

УДК 581.132.144

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ПРОГРЕВЕ

О.Ю. БОНДАРЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Исследованы особенности изменения состояния основных участков тилакоидной системы фотосинтетических мембран хлоропластов и их белкового состава после 5-минутного прогрева в темноте. Во фракциях фрагментов хлоропластов, полученных в результате обработки дигитонином, отмечено разное содержание основных белковых комплексов на фоне изменения распределения материала. Показано, что кратковременный прогрев в темноте при 25 °С «разрыхлял» структуру гранальной системы, а прогрев при 45 °С обуславливал уплотнение области стыковки тилакоидов в гране. При этом площадь стыкованной части уменьшалась, что проявилось в увеличении количества частиц, соответствующих краевым областям гранальных тилакоидов.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., хлоропласты, фотосинтетические мембраны, тилакоидная система, грана, белковые комплексы.

Известно, что условия выращивания существенно влияют на состояние и работу фотосинтетического аппарата растений [4, 8]. При этом часто резкие изменения погоды, в том числе перепады температур, оказывают существенное влияние на фотосинтетическую активность и, в конечном счете, на урожай сельскохозяйственных культур.

Выполненные нами ранее исследования показали, что кратковременное (5 мин) воздействие высоких температур приводит к уменьшению размеров хлоропластов и сопровождается изменениями структуры тилакоидной системы [1, 7, 16]. Изменения пространственного распределения пигмент-белковых комплексов, а также плотности стыковки при действии абиотических факторов окружающей среды являются одними из регуляторных механизмов фотосинтетического аппарата, что обуславливает необходимость более детального исследования этих процессов.

На микроскопических изображениях хлоропластов листьев гороха были выявлены области частичной расстыковки гранальных тилакоидов [2, 3], появление которых могло быть вызвано влиянием высокой температуры, что предполагает доступность для действия детергента большей поверхности мембран гранальных тилакоидов. Появлялись также участки грани с обратным эффектом: уплотнением областей стыковки тилакоидов, которое уменьшало доступ детергента. Обнаруженные изменения влияли на ход фрагментации тилакоидной системы хлоропластов, а также на состав полученных фрагментов.

Согласно нашей гипотезе, кратковременный прогрев листьев выших растений приводит к тому, что расстыкованные участки тилакоидов

обогащаются пигмент-белковыми комплексами, преобладающими в стыкованных участках, что может повышать эффективность взаимодействия между различными компонентами цепи транспорта электронов, а также облегчать репарацию поврежденных белков, в частности фотосистемы II (ФС II).

Целью нашей работы было исследование характеристик разных участков фотосинтетических мембран, полученных методом химической фрагментации из хлоропластов, прогретых при разных температурах.

Методика

Растения гороха (*Pisum sativum* L.) выращивали в почвенной культуре в климатической камере при среднесуточной температуре 19–20 °С и освещенности 16 клк (при длительности фотопериода 12 ч). Хлоропласты изолировали из листьев двухнедельных растений в трициновом буфере (рН 7,6) с добавлением 0,1 М сахарозы, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ по описанной ранее методике [6, 7]. Полученную суспензию хлоропластов разделяли на три части: одну использовали для исследования при кратковременном прогреве (5 мин) при 25 °С в темноте, вторую — при прогреве той же продолжительности при 45 °С в темноте, третья часть была контрольным вариантом, который во время воздействия прогрева на первые два варианта находился в темноте при 8 °С. Суспензию хлоропластов прогревали в течение 5 мин в темноте, погружая пробирку с суспензией в стакан с водой соответствующей температуры. Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли в ацетоновых экстрактах измерением оптической плотности на трех длинах волн с помощью спектрофотометра Specord 2000 (Analytik Jena, Германия). Расчеты проводили по формулам, представленным в работах [10, 18].

В исследованиях с применением метода химической фрагментации в результате 15-минутного инкубирования хлоропластов с 0,3 %-м дигитонином в соотношении дигитонин : хлорофилл = 1 : 3 и последовательного дифференциального центрифугирования получены отдельные участки (фрагменты) тилакоидной системы хлоропластов [6, 7]. Распределение материала по фракциям рассчитывали по соотношению хлорофилла в суспензии полученных частиц к общему хлорофиллу в изолированных хлоропластах каждого варианта.

Анализ относительного содержания белковых комплексов тилакоидной системы хлоропластов и частиц, полученных при дигитониновой фрагментации хлоропластов, проводили путем электрофоретического разделения белков хлоропластов и фрагментов тилакоидной системы в полиакриламидном геле с использованием *tris*-глициновой буферной системы по методике Леммли [14]. Окрашивали гель органическим красителем Brilliant Blue R (фирма «Merck») в водном растворе, содержащем 10 % этанола и 10 % уксусной кислоты. Высушенные пластинки геля сканировали на сканере «Mustek ScanExpress 12000P», регистрограммы обрабатывали по программе для обработки гелей «ScanImage». Полосы идентифицированы с помощью смеси маркерных белков фирмы «Sigma», США. Для статистического анализа использовали данные, полученные в 12 независимых экспериментах. Результаты представлены как среднеарифметические и стандартные отклонения. Различия между вариантами считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате фрагментации хлоропластов получены такие фрагменты (цифры в названии фракции означают ускорение, при котором осаждались мембранные фрагменты): 1000 g (грana в наименее поврежденном состоянии [5, 7]), 1300 g (центральная часть грани, или грана-core), 20000 g («нетипичные» гранальные тилакоиды, т.е. происходящие из грани, но отличающиеся по белковому накоплению от тилакоидов грана-core [5, 7]), 40000 g (краевые участки грани), 145000 g (фрагменты межгранальных тилакоидов). Результаты кратковременного действия прогрева на распределение (относительный выход) материала по фракциям приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что после прогрева при 45 °C выход фракции 1000 g увеличивался в среднем на 29 ± 5 % показателя контрольного варианта. Выход фракции 1300 g варианта прогрева хлоропластов, наоборот, уменьшался на 43 ± 15 % относительно хлорофилла в контрольной суспензии этих частиц. Выход фракции 20000 g уменьшался на 32 ± 16 % контрольного показателя. Это дает основание считать, что повышение плотности стыковки в грани, вызванное действием высокой температуры, уменьшает возможность доступа детергента в данную область.

Ранее было показано, что относительный выход фракции краевых участков гранальных тилакоидов (40000 g) существенно зависит от уровня освещения при выращивании [4, 7]. Результаты фрагментации хлоропластов, прогретых при 45 °C в течение 5 мин в темноте, показали, что при перестройках гранальной системы под влиянием температуры относительный выход частиц фракции 40000 g повышался на 65 ± 20 % выхода частиц в контрольных хлоропластах. Эти данные свидетельствуют о том, что на фоне уплотнения области стыковки ее площадь уменьшается.

Хлоропласты, прогретые при 25 °C в темноте в течение 5 мин, показали другую картину и степень распределения материала по фракциям (см. табл. 1). Относительный выход частиц фракции 1000 g в отличие от описанного выше варианта при прогреве уменьшался в среднем на $11 \pm 2,5$ % количества хлорофилла в контрольной суспензии этой фракции. Относительные выходы частиц фракций 1300 g и 40000 g изменялись подобно описанному выше варианту — выход частиц фракции 1300 g уменьшался в среднем на 31 ± 5 %, фракции 40000 g — повышался на 79 ± 18 % по сравнению с показателями этих фракций для контрольного варианта хлоропластов. Выход частиц фракции 20000 g увеличивался. В этом варианте, как и для фракции 1000 g, результат был противоположный варианту прогрева при 45 °C. В среднем выход фракции «нетипичных» тилакоидов повышался на 22 ± 8 % по сравнению с контрольным вариантом. Существенных изменений выхода легких частиц 145000 g в обоих вариантах прогрева не наблюдали.

ТАБЛИЦА 1. Изменения выходов частиц разных фракций при дигитониновой фрагментации хлоропластов (% контрольного варианта, результаты 12 экспериментов)

Обработка	Фракция			
	1000 g	1300 g	20000 g	40000 g
Прогрев 5 мин при 45 °C	$+29 \pm 5^*$	$-43 \pm 15^*$	$-32 \pm 16^*$	$+65 \pm 20^*$
Прогрев 5 мин при 25 °C	$-11 \pm 2,5$	-31 ± 5	$+22 \pm 8$	$+79 \pm 18$

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: *различия достоверны по сравнению с прогревом при 25 °C.

Сравнение распределения выходов частиц фракций тилакоидной системы хлоропластов показало, что в отличие от прогрева при высокой температуре (45 °С), вызывающей уменьшение площади области стыковки и параллельное ее уплотнение, прогрев при 25 °С приводил к «разрыхлению» гранальной системы, о чем свидетельствовало увеличение количества мелких фрагментов граны.

Содержание белковых комплексов во фрагментах фотосинтетических мембран разных фракций исследовали с использованием соотношения площадей под денситометрическими кривыми, которые соответствуют основным зонам дорожек полиакриламидных гелей, к суммарной площади под всей денситограммой дорожки. Для этого рассчитывали суммарные площади под кривыми, совпадающие с зонами локализации основных белковых комплексов. Идентификацию полос проводили согласно литературным и нашим данным, опубликованным ранее [9, 11, 12, 16, 17]. Содержание основных супрамолекулярных комплексов во фрагментах тилакоидной системы хлоропластов листьев гороха приведено в табл. 2. При сравнении электрофореграмм тяжелых частиц фракции 1000 g с электрофореграммами, полученными для хлоропластов, выявлено, что интенсивность полос в зоне СР1, где локализуются протеины пигмент-белкового комплекса (ПБК) ФС I, снижается для частиц фракции 1000 g на 25 %. Это свидетельствует об уменьшении концентрации комплекса ФС I в тяжелых фрагментах. Подобная картина наблюдалась в зоне СР₁, в которой локализованы протеины АТФазного комплекса. Ее интенсивность на электрофореграммах снижалась на 38 %. Это можно объяснить низкой концентрацией высокомолекулярных протеинов данной группы. На электрофореграммах частиц фракции 1000 g интенсивность основных полос *core*-комплекса ФС II СР43, СР47, 33 кД белков по сравнению с хлоропластами повышалась незначительно (всего на 3 %). Более существенно (в среднем на 26 %) увеличивалась интенсивность зоны локализации белков светособирающего комплекса (ССК).

Частицы фракции 1300 g еще более насыщены комплексами ФС II по сравнению с другими частицами. На это указывает высокая интенсивность полос зон СР43, СР47, кислородвыделяющего комплекса (33 кД белок), белков D1, D2. По сравнению с хлоропластами интенсивность данной зоны частиц фракции 1300 g повышалась на 41 %. Содержание составляющих ФС I на 43 % ниже, чем у хлоропластов, и на 24 % ниже, чем в частицах фракции 1000 g. Важным результатом, полученным при

ТАБЛИЦА 2. Распределение основных пигмент-белковых комплексов в контрольных (хранившихся в темноте при температуре 8 °С) хлоропластах и субхлоропластных фрагментах

ПБК	Хлоропласты	Фракция				
		1000 g	1300 g	20000 g	40000 g	145000 g
ФС I	0,28±0,02	0,21±0,03	0,16±0,01	0,23±0,03	0,51±0,03	0,46±0,03
ФС II	0,34±0,01	0,35±0,02	0,48±0,02	0,36±0,01	0,09±0,02	0,14±0,02
ССК II	0,19±0,04	0,24±0,02	0,23±0,03	0,26±0,03	0,16±0,04	0,14±0,03
АТФазный комплекс	0,08±0,02	0,05±0,01	0	0,02±0,01	0,12±0,02	0,16±0,01

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3, 4 указано соотношение площадей под кривыми различных полос на денситограммах полиакриламидных гелей к суммарной площади под денситограммами.

исследовании этой фракции, является отсутствие белков АТФазного комплекса, позволяющее предположить происхождение данных частиц. Отсутствие полос АТФазного комплекса указывает на то, что частицы выходят из части грани, не контактирующей со стромой, т.е. из центральной части грани, иначе говоря, грана-core [13, 16].

При центрифугировании жидкости над осадком 1300 g на скорости 20000 g была получена фракция, которая в контрольном варианте показала картину распределения белковых полос на электрофореграммах, похожую на таковую частиц фракции 1000 g (см. табл. 2). Отличия отмечены при исследовании интенсивности полос, соответствующих протеинам ФС I и ФС II, которые оказались больше, чем для частиц фракции 1000 g, но несущественно. Основным отличием было значительное (>50 %) снижение содержания протеинов АТФазного комплекса. Такие характеристики подчеркивают «нетипичность» частиц, которые, согласно данным о содержании ПБК, происходят из гран. При этом они намного меньше по размеру грани в целом и грана-core, но значительно больше краевых участков. Кроме того, низкое содержание белков АТФазного комплекса свидетельствует, что мембраны частиц этой фракции лишь частично контактируют со стромой.

Частицы фракции 40000 g на электрофореграммах дают картину, отличающуюся от таковой хлоропластов и тяжелых частиц. Выявлена повышенная интенсивность полос зон СРI — ФС I, СF₁, СF₀ — АТФазного комплекса, интенсивность полосы 34 кД — цит. b₆. Кроме того, увеличивалась интенсивность полос локализации ССК I — 22—25 кД и протеинов, поддерживающих стабильность ФС I. На фоне этого значительно уменьшалась интенсивность полос зоны ССК II, СР43, почти исчезала полоса СР43 и 33 кД белка (см. табл. 2).

Фракция легких фрагментов 145000 g насыщена компонентами ФС I. На электрофореграммах частиц этой фракции четко обозначены все компоненты ФС I. Повышена интенсивность полос зон СРI, СF₁, СF₀, редуцированы полосы СР47, СР43, 33 кД и полосы зоны ССК II. Однако фракция 145000 g более насыщена белками ФС II по сравнению с фракцией 40000 g (см. табл. 2).

Анализ содержания белков основных ПБК фрагментов, полученных из хлоропластов, прогретых при 45 °С в темноте, показал, что на электрофореграммах частиц фракции 1000 g интенсивность полос ФС I повышалась в среднем на 38 % по сравнению с контрольным вариантом, содержание белков АТФазного комплекса увеличивалось на 40 % (табл. 3). Параллельно уменьшалось относительное содержание протеинов ФС II на 17 и ССК II — на 4 %. Эти изменения наблюдались на фоне увеличения относительного выхода частиц (см. табл. 1). При уменьшении выхода частиц фракции 1300 g, которую мы получили при дигитониновой фрагментации хлоропластов, прогретых при 45 °С в темноте, наполняемость основными ПБК тоже отличалась от таковой у фракции контрольного варианта. Содержание белковых комплексов ССК II и ФС I уменьшалось в среднем соответственно на 22 и 63 %, а содержание белков ФС II — увеличивалось на 23 %. Полосы, соответствующие протеинам АТФазного комплекса, отсутствовали, как и в контрольном варианте. Частицы фракции 20000 g варианта прогрева при 45 °С, по данным исследований, были на 18 % менее насыщены белками ФС I. При этом интенсивность полос локализации протеинов ФС II

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

ТАБЛИЦА 3. Распределение основных пигмент-белковых комплексов частиц, полученных из хлоропластов, прогретых в течение 5 мин при 45 °С в темноте

ПБК	Хлоропласты	Фракция				
		1000 g	1300 g	20000 g	40000 g	145000 g
ФС I	0,30±0,02	0,29±0,03*	0,10±0,01*	0,18±0,03*	0,41±0,03*	0,41±0,02
ФС II	0,32±0,02	0,29±0,02*	0,59±0,01*	0,44±0,01*	0,18±0,02*	0,16±0,02
ССК II	0,20±0,03	0,23±0,02*	0,18±0,02*	0,23±0,03*	0,19±0,04*	0,15±0,03
АТФазный комплекс	0,11±0,01	0,07±0,01*	0	0	0,11±0,02	0,18±0,01

увеличивалась по сравнению с контролем в среднем на 22 %. Насыщенность протеинами ССК II снижалась на 12 %.

Результаты расчетов относительного выхода и содержания белков в частицах фракции 40000 g этого варианта тоже отличались от таковых в контрольных образцах. Анализ денситограмм показал, что насыщенность протеинами ФС I в этих частицах уменьшалась в среднем на 20 %, а ССК II — увеличивалась на 19 %. Содержание протеинов ФС II фракции краевых тилакоидов повышалось в среднем вдвое. На фоне этих изменений незначительно уменьшалось количество протеинов АТФазного комплекса. Белковый состав частиц фракции 145000 g данного варианта тоже изменялся. В частицах уменьшалась интенсивность полос зон локализации белков ФС I в среднем на 11 %, возрастала интенсивность полос ССК II и ФС II соответственно на 7 и 14 %.

Анализ белков разных участков тилакоидной системы хлоропластов, полученных методом дигитониновой фрагментации из хлоропластов, прогретых в течение 5 мин в темноте при 25 °С, показал, что насыщенность белками ФС I частиц фракции 1000 g варианта прогрева при 25 °С уменьшалась относительно контроля в среднем на 10 %, а насыщенность белками ФС II, наоборот, увеличивалась в среднем на 11 % (табл. 4). Кроме того, отличия между содержанием ССК II в данной фракции варианта прогрева при 25 °С и контрольном варианте были незначительными, на уровне погрешности.

Характер и направление изменений насыщенности основными ПБК частиц фракции 1300 g данного варианта оказались сходными с такими в варианте прогрева при 45 °С. На фоне уменьшения относительного выхода частиц данной фракции по сравнению с контролем увеличивалось содержание протеинов ФС II на 13 % и уменьшалось содержание ССК II на 30 %. Существенных отличий количества протеинов ФС I в

ТАБЛИЦА 4. Распределение основных пигмент-белковых комплексов во фракциях, полученных при фрагментации хлоропластов после прогрева в течение 5 мин при 25 °С в темноте

ПБК	Хлоропласты	Фракция				
		1000 g	1300 g	20000 g	40000 g	145000 g
ФС I	0,29±0,02	0,19±0,02*	0,16±0,02*	0,27±0,03*	0,46±0,03	0,46±0,03
ФС II	0,33±0,02	0,39±0,02*	0,54±0,02*	0,33±0,01*	0,16±0,02*	0,16±0,02
ССК II	0,19±0,05	0,26±0,05*	0,16±0,03*	0,25±0,06*	0,18±0,04*	0,17±0,02
АТФазный комплекс	0,09±0,02	0,03±0,01	0	0,03±0,01*	0,11±0,02	0,14±0,01*

контрольном варианте и варианте 5-минутного прогрева при 25 °С не наблюдали. Зона локализации белков АТФазного комплекса на электрофореграммах этой фракции так же, как и в описанных выше вариантах, практически отсутствовала.

Фракция 20000 g, полученная из прогретых при 25 °С хлоропластов, отличалась от контрольной повышенным содержанием ФС I на 17 % и незначительно уменьшенным содержанием протеинов ФС II и ССК II в среднем соответственно на 8 и 4 %. Интенсивность полосы белков АТФазного комплекса на электрофореграммах данной фракции после прогрева при 25 °С увеличивалась.

Наполняемость протеинами основных ПБК, как и относительный выход частиц фракции 40000 g, краевых участков гранальных тилакоидов, были сходными с такими же данными для этих частиц варианта прогрева при 45 °С. На фоне увеличения относительного выхода в частицах уменьшалось содержание белков ФС I в среднем на 10 %. Насыщение протеинами ФС II и ССК II данной фракции возрастало, как и в частицах варианта более сильного нагрева, но в меньшей степени. Интенсивность зоны ФС II повышалась на 44 %, ССК II — на 13 % относительно контрольного варианта. Для сравнения: прогрев при 45 °С этой фракции увеличивал насыщение ФС II вдвое относительно контроля, а ССК II — на 19 %. Относительное содержание протеинов АТФазного комплекса, как и в описанном выше варианте, уменьшалось.

Частицы фракции межгранальных тилакоидов 145000 g варианта прогрева хлоропластов при 25 °С не отличались суммарным содержанием протеинов комплекса ФС I от такового в контрольном варианте. Однако интенсивность полос локализации протеинов ФС II и ССК II повышалась на фоне уменьшения интенсивности зоны CF, которая является зоной локализации протеинов АТФазного комплекса, в отличие от варианта прогрева при 45 °С, в котором количество белка в этой зоне увеличивалось.

Анализ распределения материала по фракциям после прогрева хлоропластов выявил, что кратковременное воздействие высоких температур вызывает изменения в архитектонике тилакоидной системы. Показано, что прогрев при 25 и 45 °С по-разному влияет на характер перестроек и силу стекинга в гранальной системе хлоропластов. Прогрев при 25 °С вызывал уменьшение относительного выхода частиц тяжелой фракции 1000 g и увеличение выхода частиц легких фракций 20000 g, 40000 g. Прогрев при 45 °С давал иную картину перераспределения материала: на фоне повышения выхода частиц фракций 1000 g, 40000 g относительный выход частиц фракций 1300 g, 20000 g уменьшался. Следует заметить, что прогрев хлоропластов вызывал некоторое уменьшение выхода частиц, которые определялись как грана-core, и увеличение выхода частиц, которые определялись как краевые участки гранальных тилакоидов. Изменение температурного воздействия по-разному изменяло выходы фракций, которые по нашим представлениям определяются как «грانا в наименее поврежденном состоянии» и «нетипичные тилакоиды» [5, 6], т.е. при повышении выхода одних частиц выход других соответственно уменьшается. Анализ распределения основных ПБК по фракциям в разных вариантах 5-минутного прогрева тоже показал довольно существенную температурную зависимость распределения белковых комплексов между этими двумя типами частиц.

Таким образом, установлено, что кратковременный прогрев хлоропластов при температурах 25 и 45 °С по-разному изменяет состояние фотосинтетических мембран. Эти различия заключались в основном в изменении силы стекинга, что приводит к увеличению количества частиц, определяемых как «граны в наименее поврежденном состоянии» (вариант прогрева при 45 °С) и частиц «нетипичных тилакоидов», т.е. тилакоидов, находящихся в составе граны, но отличающихся по белковому составу от тилакоидов грана-core (вариант прогрева при 25 °С). В результате анализа наполненности основными ПБК и непигментированными комплексами разных участков граны прогретых хлоропластов тоже выявлена зависимость состава фрагментов от температуры прогрева.

Таким образом, наша гипотеза в целом подтверждается, но прогрев при разных температурах может иметь свои особенности. В результате прогрева при повышенной температуре увеличивается часть тилакоидной мембраны, которая экспонирована в строму, что свидетельствует о частичной расстыковке тилакоидов в этих условиях. Такая перестройка организации внутренних мембран хлоропластов может быть ранней адаптивной реакцией фотосинтетического аппарата высших растений на изменения температурных условий окружающей среды, что подтверждает его высокую пластичность. В будущих исследованиях необходимо обратить внимание на возможность корреляции характера перестроек с устойчивостью сортов сельскохозяйственных культур к высокотемпературному стрессу.

1. *Бондаренко О.Ю.* Изменение размеров хлоропластов листьев гороха, индуцированное кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 1. — С. 79–83.
2. *Бондаренко О.Ю.* Изменения структурной организации гранальной системы хлоропластов при кратковременном прогреве листьев гороха в темноте и при наличии света низкой интенсивности // Физиология растений и генетика. — 2015. — **47**, № 3. — С. 253–259.
3. *Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В.* Изменения структуры хлоропластов листьев гороха, индуцированные кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — **44**, № 3. — С. 265–269.
4. *Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В.* Особливості фрагментації тилакоїдів рослин гороху, що зростали за різних погодних умов // Наук. зап. Тернопіл. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2002. — **18**, № 3. — С. 16–20.
5. *Кочубей С.М., Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В.* Новый тип субхлоропластных фрагментов, выделенных из хлоропластов гороха с помощью дигитонина // Биохимия. — 2007. — **72**, № 9. — С. 1255–1261.
6. *Кочубей С.М., Воловик О.И., Корнеев Д.Ю. и др.* Организация и функциональная активность фрагментов межгранальных и гранальных тилакоидов гороха // Физиология растений. — 1998. — **45**, № 6. — С. 805–812.
7. *Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю.* Динамические свойства структурных единиц хлоропластов. — Киев: Логос, 2010. — 176 с.
8. *Шаркова В.Е., Буболо Л.С.* Влияние теплового стресса на структуру тилакоидной системы хлоропластов в клетках зрелых листьев пшеницы // Физиология растений. — 1996. — **43**, № 3. — С. 409–417.
9. *Albertsson P.A.* The structure and function of chloroplast photosynthetic membrane — a model of domain organization // Photosynth. Res. — 1995. — **46**. — P. 141–149.
10. *Arnon D.I.* Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poliphenoloxidase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. — 1949. — **24**. — P. 1–15.
11. *Dekker J.P., Boekema E.J.* Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — **1706**. — P. 12–39.
12. *Goral T.K., Johnson M.P., Duffy C.D. et al.* Light-harvesting antenna composition control the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in Arabidopsis // Plant J. — 2012. — **69**. — P. 289–301.

13. Kouril R., Oostergetel G.T., Boekema E.J. Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — **1807**. — P. 368—374.
14. Kouil R., Wientjes E., Bultema J.B., Croce R., Boekema E.J. High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana* // *Ibid.* — 2013. — **1827**. — P. 411—419.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — **222**. — P. 200—202.
16. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — **1058**. — P. 87—106.
17. Staehelin L.A. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supramolecular architecture of thylakoid membranes // *Photosynth. Res.* — 2003. — **76**. — P. 185—196.
18. Vernon L.R. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts // *Analyt. Chem.* — 1960. — **32**. — P. 1144—1150.

Получено 16.12.2015

ЗМІНИ СТАНУ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТІВ ГОРОХУ ЗА КОРОТКОЧАСНОГО ПРОГРІВУ

О.Ю. Бондаренко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Досліджено особливості зміни стану основних ділянок тилакоїдної системи фотосинтетичних мембран хлоропластів та їх білкового складу після 5-хвилинного прогріву в темряві. У фракціях фрагментів хлоропластів, отриманих у результаті обробки дигітоніном, відмічено різний вміст основних білкових комплексів на фоні зміни розподілу матеріалу. Показано, що короткочасний прогрів у темряві за 25 °С «розпушував» структуру гранальної системи, а прогрів за 45 °С зумовлював ущільнення ділянки стикування тилакоїдів у грані. При цьому площа стикованої частини зменшувалась, що виявилось збільшенням кількості часточок, які відповідають крайовим ділянкам гранальних тилакоїдів.

CHANGES OF PEA CHLOROPLASTS PHOTOSYNTHETIC MEMBRANES UNDER SHORT-TERM HEATING

O.Yu. Bondarenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Modifications of structural properties and protein content of the membranes from the distinct regions of thylakoid system in chloroplasts after 5 minutes of warming in the darkness have been investigated. Analysis of the fractions obtained after fragmentation of chloroplasts with digitonin followed by differential centrifugation revealed differences in the yield of fractions and the content of major protein complexes. It was demonstrated that short-term warming in the darkness at 25 °C «loosened» the structure of grana system. Heat treatment at 45 °C led to compacting of stacking zone of granal thylakoids. However, the stacking region was estimated to be smaller because of higher yield of particles originated from peripheral regions of granal thylakoids.

Key words: *Pisum sativum* L., chloroplasts, photosynthetic membranes, thylakoid system, grana, protein complexes.