius* G. L. Barron, *Pezicula ericae* (Sigler) P. R. Johnst, *Phialocephala fortinii* C. J. K. Wang & H. E. Wilcox, *Trichoderma virens* (J. H. Miller, Giddens & A. A. Foster) Arx„ види роду *Pleospora* та ін. На даний час активно вивчається видовий склад асоційованих грибів, приналежність їх до мікориз та вплив мікоризоутворюючих грибів на врожайність і якість рослин [5, 16].

Крім того, види роду *Vaccinium* є живильним субстратом і рослинами-господарями близько 260 видів грибів. Загалом, десь 25 видів фітопатогенних грибів Ascomycota та Basidiomycota виявлено в Україні, що асоційовані у своєму розвитку з рослинами роду *Vaccinium* [17]. Серед них досить поширеними є види *Botrytis cinerea* Pers., *Coleophoma empetri* (Rostr.) Petr., *Exobasidium vaccinii* (Fuckel) Woronin, *E. vaccinii-uliginosi* Boud., *Diplodina myrtilli* (Oudem.) Allesch., *Monilinia oxycocci* (Woronin) Honey, *Mycosphaerella myrtillina* (Pass.) Tomilin, *Myxothyrium leptideum* (Fries) Bubák & Kabát та ін. Останнім часом також було виявлено на цих рослинах ряд нових для території України видів *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds і *Diaporthe vaccinii* Shear [18]. Таким чином, потенціал впливу грибів на ріст і плодоношення видів *Vaccinium* є досить високим.

Подальші дослідження асоційованих з видами *Vaccinium* грибів і виділення грибів-мікоризоутворювачів у культуру можуть допомогти у розробці стратегій підвищення якості рослинної сировини, а також культивування *V. vitis-idaea*. Для вирощування та розмноження видів Vaccinium застосовують методи: насіннєвого розмноження, культури тканин, клонального мікророзмноження, соматичного ембріогенезу, розмноження пагонами з коренями та відрізками коренів, живцями [4, 6, 19]. Однак при переведенні рослин із умов *in vitro* в умови *in situ* виникають труднощі, викликані відсутністю в їх коренях гіф грибів і пов'язаною з цим проблемою вилучення клонами поживних речовин із ґрунту [6, 19].

Висновки. Рослини роду *Vaccinium*, і зокрема *V. vitis-idaea*, мають велику біологічну цінність як джерела харчових, лікарських та косметичних продуктів. Високий вміст флавоноїдів, вітамінів, дубильних речовин, органічних кислот дає можливість використовувати брусницю

як основу для фармацевтичної та косметичної продукції.

Проведені дослідження зразків рослинної сировини брусниці, відібраної у різні періоди вегетації у лісах Закарпатської та Житомирської областей, показали перспективність застосування *V. vitis-idaea* як природного джерела аскорбінової кислоти та арбутину. Аналіз водно-спиртових екстрактів брусниці виявив, що найвищій вміст аскорбінової кислоти спостерігається у період першого плодоношення (69,1 мг/100 г), а арбутину — під час цвітіння (7,2–8,1 %).

При вивченні зразків з Житомирської області відмічено підвищення радіаційного забруднення рослин (139 Бк/кг) у період плодоношення, що ускладнює використання поліської сировини у масовому виробництві, хоча забруднення не перевищувало встановленої норми.

Мікроскопічні дослідження виявили низький рівень розвитку ерикоїдної мікоризи (2–4 %) у коренях брусниці, зібраної в Житомирській обл. у перший період плодоношення. Рівень мікоризації коренів брусниці досягав 8–14 % протягом другого періоду плодоношення. Прямої кореляції між вмістом біологічно активних речовин і рівнем мікоризації не встановлено.

Найбільш біологічно цінним був матеріал, зібраний у період першого плодоношення *V. vitis-idaea* у вересні 2021 року (спостерігали високий вміст аскорбінової кислоти, дубильних речовин і вільних кислот). Проте за таким параметром, як вміст арбутину, виявилось, що найкращий час для збору сировини є період цвітіння, червень місяць, коли вміст цього глікозиду у зелених частинах рослин найвищий.

1. *Головкин Б. Н., Руденская Р. Н., Трофимова И. А., Шретер А. И.* Биологически активные вещества растительного происхождения. — М.: Наука, 2002. — 764 с.
2. *Мінарченко В. М., Тимченко І. А.* Атлас лікарських рослин України (хорологія, ресурси та охорона). — К.: Фітосоціоцентр, 2002. — 172 с.
3. *Минарченко В. М.* Лікарські судинні рослини України (медичне та ресурсне значення). — Київ: Фітосоціоцентр, 2005. — 324 с.
4. *Курлович Т. В.* Брусника, голубика, клюква, черника. — М.: Издательский Дом МСП, 2005. — 128 с.
5. *Yang H., Zhao X., Liu C., Bai L., Zhao M., Li L.* Diversity and characteristics of colonization of root-associated fungi of Vaccinium uliginosum // Scientific Reports. — 2018. — Vol. 8, No 15283. — P.1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33634-1
6. *Cappai F., Garcia A., Cullen R., Davis M., Munos P.* Advancements in low-chill blueberry Vaccinium corymbosum L. tissue culture practices // Plants. — 2020. — Vol. 9, No 1624. — P.1–18. https://doi.org/10.3390/plants9111624
7. State of the World's Fungi 2018. Report. Royal Botanic Gardens, Kew. / Ed. by K. J. Willis. — London, UK: Royal Botanic Gardens, Kew, 2018. — 88 pp.
8. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла [Електронний ресурс]: ГОСТ 24027.2-80. Дата введення 01.01.1981. URL: https://docs.cntd.ru/document/1200022957 (Міждержавний Стандарт)

9. *Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н., и др.* Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов / Под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. — М.: Высш. Школа, 1983. — 176 с.
10. Державна Фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Доп. 2. — Харків: Державне підприємство Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2015. — 1128 с.
11. Методы определения витамина С [Електронний ресурс]: ГОСТ 24556-89. Дата введення 01.01.1990. https://docs.cntd.ru/document/1200022765 (Міждержавний Стандарт)
12. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. 11-е изд. — М., 1989. — 400'с.
13. *Sun X., Tang M.* Comparison of four routinely used methods for assessing root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi // Botany. — 2012. — Vol. 90, No 11. — P.1073–1083. https://doi.org/10.1139/b2012-08
14. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. Відп. ред. А. М. Гродзінський. — К.: Видавництво Українська Енциклопедія, 1992. — 544 с.
15. *Рупасова Ж. А., Сидорович Е. А., Игнатенко В. А., Рудаковская Р. Н.* Формирование биохимического состава брусники обыкновенной в Беларуси. — Минск: Беларуская навука, 1997. — 303 с.
16. *Vohník M., Réblová M.* Fungi in hair roots of *Vaccinium* spp. (Ericaceae) growing on decomposing wood: colonization patterns, identity and in vitro symbiotic potential. Mycorrhiza. 2022. — P.1–29. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2105492/v1(препринт)
17. *Andrianova T. V., Dudka I. O., Hayova V. P., Heluta V. P., Ing B., Khodosovtsev O. Ye., Kondratyuk S. Ya., Krivomaz T. I., Merezhko T. O., Minter D. W., Mosyakin S. L., Navrotska I. L., Tikhonenko Yu. Ya., Wasser S. P.* Fungi of Ukraine. Preliminary Checklist / Eds. D. W. Minter, I. O. Dudka. — Egham, UK: CAB International, 1996. — 361 pp.
18. *Андріанова Т. В., Коновальчук В. К.* Знахідки нових видів грибів, що викликають гнилі журавлини // Шацьке поозер'я в контексті змін клімату: збірник матеріалів VI Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 70-річчю від дня народження професора Петліна В. М. (1–3 жовтня 2021 р.) / за заг. ред. В. О. Фесюка. — Луцьк: ВНУ ім. Лесі Українки, 2021. — С.189–190.
19. *Debnath S. C.* Propagation of *Vaccinium in vitro* // International Journal of Fruit Science. — 2007. — Vol. 6 (2). — P.47–71.