

УДК 577.352.33:577.115

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. И. С. Капустина^а, В. В. Гурина^а, Е. В. Спиридонова^{а, *}, Н. В. Озолина^а

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: yatakol@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

При исследовании рафтовых структур мембран хлоропластов пшеницы, выявленных ранее в зоне 15% сахарозы после высокоскоростного центрифугирования, была обнаружена дополнительная зона опалесценции в области 5% сахарозы. Анализ состава стерина и жирных кислот липидов этой зоны в сравнении с зоной рафтов и мембран хлоропластов показал, что в этой зоне также могут присутствовать рафтовые структуры. Это говорит о том, что мембраны хлоропластов пшеницы могут содержать два типа рафтовых структур.

Ключевые слова: хлоропласты, рафты, жирные кислоты, стерины

DOI: 10.31857/S0233475523060051, **EDN:** FMXCTT

ВВЕДЕНИЕ

Пшеница как продовольственная культура – один из основных источников энергии для человека и животных [1]. Ее урожайность во многом зависит от продуктивности фотосинтеза хлоропластов [2]. Очевидно, что эффективность фотосинтеза зависит от того, как устроена мембранная инфраструктура хлоропластов. В связи с чем изучение мембранных структур хлоропластов пшеницы является актуальной задачей.

Хлоропласты имеют сложную структуру. Внешняя оболочка хлоропласта состоит из двух липидных мембран, а внутреннее пространство (строму) пронизывают удлинённые мембраны (ламеллы), которые образуют замкнутые уплощенные пузырьки – тилакоиды. Известно, что при адаптации растений к холоду происходит перестройка мембранных элементов хлоропластов, а именно увеличивается общее количество тилакоидов, что может быть одним из факторов повышения устойчивости растений к холоду [3]. Основу мембран хлоропластов составляет липидный бислой, в который встроены белковые комплексы [4]. Липидный бислой служит не только “изолятором”, отделяющим внутреннее пространство тилакоидов (люмен) от стромы, но также является средой, в которой диффундируют молекулы пластохинона. Липиды участвуют в поддержании димерной структуры пигмент-белковых комплексов ФС1 и ФС2 [5]. В последнее время доказано, что липиды мембран образуют доменные структуры, которые

называют рафтами. По определению рафты – это специфические области мембраны, плавающие на поверхности фосфолипидного бислоя (от англ. lipid raft). Липидный и белковый состав рафтов зависят от особенностей мембраны и от условий среды, в которой находятся организмы. К рафтообразующим липидами относят стерины, сфинголипиды и глицеролипиды с насыщенными жирными кислотами [6]. Известно, что рафтовые структуры принимают участие во многих клеточных процессах (передача сигнала, эндоцитоз, импорт ДНК, участие в механизмах защиты растений от неблагоприятных факторов) [7–9]. Наименее исследованы доменные структуры в мембранах хлоропластов. Возможно, это связано с их сложной структурой. Недавно проведено изучение липидного профиля микродоменов хлоропластов галофитов [9]. Ранее нами были начаты исследования рафтов мембран хлоропластов пшеницы, и белок-липидные микродомены были обнаружены после высокоскоростного центрифугирования сахарозного градиента в области 15% сахарозы [10]. В настоящем исследовании при получении рафтовых структур была обнаружена дополнительная зона опалесценции в области 5% сахарозы, что может свидетельствовать о присутствии рафтовых микродоменов. Цель данного исследования состояла в изучении характеристик новой опалесцирующей зоны и сравнении ее с известными рафтовыми структурами мембран хлоропластов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали яровую пшеницу сорт Новосибирская 29. Растения выращивали в климатической камере до первого настоящего листа. Условия выращивания: температура воздуха 22°C, фотопериод 16/8 день/ночь. Освещенность 300 мкмоль/м² с⁻¹. Далее выделяли хлоропласты типа В (неразрушенные хлоропласты) с помощью метода дифференциального центрифугирования. Контроль чистоты фракций хлоропластов и оценку их интактности проводили с использованием инвертированного биологического микроскопа ("Axio observer Z1", Carl Zeiss, Германия) [11, 12]. Для получения липидных рафтов суспензию хлоропластов солибилизировали 1% тритоном X-100 30 мин при 4°C, наносили на градиент сахарозы 35–25–15–5% и центрифугировали при 200000 g в течение 2 ч. После центрифугирования в области 5 и 15% градиента сахарозы были выявлены опалесцирующие зоны (рис. 1). Известно, что ранее рафты хлоропластов галофитов и пшеницы были обнаружены в зоне 15% сахарозы [10, 13]. Опалесцирующая зона в области 5% сахарозы градиента ранее не исследовалась. Поэтому для настоящего исследования были взяты обе опалесцирующие зоны (5 и 15%) и суспензия хлоропластов в качестве контроля.

Общие липиды экстрагировали модифицированным методом Фолча [14]. Стерины анализировали с помощью одномерной ТСХ с использованием системы растворителей для нейтральных липидов: гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (80 : 20 : 1). Хроматограммы обрабатывали 10% серной кислотой и нагревали до 105°C [15]. Стерины, элюированные с пластинок хлороформом и этилацетатом, подвергали силилированию гексаметилдисилазаном и N,O-бис(триметилсилил)ацетамидом. Образовавшиеся триметилсилильные производные стерина были проанализированы с помощью хроматомасс-спектрометра GC–MS 7000/7890A TripleQuad, Agilent Technologies (США). Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 41–550 а.е.м. Для разделения компонентов использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м × 0.250 мм × 0.50 мкм), Agilent Technologies (США). Неподвижная фаза – 5% фенилметилполисилоксан. Градиент температуры: 2 мин при 150°C, затем со скоростью 10°C/мин температуру повышали до 300°C и выдерживали в течение 15 мин. Подвижная фаза – гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Разделение потоков 5 : 1. Масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI) (энергия ионизации 70 эВ). Идентификацию стерина проводили путем сравнения их времени удержания со стандар-

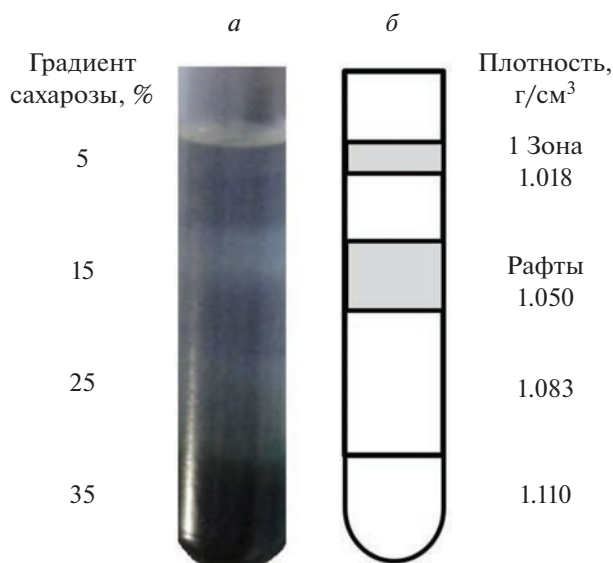


Рис. 1. Фотография (а) и схема (б) распределения суспензии хлоропластов, солибилизированной 1% тритоном X-100, после центрифугирования (200000 g, 2 ч) в градиенте плотности сахарозы (5–35%).

тами, а также использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ был проведен с использованием калибровочной кривой по холестерину, кампестерину, стигмастерину (Sigma-Aldrich, США) и β-ситостерину (European pharmacopoeia reference standard, Франция) [16].

Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу [17]. К экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1% метанольный раствор серной кислоты и нагревали на водяной бане при 60°C в течение 30 мин. После охлаждения трижды экстрагировали метилловые эфиры ЖК гексаном (3 × 5). Анализ метилловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хроматомасс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Детектор – масс-спектрометр – квадруполь, способ ионизации – электронный удар (EI), энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Неподвижная фаза – полиэтиленгликоль. Подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром – 280°C. Диапазон сканирования 41–450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков 5 : 1. Хроматографирование проводили в изотермическом режиме при 200°C.

Для идентификации пиков метилловых эфиров жирных кислот использовали стандарты метило-

вых эфиров (Sigma, USA) и данные библиотеки масс-спектров NIST 05 [17]. Рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот (Σ ННЖК), сумму насыщенных жирных кислот (Σ НЖК).

Для проведения статистической обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Excel и SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в 3–5 независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или интерквартильной широты [25 процентиль – 75 процентиль]. С помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479–2002) [18]. При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью. Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали Н-критерий Краскела–Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента–Ньюмена–Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в мембранах хлоропластов высокое содержание белка и низкое содержание липида. Поэтому, чтобы выделить липидные рафты из мембран хлоропластов, под градиент сахарозы вносили большое количество материала – 3 мг по белку, в то время как при выделении рафтовых структур из тонопласта было достаточно 0.7 мг по белку, так как в вакуолярной мембране липидов больше, чем белков.

После высокоскоростного центрифугирования в градиенте сахарозы различной плотности была обнаружена ожидаемая опалесценция в области 15% сахарозы, свидетельствующая о наличии рафтов хлоропластов [10, 13]. Дополнительно выявлена опалесценция в области 5% (зона 1) сахарозы (рис. 1). Возможно, данная опалесценция выявилась из-за большого количества внесенного материала. Опалесцирующая зона в области 5% сахарозы представляла интерес для дальнейшего исследования. Известно, что опалесценция часто связана с рафтовыми структурами, получаемыми методом с использованием детергента [19, 20]. Для проверки наличия в зоне опалесценции 5% сахарозы рафтовых структур проводили ее сравнение с рафтовыми структурами из зоны опалесценции в области 15% сахарозы по показателям, характерным для рафтовых структур.

Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (ЖК) (жидкоупорядоченная фаза Lo), а сами рафты функционируют как агенты для концентрирования мембранных и мембран-ассоциированных белков [21]. Анализ жирнокислотного состава липидов опалесцирующих зон показал, что доля насыщенных ЖК составляла 63.5% в зоне из 5% сахарозы и 79.8% в рафтах из зоны 15% сахарозы, в то время как в самой фракции хлоропластов этот показатель составлял 24.4% (табл. 1). Подобная тенденция наблюдалась в рафтах хлоропластов различных видов галофитов, насыщенность липидов варьировала от 56 до 62%, тогда как в самой фракции хлоропластов доля насыщенных ЖК составляла от 25 до 45% от суммы ЖК [22]. В опалесцирующих зонах основной насыщенной ЖК является пальмитиновая ($C16:0$). Ее количество практически в 2 раза больше чем в хлоропластах, из которых были выделены рафтовые структуры (табл. 1). Липидные рафты – мобильные структуры, для выполнения функций в клетке осуществляется их сборка, и в них “заякоривается” необходимый белок, возможно, это происходит с участием пальмитиновой кислоты. Предполагается, что $C16:0$ может образовывать тиюэфирную связь с цистеином или сложноэфирную с остатками серина и треонина и таким образом выполнять роль мембранного “якоря” для белков. Кроме этого, относительное содержание $C16:0$ в составе липидов определяет микровязкость мембран [23].

Интересно, что в исследуемых зонах содержание арахидиновой ЖК ($C20:0$) больше в 6 и 9 раз по сравнению с фракцией хлоропластов (табл. 1). Как известно, $C20:0$ относится к ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ). ЖКОДЦ одновременно находятся в обеих частях липидного бислоя, тем самым стабилизируя сильно изогнутые участки клеточных мембран [24].

Можно отметить, что в обеих опалесцирующих зонах количество миристиновой ЖК ($C14:0$) в разы больше (2.9–5.9%), чем во фракции хлоропластов (0.74), из которых были получены опалесцирующие зоны. Также в исследуемых нами зонах наблюдалось более высокое по сравнению с фракцией хлоропластов содержание стеариновой ЖК ($C18:0$). Увеличение в рафтах количества насыщенных ЖК, приводило, соответственно, к снижению количества ненасыщенных ЖК, особенно $C18:3(n-3)$ с 52 до 18% в зоне 1 и до 6% в зоне рафтов. Подобное снижение наблюдалось в рафтах хлоропластов галофитов с 30% до следовых количеств [22]. Кроме того, отмечено, что в зоне 1 присутствуют $C16:1(n-7)$ и $C16:1(n-5)$ в отличие от зоны рафтов 15% градиента сахарозы.

Таблица 1. Жирнокислотный состав липидов суспензии хлоропластов и полученных из нее микродоменов (% от суммы ЖК)

Жирная кислота	Хлоропласты	Зона 1	Рафты
C14:0 , миристиновая	0.7 [0.7; 1]	3 [3; 3.7]*	5.9 [5.4; 5.9]*
C15:0 , пентадекановая	0.2 [0.2; 0.4]	0.7 [0.6; 0.8]*	1.4 [1.3; 1.5]*
C16:0 , пальмитиновая	19.2 [19.1; 27.7]	33.7 [33.3; 35]	47.3 [46; 48]*
C16:1(n-9) , пальмитолеиновая	0.2 [0.2; 0.2]	0.7 [0.6; 0.8]*	1.7 [1.5; 1.8]*
C16:1(n-7) , пальмитолеиновая	0.2 [0.2; 0.3]	0.6 [0.6; 0.6]*	
C16:1(n-5) , пальмитолеиновая	1.4 [1.3; 1.6]	0.4 [0.4; 0.4]*	
C17:0 , маргаритовая	0.2 [0.2; 0.3]	0.5 [0.5; 0.5]*	0.8 [0.7; 0.9]*
C18:0 , стеариновая	3 [3; 4]	11.8 [11.6; 12.3]*	16.8 [16.6; 17.7]*
C18:1(n-9) , олеиновая	2.5 [2.5; 2.9]	9 [7.9; 9.2]*	8.4 [7.7; 8.4]*
C18:1(n-7) , <i>цис</i> -вакценовая	1 [1; 1.1]	1.3 [1.2; 1.4]	0.6 [0.5; 0.7]*
C18:2(n-6) , линолевая	14.6 [12.5; 15.1]	6.3 [6.2; 6.3]*	3.2 [3.1; 3.7]*
C18:2(n-4)	0.4 [0.3; 0.5]		
C18:3(n-3) , α -линоленовая	52 [43.7; 52.1]	18.4 [18.1; 20.1]*	6.3 [6.1; 6.5]*
C18:4(8.11.14.17)	2.6 [2.0; 2.7]		
C20:0 , арахидовая	0.5 [0.4; 0.6]	4.6 [4.3; 4.6]*	2.9 [2.9; 3]*
C20:1(n-9) , эйкозеновая	0.1 [0.1; 0.2]		
C20:3(7.14.17)	0.2 [0.2; 0.3]		
C22:0 , бегеновая	0.8 [0.8; 0.9]	8.3 [7.5; 8.4]	5.2 [5.2; 5.4]*
Σ НЖК	24.4 [24.3; 34.7]	63.5 [62.9; 63.6]*	79.8 [79.5; 80.6]*
Σ ННЖК	75.6 [65.3; 75.8]	36.5 [36.5; 37.1]*	20.2 [19.5; 20.5]*

Примечание: $n = 3-5$. Ме [25 процентиль – 75 процентиль], * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью метода Н-критерия Краскела–Уоллиса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Если сравнить исследуемые зоны с фракцией хлоропластов, то в них отсутствовали такие ЖК, как C18:2(n-4), C20:1(n-9), C20:3(7.14.17).

В настоящее время показано, что стеринны являются одним из основных классов рафтообразующих липидов микродоменов хлоропластов [6]. Полученные нами результаты показали, что сумма общих стериннов (свободные стеринны + эфиры стериннов) в опалесцирующих зонах больше чем в мембранах, из которых они получены (табл. 2).

Причем опалесцирующая зона 1 и зона рафтов мало отличались по сумме общих стериннов. Интересно, что сумма эфиров стериннов обеих опалесцирующих зон находилась на одном уровне – 9 мкг/мг общих липидов. В мембранах хлоропластов сумма эфиров стериннов была в 3 раза ниже – 3.96 мкг/мг суммарных липидов. Известно, что эфиры стериннов играют основную роль в гомеостазе стериннов [25], регулируют уровень как свободных стериннов, так и незаменимых жирных кислот в различные периоды онтогенеза [26].

Таблица 2. Содержание свободных стерина (СС) и эфиров стерина (ЭС) суспензии хлоропластов и полученных из нее микромоменов, мкг/мг общих липидов

Стерины	Хлоропласты		Зона 1		Рафты	
	СС	ЭС	СС	ЭС	СС	ЭС
Холестерин	0.28 ± 0.1	0.37 ± 0.15	0.69 ± 0.17*	0.89 ± 0.17**	0.74 ± 0.11*	0.9 ± 0.22**
Кампестерин	0.77 ± 0.08	0.28 ± 0.11	0.79 ± 0.14	0.67 ± 0.06**	0.61 ± 0.07	0.56 ± 0.03**
Стигмастерин	0.41 ± 0.1	0.19 ± 0.05	0.6 ± 0.12*	1.63 ± 0.23**	1.25 ± 0.37*	1.83 ± 0.62**
β-ситостерин	9.82 ± 1.3	3.12 ± 1.28	8.24 ± 0.53*	5.95 ± 1.06**	6.15 ± 0.38*	5.9 ± 0.52**
Σ	11.28 ± 1.35	3.96 ± 1.43	10.32 ± 0.56	9.14 ± 1.16*	8.76 ± 0.48*	9.19 ± 0.22**
СС + ЭС	15.52 ± 3.21		19.32 ± 0.14***		18.74 ± 2.04	

Примечание: * – значимость различий по сравнению с СС хлоропластов, ** – значимость различий по сравнению с ЭС хлоропластов, *** – значимость различий по сравнению с СС + ЭС хлоропластов. $M \pm S.D.$, $n = 3-5$. значимость различий рассчитана с помощью метода LSD Фишера. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Свободные стерин – это интегральные компоненты мембранного липидного бислоя, которые взаимодействуют с некоторыми молекулярными видами фосфо- и сфинголипидов. Преобладающими мембранными стеринами высших растений являются Δ^5 -стерины: β-ситостерин, кампестерин и стигмастерин, показано также наличие холестерина [27]. Аналогичный спектр стерина наблюдался в мембранах хлоропластов пшеницы и полученных из них опалесцирующих зонах (табл. 2). В этих зонах, как и в самих мембранах, доля β-ситостерина была выше по сравнению с другими стеринами. Известно, что β-ситостерин как и кампестерин, может регулировать текучесть и проницаемость мембран путем взаимодействия с насыщенными алкильными цепями фосфолипидов и сфинголипидов, ограничивая их подвижность [28]. В обеих опалесцирующих зонах стигмастерин занимал второе место по содержанию после β-ситостерина. В зоне рафтов стигмастерина было больше, чем в зоне 1 (табл. 2). В микромоменах хлоропластов галофитов также были идентифицированы β-ситостерин, стигмастерин, холестерин и ряд компонентов, определение которых требует дополнительных исследований. Однако среди обнаруженных стерина доминировал стигмастерин – 38%, доля β-ситостерина составила 25%, холестерина – 6% [29]. По сравнению с β-ситостерином, стигмастерин имеет дополнительную двойную связь при C22 в боковой цепи, что делает алкильную цепь менее гибкой из-за жесткости двойной связи и, следовательно, влияет на встраивание и размещение стигмастерина в липидном бислое. Экспериментально доказано, что встраивание стигмастерина между динасыщенными и мононенасыщенными цепями ЖК приводит к меньшей упорядоченности бислоя, чем встраивание β-ситостерина [28].

Детальный анализ рафтообразующих липидов растений выявил не только наличие стерина, но и наличие двух классов сфинголипидов – гликозил-церамидов и гликозилинозитолфосфоцерамидов [27]. В мембранах хлоропластов галофитов цереброзиды занимают 3% от количества мембранных липидов, в рафтах хлоропластов цереброзидов также немного – 7% от общих липидов [22]. Эти данные показывают, что для рафтов хлоропластов галофитов цереброзиды не являются основным рафтообразующим липидом. В дальнейшем мы планируем провести подробный липидный анализ исследуемых зон.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что в мембранах хлоропластов пшеницы присутствуют два типа рафтовых структур, выявляемых в разных зонах сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования в виде зон опалесценции. Этот вывод основан на результатах анализа состава липидов и жирных кислот.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН № 0277-2022-0005 с частичным использованием средств гранта Президента МК-666.2020.11 на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгополова Н.В., Скрипин В.А., Шершнева О.М., Алябьева Ю.В. 2009. Значение озимой и яровой пшеницы в производстве продуктов питания. *Вестник КГСХА*. **5**, 52–56.
2. Петров Н.Ю., Онищенко Н.С. 2012. Фотосинтетическая деятельность и продуктивность сортов озимой пшеницы в зависимости от применяемых био-препаратов. *Вестник АГСХА*. **10** (96), 23–25.
3. Антипина О.В., Астахова Н.В., Попов В.Н., Селиванов А.А. 2015. Изменение ультраструктурной организации хлоропластов растений табака и арабидопсиса в связи с формированием устойчивости к гипотермии. *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования*. **11**, 188–192.
4. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. 2019. pH-зависимая регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах *in situ* и *in silico*. *Биол. мембраны*. **36** (4), 242–254.
5. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. 2021. Структурно-функциональные аспекты терморегуляции электронного транспорта и синтеза АТФ в хлоропластах. *Биохимия*. **86** (1), 109–124.
6. Rozentsvet O., Nesterkina I., Ozolina N., Nesterov V. 2019. Detergent-resistant microdomains (lipid rafts) in endomembranes of the wild halophytes. *Functional Plant Biology*. **46**, 869–876.
7. Klimenko E.S., Nesterkina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Koulintchenko M.V., Konstantinov Y.M. 2020. Tonoplast rafts stimulate DNA import into the mitochondria of potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. **14** (4), 351–354.
8. Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Spiridonova E.V., Tretyakova A.V. 2021. Protective function of lipid rafts. *Casp. J. Environ. Sci.* **19** (4), 685–690.
9. Rozentsvet O.A., Bogdanova E.S., Nurminsky V.N., Nesterov V.N., Chernyshov M.Yu. 2023. Detergent-resistant membranes in chloroplasts and mitochondria of the halophyte *salicornia perennans* under salt stress. *Plants*. **12** (6), 1265.
10. Kapustina I.S., Ozolina N.V., Gurina V.V., Spiridonova E.V., Bobkova V.A. 2021. Study of the composition of the sterols of wheat chloroplast rafts. *Vidyabharati International Interdisciplinary Research Journal. Special Issue on "Engineering Technologies and Management"*. **8**, 1180–1184.
11. Розенцвет О.А., Кособрюхов А.А., Богданова Е.С., Нестеров В.Н. 2019. Дневная динамика структурно-функциональных параметров фотосинтетического аппарата галофитов дикой флоры. *Физиология растений*. **66** (6), 431–440.
12. Филиппова Г.Г. 2017. *Фотосинтез: методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов биологического факультета*. Минск: БГУ. 40 с.
13. Нестеров В.Н., Нестеркина И.С., Розенцвет О.А., Озолина Н.В., Саяев Р.К. 2017. Обнаружение липид-белковых микродоменов (рафтов) и изучение их функциональной роли в хлоропластных мембранах галофитов. *ДАН*. **476** (3), 350–352.
14. Folch J., Sloan Stanley G.H., Lees M. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
15. Кейтс М. 1975. *Техника липидологии*. М.: Мир. 322 с.
16. Нестеркина И.С., Гурина В.В., Озолина Н.В., Нурминский В.Н. 2019. Изменение содержания стерина тонопласта при осмотическом стрессе. *Биол. мембраны*. **36** (4), 301–304.
17. Christie W.W. 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Adv. Lipid Methodol.* **2**, 69–111.
18. Гланц С. 1999. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика. 459 с.
19. Mongrand S., Stanislas T., Bayer E.M., Lherminier J., Simon-Plas F. 2010. Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci.* **15**, 656–663.
20. Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J., Blein J., Simon-Plas F. 2006. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell. Proteomics*. **5** (8), 1396–1411.
21. Радюхин В.А., Баратова Л.А. 2020. Молекулярные механизмы формирования рафтов биологических мембран. *Биорг. химия*. **46** (3), 227–238.
22. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н. 2021. Рафтообразующие липиды мембран митохондрий и хлоропластов галофита *Halocnemum strobilaceum*. *Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии*. **30** (3), 66–71.
23. Жуков А.В. 2015. Пальмитиновая кислота и ее роль в строении и функциях мембран растительной клетки. *Физиол. растений*. **62** (5), 751–760.
24. Жуков А. В. 2018. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов. *Физиол. растений*. **65** (6), 418–437.
25. Ferrera A., Altabella T., Arróa M., Boronat A. 2017. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progr. Lipid Research*. **67**, 27–37.
26. Девятловская А.Н., Журавлёва Л.Н. 2010. Динамика содержания стерина в анатомических частях березы бородавчатой. *Вестник КрасГАУ*. **6**, 89–93.
27. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерин: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия*. **18**, 1050–1068.
28. Grosjean K., Mongrand S., Beney L., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot P. 2015. Differential effect of plant lipids on membrane organization: Specificities of sphingolipids and phytosterols. *J. Biol. Chem.* **290** (9), 5810–5825.
29. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н. 2021. Особенности липидного профиля детергентустойчивых мембран митохондрий и хлоропластов эукариоты *Halocnemum strobilaceum*. *Химия природ. соедин.* **5**, 696–699.

Characteristics of Membrane Structures of Wheat Chloroplasts

I. S. Kapustina¹, V. V. Gurina¹, E. V. Spiridonova¹, *, N. V. Ozolina¹

¹*Federal State Budgetary Institution of Science Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

**e-mail: yatakol@mail.ru*

When studying the raft structures of wheat chloroplast membranes, previously identified in the 15% sucrose zone after high-speed centrifugation, an additional opalescence zone was found in the 5% sucrose region. Analysis of the composition of sterols and fatty acids of lipids in this zone in comparison with the zone of rafts and chloroplast membranes showed that raft structures may also be present in this zone. This suggests that wheat chloroplast membranes may contain two types of raft structures.

Keywords: chloroplasts, rafts, fatty acids, sterols