

## Effet du zinc sur la germination et la composition biochimique du lin oléagineux (*Linum usitatissimum* L.)

Imène BEN SALAH<sup>1</sup>, Héla MAHMOUDI<sup>1</sup>, Améni SMAOUI<sup>1</sup>, Sana MDIMAGH<sup>2</sup>, Zeineb OUERGHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Productivité Végétale et Contraintes Environnementales, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar 2092, Tunis, Tunisie

<sup>2</sup> Laboratoire des Grandes Cultures, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, INRAT, 1004 El Menzah, Tunis, Tunisie, Université de Carthage.

---

### Abstract:

**Background:** La contamination des sols par des métaux lourds toxiques présente une menace pour l'agriculture mais aussi un problème de plus en plus important dans le monde pour des raisons écologiques, nutritionnelles et environnementales. Le zinc qui est un oligoélément nécessaire pour favoriser une croissance et un développement normaux. Mais lorsqu'il est présent à des teneurs élevées dans le sol, il devient toxique et peut causer la mort des plantes. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du zinc sur la germination et la croissance végétative précoce du lin oléagineux (*Linum usitatissimum* L.) à travers l'analyse de données physiologiques et biochimiques.

**Materials and Methods:** Des grains sont mises à germer à l'obscurité à 25°C en présence de différentes concentrations de zinc (0,5, 1, 2, 4, 5 et 6 mM). Les paramètres physiologiques (taux de germination et croissance des plantules) et biochimiques (teneurs en sucres solubles et amidon, activités des enzymes antioxydantes, teneurs en molécules antioxydantes) ont été analysés.

**Results:** L'analyse des résultats ont révélé que la germination du lin n'est pas affectée par le zinc même à fortes doses (jusqu'à 6 mM) mais c'est plutôt la croissance de la racine qui est inhibée dès les faibles concentrations (0,5 mM de zinc). L'inhibition de la croissance de la racine par le zinc n'est pas la conséquence d'une limitation de l'approvisionnement en eau mais elle est plutôt liée à une altération du processus de mobilisation des réserves comme le montre la réduction de la teneur en sucres soluble totaux et l'accumulation de l'amidon, notamment en présence de fortes concentrations de zinc. L'étude de la réponse antioxydante chez les jeunes plantules de lin a montré que le zinc induit une peroxydation des lipides membranaires comme le témoigne l'accumulation de malondialdéhyde. En réponse au stress oxydatif, les plantules ont répondu par une stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes. Cette stimulation devient défailante notamment à forte dose de zinc (5 mM) suite à la réduction de l'accumulation de molécules antioxydantes.

**Conclusion:** La germination du lin n'est pas affectée par le zinc même à fortes doses. C'est plutôt la croissance de la racine qui était inhibée. Cette inhibition n'est pas la conséquence d'une limitation de l'approvisionnement en eau; elle serait liée à une altération du processus de mobilisation des réserves et aussi à une défaillance du système antioxydant.

**Key Word:** Germination, Malondialdéhyde, Molécules antioxydantes, Stress oxydatif.

---

Date of Submission: 14-11-2021

Date of Acceptance: 29-11-2021

---

### I. Introduction

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les ions métalliques. Les métaux lourds les plus préoccupants sont le cadmium, le cuivre et le zinc, puisque ces éléments sont dotés d'une mobilité importante dans le sol<sup>1</sup>. Le zinc est un micronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes<sup>2</sup>. Cependant à fortes doses, cet oligoélément devient toxique et inhibe la croissance de la racine et le développement de la partie aérienne suite à l'altération de l'activité mitotique et de la perturbation de la photosynthèse témoignée par une chlorose foliaire et aussi suite à l'altération de l'approvisionnement de la plante en nutriments essentiels tels que le fer, le cuivre et le magnésium<sup>3,4,5</sup>. Le présent travail, intègre des données physiologiques et biochimiques afin d'étudier l'effet de différentes concentrations de zinc sur la germination et la croissance précoce du lin oléagineux.

## II. Matériel et Méthodes

### Matériel végétal

La variété de lin (*Linum usitatissimum*) utilisée est « Matri ». Après désinfection avec l'eau de javel 5%, les grains sont mis à germer à l'obscurité à 25°C en présence de différentes concentrations de zinc (0.5, 1, 2, 4, 5 et 6 mM) dans des boîtes de pétri. Le pourcentage final de germination (PFG) est calculé comme suit : **PFG = (nombre de graines germées x 100) / nombre total de graines**. L'indice de vigueur (IV) est calculé selon la formule suivante : **IV = (Longueur de la radicule + longueur de l'hypocotyle) x PG**. A la récolte, les plantes sont séparées en radicule, hypocotyle et cotylédons dont la masse de matière sèche est estimée après un séjour 72 de h dans une étuve à 60°C. La teneur en eau est calculée par la différence entre la masse de matière fraîche (MF) et la matière sèche (MS), exprimée en ml d'eau par gramme de matière sèche (ml g<sup>-1</sup>MS).

### Extraction des protéines soluble, dosage des enzymes antioxydantes et des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La matière fraîche (1g) est broyée dans un tampon d'extraction contenant du phosphate de potassium (50 mM, pH 7.5), PVPP (5%), glycérol (5%), DTT (1 mM), EDTA (100 mM) avec un rapport masse/ volume (1/2). Une centrifugation est effectuée à 13 000 g à 4°C, pendant 20 min. Le surnageant obtenu contient les protéines solubles qui sont dosées selon la méthode de Bradford<sup>6</sup>. L'activité de la gaïacol peroxydase est déterminée selon la méthode de Srinivas et al.<sup>7</sup> et celle de la catalase selon la méthode de Cakmak et Marschner<sup>8</sup>. La méthode utilisée pour l'estimation *in vitro* de la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques est le dosage du TBARS par la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA)<sup>9</sup>.

### Extraction et dosage des composés phénoliques, flavonoïdes et activités antioxydantes totales

L'extraction et le dosage des composés phénoliques sont réalisés selon les méthodes décrites par Mau et al.<sup>10</sup> et Zhishen et al.<sup>11</sup>, respectivement. L'activité antioxydante totale des composés phénoliques est mesurée selon la méthode de Prieto et al.<sup>12</sup>.

### Extraction et dosage des sucres solubles totaux (SST)

La matière fraîche est extraite dans l'éthanol 80% (v/v) à l'ébullition. Les sucres solubles totaux sont dosés selon la méthode à l'anthrone<sup>13</sup>. Le culot obtenu après extraction des SST est utilisé pour le dosage de l'amidon selon la méthode à l'anthrone<sup>14</sup>.

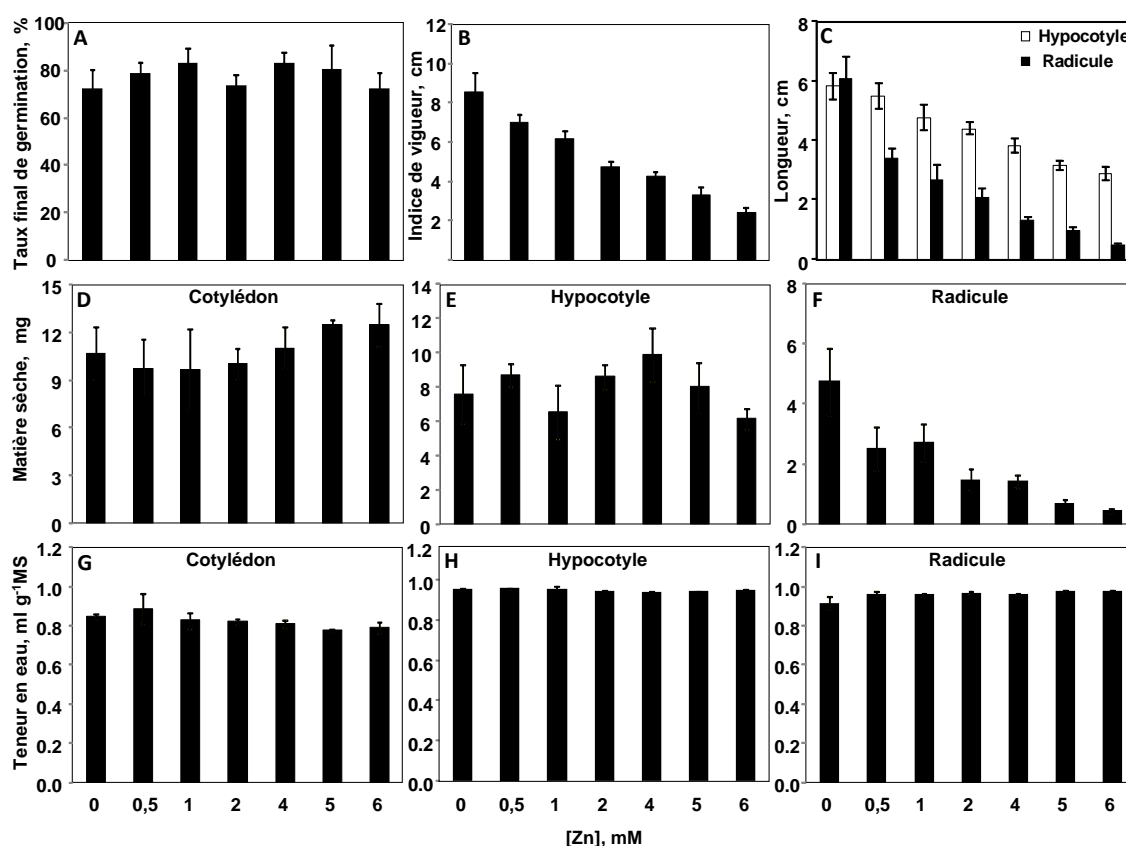
### Analyse statistique

L'analyse de la variance est utilisée pour l'analyse statistique des données. En cas de différences significatives au seuil de 5%, le test Fisher est effectué.

## III. Résultat

### Effet du zinc sur la germination et la croissance précoce du lin oléagineux

Les résultats révèlent que le taux final de la germination n'est pas modifié même en présence de fortes concentrations de zinc (Figure 1A). Au contraire, l'indice de vigueur (paramètre qui renseigne sur la qualité de la germination) montre une réduction dès 0.5 mM de zinc; Cet effet est accentué davantage aux concentrations élevées de zinc (Figure 1.B) pour atteindre 70 % en présence de la concentration 6 mM. En outre, la présence de zinc entraîne une réduction de la longueur de l'hypocotyle et de la radicule (Figure 1C). L'effet dépressif des différentes concentrations de zinc est plus marqué dans le cas de la radicule. La réduction de la longueur par la concentration 6 mM est de l'ordre de 50 et 90 % dans le cas de l'hypocotyle et de la radicule, respectivement. Par ailleurs, les résultats montrent que la matière sèche des cotylédons ainsi que celle de l'hypocotyle n'est pas affectée par la présence de différentes concentrations de zinc contrairement à la radicule qui montre une réduction même en présence de la plus faible dose de zinc (0.5 mM); cette réduction est d'autant plus importante que la concentration de zinc est élevée et atteint 90% en présence de 6 mM de zinc (Figure 1D,E,F). Concernant la teneur en eau (Figure 1 G,H,I), ce paramètre reste inchangé au niveau des trois parties de la plantule.



**Figure 1.** Effet de différentes concentrations de zinc (0, 0,5, 1, 2, 4, 5 et 6 mM) sur le pourcentage final de germination (A) et l'indice de vigueur (B) des graines de lin, sur la longueur de l'hypocotyle et de la radicule (C), la masse sèche (D, E, F) et la teneur en eau (G,H,I) des cotylédons, hypocotyle et radicule, respectivement. Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$  ( $n=4$ ).

#### Effet du zinc sur les paramètres biochimiques

Les résultats montrent que la teneur en SST reste inchangée par la présence de 1 mM de zinc alors qu'elle est réduite de 40% chez les plantules en présence de 5 mM. Parallèlement, la teneur en amidon augmente 3.5 et 5 fois en présence de 1 et 5 mM, respectivement (Tableau 1).

**Tableau 1.** Effet de différentes concentrations du zinc (0, 1 et 5 mM) sur les teneurs en sucres solubles totaux (SST, mg glucose/g MS), en amidon (mg glucose/g MS), polyphénols totaux (PPT, mg EAG/g MS), Flavonoïdes (mg Eq catéchine/g MS), l'activité antioxydante totale (AAT, mg EAG/g MS), protéines ( $\mu\text{g/g}$  MF), malondialdéhyde (MDA, nmol/mg MF) et sur les activités des enzymes antioxydantes (U/mg protéines) peroxydase (POX) et catalase (CAT) des plantules de lin.

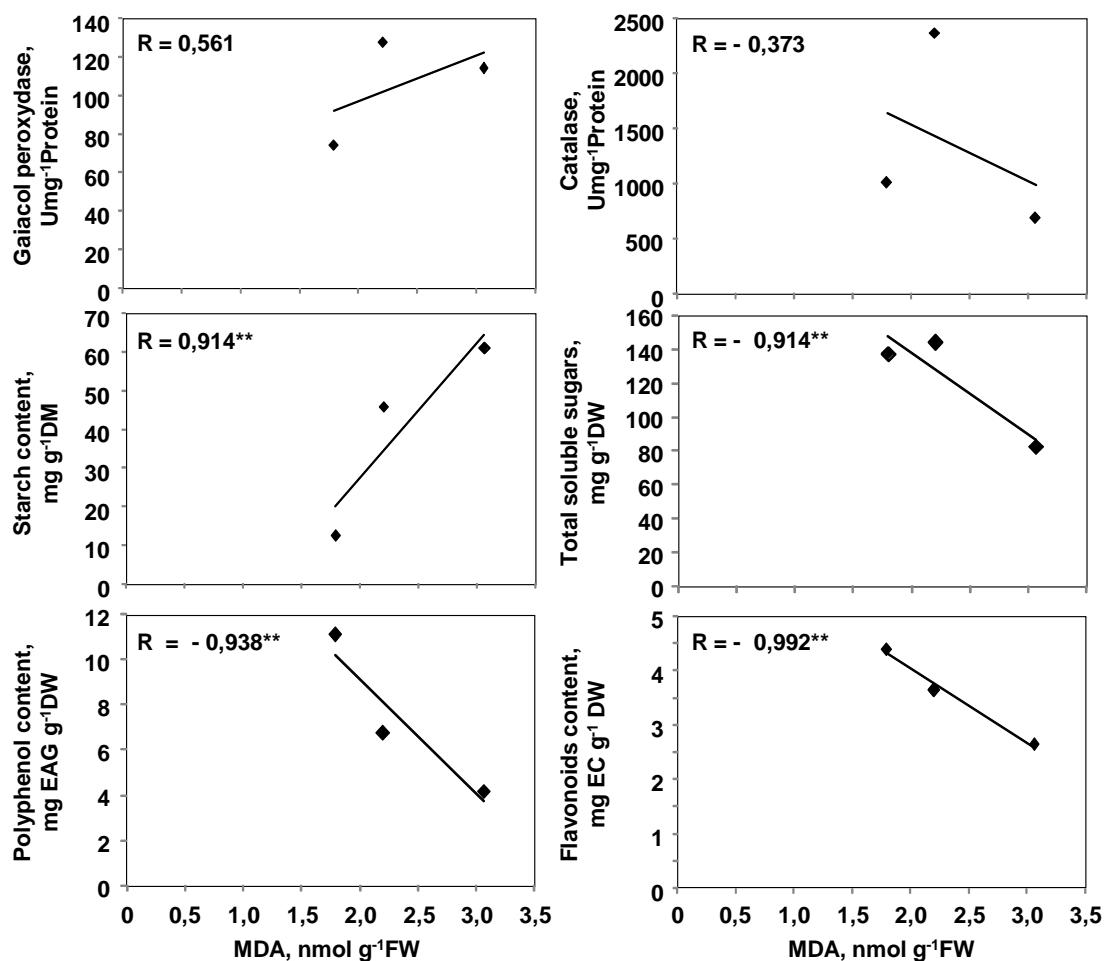
[Zinc], mM	0	1	6
SST	138±21a	144±10a	82±17b
Amidon	13±2c	46±4b	61±6a
PPT	11.1±0.8a	6.8±0.5b	4.2±0.2c
Flavonoïdes	4.4±0.2a	3.6±0.3b	2.6±0.2c
AAT	25.5±0.6a	24.8±1.7a	17.0±0.4b
Protéines	2.9±0.6a	2.2±0.1a	2.7±0.2a
MDA	1.8±0.0a	2.2±0.0b	3.0±0.1c
POX	74.7±19.7b	127.9±11.2a	114.4±7.7a
CAT	1009±57b	2361±513a	692±192c

Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0.05$  ( $n=3$ ).

Par ailleurs, le zinc réduit aussi les teneurs en composés phénoliques, la réduction étant plus importante dans le cas des polyphénols totaux. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante est maintenue en présence de 1 mM de zinc alors qu'elle est réduite de l'ordre de 35 % en présence de 5 mM de zinc (Tableau 1). Le zinc n'affecte pas la teneur en protéines même à forte dose. En outre, le contenu en TBARS

augmente de 120 et 170 % chez les plantules issues de la germination en présence de 1 et 5 mM de zinc, respectivement (Tableau 1).

Les résultats montrent aussi une augmentation de l'activité de la gaïacol peroxydase de l'ordre de 160 % en présence des deux concentrations de zinc. De même, l'activité de la catalase est stimulée par 1 mM de zinc de l'ordre de 250%. L'augmentation des activités antioxydantes en présence de zinc reste insuffisante pour minimiser l'accumulation d'espèces réactives d'oxygènes. Ceci se manifeste par l'augmentation du contenu en MDA avec l'augmentation de la dose du zinc. L'accumulation de MDA serait la conséquence de la réduction de la teneur en SST (et donc l'accumulation de l'amidon) et en molécules antioxydantes (polyphénols totaux et flavonoides) comme le montre la forte corrélation entre la teneur en MDA et les teneurs en SST, amidon, polyphénols totaux et flavonoides (Figure 2).



**Figure 2.** Relation entre la teneur en MDA, les activités de la gaïacol peroxydase et de la catalase et les teneurs en SST, amidon, polyphénols et en flavonoides chez des plantules de lin traitées ou non avec 1 et 5 mM de zinc.

#### IV. Discussion

L'ensemble de ces résultats montre que le zinc n'exerce pas son effet toxique durant le stade de la germination et prouve que la racine est plus sensible que la graine au stress métallique ce qui est en accord avec les résultats de Marichali et al.<sup>15</sup>. L'insensibilité du stade germinatif au zinc pourrait être expliquée par la présence de mucilage. En effet, les graines de lin ont la particularité de développer cette substance gélatineuse lors de la phase d'imbibition. Cette substance présente un rôle protecteur contre les effets néfastes des métaux lourds<sup>16</sup>. Par ailleurs, l'absence de modification de la teneur en eau des différentes parties de la plantule laisse supposer que l'inhibition de la croissance de la racine par le zinc ne serait pas la conséquence d'une limitation de l'approvisionnement en eau.

La diminution de la teneur en sucres solubles totaux au profit d'une accumulation d'amidon, notamment en présence de 5 mM de zinc suggère que la réduction de la croissance de la racine par le zinc pourrait être liée à l'altération du processus de mobilisation des réserves par les enzymes hydrolytiques. Ceci pourrait être lié à une inhibition des activités amylolytiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Gonçalves

et al.<sup>17</sup> qui ont observé une accumulation de TBARS chez le concombre. La présence de 5 mM de zinc entraîne une réduction de l'activité de la catalase de l'ordre de 30 % par rapport au témoin probablement suite à l'inhibition par le zinc comme le suggère Das et al.<sup>18</sup>. Nos résultats sont en accord avec d'autres études qui plaident en faveur de l'implication des osmolytes et des molécules antioxydantes dans la protection contre le stress oxydatif grâce à leurs capacités importantes à piéger les radicaux libres et à chélater les ions de transition.

## V. Conclusion

Au cours de notre étude, la réponse au zinc du lin oléagineux (*Linum usitatissimum* L.) est décrite au stade germinatif et à un stade précoce de la croissance végétative par des outils physiologiques et biochimiques. Les résultats ont révélé que la germination du lin n'est pas affectée par le zinc même à fortes doses (jusqu'à 6 mM de zinc) mais c'est plutôt la croissance de la racicule qui était inhibée dès les faibles doses de zinc (0.5 mM de zinc). Nos résultats montrent que l'inhibition de la croissance de la racicule par le zinc n'est pas la conséquence d'une limitation de l'approvisionnement en eau. L'effet dépressif du zinc sur la croissance serait lié à une altération du processus de mobilisation des réserves comme le montre la réduction de la teneur en SST et l'accumulation de l'amidon, notamment à fortes doses de zinc. L'étude de la réponse antioxydante chez les jeunes plantules de lin a montré que le zinc induit une peroxydation des lipides membranaires comme le témoigne l'accumulation de MDA. En réponse au stress oxydatif, les plantules ont répondu par une stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes (péroxydase et catalase). Cette stimulation devient défailleante notamment à forte dose de zinc (5 mM). Le stress oxydatif se trouve encore renforcé suite à la réduction de l'accumulation de molécules antioxydantes (polyphénols et flavonoïdes).

## References

- [1]. Wilson MJ, Bell N. Acid deposition and heavy metal mobilization. *Appl Geochem* 1996, 11: 133–7
- [2]. Shariatipour N, Alavikia SS, Vahed MM, Velu G, Heidari B. Foliar applied zinc increases yield, zinc concentration, and germination in wheat genotypes. *Agr J* 2020,112: 961-974
- [3]. Ali G, Srivastava PS, Iqbal M. Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monniera* cultures to zinc toxicity. *Plant Sci* 1999, 143: 187–193
- [4]. Michael PI, krishnaswamy M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environ Exp Bot* 2011, 74: 171– 177
- [5]. Osman HE, Al-Jabri M, El-Ghareeb DK, Al-Maroua YA. Impact of aluminum and zinc oxides on morphological characters, germination, metals accumulation and DNA in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). *J Saudi Soc. Agr Sc* 2020, 19: 510-520
- [6]. Bradford KJ. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions *Hort Sci* 1986, 21 : 1105-1112
- [7]. Srinivas ND, Rshami KR, Raghavarao KSMS. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochem* 1999, 35, 43–48
- [8]. Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxyde dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Pysiol* 1992, 98 : 1222-1227
- [9]. Hernandez JA, Almansa MS. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiol Plant* 2002, 115 : 251–257
- [10]. Mau JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci.* 2001 ; 6: 273- 278.
- [11]. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 1999, 64 : 555–559
- [12]. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E *Analytical biochem* 1999, 269: 337-341
- [13]. Yemm EW, Willis J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 1954; 57: 508–514
- [14]. Morris D. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science.* 1948; 107: 254–255.
- [15]. Marichali A, Dallali S, Ouerghemmi S, Sebei H, Casabianca H, Hosni K. Responses of *Nigella sativa* L. to zinc excess: focus on germination, growth, yield and yield components, lipids and terpenes metabolisms, total phenolics and antioxidant activities *J Agric Food Chem* 2016, 64 : 1664–1675
- [16]. Horst WJ, Wagner A, Marschner H. Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z Pflanzphysiol* 1982, 105 : 435 - 444
- [17]. Gonçalves JF, Becker AG, Cargnelutti D, Tabaldi AL, Pereira LB, Battisti V, Spanevello RM, Morsch VM, Nicoloso FT, Schetinger MRC. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings *Braz J Plant Physiol* 2007, 19: 223–232
- [18]. Das P, Samantary S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review *Environ Pollut* 1997, 98 : 29–36

Imène BEN SALAH, et. al. "Effet du zinc sur la germination et la composition biochimique du lin oléagineux (*Linum usitatissimum* L.)." *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 16(6), (2021): pp. 33-37.