

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY MEETING

in LOS ANGELES

- California -

March, 28 - April, 2
1971

Short comment, by Jean-Claude AUTRAN and Albert BOURDET

(Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, 16, rue Nicolas Fortin, Paris 13^e, FRANCE)

Improved Electrophoretic Fractionations

of Wheat Histones

Information about plant histones are relatively limited compared with our knowledge concerning those from animal origin. For wheats particularly, only histones of the embryo have been studied. The present paper reports attempts to compare histones isolated from wheat germ, wheat endosperm and calf thymus, and to differentiate several wheat types.

Nucleohistone was isolated from these materials, by differential salt extraction, according to MIRSKY and POLLISTER's procedure.

Nucleohistone was purified through precipitations and redissolutions in saline medium 0, 14 M and 1 M respectively, and the basic protein fractions apparently associated with DNA, namely histones, were then extracted by dilute hydrochloric acid.

Wheat germ nucleohistones thus isolated and the classical calf thymus deoxyribonucleoprotein have similar compositions: 40% DNA, 45% histone and 15% residual protein, giving a histone/DNA ratio of about 1,1.

The different histones isolated by acid way, then dialysed and freeze-dried, were fractionned by electrophoresis. As seen on figure 1, the use of starch as support gives a rather poor resolution

- (1) calf thymus histone
- (2) wheat flour histone
- (3) wheat germ histone.

Consequently, further experiments used preferentially polyacrylamide gel as support.

The procedure used is that of PANYIM and CHALKLEY with some modifications about methylene-bis-acrylamide and gel slabs preparation. The final medium is 15% in acrylamide, 6,25 M urea and pH 3,2.

This technique gives high resolution of histones and shows important qualitative differences between calf thymus and wheat histones. See figure 2:

- (1) wheat flour histone
- (2) calf thymus histone
- (3) wheat germ histone

The preparations from calf thymus give five or six bands, corresponding to the main classical fractions F1, F2(a)1, F2(a)2, F2(b) and F3. Comparatively, the wheat histones ^{seem} ~~can~~ to be composed by nine or ten bands, most of which don't correspond to the calf thymus ones.

Furthermore, identification of the fractions was made easier by the particular staining property of amidoblack for histones which appeared dark-blue, green-blue or turquoise according to the considered band.

On the other hand (figure 2), germ (3) and flour (1) histones from the same wheat variety show very large similarity. Few differences appeared also when germ histones from several selected types of wheat are compared.

See figure 3:

- | | | |
|-------------|------------|----------------------|
| (1) variety | Cappelle) | |
| (2) " | Capitole) | French soft wheats |
| (3) " | Lakota) | U.S. durum |
| (4) " | Conley) | |
| (5) " | Selkirk) | U.S. hard red spring |
| (6) " | Triumph) | U.S. Hard red winter |

French soft wheats (1) and (2) give a single slow band, when durum (3) shows two slow bands and weaker fast fractions. Histones from American hard wheat types (4), (5), (6), appear rather intermediate between French soft wheats and durum types.

In conclusion, it seems unlikely to identify wheat varieties on the basis of their total histones. However, better information would perhaps be obtained when considering only the most specific fractions (lysine rich) of histone and improving this study by immunochemical data. But for lack of such results, we do think that the electrophoretic fractionation of gliadins offers the best way for differentiating wheat varieties.

It appears finally that if wheat histone fractionation is not a convenient analytical tool for genetic studies, it offers interesting prospects in wheat and plant physiology.



Figure 1.

Référence cahier E 91



Figure 2

- 1 - Histone d'albumen de blé
- 2 - Histone de thymus de veau
- 3 - Histone de germes de blé

Référence F 43

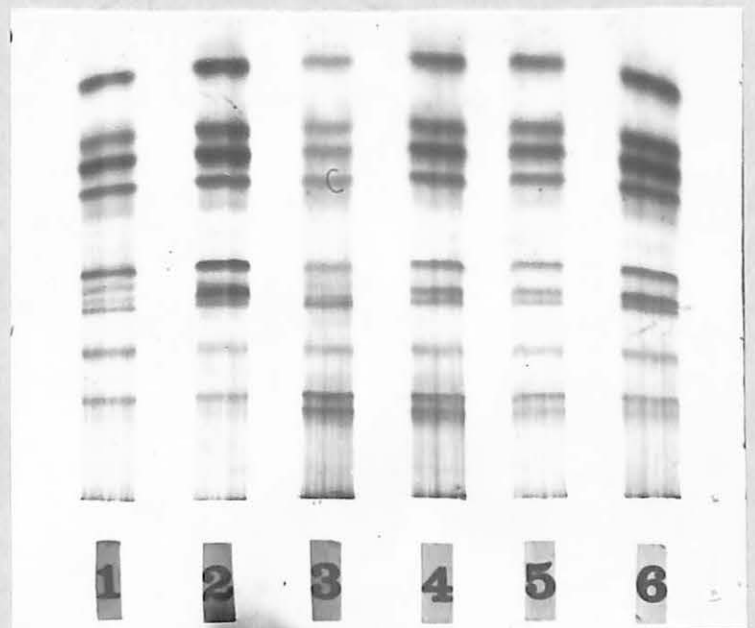


Figure 3: Histones de germes des variétés suivantes :

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1 - Caille | } blés tendres français |
| 2 - Capitale | |
| 3 - Lakota : durum | } U.S. |
| 4 - Conley HRS | |
| 5 - Selkirk HRS | |
| 6 - E. Triumph HRW | |

Référence F 42

American Chemical Society meeting in LOS ANGELES. California.

28 Mars - 2 Avril 1971.

Communication de MM. Jean-Claude AUTRAN et Albert BOURDET (Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés. I.N.R.A. 16 rue Nicolas-Fortin PARIS 13^e)

CONSTITUTION ELECTROPHORETIQUE DES HISTONES DE DIFFERENTS TYPES DE BLES.

Peu d'histones végétales ont été étudiées. Chez le blé, on ne connaît surtout que les histones de l'embryon. Le travail rapporté ici se propose de comparer les histones isolées de germe de blé, d'albumen de blé et de thymus de veau, d'une part, les histones de germes de différents types de blés, d'autre part.

A partir de ces matériels, la nucléohistone a été isolée à l'aide du procédé d'extraction saline différentielle, par NaCl 0,14 M et 1 M, de MIRSKY et POLLISTER.

De la nucléohistone purifiée par précipitations et redissolutions en milieux salins respectivement 0,14 M et 1 M, il a été possible d'extraire à l'aide d'un acide dilué, les fractions basiques des protéines apparemment associées à l'ADN, c'est-à-dire les histones.

Les nucléohistones isolées de germes de blé ont des compositions voisines de celles des désoxyribonucléoprotéines classiques de thymus de veau: 40% d'ADN, 45% d'histone, 15% de protéine résiduelle acide et donc un rapport histone/ADN voisin de 1,1.

Les histones de ces différents matériels, ainsi isolées par voie acide puis dialysées et lyophilisées ont été soumises à un fractionnement. L'électrophorèse en gel d'amidon (cliché 1. : (1) histone de thymus de veau (2) histone d'albumen de blé; (3) histone de germes de blé) n'ayant jamais donné de diagramme idéal, le procédé d'électrophorèse en gel de polyacrylamide a été utilisé de préférence.

La technique employée est inspirée de celle de PANYIM et CHALKLEY avec des modifications portant sur la teneur en méthylène bis-acrylamide et les conditions de préparation du gel, permettant l'électrophorèse en plaques. Le gel obtenu est à 15% d'acrylamide, 6,25M urée et pH 3,2.

Ce procédé de fractionnement a permis de révéler de très importantes différences qualitatives entre les histones isolées du thymus de veau et du blé (cliché 2. : (1) histone de farine de blé; (2) thymus de veau; (3) germes de blé.). Celle de thymus comporte 5-6 bandes correspondant aux principales fractions classiques: F1, F2(b), F2(a)2, F3 et F2(a)1. Celles de blé semblent constituées de 9-10 fractions dont la plupart ne correspondent pas à celles de l'histone de thymus. De plus, le complexe formé par l'amido-schwarz et les histones prend une coloration bleu foncé, bleu-vert ou turquoise selon la bande considérée, ce qui pourrait contribuer à une meilleure identification des fractions.

Par contre (cliché 2), les histones isolées de germes et d'albumen de blé d'une même variété, ne présentent pas de différences significatives.

De même, si l'on examine les histones isolées de germes de différents types de blés: (cliché 3 : de gauche à droite:

1 - variété	Cappelle	}	blés tendres	
2 - "	Capitole		français.	
3 - "	Lakota		durum U.S.	
4 - "	Conley		H.R.S.	U.S.
5 - "	Selkirk		H.R.S.	U.S.
6 - "	E. Triumph		HRW	U.S.)

on ne décèle pas de différences fondamentales. On peut tout au plus signaler que le blé durum (3) possède une forte double bande lente et de faibles fractions rapides. Les blés tendres français possèdent au contraire, (1) et (2), de fortes fractions rapides et une seule bande lente. Les 2 blés américains analysés (4), (5) et (6) semblent plutôt intermédiaires des types précédents.

Il ne semble donc pas que les histones totales isolées des germes de blés présentent des différences suffisantes pour permettre l'identification spécifique des variétés de blés cultivés actuellement. On pourrait alors penser à ne considérer que les seules fractions les plus spécifiques de l'histone (fractions riches en lysine) et à compléter leur étude par des analyses immunochimiques. Mais, dans l'ignorance des conclusions qu'une telle étude apporterait, nous pensons que la constitution des protéines du type "gliadines" est actuellement le meilleur moyen d'identification des variétés de blés.

Signalons enfin que si le fractionnement des histones tel que nous l'avons décrit, semble mal se prêter à l'étude de facteurs génétiques, il permet par ailleurs d'intéressantes conclusions à partir de l'étude de phénomènes physiologiques.

XXXXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX

Dr. G.E. INGLETT, Chief
Cereal Properties Laboratory
USDA - ARS
Northern Utiliz. Res. Div.
1815, North University Str.
PEORIA (QIL1. 61.604)

3 Mars 1971

Cher Docteur INGLETT,

Je vous prie de bien vouloir trouver ci-inclus le texte de la communication de 5 minutes sur "La Constitution électrophorétique des histones de différents types de blé", que mon collaborateur J-C AUTRAN et moi-même souhaiterions voir présenter au Symposium sur les "Seed Proteins", qui se déroulera du 28 mars au 2 avril prochain à Los Angeles, California.

La présentation de cette communication doit être assurée par notre collègue M. BAUDET, qui a été désigné par l'Institut National de la Recherche Agronomique pour se rendre à Los Angeles.

J'espère que le léger retard apporté dans la transmission de ce texte ne compromettra pas sa présentation, et je vous en remercie à l'avance.

Au cas où il serait nécessaire de vous en adresser la traduction en anglais, ayez l'obligeance de me le faire savoir.

Veillez agréer, cher Docteur INGLETT, l'expression de mes sentiments les meilleurs.

A. BOURDET
Directeur du Laboratoire

P.S. - 1 texte et 3 photos

WXXXXXXXXXX

XXXXXX

Monsieur BAUDET
Directeur de Recherches
LABORATOIRE DES PROTEINES
C.N.R.A.
Route de St-Cyr
78- VERSAILLES

19 Mars 1971

Messieurs,

Suite à votre récente conversation téléphonique, j'ai l'honneur de vous transmettre le texte de la communication que M. BOURDET et moi-même souhaiterions voir présentée au Symposium sur les "Seed Proteins" à Los Angeles.

Je vous prie de bien vouloir trouver ci-inclus les trois clichés et leur présentation en diapositives qui doivent, en principe, illustrer notre texte.

En vous remerciant à l'avance pour ce surcroît de travail que vous avez eu l'obligeance d'accepter, recevez, Monsieur, l'expression de mes sentiments dévoués.

J-CI. AUTRAN
Assistant de Recherches

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE
NORTHERN, UTILIZATION RESEARCH AND DEVELOPMENT DIVISION
1815 NORTH UNIVERSITY STREET
PEORIA, ILLINOIS 61604

March 17, 1971

AIR MAIL

Dr. A. Bourdet
Directeur du Laboratoire
Ministere de l'Agriculture, I.N.R.A.
Laboratoire de Recherches
16, Rue Nicolas-Fortin
Paris 13^e, FRANCE

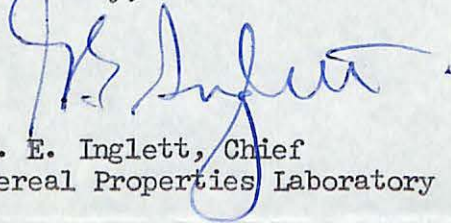
Dear Dr. Bourdet:

Thank you for your letter and comment of March 3. Your comment will make a good contribution to the symposium.

An appropriate time for Dr. Baudet to read your comment would be at 11:10 a.m., March 29, after J. W. Dieckert's presentation. (See enclosure).

With best wishes.

Sincerely,


G. E. Inglett, Chief
Cereal Properties Laboratory

cc:

Dr. Baudet

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE
NORTHERN UTILIZATION RESEARCH AND DEVELOPMENT DIVISION
PEORIA, ILLINOIS 61604

April 13, 1971

AIR MAIL

Dr. J. Baudet
Centre Nationale de Recherches Agronomiques
Station Centrale de Physiologie Vegetale
Etoile de Choisy
Route de St. Cyr
78 Versailles, FRANCE

Dear Dr. Baudet:

My sincere thanks for your participation in the Seed Protein Symposium. You did your organization and the other two laboratories (Station de Biochimie et Physico-Chimie des Cereales and Laboratoire de Recherches sur la Qualite des Bles) a wonderful tribute in projecting some of their research activities before the symposium.

You will find enclosed your comment for publication wherever you desire.

I am looking forward to seeing you again in Paris on April 26.

With kindest regards.

Sincerely,

G. E. Inglett, Chief
Cereal Properties Laboratory

cc:

Dr. J. Mossé
Dr. A. Guilbot
✓ Dr. A. Bourdet