

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun de Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



## THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Sciences de l'Environnement et Ecologie

Présentée par

**MAAMAR Benchohra**

**THEME :**

**Effets de l'Ozone troposphérique O<sub>3</sub> sur le comportement  
écophysiological de quelques espèces végétales : cas de deux  
variétés de tomate Rechaiga II et De Colgar *Solanum  
lycopersicum. L* et de peuplier *Populus nigra. L* .**

**Membres du jury :**

M DELLAL A.....	Prof, Univ.Tiaret .....	Président
M HELLAL B.....	Prof, Univ.Tiaret.....	Examineur
M HASNAOUI O.....	Prof, Univ.Saida.....	Examineur
M BORSALI M A.....	MCA, Univ.Saida.....	Examineur
M MAATOUG M.....	Prof, Univ.Tiaret.....	Directeur de Thèse
M IRITI M.....	Prof, Univ.Milan.....	Directeur de thèse l'étranger

**Année universitaire : 2016 – 2017**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministry of Higher Education  
And Scientific Research  
University Ibn Khaldoun of Tiaret  
Faculty of Science of Nature and Life



## THESIS OF DOCTORATE IN SCIENCE

Natural and Life Sciences

Specialty: Environmental Sciences and Ecology

Presented by  
**MAAMAR Benchohra**

### THEME:

**Effects of the tropospheric ozone O<sub>3</sub> on the ecophysiological behavior of some plant species: case of two varieties of tomato Rechaiga II and De Colgar *Solanum lycopersicum. L* and poplar *Populus nigra. L*.**

### Jury members:

M DELLAL A..... Prof, Tiaret. Univ ..... Chairman  
M HELLAL B..... Prof, Tiaret. Univ ..... Examiner  
M HASNAOUI O..... Prof, Saida. Univ ..... Examiner  
M BORSALI M A..... MCA,Saida. Univ ..... Examiner  
M MAATOUG M..... Prof, Tiaret. Univ ..... Supervisor  
M IRITI M..... Prof, Milan. Univ ..... Supervisor abroad

**Année universitaire : 2016 – 2017**



## ملخص:

تم تعريض صنفين من الطماطم *Solanum lycopersicum* رشايقة II و دي كولقار إلى تركيزات مختلفة من الأوزون التروبوسفيري (50، 80 و 100 ج م ب) في غرفة للتبخير لتقييم مدى حساسيتها والتحقق من تأثير الأوزون في بعض العوامل الفيزيولوجية. أظهرت النتائج أن صنف رشايقة حساس بشكل خاص للـ: O<sub>3</sub> بشكل خاص وفي مرحلة مبكرة من النمو، فكانت الاستجابة نموذجية في غضون 24 ساعة وهذا بعد التعرض لنبضة واحدة من الأوزون 50 ج م ب لمدة 4 ساعات على فترة 7 أيام. تبعت التجربة الأولى تجربة ثانية على نبات الحور *Populus nigra*، حيث كان تركيز الأوزون 30 ج م ب ولكن لمدة قاربت الشهر في غرفة تبخير خاصة ذات سقف مفتوح.

لقد عانت العوامل الفسيولوجية (تصرف خلايا الثغور، سلامة الغشاء، الكلوروفيل أ، ب و الكلي، الكاروتينات والسكريات القابلة للذوبان) من تغيرات متباينة بعد التعرض للـ: O<sub>3</sub>.

بينت النتائج أن صنف رشايقة حساس اتجاه الأوزون في ظل صنف دي كولقار مقاومة وبدون أعراض طيلة التجربة.

بالإضافة إلى ماسيق، فإن نبات الحور هو الآخر تبين أنه حساس اتجاه الأوزون، إذ ظهرت على أوراقه علامات حروق (نخر) نموذجية كما تأثرت العوامل الفسيولوجية هي الأخرى بدورها

## الكلمات المفتاحية

الأوزون، غرف التبخير، *Solanum lycopersicum*، *Populus nigra*، نخر، العوامل الفسيولوجية.

## Résumé

Deux cultivars de tomate *Solanum lycopersicum. L* Rechaiga II et tomate De Colgar, ont été exposés à des concentrations d'O<sub>3</sub> différentes (50, 80 et 100 ppb), dans une chambre de fumigation, afin d'évaluer leurs sensibilités et de vérifier quelques paramètres physiologiques. Les plantes du cultivar Rechaiga II sont apparus particulièrement sensibles à l'O<sub>3</sub> à un stade précoce de la croissance. Des réponses typiques des taches chlorotiques dans les 24 heures après l'exposition à une seule impulsion de 50 ppb pendant 4 h, pour une durée de 7 jours ont été enregistrées. Suivi d'une fumigation du peuplier *Populus nigra. L*, avec une dose 30 ppb pendant environ un mois dans chambre à ciel ouvert (*Open Top Chamber* « OTC »).

Les paramètres physiologiques enquêtés (conductance stomatiques, l'intégrité membranaires, la teneur en chlorophylle a, b, totale, caroténoïdes et en sucres solubles), ont subis des altérations suite à l'exposition dans les deux cas (tomate et peuplier).

La tomate Rechaiga II s'est avérée sensible à l'ozone, tandis que la tomate De Colgar a resté asymptotique (résistante) toute au long de l'expérience.

le peuplier, quant a lui aussi s'est avéré sensible envers l'ozone, ou la sensibilité se manifesta par l'apparition des taches nécrotiques et des dommages au niveau physiologique.

## Mots clés

L'ozone, chambres de fumigation, *Solanum lycopersicum. L*, *Populus nigra. L*, nécroses, paramètres physiologiques.

## **Summury**

Two cultivars of tomato *Solanum lycopersicum. L* Rechaiga II and De Colgar tomato, were exposed to different concentrations of O<sub>3</sub> (50, 80 and 100 ppb) in a fumigation chamber to assess their sensitivities and check some physiological parameters. The plants of the cultivar Rechaiga II appeared particularly sensitive to O<sub>3</sub> at an early stage of growth. Typical responses of chlorotic spots within 24 hours after exposure to a single pulse of 50 ppb for 4 hours, for a period of 7 days were recorded. Followed by Poplar fumigation *Populus nigra. L*, with a dose 30 ppb for about a month in Open Top Chamber "OTC".

Physiological parameters (stomatal conductance, the membrane integrity, chlorophyll a, b, total, carotenoids and soluble sugars), have suffered alterations due to exposure in both cases (tomato and poplar).

The Rechaiga II tomato proved to be sensitive to ozone, while the tomato De Colgar has remained asymptomatic (resistant) throughout the whole experiment.

Poplar, has also proved to be sensitive to ozone, the sensitivity manifested by the appearance of necrotic spots and damages on the physiological level.

## **Keywords**

Ozone, fumigation chambers, *Solanum lycopersicum. L*, *Populus nigra. L*, necrosis, physiological parameters.

# إهداء

إلى روح الوالدة رحمها الله

إلى الوالد العزيز أطال الله عمره وأدام عليه الصحة والعافية

إلى الإخوة والأخوات

إلى كل الأحبة والأصدقاء

## **Remerciements**

*Au premier lieu, mes profonds remerciements vont à Allah.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à M MAATOUG Mohamed pour m' avoir fait confiance et accepter de m'encadrer. Ainsi que pour son aide, sa disponibilité et ses conseils judicieux,*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à M DELLAL Abdelkader, pour avoir accepté de présider le jury,*

*Je n'oublie pas M HASNAOUI Okkacha et M BORSALI Mohamed A et M HELLAL Benchaben, qui ont bien voulu examiner et juger ce travail,*

*Mes remerciements vont aussi à M IRITI Marcello pour sa valeureuse aide, qu'il trouve ici ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier mes amies de la promotion.*

*Je tiens à remercier vivement les différentes personnes qui m'ont aidé tout au long de ce travail.*

*A tous et à toutes je dis, merci.*

## Liste des tableaux

<b>Le tableau N°1</b> : Les sources principales de pollution atmosphérique à différentes échelles. <b>Projet de PRQA en Alsace (2004).</b>	<b>10</b>
<b>Tableau N°2</b> : Résultats de trois tours de fumigation par l'Ozone sur les feuilles de <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.)	<b>33</b>
<b>Tableau N°3</b> : Analyse de variance entre l'effet dose et le pourcentage des nécroses.	<b>36</b>
<b>Tableau N°4</b> : Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques	<b>37</b>
<b>Tableau N°6</b> : Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques	<b>39</b>
<b>Tableau N°7</b> : Matrice de corrélations : paramètres physiologiques pourcentage de nécrose- doses.	<b>39</b>
<b>Tableau N°8</b> : Analyse de variance de l'effet dose sur les paramètres physiologiques.	<b>40</b>
<b>Tableau N°9</b> : Matrice de corrélation entre le nombre de jours et le pourcentage des nécroses.	<b>45</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> structure de l'atmosphère ( <b>Webmaster 01</b> ).	<b>4</b>
<b>Figure 2:</b> Cycle de l'Ozone troposphérique. ( <b>Jenkin et Clemisthaw, 2000</b> )	<b>15</b>
<b>Figure 3 :</b> Transplantation des plantules en pots (cliché : MAAMAR Benchohra, 2013).	<b>26</b>
<b>Figure 4 :</b> Chambre de fumigation utilisée lors de l'expérimentation (cliché : MAAMAR Benchohra, 2013).	<b>27</b>
<b>Figure 5 :</b> Les arbres de <i>Populus nigra</i> (cliché MAAMAR Benchohra, 2015)	<b>28</b>
<b>Figure 6 :</b> Chambre à ciel ouvert (cliché MAAMAR Benchohra, 2015)	<b>29</b>
<b>Figure 7 :</b> Fumigation de plantes (cliché MAAMAR Benchohra, 2015).	<b>29</b>
<b>Figure 8 :</b> Différents stades de développement des nécroses produites par l'Ozone produit par l'Ecobox sur les feuilles de tomate Rechaiga II	<b>34</b>
<b>Figure 9 :</b> Les étapes de calcul des pourcentages de blessures à l'aide de logiciel <i>Mesurim</i>	<b>34</b>
<b>Figure 10 :</b> pourcentages de nécrose en fonction des doses de l'Ozone troposphérique générées par l'Ecobox.	<b>35</b>
<b>Figure 11:</b> Pourcentages de nécrose en fonction des doses générées par l'Ecobox	<b>36</b>
<b>Figure 12 :</b> Distribution Normale des pourcentages de nécrose en fonction des doses de l'Ozone générée par l'Ecobox.	<b>37</b>
<b>Figure 13 :</b> l'évolution des paramètres physiologiques en fonction de la dose d'Ozone	<b>41</b>
<b>Figure 14 :</b> Différents stades de développement des nécroses produites par l'Ozone produit par l'Ecobox sur les feuilles du peuplier (cliché Maamar Benchohra, 2015)	<b>42</b>
<b>Figure 15 :</b> Les étapes de calcul des pourcentages de blessures à l'aide de logiciel <i>Mesurim</i> ( cliché Maamar Benchohra, 2015)	<b>43</b>
<b>Figure 16 :</b> Développement de la surface des nécroses en fonction du temps.	<b>44</b>
<b>Figure 17 :</b> Comparaison de la conductance stomatique des plantes fumigées avec le témoin.	<b>45</b>
<b>Figure 18 :</b> Comparaison de l'intégrité membranaire des plantes fumigées avec le témoin.	<b>46</b>
<b>Figure 19:</b> Comparaison des teneurs en chlorophylle a, b et T des plantes fumigées avec le témoin.	<b>47</b>
<b>Figure 20 :</b> Comparaison des teneurs en sucre solubles des plantes fumigées avec le témoin.	<b>48</b>

## Liste d'abréviations

**µg:** Microgramme  
**APPA:** Association Pour La Prévention De La Pollution Atmosphérique  
**Ar:** Argon  
**As:** Arsenic  
**atm:** Atmosphère  
**C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>:** Benzène  
**Cd:** Cadmium  
**CFC :** Chlorofluorocarbone  
**CH<sub>4</sub>:** Méthane  
**cm:** Centimètre  
**CO:** Monoxyde de carbone  
**CO<sub>2</sub>:** Dioxyde de carbone  
**COV:** Composés organiques volatils  
**COVNM:** Composés Organiques Volatils Non Métalliques  
**Cr:** Chrome  
**GPL :** Gaz pétrole liquéfié  
**Hab :** Habitant  
**HAM:** Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques  
**HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
**HC:** Hydrocarbures  
**HCFC :** Hydrochlorofluorocarbone  
**INERIS :** Institut National De L'environnement Industriel Et Des Risques  
**INRA:** Institut National De Recherches Agronomiques  
**INRS:** Institut National De Recherches Et De Sécurité  
**K:** Kelvin  
**KM:** Kilometer  
**Mbar:** Millibar  
**N<sub>2</sub>:** Diazote  
**N<sub>2</sub>O:** Pyroxyde d'azote  
**Ni:** Nickel  
**Nm<sup>3</sup> :** Nanomètre cube  
**No:** Oxyde d'azote  
**NO<sub>2</sub>:** Dioxyde d'azote  
**No<sub>x</sub>:** Les oxydes d'azote  
**O:** Oxygène  
**O<sub>2</sub>:** Dioxygène  
**O<sub>3</sub>:** Ozone  
**Oms :** Organisation Mondiale De La Sante  
**Ons :** Office National De Statistique  
**Pan :** Peroxyacylnitrate  
**Pb:** Plomb  
**Pm :** Poids Molaire  
**Pm:** Particule Minuscule  
**Ppa :** Plan De Protection De L'atmosphère  
**Ppb :** Partie Par Billion  
**Ppbv :** Partie Par Billion En Volume  
**Ppm :** Partie Par Million  
**Ppmv :** Partie Par Million En Volume  
**Prqa:** Plan Regional De La Qualite De L'air

**Ps:** Particules En Suspension

**RN :** Route nationale

**SO<sub>2</sub>:** Dioxyde De Soufre

**Srcae :** Schema Rhone Climat Air Energie

**Ubpa:** Un Bon Plan Pour L'air

**Uv:** Ultraviolet

**Zn:** Zinc.

## Table des matières

Liste des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières	
Introduction générale	

### Partie I

#### Chapitre 1. Généralités sur la pollution atmosphérique

1. L'atmosphère	4
2. Définition de la pollution atmosphérique	5
3. Sources de pollution atmosphériques	5
a. Sources naturelles	6
b. Sources anthropiques	6
4. Les principaux polluants	6
a. Les oxydes d'azote (NO <sub>x</sub> )	6
b. Les oxydes de soufre	6
4.1. Le monoxyde de carbone(CO)	7
4.4. Les composés organiques volatils (COV)	7
a. Les grandes familles des composés organiques volatils	7
b. Les composés organiques non méthaniques (COV NM)	7
4.5. Le benzène : (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	7
4.6. Les hydrocarbures	8
4.7. les particules en suspension (Ps)	8
4.8. Les métaux lourds	8
5. Les échelles spatiales de pollution	9
1. Echelle locale ou pollution de proximité	9
2. Echelle régionale	9
3. Echelle globale ou pollution planétaire	9
6. L'impact de la pollution atmosphérique	11
1. L'impact sanitaire	11
2. Impact sur l'environnement	12

#### Chapitre 2. Généralités sur l'Ozone

L'Ozone	13
1. Définition	13
2. La formation de la couche d'Ozone	13
3. La pollution photochimique	13
4. Processus de la formation d'Ozone troposphérique	14
6. Réglementation de l'Ozone	16
La valeur limite	17
Seuil d'information	17
Seuil d'alerte	17
7. L'impact de l'Ozone	17
Impact sur la santé public	17
Impact sur la végétation	17
Impact sur les bâtis	18
Impact sur la biodiversité	18

Chapitre 3.  
Généralités sur les espèces étudiées

1. La tomate	20
a. Les solanacées	20
2. Quelques généralités sur la tomate	20
3. Place de la tomate dans le secteur du maraichage	20
4. Variétés fixées ou hybrides	20
5. Description botanique du plant de tomate	21
1. Racine	21
2. Tige	21
3. Feuillage	21
4. Fleur.	21
5. Fruit	22
6. Graines	22
Cycle de vie de la tomate	22
La germination	22
La croissance	22
La floraison	23
La pollinisation	23
La fructification et nouaison des fleurs	23
La maturation du fruit	23
Le peuplier	24
Importance et usage	24
Description	24
Bourgeon	24
Feuille	25
Fruit	25
Fleur	25
Ecorce	25
Bois	25
Répartition	25
Utilisation	25

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 4

Matériel et Méthodes

Objectif de l'étude	25
Matériel biologique	25
Tomate	25
Conduite expérimentale	26
3. Conduite expérimentale	26
4. Fonctionnement de la chambre de fumigation	27
Cas du peuplier	28
4. Conduite expérimentale	28
5.1. Fonctionnement de la chambre de fumigation	29
5. Mesures des paramètres physiologiques	30
5.1. La conductance stomatique	30
5.2. Paramètres liés à l'intégrité membranaire	30
6. Paramètres liés à la photosynthèse	30
a. Les pigments photosynthétiques	30
b. Les sucres solubles	31
7. Paramètres liés à la balance minérale	31
Analyse statistique	32

L'étude statistique pour le cas de tomate	32
L'étude statistique pour le cas du peuplier	32

## Chapitre 5 Résultats et discussions

Cas de la tomate	33
4.2. Calcul de surface des nécroses	34
Estimation de pourcentage de nécroses en fonction de la dose chez la tomate Rechaiga II	35
1.2- Effet dose sur le pourcentage de nécroses : analyse de variance	36
Mesures de paramètres physiologiques en fonction des doses	37
Cas de dose 50ppb	37
Cas de 80 ppb	38
Cas de 100 ppb	39
Corrélations : paramètres physiologiques – pourcentage de nécrose- doses.	39
Effet Dose sur les paramètres physiologiques : analyse de variance	40
Evolution des paramètres physiologiques en fonction de la dose	41
Cas du Peuplier	42
5.2. Calcul de surface des nécroses	43
Développement des nécroses en fonction du temps	44
Corrélation des nécroses en fonction du nombre des jours de fumigation	44
Mesures de paramètres physiologiques en fonction des doses	45
La conductance stomatique	45
L'intégrité membranaire	46
Paramètres liés à la photosynthèse	46
Les pigments photosynthétique	46
Les sucres solubles	48
Discussions	48
La conductance stomatique	48
L'intégrité membranaire	48
Paramètres liés à la photosynthèse	49
Les pigments photosynthétiques	49
Les sucres solubles	50
Conclusion générale	
Références bibliographiques	

# Introduction générale

L'Ozone (O<sub>3</sub>) est le plus important polluant atmosphérique phytotoxique dans de nombreuses parties du monde (**Ashmore, 2005; Van Dingenen et al, 2009**), et est estimé à 2-3 milliards de dollars par an en pertes de récoltes dans l'USA (**Lorenzini et Saitanis, 2003**) et 14-26 milliards de dollars dans le monde entier (**Van Dingenen et al, 2009**). Même avec la mise en oeuvre de la législation pour contrôler les émissions de ses précurseurs, les concentrations ambiantes augmentent dans une grande partie du monde au cours du présent siècle (**Royal Society, 2008**).

**GIEC (2007)** prédit que les concentrations ambiantes peuvent augmenter de 20-25% entre 2015 et 2050, et encore de 40-60% en 2100. En conséquence, il est prévu que la pollution par l'O<sub>3</sub> peut présenter une aussi grande menace pour la sécurité alimentaire mondiale comme le changement climatique en 2030. (**Royal Society, 2008**). D'autres part, les forêts à leur tour ne sont pas épargnées, l'effet délétère de l'O<sub>3</sub> a été signalé par (**Moura et al, 2014**).

Les effets phytotoxiques de l'O<sub>3</sub> ont été étudiés depuis plus de 50 ans (**Elagoz et Manning, 2005**), et il est bien établi que l'exposition chronique à des concentrations élevées peut provoquer une chlorose, bronze pointillé et une nécrose des feuilles (**Manning et al, 2002**), de réduire la photosynthèse, la croissance et le rendement grainier dans un large éventail de cultures et des espèces dans les (semi-) communautés naturelles (**Hayes et al, 2007; Mills et al, 2007; Booker et al, 2009; Guidi et al, 2009; Singh et al, 2009; Cascio et al, 2010**) et induire la sénescence prématurée (**Tonneijck et al, 2004**).

La nature et la gravité des réactions à l'O<sub>3</sub> durant la croissance végétative sont affectés à la fois par des facteurs extrinsèques, comme le moment et la durée de l'exposition et les conditions environnementales qui influencent le flux d'O<sub>3</sub>, et la variation intrinsèque de la sensibilité des espèces individuelles ou de génotypes. L'impact de l'O<sub>3</sub> est influencé par une série de mécanismes d'acclimatation, de réparation et de compensation opérant au niveau végétatif (**Ashmore et al, 200; Matyssek et al, 2004; Fiscus et al, 2005; Black et al, 2007; Betzelberger et al, 2010**).

Les effets sur la végétation apparaissent sous la forme de conséquences visibles sur les feuilles de, par exemple le tabac, les haricots, les diverses espèces de trèfle (**Manes et al, 2003; Crous et al, 2006**), la pastèque (**Gimeno et al, 1999; Benton et al, 2000; Fumagalli et al, 2001**), et les épinards (**Calatayud et al, 2004**).

Les feuilles peuvent présenter des pointillés, ou la pigmentation sur les surfaces foliaires adaxiales (supérieur) (EPA, 1996; Pleijel, 2000). Les feuilles peuvent aussi vieillir prématurément en raison de l'exposition à l'Ozone, comme dans le cas du blé et d'autres espèces de céréales (Machler et al, 1995; Pleijel, 2000). Il peut aussi y avoir des effets physiologiques qui se manifestent comme la photosynthèse réduite sans aucun signe extérieur de dégâts (Pleijel, 2000). L'Ozone réduit les rendements dans les cultures comme les carottes (Bennett et Oshima, 1976), et les tomates (Aguayo et al, 2006).

L'impact de l'ozone sur la végétation est souvent étudié avec les systèmes de chambre de fumigation, dans lesquelles les plantes ou parties d'eux sont fumigées avec des niveaux d'ozone enrichis (Loreto et Velikova 2001). Ces systèmes permettent de détecter la réponse des plantes aux expositions aiguës, deux cultures de tomate sont fumiguées ainsi avec de faibles doses d'ozone et dans une durée relativement courte.

Les systèmes de fumigation à courte durée peuvent parfois ne pas être pratique pour déterminer l'impact des expositions chroniques. En outre, l'ozone réagit rapidement avec d'autres espèces chimiques et on ne sait pas si ses effets négatifs peuvent être exercés à des distances à partir du site de la pollution aiguë. Dans ce travail, un deuxième système de fumigation a été créé pour permettre aux fumigations à long terme avec des niveaux faibles d'ozone sur les jeunes arbres du peuplier complètement

En effet, notre étude se subdivise en deux parties, la première vise à étudier l'effet d'une exposition aiguë de l'Ozone troposphérique sur deux cultivars de tomate :

1. Quels effets aura-t-il sur les feuilles ?
2. Quels sont les manifestations des réponses des plantes vis-à-vis de l'Ozone ?
3. Quels dommages pourra-t-il produire au plan physiologique ?

La deuxième partie, vise à étudier les effets d'une exposition chronique des arbres du peuplier, différents niveaux d'investigation sont établis: physiologique, anatomique et biochimique.

Pour répondre à ces questions nous avons structuré le travail comme suit : un chapitre qui englobe des connaissances générales sur la pollution atmosphérique (chapitre 01), Ensuite un autre qui contient un aperçu sur l'Ozone troposphérique (chapitre 02), ainsi que sur les espèces étudiées : la tomate et le peuplier (chapitre 03), afin d'entamer le chapitre 04 qui

comprend l'ensemble du matériel et méthodes utilisées, pour qu'on puisse enfin, avoir une meilleure analyse et interprétations des résultats (chapitre 05).

Une conclusion, qui récapitule les résultats obtenus ainsi que d'importantes recommandations, sont faites.

**PARTIE I**  
**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE 1**

## Généralités sur la pollution atmosphérique

## 1. L'atmosphère :

L'atmosphère terrestre est composée de différentes couches superposées, depuis le sol, Nous distinguons notamment la troposphère, la stratosphère, la mésosphère, suivi de la thermosphère (figure 1) (Sportisse, 2008).

La troposphère est la basse couche atmosphérique où la vie a pu s'épanouir de façon permanente pour les altitudes inférieures à 8 km au dessus des pôles 18 km au dessus de l'équateur.

La stratosphère jusqu'à 50 km, la température est d'abord constante puis croît jusqu'à environ 270 °K, l'ozone (O<sub>3</sub>) et l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) forment la couche d'ozone qui du fait absorbe les rayons solaire ultraviolets (UV).

La mésosphère jusqu'à 85-90 km (le point le plus froid de l'atmosphère).

La thermosphère appelée également l'ionosphère (environ 150 km l'altitude).

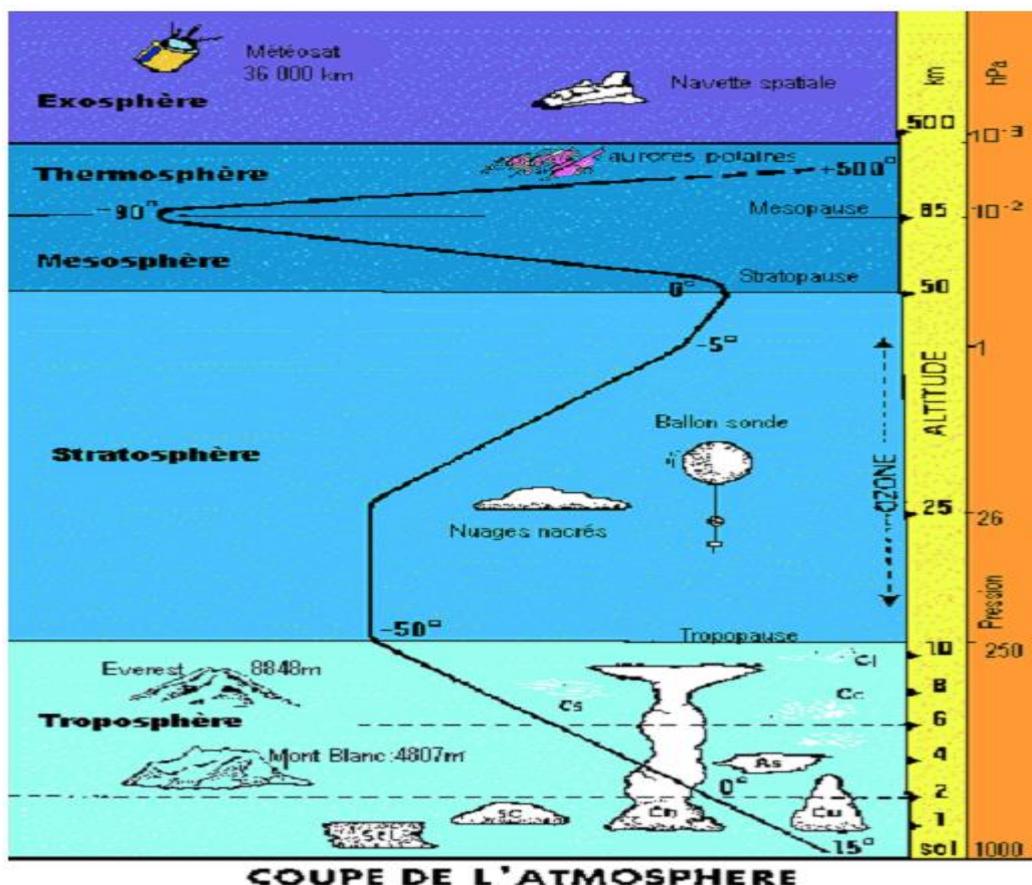


Figure 1 : structure de l'atmosphère (Webmaster 01).

## **2. Définition de la pollution atmosphérique :**

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux de l'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède, les possibilités récréatives du milieu ou encore en enlaidissant la nature (**Ramade, 2007**).

## **3. Sources de pollution atmosphériques :**

L'air est un mélange inodore et incolore de plusieurs gaz de composition constante à l'état pur, 78% de diazote ( $N_2$ ), 21% de dioxygène ( $O_2$ ), 1% d'argon(Ar), 0.04 de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) ainsi que de gaz rares. Nous inhalons 12 000 à 15 000 L d'air par jour, cet air contient également des polluants de divers origines (naturelle ou anthropique) et pouvant présenter des risques à plus ou moins longue durée pour la santé humaine et l'environnement.

### **a. Sources naturelles :**

La pollution atmosphérique peut avoir une origine naturelle : éruption volcanique, incendies spontanés, zones de marais...

Les feux des forêts, des cultures ou des prairies contribuent à des émissions importantes de noyaux de condensation, d'imbrûlés et de gaz. Les volcans émettent des gaz comme le dioxyde de soufre et de l'hydrogène sulfureux, et des particules des cendres en grandes quantités dont les nuages peuvent parcourir des distances considérables.

Les embruns marins sont constitués par des aérosols renfermant des cristaux de sels qui peuvent entraîner une pollution.

Les végétaux sont à leur tour à l'origine d'une pollution par les pollens, les spores et les champignons. L'homme et les animaux rejettent des quantités importantes de dioxyde de carbone et sont à l'origine d'une pollution microbienne.

L'Ozone est formé naturellement à haute altitude à partir de réaction photochimique impliquant l'oxygène de l'air, ainsi une fois transporté dans les zones rurales par le vent, l'Ozone se forme en grande quantité lorsque l'insolation est très élevée (**Day, 1999**).

## **b. Sources anthropiques :**

Depuis la révolution industrielle la pollution de notre environnement ne cesse à augmenter, ce-ci est du à l'activité humaine pour répondre aux besoins. La circulation automobile, les installations industrielles (activités métallurgiques, chimie, pétrochimie...), les combustions (chauffage, combustion fossile pour la production d'énergie), ainsi que l'agriculture moderne et ces moyens (fertilisants, pesticides...) contribuent à une élévation importante du seuil de pollution atmosphérique.

### **4. Les principaux polluants :**

Nous distinguons différents types de polluants : primaires qui sont émis directement par les sources de pollution et les polluants secondaires qui ne sont pas émis, mais qui résultent de la transformation physico-chimique des polluants primaires au cours de leur séjour dans l'atmosphère (OFEV, 2008).

#### **4.1. Les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) :**

Notés par le sigle NO<sub>x</sub>, regroupent : le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), n'oublions pas le pyroxyde d'azote (N<sub>2</sub>O). Les oxydes d'azotes résultent de la combustion à haute température et à haute pression (combustibles fossiles, déchets, émission des installations de combustion et des moteurs thermiques, combustion de carburants y compris les moteurs automobiles, diesel en particulier émettent 2 à 3 fois de plus que les moteurs à essence). Ils sont des précurseurs de l'Ozone (Massey, 1999).

#### **4.2. Les oxydes de soufre :**

Ils sont considérés comme des polluants majeurs de l'atmosphère et en particulier le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) ou Anhydride sulfureux. Le SO<sub>2</sub> est un gaz incolore et ininflammable, irrite les yeux ainsi que les voies respiratoires lors de son passage, sa solubilité dans l'eau lui a permis d'être responsable de dégâts catastrophiques par exemple: les pluies acides, la dégradation du couvert végétale (dépérissement des forêts), acidification des lacs et même des sols.

Ce gaz est multi-originaire : les grandes installations de combustion, les raffineries et dans une moindre mesure, la chimie, la métallurgie, la sidérurgie, les verreries, les papeteries et les sucreries...etc. (Jacubowicz, 2000).

### **4.3. Le monoxyde de carbone(CO) :**

Le monoxyde de carbone est un gaz incolore, inodore et toxique. Il est produit par diverses sources biotiques et abiotiques : volcanismes, oxydation des terpènes végétaux, combustion incomplète de la matière fossile (charbon) et dans les moteurs à combustion interne (moteurs à essence). Des travaux récents ont montré que les océans en produisant 40 millions de tonnes de CO par an constituent une source naturelle moins importante qu'il ne l'avait préalablement été estimé (**Zafiriou et al, 2003**) in (**Ramade, 2007**).

### **4.4. Les composés organiques volatils (COV) :**

D'après l'EPA (2006) (*Environment Protection Agency*) : nous appelons composé organique volatil COV tout composé organique qui une fois libéré dans l'atmosphère peut y demeurer un temps suffisamment long pour participer à des réactions photochimiques.

#### **a. Les grandes familles des composés organiques volatils :**

Parmi les composés organiques volatils, on peut distinguer différentes familles:

- les alcanes (saturés, abondants, par exemple propane, butane),
- les alcènes (liaison doubles, très réactifs par exemple éthylène, propylène),
- les hydrocarbures halogénés (1, 1,1 trichloroéthane, tétrachloroéthane),
- les diènes et les terpènes (multiples doubles liaisons)
- les composés oxygénés (aldéhydes, cétones, esters, alcool...etc.) (**PRQA, 2004**).

#### **b. Les composés organiques non méthaniques (COV NM) :**

Il est fréquent de distinguer séparément le méthane (CH<sub>4</sub>) qui est un COV particulier, naturellement présent dans l'air des autres COV pour lesquels on emploie la notation COVNM.

### **4.5. Le benzène (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) :**

Le benzène est un liquide inflammable et toxique apatrié de la famille des hydrocarbures aromatiques chimiquement stable et peu soluble dans l'eau. C'est un solvant utilisé pour le dégraissage, la préparation des vernis, l'industrie des matières colorantes, des parfums. Cette substance se distingue pour l'espèce humaine par ses grandes toxicités pour les cellules sanguines et les organes qui les produisent (moelle osseuse), le benzolisme, l'affection qui préoccupe le plus tant au niveau professionnel qu'environnemental est la survenue de cancers du sang liés à l'exposition répétée à des concentrations de benzène de

quelques ppm pendant plusieurs dizaines d'années, celui-ci provoque certaines leucémies myéloïdes (INRS, 2007).

#### **4.6. Les hydrocarbures :**

1. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) : benzène, toluène, xylène, éthylbenzène...
2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : constituent un groupe particulier en raison de leurs caractéristiques chimiques et toxicologiques (cancérogènes), citons par exemple I: naphtalène, phénanthrène, le Benzo(a)Pyrène est le plus étudié.

Ils proviennent des processus de pyrolyse de la combustion incomplète de la matière organique, mais aussi du chauffage (charbon principalement au bois ou au fuel domestique), les véhicules automobiles, la production de coke.

#### **4.7. Les particules en suspension (Ps) :**

Également connues sous le nom de particules ou fumées noires, le terme désigne en général la fraction des composants liquides ou solides en suspension dans les milieux gazeux. La granulométrie des Ps fait l'objet de leur classification :

PM 10 : masse des particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 10  $\mu\text{m}$

PM 2.5 : masse des particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 2.5  $\mu\text{m}$

PM 1.0 : masse des particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 1  $\mu\text{m}$

Ultrafines : particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 0.1  $\mu\text{m}$

Nanoparticules : particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 0.05 ou 0.03  $\mu\text{m}$

Selon **Tomasevic et al. (2005)** : les particules PM 10 et PM 2.5 sont des particules minuscules de solide composées d'un ou plusieurs produits chimiques et avec beaucoup de sources. La combustion est une source importante des particules les plus minuscules.

#### **4.8. Les métaux lourds :**

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par  $\text{cm}^3$ .

Les principaux métaux lourds sont : l'arsenic(As), le cadmium(Cd), le chrome(Cr), le cuivre(Cu), le nickel(Ni), le plomb(Pb) et le zinc(Zn), provenant de la combustion de charbon, pétrole, ordures ménagères et de certains procédés industriels (**Micquel, 2001**).

## 5. Les échelles spatiales de pollution

### 1. Echelle locale ou pollution de proximité

Cette pollution provient des sources d'émission de gaz et des effets directs du chauffage individuel, des fumées des usines et de trafic routier. C'est-à-dire qu'elle est produite au voisinage des sources de rejets (rue, quartier, ville et donc une distance de 10 m à 10 km)

L'impact de cette Pollution touche les populations directement à court terme, comme à long terme pour certaines pathologies (**Kim et Maude, 2002**).

### 2. Echelle régionale

Pollution à longue distance (environ 100 km), concerne les zones distantes de quelques dizaines à quelques centaines de kilomètres de source de pollution relativement aux phénomènes physico-chimiques complexes et variés qui interviennent. Deux phénomènes secondaires apparaissent lors de cette pollution : les pluies acides et la pollution photochimique.

- Les pluies acides : ont un fort impact dans le dépérissement des forêts, des lacs et l'acidification des sols. Des zones étendues et éloignées sont concernées en raison des transformations physico-chimiques et des conditions climatiques (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et (HNO<sub>3</sub>) sont issues des émissions des (SO<sub>2</sub>) et (NO<sub>x</sub>) respectivement.
- La pollution photochimique : qui désigne les mécanismes à la rupture naturelle de formation et de destruction de l'Ozone troposphérique ( à basse altitude ) et à l'augmentation de sa concentration dans l'air (**Kim et Maude, 2002**).

### 2. Echelle globale ou pollution planétaire

Les couloirs de circulations planétaires (vents et courants marins) permettent aux polluants dont les plus stables chimiquement d'agir sur l'ensemble de la planète : réduction de l'épaisseur de la couche d'Ozone, l'augmentation de l'effet de serre et la provocation des changements climatiques importants.

La diminution de l'épaisseur de la couche d'Ozone (trou d'Ozone) dans la stratosphère : ce ci est dû aux molécules de chlore libéré des CFC1 et des HCFC2 sachons qu'une molécule de chlore peut détruire jusqu'à 10 000 molécules d'Ozone.

HCFC : hydro chlorofluorocarbone (gaz utilisés pour créer le froid dans les réfrigérateurs ainsi que dans certains aérosols) dérive dans l'atmosphère et réagit avec les rayons solaires pour libérer du chlore qui détruit l'Ozone. Une diminution de 1% de la couche d'Ozone pourrait entraîner une augmentation de 2% des cancers de la peau (**Kim et Maude, 2002**).

**Tableau N°1 : les sources principales de pollution atmosphérique à différentes échelles. Projet de PRQA en Alsace (2004).**

Echelle	Origines	Principaux polluants concernés	Problèmes rencontrés	Portée dans le temps
Pollution Locale < ; 500 m	Echappement automobile lors de circulation intense Panache de fumée industrielle Incinération sauvage ...	NO, NO2, CO, COV, imbrûlés, poussières SO2, métaux lourds COV, imbrûlés	Pollution industrielle, automobile, domestique ou agricole de proximité	Minutes ou Heures
Pollution Urbaine < ; 10 Km	Résultante des pollutions précédentes à l'échelle de grandes agglomérations Transformation photochimique de la pollution automobile d'origine urbaine	NO, NO2, CO, COV, imbrûlés, poussières  O3, PAN	Pollutions urbaines de fond	Heures ou jours
Pollution Régionale < ; 1 000 km	Transformation chimique et transport de la pollution Transport de pollution à longue distance	O3  SO2, NO, NO2, radioéléments	Pollution photochimique  Pluie acide	Jours
Pollution Planétaire	Migration de polluants vers la stratosphère Augmentation des gaz à effets de serre	CFC, N2O, HCFC  CO2, CH4, N2O, CFC, O2, HCFC, HFC, PFC, SF6	Amincissement de la couche d'Ozone  Accroissement de l'effet de serre	Années

## 6. L'impact de la pollution atmosphérique

### 1. L'impact sanitaire

Les effets de la pollution atmosphérique sur la santé peuvent se répartir schématiquement en deux groupes :

A court terme : définis comme des manifestations cliniques, fonctionnelles ou biologiques survenant dans des délais brefs (quelques heures, quelques jours, ou semaines) suite aux variations journalières des niveaux ambiants de pollution atmosphérique.

A long terme : des affections aux pathologies survenant après une exposition chronique (plusieurs mois ou années) les études épidémiologiques visant à étudier ces effets différés sont difficiles à mettre en œuvre car elles nécessitent le suivi de large population sur de longues périodes. (Filleul, 2001).

#### La population sensible

Plusieurs facteurs influencent la vulnérabilité d'une personne à la pollution de l'air, notamment :

- ✓ le type de polluant atmosphérique auquel la personne est exposée dans son milieu de vie ;
- ✓ le degré d'exposition aux polluants
- ✓ l'état de santé, l'âge, les prédispositions génétiques et les habitudes de vie de la personne (par exemple, le tabagisme).

Bien que personne ne soit à l'abri des effets de la pollution atmosphérique sur la santé, certaines personnes pourraient y être plus sensibles et plus à risque. Il s'agit :

**a) Des personnes âgées :** les personnes âgées qui sont plus sensibles en raison de vieillissement des tissus respiratoires et de pathologies plus fréquent associées ainsi que d'une diminution des défenses respiratoires, les personnes souffrant de pathologies chroniques (par exemple maladies allergiques et asthmatiques ou maladies cardio-vasculaire) (Filleul, 2001).

**b) Les sportifs :** En plein air ou qui travaillent à l'extérieur de façon régulière, surtout si les niveaux de contaminants sont élevés à un moment précis ou dans leur milieu de vie (à proximité de sources de polluants, telles que le trafic routier, les zones industrielles, etc.). L'activité sportive accroît la ventilation alvéolaire, lors de l'activité physique les personnes pratiquants une activité sportive seront soumises à une exposition plus importante. (SRCAE, 2011).

## 2. Impact sur l'environnement

Les polluants atmosphériques peuvent affecter les plantes et les écosystèmes à différents niveaux dans leur fonctionnement, on distinguera :

- **Les effets directs** : induits par une absorption du polluant par la plante ou un dépôt à sa surface.
- **Les effets indirects** : dus à une modification du milieu dans lequel la plante se développe : sol ou atmosphère

Principalement il y a trois catégories de polluants atmosphériques qui créent des impacts sur les écosystèmes ; les aérosols, les dépôts atmosphériques, l'Ozone. Les impacts des particules sont multiformes, ils commencent par une modification quantitative et qualitative du rayonnement qui peut, dans certaines régions modifier sensiblement la photosynthèse, donc la production végétale et l'évapotranspiration.

D'autres effets passent par une modification de la pluviométrie à l'échelle régionale par la multiplication des régimes de circulation. Les dépôts atmosphériques constituent un apport de nutriments très significatif pour de nombreux écosystème, en particulier les forêts, ils risquent souvent de modifier profondément les écosystèmes et leur fonctionnement, d'une part par des modifications induites au niveau de sol (acidification) d'autre part en changeant les conditions de composition entre les espèces végétales et microbiennes et donc la nature même de l'écosystème. L'Ozone peut modifier profondément le fonctionnement de la plante et semble tout d'abord être à l'origine de nécroses importantes chez la végétation et il intervient dans le phénomène de dépérissement des forêts (facteur aggravant). (SRCAE, 2011).

# **CHAPITRE 2**

## Généralités sur l'Ozone

## **L'ozone**

C'est le chimiste allemand Christian Friedrich Schönbein qui a mis l'hypothèse que l'odeur qui suit la foudre, celle qui accompagne l'électrolyse de l'eau et celle qu'il sent dans son laboratoire, provienne d'une même substance, Schönbein donne à cette substance le nom d'Ozone de la racine grecque « *ozein* » qui signifie exhaler une odeur (**Rubin, 2001**)

### **1. définition**

L'Ozone est un constituant minoritaire de l'atmosphère et représente de 0 à 0.07 ppm (partie par million en volume) selon l'altitude ; Sa molécule est formée de trois atomes d'oxygène (O), ce gaz incolore est caractérisé par une odeur très forte âcre et un fort pouvoir oxydant. Il se trouve concentré naturellement à 90 % dans la stratosphère (entre 15 et 35 kilomètres d'altitude). Il forme ce qu'on appelle la couche d'Ozone, qui est un filtre naturel protégeant les écosystèmes terrestres des rayons ultraviolets (**Rubin, 2001**).

### **2. Formation de couche d'ozone**

Au niveau de la stratosphère, l'Ozone se forme essentiellement dans les zones bien ensoleillées telle que les zones équatoriales, les vents servent comme vecteur d'Ozone de la haute atmosphère vers des latitudes plus élevées. La couche d'Ozone est d'ordre d'épaisseur de 3 mm seulement. Les 10 % restante se répartissent dans la basse atmosphère, à ce niveau l'Ozone est considéré comme un polluant qui résulte d'une réaction photochimique. Lorsque l'équilibre n'est pas établi entre la production et destruction d'Ozone ou la destruction est plus rapide que la production, on assiste à un appauvrissement de la couche, d'où le trou de la couche d'Ozone qui n'est en réalité qu'un amincissement (**APPA, 2006**).

### **3. La pollution photochimique**

Elle est connue dans la littérature sous le nom de smog photochimique, elle provient de la combinaison des termes anglais *smoke* et *fog*. L'apparition des smogs est liée à la présence de plusieurs facteurs météorologiques. Il est représenté sous deux formes :

- Le smog oxydant comme l'Ozone et le peroxyacétylnitrate (PAN) dans les régions à climat méditerranéen à forte insolation.
- Le smog acide comme les pluies acides dans les régions de climat tempéré froid et humide. (**Ramade, 2005**).

#### 4. Processus de formation d'ozone troposphérique

L'Ozone est un polluant secondaire, c'est-à-dire non émis directement par les activités humaines mais résulte de la transformation physico-chimique des polluants primaires ou cours de leur séjour dans l'atmosphère (**Stéphanie, 2005**).

La formation d'Ozone troposphérique ou ce que l'on appelle les pics d'Ozone répond à des mécanismes complexes. Cette formation résulte par réaction photochimique, nécessite des polluants primaires « précurseurs » comme (NO<sub>x</sub> et COV) d'origine automobile et industrielle, peuvent provenir de sources biologiques telle que l'élevage des ruminants et céréaliculture, en particulier l'été associée aux facteurs météorologiques et physiques (fort ensoleillement, température élevée, faible humidité, absence de vent, phénomène d'inversion de température) de la topographie du relief ( montagne, vallée ) et de la quantité de polluants présents dans l'air. Ces trois paramètres vont réguler les mécanismes de formation et de destruction de l'Ozone (**Webmaster 02**).

Bien que le processus de formation de l'Ozone soit complexe, les principaux éléments sont bien connus et peuvent être résumés comme suit :

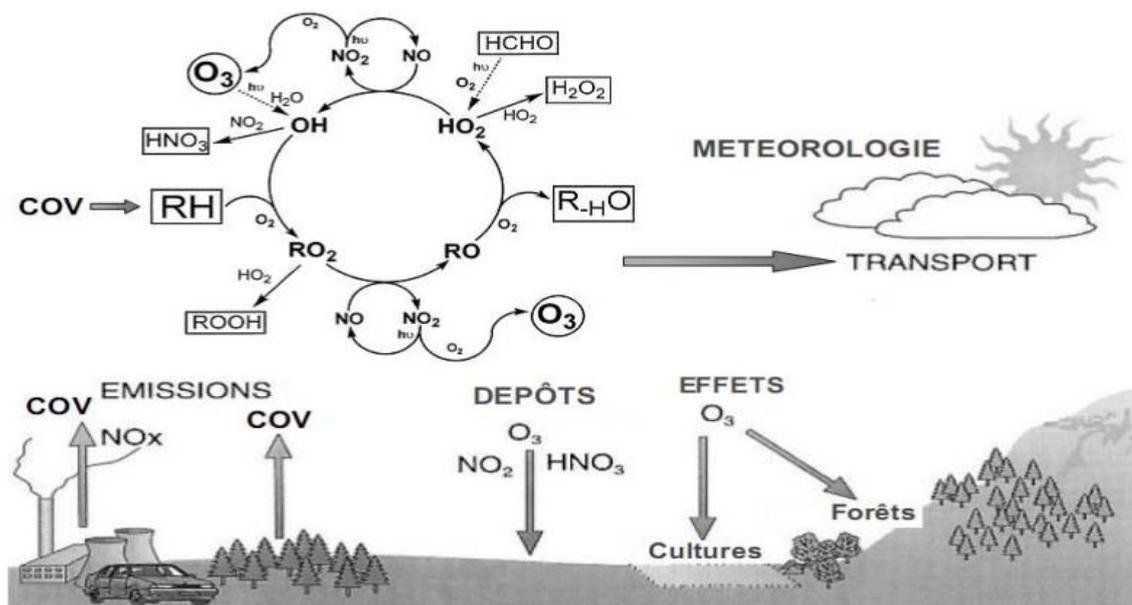


Les réactions sont réversibles : la nuit, l'Ozone généré à la lumière du jour, disparaît, mais la présence d'hydrocarbures dans l'air génèrent des radicaux peroxy R-O-O qui réagissent avec NO selon :



La réaction (4) est plus rapide que la réaction (3) qui consomme l'Ozone, la concentration en Ozone augmente donc en présence d'hydrocarbures. (**El melki, 2007**). Ces réactions produisent un état d'équilibre photochimique qui s'établirait dans l'atmosphère, la quantité d'Ozone dépendrait des proportions des gaz (NO<sub>2</sub> et NO) et de l'intensité du rayonnement solaire. En effet, l'atmosphère contient toujours des espèces chimiques capables d'interférer avec les réactions présentées comme le montre la figure (2).

## 5. Schémas des réactions



**Figure 2:** Cycle de l'Ozone troposphérique (Jenkin et Clemisthaw, 2000).

Dans une atmosphère polluée, les hydrocarbures en phase gazeuse (RH) connus comme les composés organiques volatiles (COV) se combinent préférentiellement avec le monoxyde d'azote (Jenkin et Clemisthaw, 2000). Différents facteurs affectent la dispersion et le séjour de l'Ozone, ces facteurs sont d'ordre météorologique et d'ordre physique.

## 6. Influences des facteurs météorologiques

### 6.1. Le vent

La direction, la vitesse, la turbulence et la stabilité des vents ont des effets sur le transport, la dilution et la dispersion des polluants, notamment à partir de 20 km/h. Toutefois, il peut également amener des masses d'air contenant des polluants en provenance d'autre source. Lorsqu'il est de faible vitesse, ces phénomènes de transport accompagnés d'accumulation, est courant.

La dispersion des polluants augmente avec la vitesse et la turbulence du vent : en été, un vent fort permet la dispersion de l'ozone, ce qui améliore la qualité de l'air. Par contre en hiver, un vent fort peut provoquer un apport d'ozone « naturel ». Lors de vent faible, dont la direction

est souvent variable, les polluants stagnent ce qui engendre une stabilisation voire une dégradation de la qualité de l'air par cumul ( **Kochanski, 1999**)

## **6.2. Le gradient vertical de température**

La température agit sur la chimie des polluants : le froid diminue la volatilité de certains gaz tandis que la chaleur estivale est favorable à la formation photochimique de l'ozone : En été, une augmentation de température (2 à 4°C) augmente la formation d'ozone. En hiver, une diminution de température (2 à 4°C) peut provoquer la formation d'une couche d'inversion, notamment par temps clair, et dégrader la qualité de l'air par accumulation des polluants primaires ( **Kochanski., 1999**)

## **6.3 Température et rayonnement solaire**

Pour comprendre l'influence de l'ozone la température de l'atmosphère sur la formation d'ozone troposphérique, il faut examiner plus en détail la réaction  $O_2 + O \rightarrow O_3$  de formation de l'ozone. Pour former l'ozone à partir du dioxygène, il faut former une liaison O-O, or la formation de liaison est une réaction exothermique : elle libère de l'énergie dans le milieu. Cette énergie est égale à l'énergie de la liaison créée (nous notons la symétrie par rapport à la réaction de dissociation qui nécessite-t-elle d'apporter au moins l'énergie de la liaison pour la briser.)

## **6.4 L'humidité**

L'humidité influence la transformation des polluants primaires émis :

- de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) se forme à partir du dioxyde de soufre ( $SO_2$ )
- de l'acide nitrique ( $HNO_3$ ) se forme à partir des oxydes d'azote ( $NO_x$ ).

## **7. Réglementation de l'Ozone**

La constitution algérienne a donné une grande importance à la réglementation de la pollution en générale, l'Ozone se figure dans la Loi n° 06-02 du 8 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 8 janvier 2006 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable : la surveillance de la qualité de l'air concerne la substance suivantes :( Le dioxyde d'azote, le dioxyde de soufre, l'Ozone, les particules fines) Au sens au présent décret, il est entendu par :

### **La valeur limite**

Un niveau maximal de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère, fixé sur la base de connaissances scientifiques.

### **Seuil d'information**

Un niveau de concentrations de substances polluantes dans l'atmosphère au-delà de laquelle une exposition de courte durée à des effets limités et transitoires sur la santé de catégories de la population particulièrement sensibles.

### **Seuil d'alerte**

Un niveau de concentrations de substances polluantes dans l'atmosphère au-delà de laquelle une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine ou pour l'environnement. Pour l'Ozone on a :

**Valeur limite** : 200 microgrammes/Nm<sup>3</sup>.

**Seuil d'information** : 180 microgrammes/Nm<sup>3</sup>.

**Seuil d'alerte** : 360 microgrammes/Nm<sup>3</sup>.

## **8. l'impact de l'ozone**

### **8.1 L'impact sur la santé**

L'Ozone est un gaz toxique, très néfaste pour la santé publique parmi les effets aigus dus à l'Ozone, on peut mentionner, selon **Basha et al (1994) ; Brook et al (2002) ; Hermans et al (2005) et PPA (2005)**:

- Des irritations muqueuses qui se manifestent par des picotements du nez, gorge, les yeux et voies respiratoires et des réactions inflammatoires particulièrement chez les enfants ;
- Des moindres de performances physiques, et de l'endurance ;
- Modifie la coagulation du sang, et peut conduire à des accidents cardiovasculaire.
- Un inconfort thoracique, d'essoufflement ou encore de douleur à l'inspiration profonde, avec présence des inflammations respiratoires.

### **8.2 L'impact sur la végétation**

La pollution par l'Ozone est également néfaste à la végétation, lorsque les charges en Ozone croissent, les dégâts visibles apparaissent périodiquement sur les feuilles sous formes de nécroses perturbant la croissance, la photosynthèse et altérant leur résistance (**Ashmore,**

**2005).** La pollution due à l'Ozone entraîne aussi des pertes importantes ; 25% à la production agricole du blé et de pommes de terre.

L'exposition à l'Ozone peut toucher la reproduction par l'inhibition de la germination, du pollen et de croissance de tube pollinique (**Pleijel et al, 2007**).

### **8.3 L'impact sur les bâtis**

En tant que leurs propriétés oxydantes les molécules d'Ozone sont responsables de multiples effets néfastes. Elles peuvent altérer certains matériaux plastiques, caoutchouc, peinture, matériaux de construction (**Massey, 1999**).

L'Ozone contribue à la dégradation des pierres, à la dissolution calcaire, noircissement et corrosion des métaux (**APPA, 2004**).

### **8.4 L'impact sur la biodiversité**

La diminution de la couche d'ozone s'accompagne d'une augmentation du rayonnement UV à la surface de la terre. Ce qui constitue une menace grave à la fois pour l'homme et la biodiversité. Sur le plan paléo-climatique, les organismes terrestres et aquatiques n'ont pu commencer à se développer que lorsque la couche d'ozone stratosphérique est devenue assez dense pour constituer un bouclier de protection suffisant contre les UV et cela il y a un demi-milliard d'années auparavant (dernier dixième récent de l'histoire de la terre). La vie sur terre a été pendant longtemps confinée à l'océan où il y avait une protection substantielle contre le rayonnement UV.

L'exposition de plus en plus grande au rayonnement UV va affecter de façon sensible et négative les écosystèmes terrestres et perturber l'équilibre des espèces au sein des écosystèmes (**Abdelguerfi, 2003**).

# **CHAPITRE 3**

*Généralités sur les espèces  
étudiées*

## **1. La tomate**

### **Les solanacées**

La famille des solanacées contient environ 3000 espèces (90 genres) avec de morphologie variée : arbres, arbrisseaux, lianes, plantes herbacées vivaces ou annuelles.

Le genre *Solanum* avec environ 1400 espèces, ce genre est le plus riche en espèces de la famille des *Solanaceae* et l'un des plus grands des angiospermes. (Bureaux, 1994).

### **2. Généralités sur la tomate**

La tomate est d'origine sauvage américaine, en particulier d'Amérique centrale et Amérique du Sud (Mexique, Pérou, Equateur et Bolivie) (Kolev, 1976). La tomate est une plante annuelle de la famille des Solanacées, dont le fruit est une baie. Cette dernière est rouge, parfois jaune ou orangée, de forme ronde ou plus ou moins allongée, lisse ou creusée de sillons. Les fruits sont de grosses baies, toujours charnues, tantôt lisses, tantôt côtelées, qui contiennent, noyées dans la pulpe une grande quantité de petites graines blanches, plates, réniformes, feutrées lorsqu'elles sont sèches. (Chaux et Foury, 1994 ; Shankara et al, 2005).

### **3. Place de la tomate dans le secteur du maraichage**

La tomate (*Lycopersicum*) famille des solanacées, occupe une place privilégiée dans le secteur maraicher en Algérie. Elle est considérée à juste titre comme une espèce prioritaire comme la pomme de terre, l'ail et l'oignon

La tomate est cultivée selon deux modes de production à savoir en culture maraichère et en culture industrielle. La superficie totale réservée est de 32962 Ha représentée par 63,06% pour la tomate maraichère et 36,93% pour la tomate industrielle. La tomate représente 7,94% de la superficie totale réservée aux cultures maraichères et industrielles. (Bureaux, 2011).

### **4. Variétés fixées ou hybrides**

Depuis que les hommes se nourrissent de plantes, ils ont cherché à les améliorer pour faciliter leur travail et les rendre plus productives. Toutes les tomates (y compris celles que l'on appelle « anciennes ») sont issues d croisements et d'améliorations pour donner les variétés d'aujourd'hui.

- Les variétés fixées : comme leur nom l'indique, le croisement dont elles sont issues a permis de conserver de manière stable leurs caractéristiques (vigueur, forme, couleur, gout...)
- Les variétés hybrides F1 : la variété est issue du résultat du croisement de deux variétés de lignées pures. Cette variété de première génération bénéficie du patrimoine de ces deux parents. Avec un effet de vigueur supplémentaire.

Les variétés fixées ou les hybrides F1 sont donc toutes deux issues du procédé naturel de pollinisation des plantes. (**Bureaux, 2011**)

## **5. Description botanique du plant de tomate**

### **1. Racine**

Forte racine pivotante qui pousse jusqu'à une profondeur de 50 cm ou plus. La racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices.

### **2. Tige**

Le port de croissance varie entre érigé et prostré. La tige pousse jusqu'à une longueur de 2 à 4 m. La tige est pleine, fortement poilue et glandulaire.

### **3. Feuillage**

Feuilles disposées en spirale, 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires. Les grandes folioles sont parfois pennatifides à la base. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm.

### **4. Fleurs**

Bisexuées, régulières et entre 1,5 et 2 cm de diamètre. Elles poussent opposées aux - ou entre les feuilles. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants. En général il y a 6 pétales qui peuvent atteindre une longueur de 1 cm, qui sont jaunes et courbées lorsqu'elles sont mûres. Il y a 6 étamines et les anthères ont une couleur jaune vif et entourent le style qui a une extrémité stérile allongée. L'ovaire est supère avec entre 2 et 9 carpelles. En général la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu. Les abeilles et les bourdons sont les principaux pollinisateurs.

## **5. Fruit**

Baie charnue, de forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Lorsqu'il n'est pas encore mûr, le fruit est vert et poilu. La couleur des fruits mûrs varie du jaune au rouge en passant par l'orange. En général les fruits sont ronds et réguliers ou côtelés.

## **6. Graines**

Nombreuses, en forme de rein ou de poire. Elles sont poilues, beiges, 3 à 5 mm de long et 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen. 1000 graines pèsent approximativement 2,5 à 3,5 g. (Naika et al, 2005)

## **6. Cycle de vie de la tomate**

D'après Gallais et Bannerot (1992), le cycle végétatif complet de la graine à la graine de tomate varie selon les variétés, l'époque et les conditions de culture. Mais, il dure généralement de 3.5 à 4 mois du semis, jusqu'à la dernière récolte (7 à 8 semaines de la graine à la fleur et 7 à 9 semaines de la fleur au fruit).

Six phases font construire ce cycle et se sont :

### **a. La germination**

La germination est le stade de levée qui mène la graine jusqu'à la jeune plante capable de ce croître normalement. (Corbineau et Core, 2006)

Elle est épigée chez la tomate, cette dernière exige une température d'environ 20°C et une humidité relative de 70 à 80% (Chaux et Foury, 1994).

### **b. La croissance**

Suivant Laumonier (1979), la croissance est l'augmentation de dimension d'un végétal, elle se déroule en 2 phases et en 2 milieux pour les plants de tomate.

En pépinière : de la levée, on remarque l'apparition des racines non fonctionnelles et des pré feuilles.

En plein champs : après l'apparition des feuilles à photosynthèse intense et des racines fonctionnelles, les plantes continuent leur croissance. La tige s'épaissit et augmente le nombre de feuilles.

### **c. La floraison**

C'est le développement des ébauches florales par transformation du méristème apicale de l'état végétatif, à l'état reproducteur.

### **d. La pollinisation**

La pollinisation nécessite l'intervention des agents extérieurs, le vent ou certains insectes comme le bourdon qui est capable de faire vibrer les anthères et de libérer le pollen (**Chaux et Foury, 1994**)

### **e. La fructification et nouaison des fleurs**

La nouaison est l'ensemble de gamétogenèse, pollinisation, croissance de tube pollinique, la fécondation des ovules et le développement des fruits «fructification».

### **f. La maturation du fruit**

La maturation du fruit se caractérise par le grossissement du fruit, changement de couleur du vert au rouge.

La lumière intense permet la synthèse active de matière organique qui est transportée rapidement vers les fruits en croissance, pour cela il faut une température de 18°C la nuit et 27°C le jour (**Rey et Costes, 1965**).

## 2. Le peuplier

Le peuplier noir, (*Populus nigra*) L. famille des *Salicaceae*, est une espèce arborescente. Espèce héliophile, le peuplier noir constitue des populations locales en colonisant les rives et les îles par l'intermédiaire de graines, de boutures de tiges ou de fragments de racines. Le peuplier noir est caractérisé par une grande diversité de types de population – arbres isolés, petits bosquets ou grands peuplements purs ou mélangés. Le peuplier noir peut vivre plus de 400 ans.

L'espèce est dioïque, présentant donc des individus de sexe mâle ou de sexe femelle. Ils atteignent le stade de la maturité sexuelle à l'âge de 10-15 ans. Environ une à trois semaines avant le débourrement du bourgeon végétatif au début du printemps (mars-avril). (Lefèvre et al, 2001).

### 1. Importance et usage :

Le peuplier noir est une espèce d'intérêt économique diversement utile aux hommes. Il est principalement employé dans les programmes d'amélioration génétique de nombreux pays dans le monde et a été utilisé dans 63 % des cultivars de peuplier, soit comme une espèce pure ou espèce parente de cultivars hybrides. Le peuplier noir forme avec *Populus deltoides* et d'autres espèces exotiques des hybrides interspécifiques, conférant une bonne adaptation à différents types de sols et de conditions climatiques, une bonne capacité d'enracinement, une résistance élevée au chancre. Le peuplier noir est également d'intérêt économique comme espèce pure. Il est largement cultivé pour un usage domestique en Europe de l'Est et, grâce à sa plasticité, employé pour la protection des sols et le reboisement de zones polluées par l'industrie. Le peuplier noir, espèce emblématique des forêts alluviales présente également de nombreux atouts écologiques. Il domine, avec d'autres membres de la famille des *Salicaceae* et *Alnusincana*, la forêt pionnière de bois tendre des plaines inondables de nombreuses régions tempérées (Lefèvre et al, 2001).

### 2. Description

Le peuplier noir atteint 20 à 25 mètres de hauteur. Son houppier est ample et découpé.

#### a. Bourgeon

Les bourgeons du peuplier noir sont petits, glabres, pointus, poisseux et proches du rameau.

## **b. Feuille**

La feuille du peuplier noir est simple, alterne, longue de 6 à 10 cm, de forme triangulaire à losangique. Elle est brillante sur le dessus. Certaines feuilles se terminent par une pointe.

## **c. Fruit**

Les graines sont duveteuses et sont disséminées entre mai et juin.

## **d. Fleur**

Un arbre est soit mâle, soit femelle. Les fleurs sont groupées en chatons de 5 à 7 cm.

## **e. Ecorce**

L'écorce du peuplier noir est profondément fissurée verticalement.

## **f. Bois**

Le bois du peuplier noir est blanc, pouvant être coloré de gris-brun au cœur. Il est particulièrement tendre, léger, poreux et souvent noueux. Son odeur est désagréable à la coupe.

## **3. Répartition**

C'est une espèce généralement implantée au bord des rivières. Autrefois, on rencontrait le peuplier un peu partout dans les vallées. (Villar., 2009)

## **4. Utilisation**

Les bourgeons possèdent des qualités médicinales. Autrefois les gourmands étaient utilisés en vannerie (Villar, 2009).

**PARTIE II**  
*ETUDE EXPERIMENTALE*

# **CHAPITRE 4**

## *Matériel et Méthodes*

## 1. Objectif de l'étude

Le bioindicateur le plus largement décrit pour l'O<sub>3</sub> a été le tabac extrêmement sensible (*Nicotiana tabacum*) cv. Bel-W3 (**Heggstad, 1991**), qui affiche de reconnaissables et typiques symptômes nécrotiques à un seuil de 400 ppb pour une exposition de 4 h (**Larsen et Heck, 1976**).

Cette étude, dans un premier volet, vise à caractériser les réponses physiologiques de deux phénotypes de tomate *Solanum lycopersicum*, soumis à un stress oxydatif produit par l'application de trois doses d'Ozone séparément sur une période de sept jours, afin de dévoiler le potentiel indicateur de sensibilité au sein de cette espèce.

Dans le deuxième volet, l'application d'une dose unique et pour une période relativement importante (un mois) a été testée sur les arbres de *Populus nigra*.

Plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques ont été évalués à travers cette étude, pour servir comme marqueur de résistance ou de sensibilité.

## 2. Matériel biologique

### a. Tomate

La recherche d'un autre bioindicateur de remplacement, une autre espèce de *Solanaceae* a été testé, *Lycopersicum pinpinellifolium* (**Gentile et al, 1971**) ; de ce fait, aucun autre rapport n'a été publié, depuis cette période, sur le niveau et les caractéristiques de la sensibilité de la tomate.

Le choix du matériel biologique utilisé pour la réalisation de cette étude est porté sur la tomate *Solanum lycopersicum* qui est la culture légumière la plus importante, après la pomme de terre en termes de production (**FAO, 2005**). La littérature a révélé que la tomate est très sensible à l'Ozone, aux divers processus physiologiques altérés sous pression d'Ozone (**Iriti et al, 2006**).

Les espèces et les variétés de plantes qui ont été utilisées pour le test d'Ozone sont comme suit :

- Tomate De Colgar *Solanum lycopersicum* (L.). (Sensibilité à tester durant le processus d'expériences).
- Tomate hybride dite locale « Rechaiga II» *Solanum lycopersicum*.(L). (Sensibilité à tester au cours du processus d'expériences).

Les plantes ont été cultivées à partir de graines dans un mélange standard de substrat composé de sable, terre et matière organique à des proportions respectives de 1/1/1. Ce substrat a été mis dans des pots en plastique de diamètre de 23 cm et de hauteur de 21 cm. Les graines ont été mis dans une étuve à une température de 22°C dans des boîtes de pétri, contenant du papier buvard imbibé d'eau pour l'humidité des graines

### 3. Conduite expérimentale

Les plantules ont été repiquées dans des gobelets en plastique, après trois jours de la germination qui contenaient de la tourbe commercialisée.

Les plantes ont été transplantées en pots sous serre. Trois plantes par pots avec 15 répétitions de chaque variété ont été utilisées ; après quelques semaines, les plantes ont développées 5 à 6 feuilles composées pennées ; la hauteur est de l'ordre de 15 à 20 cm.



**Figure 3 :** Transplantation des plantules en pots (cliché : MAAMAR Benchohra, 2013).

Les plantes ont été irriguées quotidiennement et entièrement vérifiées. Les seules plantes, avec des feuilles en bonne santé, ont été sélectionnées pour ces expériences.

La méthode utilisée pour la fumigation des plantes dans ces expériences est, en effet, une chambre fermée, naturellement éclairée et contrôlée.

La chambre de fumigation présente les dimensions de 2 m de long 2.5 m de hauteur 2.7 m de large, avec un espace de 13.5 m<sup>3</sup> entre la plate-forme de la plante et le toit de la chambre figure (4).



**Figure 4** : Chambre de fumigation utilisée lors de l'expérimentation (cliché : MAAMAR Benchohra, 2013).

**4.1. Fonctionnement de la chambre de fumigation** L'air frais a été admis en laissant la porte partiellement ouverte.

Trois tours de fumigation ont été réalisés à 50, 80 et 100 ppb pendant 4 heures et durant 07 jours sur une période de 21 jours au total. L'Ozone a été produit par un générateur d'Ozone Ecobox (DBG Group Investments, LLC, Bristol Va, USA <sup>1</sup>). Les concentrations d'Ozone ont été surveillées en permanence avec un analyseur photochimique (modèle : A-21ZX, Eco Sensors, Inc, Boudry, Switzerland<sup>2</sup>). Dans les séries d'expériences les plantes en nombre de douze ont été exposées pendant quatre heures à des concentrations d'O<sub>3</sub>, à savoir 50, 80, 100 ppb de 08 à 12 h chaque jour pendant 07 jours respectivement, tandis que les non traitées ont été utilisées comme contrôle. .

---

<sup>1</sup> Le générateur d'Ozone Ecobox est un nouveau modèle conçu pour les études scientifiques. Génère de l'ozone à partir de l'air frais.

<sup>2</sup> L'Eco capteur d'ozone portable modèle A-21ZX fournit un moyen fiable et peu coûteux de contrôle de générateurs, vannes, tuyauteries et des environnements générales pour les fuites d'ozone et pour estimer les niveaux d'ozone. Il peut être utilisé comme un moniteur intérieur permanent. Comme il peut être utilisé en extérieur pour les études de l'ozone dans des conditions de température modérées

## b. Peuplier

Le choix du matériel biologique utilisé pour la réalisation de cette partie est porté sur le peuplier noir (*Populus nigra*), espèce très répandue sur le territoire algérien, fortement commercialisée et très hautement utilisée dans les travaux de reboisement. L'espèce est connue par sa croissance rapide.

La littérature a révélé que le peuplier noir est très sensible à l'Ozone, aux divers processus physiologiques altérés sous pression d'Ozone (Fares et al, 2006 ; Dumont et al, 2013)

Nous avons procuré les plantes du peuplier de la conservation des forêts de Tissemsilet



**Figure 5 :** Les arbres de *Populus nigra* (cliché MAAMAR Benchohra, 2015)

Les plantes ont été irriguées quotidiennement et entièrement vérifiées. Les seules plantes, avec des feuilles en bonne santé, ont été sélectionnées pour cette expérience.

### 1. Conduite expérimentale

La méthode utilisée pour la fumigation des plantes dans ces expériences est, en effet, une chambre à ciel ouvert naturellement éclairée et contrôlée. La chambre de fumigation présente les dimensions de 3 m de long 3 m de hauteur 3 m de large, avec un espace de 27 m<sup>3</sup> entre l'ouverture du toit et la base de la chambre.



**Figure 6 :** Chambre à ciel ouvert (cliché MAAMAR Benchohra, 2015)

## **2. Fonctionnement de la chambre de fumigation**

Chambre à ciel ouvert aide à l'aération, on applique une dose de fumigation de par 30ppb pendant 4 heures et durant un mois au début 1 mai 2016 jusqu'à 28 mai 2016.

L'Ozone a été produit par un générateur d'Ozone Ecobox (DBG Group Investments, LLC, Bristol Va, USA). Les concentrations d'Ozone ont été surveillées en permanence avec un analyseur photochimique (modèle : A-21ZX, Eco Sensors, Inc, Boudry, Switzerland).



**Figure 7 :** Fumigation de plantes (cliché MAAMAR Benchohra, 2015).

## 5. Mesures des paramètres physiologiques

Différents paramètres qui ont un lien direct avec l'effet de l'Ozone sur les plantes ont été mesurés :

### 5.1. La conductance stomatique

La conductance stomatique a été mesurée à l'aide d'un poromètre (AP4DELTA-T Devices, Cambridge, U.K). Cet appareil regroupe une unité portable permettant le contrôle et l'analyse de la conductance stomatique. Les mesures ont été réalisées sur des feuilles atteintes par l'Ozone et des feuilles saines, durant un temps de 8 à 10 h et sous l'éclairage solaire : température et humidité ambiante.

### 5.2. Paramètres liés à l'intégrité membranaire

L'intégrité membranaire a été évaluée selon la méthode de **Campos et al. (2003)**, afin de vérifier la fluidité transmembranaire. Les disques de feuilles fraîchement coupées (0,5 cm<sup>2</sup>) ont été rincés 3 fois (2 -3 min) avec de l'eau déminéralisée ; ils sont ensuite flottés sur 10 mL d'eau déminéralisée. La fuite d'électrolyte dans la solution était mesurée après 22 h de flotter à une température ambiante, en utilisant un conductimètre (pH-LF 3001-2). La conductivité totale a été obtenue après avoir maintenu les flacons dans un four de 90 ° C pendant 2 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la conductivité totale.

## 6. Paramètres liés à la photosynthèse

### a. Les pigments photosynthétiques

La méthode utilisée est celle de **Lichtenthaler et Welburn (1983)** modifiée par **Porra (2002)**. Elle consiste à broyer une portion 100 mg de feuille, dans un mortier en porcelaine dans 8 ml d'acétone dilué à 80%. Le broyat été filtré dans un tube à essai, en utilisant un papier Watman 22. Le volume du tube été complété à 10 ml, en ajoutant de l'acétone dilué. Les absorbances ont été lues au spectrophotomètre à flamme, à des longueurs d'onde de 470 nm, 645 nm et 663 nm. Les résultats de teneur de Chlorophylle a, Chlorophylle b, Chlorophylle totale et Caroténoïde sont exprimés en mg.g<sup>-1</sup> MF. En effet, la quantification de chlorophylle et le calcul du coefficient d'extinction sont effectués selon la loi de Beer-Lambert. Les équations de quantification de la chlorophylle totale, la chlorophylle a et b et le contenu en chlorophylle dans un extrait de l'acétone à 80%, sont calculés suivant les formules **Porra (2002)**:

**Porra (2002)** rapporte les équations suivantes dans tamponnée aqueuse à 80% d'acétone:

Chlorophylle a ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $12.25 (A_{663.6}) - 2.55 (A_{646.6})$  Chlorophylle b ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $20.31 (A_{646.6}) - 4.91 (A_{663.6})$ . Chlorophylle Totale ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $17.76 (A_{646.6}) + 7.34 (A_{663.6})$ .

## **b. Les sucres solubles**

Les sucres solubles ont été dosés par la méthode de **Dubois et al. (1956)**. La méthode consiste à prendre 100 mg du matériel végétal dans un tube à essai, 2 ml d'éthanol ajoutée à 80% pour faire l'extraction des sucres, les tubes sont laissés à température ambiante et à l'obscurité. Après 48 heures d'extraction on place les tubes dans un bain marie à 70°C pour faire évaporer l'alcool. Après refroidissement, chaque tube 20 ml est rempli de l'eau distillée. On prend ensuite 1 ml de la solution dans un autre tube, on ajoute 1 ml de phénol à 5 % puis 5 ml d'acide sulfurique concentré et on agite au vortex pour homogénéiser la solution. On laisse les tubes au repos pendant 10 mn ensuite on les place une autre fois dans le bain marie pendant 15 mn sous une température de 30°C. On détermine la longueur d'onde de la solution à 490 nm puis on convertit les densités optiques selon la courbe d'étalonnage en  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$ .

## **7. Paramètres liés à la balance minérale**

Le dosage des ions minéraux  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  a été réalisé selon la méthode décrite par **(Vogel, 1955)**. Après la récolte des plantes, les feuilles ont été enveloppées dans du papier aluminium et passées dans l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

La poudre végétale finement broyée est homogénéisée puis séchée durant 24 heures à 80°C, elle est ensuite refroidie dans un dessiccateur pendant 30 min. Une masse de 0.5 g d'échantillon est déposée dans un creuset en porcelaine et placée dans un four à moufle dont sa température sera portée graduellement jusqu'à 650°C et puis maintenue pendant 03 heures jusqu'à l'obtention des cendres blanches.

Les cendres obtenues ont été humectées par 02 ml d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  absolue après le refroidissement des creusets. Le tout est mis sur une plaque chauffante afin d'évaporer l'acide et puis remis dans le four à moufle pendant 01 heure, et pour être sûr que toute la matière organique est déminéralisée, 01 ml de l'acide chlorhydrique concentré  $\text{HCl}$  6N est additionné au contenu de la capsule, ensuite le taux de cendre est déterminé par pesée.

La capsule et le filtre sont rincés à l'eau tiède, le mélange obtenu est filtré sur un papier filtre sans cendres (wattman) dans une fiole jaugée de 50 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau bi-distillée. Le produit final se prête aux dosages par spectrométrie à flamme des éléments  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et les densités optiques ont été converties selon la masse de l'échantillon et le volume de dilution.

## **8. Analyse statistique**

### **a. L'étude statistique pour le cas de tomate**

Le traitement statistique a été effectué à l'aide du logiciel STATISTICA 8.0 dont les données obtenues ont été soumises à plusieurs types d'analyse, à savoir :

- Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques
- Tests d'analyse de variance à un seul facteur de classification : Effet dose sur le pourcentage de nécroses
- Corrélations : paramètres physiologiques – pourcentage de nécrose- doses.
- Evolution des paramètres physiologiques en fonction de la dose.

### **b. L'étude statistique pour le cas du peuplier**

Etude de la relation pourcentage de nécroses en fonction du temps ;

Comparaison entre les paramètres étudiés avec celle du témoin (conductance stomatique, intégrité membranaire et les paramètres liés à la photosynthèse) .

**CHAPITRE 5**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSIONS**

## 1. Cas de la tomate

Les séries d'expériences préliminaires de fumigation ont été effectuées pour établir la gamme de concentrations à tester. La concentration la plus faible est de 50 ppb ; celle-ci a été estimée pendant 4 heures d'exposition à l'Ozone sur les plants de tomate, et pendant 7 jours. En effet, cette dose a entraînée de graves blessures sur les feuilles, avec un vaste effondrement des tissus du mésophylle, visible qu'après 24 heures de fumigation pour la variété locale « Rechaiga II ». Les feuilles les plus endommagées sont les cinquièmes et sixièmes feuilles de l'apex. Ces zones lésées sont devenues nécrotiques dans les jours suivants, tandis qu'aucun effet n'a été remarqué sur les feuilles de l'autre variété tomate de Colgar même après une semaine. Les résultats sont illustrés dans le tableau N° 2.

**Tableau N° 2 :** Résultats de trois tours de fumigation par l'Ozone sur les feuilles de *Solanum lycopersicum* (L.)

Variété	Concentration (ppb)	Temps après la fumigation		
		24 h	48 h	7 jrs
Rechaiga II	50	Ptc	Tj	F
	80	Ptc	Ptb	Tb+F
	100	Tj	Tb	Fb
De Colgar		0	0	0

Légende :

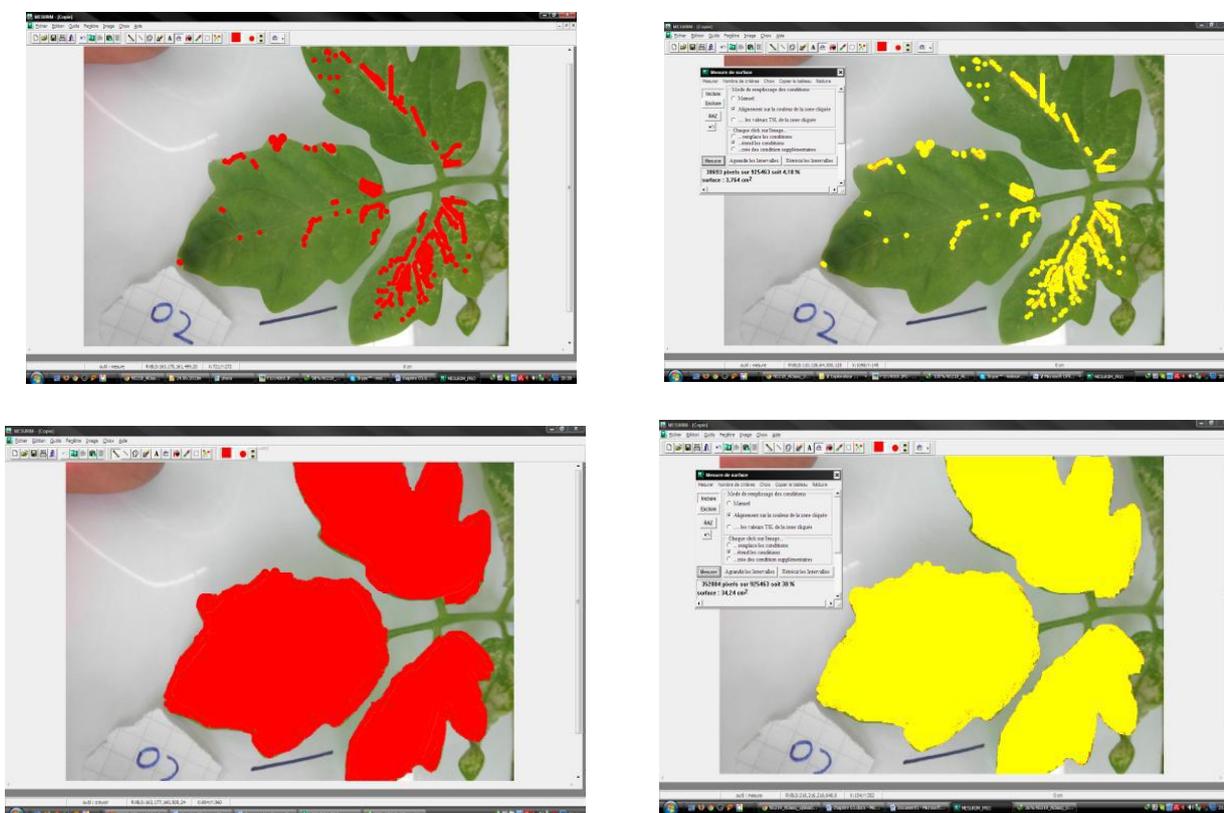
Ptc : petites taches chlorotiques inter-nervures Tb : taches de couleur bronze Tj : taches jaunes inter-nervures

F : flétrissement des feuilles Fb : flétrissement + couleurs bronze des feuilles 0 : Pas de réponses.



**Figure 8 :** Différents stades de développement des nécroses produites par l’Ozone produit par l’Ecobox sur les feuilles de tomate Rechaiga II.

**2. Calcul de surface des nécroses** Après chaque tour de fumigation, des blessures visibles ont été évalués comme étant le pourcentage de la feuille blessée à l’aide d’un logiciel de calcul de surface *Mesurim*<sup>®</sup>. Des photos numériques, de haute qualité et d’une manière très précise, ont prises sur chaque feuille de la plante Figure (9).



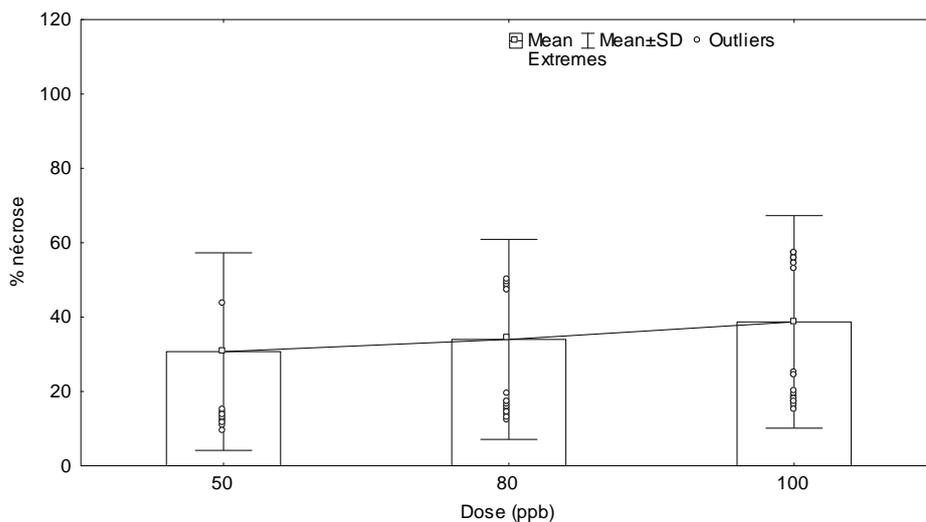
**Figure 9 :** Les étapes de calcul des pourcentages de blessures à l’aide de logiciel *Mesurim*

Le calcul de pourcentages des nécroses commençait par :

1. la coloration des surfaces de nécroses (A),
2. calcul de cette surface (B),
3. Coloration de la surface totale (C),
4. Calcul de la surface totale (D),
5. Calcul du rapport surface nécrosée/ surface totale.

### 3. Estimation de pourcentage de nécroses en fonction de la dose d'Ozone chez la tomate Rechaiga II :

Les résultats d'estimation de pourcentage des surfaces nécrosées, en fonction des trois doses d'O<sub>3</sub>, sont représentés dans la figure N° 10.



**Figure 10 :** Pourcentages de nécrose en fonction des doses de l'Ozone.

La lecture de cette figure a permis de constater, après les trois expériences de fumigation d'O<sub>3</sub> allant de 50 à 100 ppb pendant 4 heures et durant 7 jours, que les plantes ont présenté des symptômes différents au cours de la semaine. Une fumigation de 50 ppb, peut causer des lésions nécrotiques typiques d'ivoire inférieures à 1 mm, qui étaient reconnaissables seulement 24 heures plus tard. Ces taches gagnaient de surface tout en arrivant à un flétrissement à la fin de l'expérience. Par ailleurs, la concentration de 80 ppb a donné une réponse similaire, mais les zones de tissus effondrés étaient presque arrondis, peut aller à un diamètre de plus de 2 mm ; elles s'évaluent par la suite en points bruns rougeâtres

nécrotiques. Ainsi, le bronzage a continué de croître durant les jours suivants. Cependant, l'effondrement du mésophylle était déjà visible peu de temps après la fumigation avec 100 ppb. Quant aux plantes de tomate Colgar sont restées asymptomatiques.

Les blessures foliaires augmentent avec l'augmentation de la concentration d'O<sub>3</sub> dans une relation linéaire dans tous les cas (Albert et al, 1990).

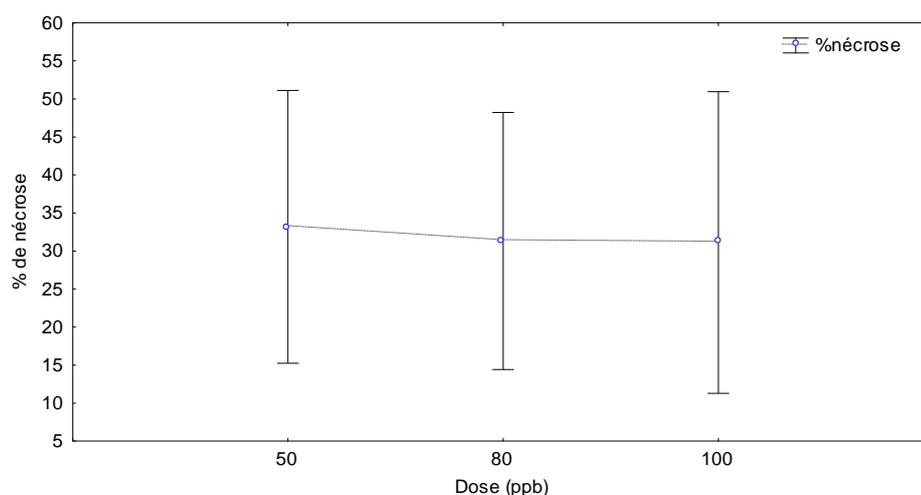
#### 4. Effet dose sur le pourcentage de nécroses : analyse de variance

Pour étudier l'effet dose sur le pourcentage de nécroses sur les feuilles de tomate Rechaïga II, nous avons réalisé une analyse de variance à un seul facteur de classification

**Tableau N°3** : Analyse de variance entre l'effet dose et le pourcentage des nécroses.

Analysis of Variance. Marked effects are significant at $p < ,05000$					
	SCE	DDL	CM	F	p
%nécrose	30,94	2	15,47	0,01	0,98

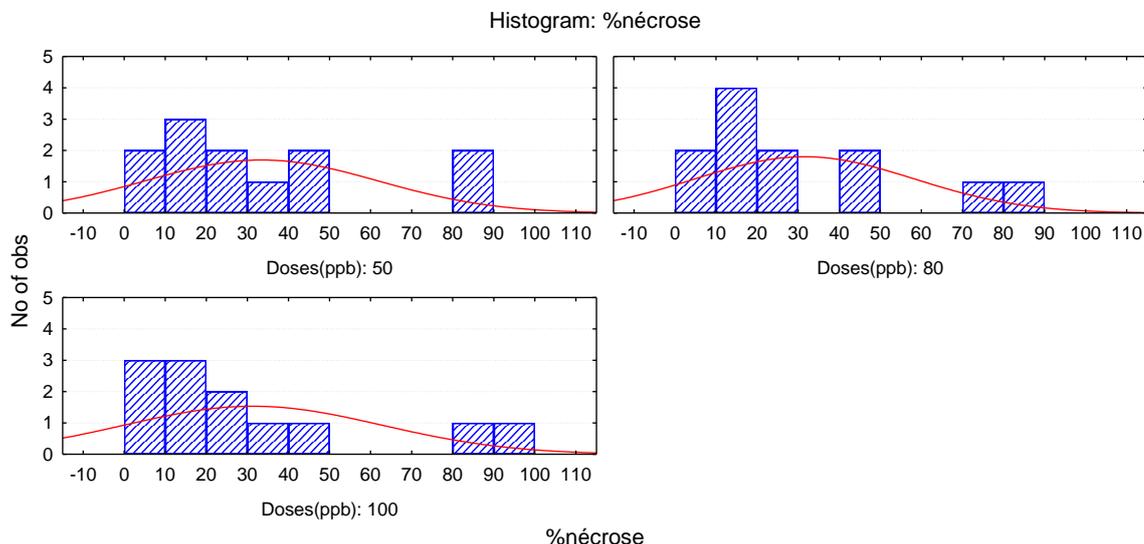
Aucun effet significatif n'est donné par cette analyse de la variance, il n'existe aucune différence entre les trois doses d'Ozone utilisées en termes d'effet. Ceci a été confirmé par Iriti et al, (2006), chez la tomate *Lycopersicon pimpinellifolium*, où les concentrations cumulées par heures ont dépassées les 40 ppb pour donner un effet sur cette espèce. Cette analyse a permis de constater que la concentration de 50 ppb est la concentration la plus basse est la plus effective, qui au-delà du quelle, Nos plantes de tomate commencent à donner des réponses de sensibilité envers l'Ozone.



**Figure 11:** Pourcentages de nécrose en fonction des doses.

Les réponses de la tomate durant les trois tours de fumigation, sont en quasi-totalité similaires, confirmé par la (fig 11). Nous remarquons une stabilisation des réponses après 7

jours. Une sensible diminution de la tendance dans le graphe est remarquée entre les doses 50 et 80 ppb, celle-ci, est peut être due, à la différence en nombre de feuilles analysées. Il faut noter aussi que, le pourcentage de nécroses en fonction des doses d'O<sub>3</sub> suit une loi Normale



**Figure 12 :** Distribution Normale des pourcentages de nécrose en fonction des doses de l'Ozone.

## 5. Mesures de paramètres physiologiques en fonction des doses :

### a. Cas de dose 50 ppb

Pour bien vérifier, l'effet de la dose sur les paramètres physiologiques, nous avons fait appel, aux statistiques descriptives.

**Tableau N° 4 :** Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques.

	N	Moy	Med	Min	Max	1 ère Q	3 ème Q	Ecart type	Témoin
Con (S cm <sup>-1</sup> )	12	1,19	1,17	0,44	1,68	1,02	1,43	0,33	1,88
IM (%)	10	10,51	10,10	5,26	15,78	6,25	14,24	4,07	4,16
K <sup>+</sup> (ppm)	12	0,03	0,03	0,00	0,06	0,01	0,05	0,02	0,08
Na <sup>+</sup> (ppm)	12	0,11	0,08	0,01	0,27	0,06	0,15	0,07	0,22
Chl a ( mg.g <sup>-1</sup> MF)	11	6,65	7,13	4,05	9,81	4,82	7,52	1,81	16,67
Chl b( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	4,68	4,68	3,00	6,7	4,02	5,25	1,07	15,5
Chl T( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	11,32	11,37	7,89	14,82	9,39	13,84	2,42	32,43
Caro( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	1,96	1,99	0,38	3,81	1,27	2,71	1,03	4,72
Suc (µg.g <sup>-1</sup> MF)	12	0,56	0,52	0,40	0,79	0,46	0,69	0,14	0,47

Les résultats de statistique descriptive des données sont illustrés dans le tab.4, dont lesquels, nous remarquons que la moyenne de conductance stomatique qui est de  $1,19 \pm 0,33$

S cm<sup>-1</sup>; elle est inférieure à celle du témoin. De même, les teneurs en potassium (K<sup>+</sup>), en sodium (Na<sup>+</sup>), la chlorophylle a (chl a), la chlorophylle b (chl b), la chlorophylle totale (chl T), et les caroténoïdes ont, respectivement, les valeurs de 0.03 ± 0.02 ppm ; 0.11 ± 0.07 ppm ; 6.65 ± 1.81 mg.g<sup>-1</sup> MF ; 4.68 ± 1.07 mg.g<sup>-1</sup> MF ; 11.32 ± 2.42 mg.g<sup>-1</sup> MF; 1.96 ± 1.03 mg.g<sup>-1</sup> MF dépassant nettement les valeurs témoins qui sont, respectivement, 0.08 ppm; 0.22 ppm; 16.67 mg.g<sup>-1</sup> MF; 15.50 mg.g<sup>-1</sup> MF ; 32.43 mg.g<sup>-1</sup> MF ; 4.72 mg.g<sup>-1</sup> MF.

En revanche, l'intégrité membranaire et la teneur en sucres solubles semblent avoir des moyennes de 10.51 ± 4.07 % et 0.56 ± 0.14 mg.g<sup>-1</sup> MF supérieures à celles enregistrées chez le témoin qui sont de l'ordre de 4.16 % et 0.47 mg.g<sup>-1</sup> MF.

### b. Cas de 80 ppb

Une autre analyse descriptive est faite, pour décortiquer les résultats de la fumigation par la dose 80 ppb sur l'ensemble des paramètres physiologiques.

**Tableau N°5** : Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques.

	N	Moy	Med	Min	Max	1 <sup>ère</sup> Q	3 <sup>ème</sup> Q	Ecart type	Témoin
Con (S cm <sup>-1</sup> )	12	0,85	0,93	0,27	1,61	0,37	1,19	0,49	2,03
IM (%)	12	11,69	12,41	5,24	14,87	10,50	13,57	2,88	5,04
K <sup>+</sup> (ppm)	12	0,04	0,04	0,02	0,08	0,03	0,06	0,01	0,10
Na <sup>+</sup> (ppm)	12	0,09	0,05	0,01	0,29	0,04	0,15	0,08	0,29
Chl a ( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	6,79	7,17	4,01	9,71	5,07	8,58	1,89	18,62
Chl b( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	5,69	5,50	3,32	8,84	4,70	6,51	1,42	15,12
Chl T( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	12,26	12,77	8,54	15,26	10,52	13,96	2,23	31,75
Caro( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	5,36	5,33	3,32	6,86	4,70	6,13	1,03	11,46
Suc (µg.g <sup>-1</sup> MF)	12	0,58	0,53	0,44	0,80	0,48	0,70	0,13	0,43

L'analyse du tableau N° 5 a permis de constater une similitude de résultats avec de légères différences entre le Tab. 4 et 5. Les moyennes trouvées de conductance stomatique, teneur en potassium, teneur en sodium, teneur en chlorophylle a, b, T et la teneur en caroténoïdes respectivement sont de l'ordre de 0.85 ± 0.49 ; 0.04 ± 0.01 ; 0.09 ± 0.08 ; 6.79 ± 1.89 ; 5.69 ± 1.42 ; 12.26 ± 2.23 ; 5.36 ± 1.03 inférieures aux moyennes des témoins enregistrées.

Cependant, les moyennes qui correspondent à l'intégrité membranaire et la teneur en sucre sont aussi de 11.69 ± 2.88 ; 0.58 ± 0.13 supérieures aux valeurs 5.04, 0.43 du témoin.

### c. Cas de 100 ppb

L'effet de la dose 100 ppb sur les paramètres physiologiques est détaillé dans le tableau suivant.

**Tableau N°6** : Statistiques descriptives des différents résultats lors de la mesure des paramètres physiologiques

	N	Moy	Med	Min	Max	1 <sup>ère</sup> Q	3 <sup>ème</sup> Q	Ecart type	Témoin
Con (S cm <sup>-1</sup> )	12	1,20	1,25	0,42	1,83	0,88	1,55	0,45	1,94
IM (%)	12	12,06	12,61	5,32	16,80	10,67	14,07	3,18	5,12
K <sup>+</sup> (ppm)	12	0,13	0,08	0,05	0,45	0,06	0,09	0,13	0,094
Na <sup>+</sup> (ppm)	12	0,10	0,08	0,04	0,21	0,06	0,13	0,05	0,228
Chl a ( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	6,68	6,88	4,09	9,75	4,86	8,41	1,90	20,91
Chl b( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	5,28	5,33	3,34	6,86	4,34	6,30	1,17	11,42
Chl T( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	12,16	12,70	8,42	15,29	10,48	13,73	2,28	32,65
Caro( mg.g <sup>-1</sup> MF)	12	4,62	4,87	1,16	6,11	4,33	5,35	1,25	6,71
Suc (µg.g <sup>-1</sup> MF)	12	1,20	1,25	0,42	1,83	0,88	1,55	0,45	1,94

Si nous comparons les résultats des tableaux N° 4 et N° 5 avec le tableau N° 6, nous pouvons conclure, en tenant compte des valeurs de l'intégrité membranaire et la teneur en sucres solubles, demeurent toujours supérieures à celles du témoin, tandis que les moyennes des autres paramètres présentent la même infériorité en comparaison avec celles du témoin. Les altérations peuvent se manifester à de concentrations de cinquantaine de ppb (v). (Ramade, 2007). Confirmant que la dose 50 ppb la plus basse qui au-delà de laquelle les réponses commencent à apparaître.

### 6. Corrélations : paramètres physiologiques – pourcentage de nécrose- doses.

Les résultats ont fait l'objet d'une matrice de corrélation, afin d'étudier les relations significatives qui peuvent exister entre les paramètres physiologiques, pourcentage de nécrose et les différentes doses générées par l'Ecobox (Tab 7).

**Tableau N°7** : Matrice de corrélations : paramètres physiologiques pourcentage de nécrose-doses.

	Doses	Con	IM	K <sub>+</sub>	Na <sub>+</sub>	Chl a	Chl b	Chl T	Caro	Néc	Suc
Doses	1,00										
Con (S cm <sup>-1</sup> )	-0,03	1,00									
IM (%)	0,19	0,04	1,00								
K <sub>+</sub> (ppm)	0,43*	-0,06	0,20	1,00							
Na <sub>+</sub> (ppm)	-0,12	-0,06	-0,19	-0,13	1,00						
Chl a ( mg.g <sup>-1</sup> MF)	-0,03	-0,03	0,20	0,31	-0,14	1,00					
Chl b( mg.g <sup>-1</sup> MF)	0,17	-0,15	0,15	0,05	0,28	0,25	1,00				
Chl T( mg.g <sup>-1</sup> MF)	0,06	-0,00	0,29	0,32	-0,10	0,65	0,35	1,00			
Caro( mg.g <sup>-1</sup> MF)	0,61***	-0,18	0,26	0,24	-0,02	0,02	0,26	0,24	1,00		
Néc	0,06	-0,17	-0,32	-0,21	-0,12	-0,56**	-0,05	-0,47**	-0,20	1,00	
Suc (µg.g <sup>-1</sup> MF)	0,49**	-0,18	0,08	0,48	-0,03	0,14	0,05	0,19	0,26	0,06	1,00

Légende : \*Effet significatif. \*\*Effet hautement significatif. \*\*\* Effet très hautement significatif.

L'analyse du tableau, montre qu'il existe un effet significatif entre la dose d'Ozone et la teneur en potassium ( $P \leq 0.05$ ) ; la teneur sucres solubles dépend directement de la dose admise d'Ozone ( $P \leq 0.01$ ), autre que ces deux liaisons, il existe un lien étroit entre la dose d'Ozone et la teneur en caroténoïdes ( $P \leq 0.001$ ).

Indépendamment des premiers résultats, un autre lien négativement significatif existe entre les teneurs en chlorophylle (a, T) et le pourcentage de nécroses, plus cette dernière augmente, plus les teneurs diminuent.

## 7. Effet Dose sur les paramètres physiologiques : analyse de variance

Les résultats font également l'objet d'une analyse de variance à un seul facteur de classification " effet dose". Les résultats de cette analyse sont représentés dans le tableau N°8.

**Tableau N°8** : Analyse de variance de l'effet dose sur les paramètres physiologiques.

	SCE	DDL	CM	F	p
K <sub>+</sub> (ppm)	0,06	2	0,03	5,50**	0,00
Caro( mg.g <sup>-1</sup> MF)	76,45	2	38,22	30,80***	0,00
Suc (µg.g <sup>-1</sup> MF)	0,31	2	0,15	6,84**	0,00

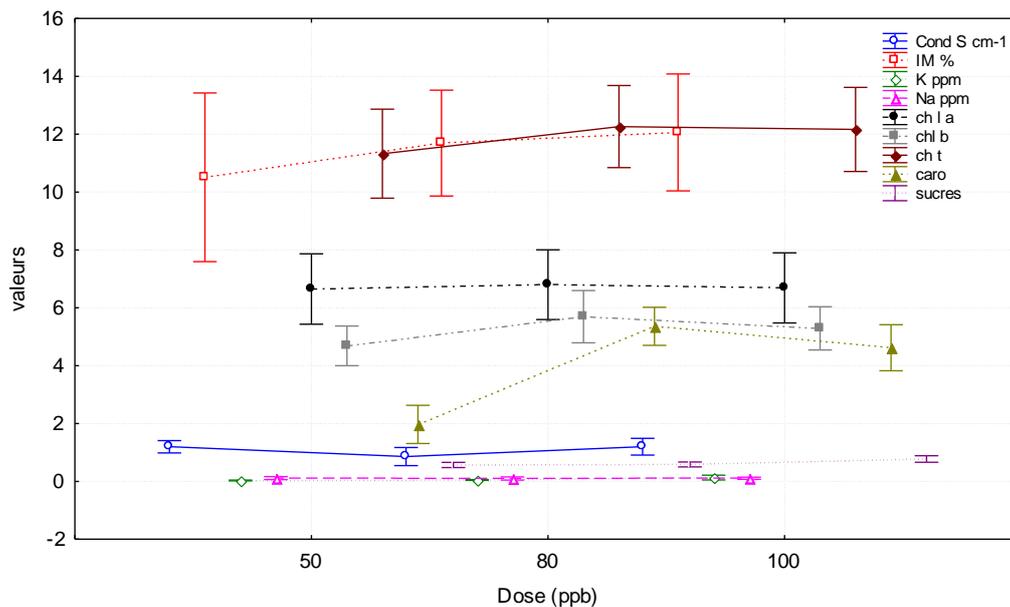
\*Effet significatif. \*\*Effet hautement significatif. \*\*\* Effet très hautement significatif

Nous constatons, en analysant le tableau N° 8, qu'il y a un effet de dose hautement significatif sur : la teneur en potassium et sur la teneur en sucres solubles, en parallèle, il existe un effet très hautement significatif de la dose d'Ozone sur la teneur en caroténoïdes.

Par contre, il n'existe aucun effet significatif pour les autres paramètres. Une figure démontrant la tendance d'évolution des paramètres en fonction de la dose a été faite pour donner plus d'explications.

### 8. Evolution des paramètres physiologiques en fonction de la dose :

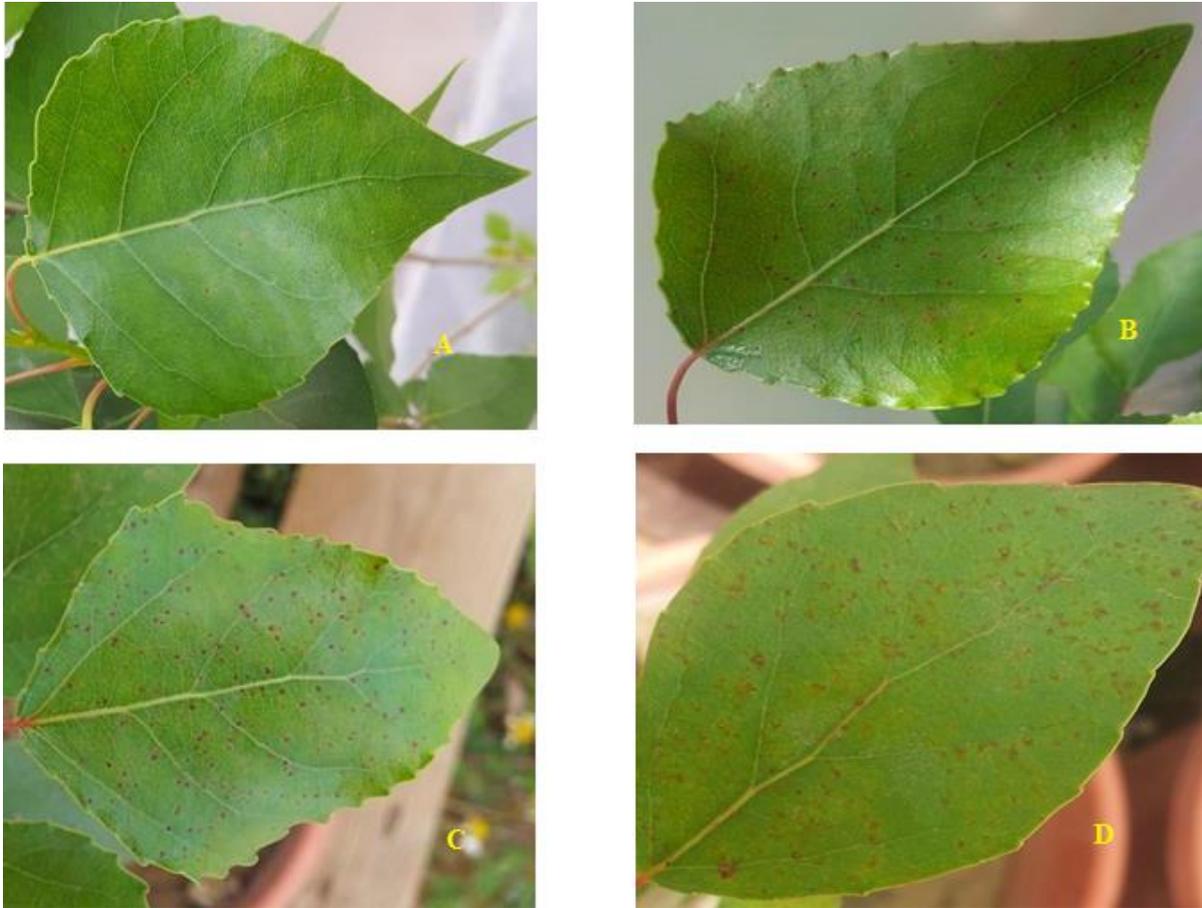
Dans le but d'étudier l'évolution des paramètres physiologiques (conductance stomatique, l'intégrité membranaire, teneur en chlorophylle a, b et totale, teneur en potassium, en sodium ainsi que la teneur en sucres solubles) en fonction de la dose (50, 80 et 100 ppb), nous avons réalisé la courbe : paramètre – dose. L'ensemble des ces courbes sont regroupé dans la figure 13.



**Figure 13 :** l'évolution des paramètres physiologiques en fonction de la dose d'Ozone.

## 2. Cas du Peuplier

Une dose de 30 ppb a été attribuée pour la fumigation des jeunes arbres du peuplier, cette fumigation quotidienne pour un mois de 8 à 12h, a révélé que le peuplier noir *Populus nigra* est sensible envers l'Ozone troposphérique, comme le montre la figure (14).



**A** : Feuille saine ; **B** : Première apparition des nécroses ;

**C** : Développement des nécroses ; **D** : Stade final (fin de l'expérience).

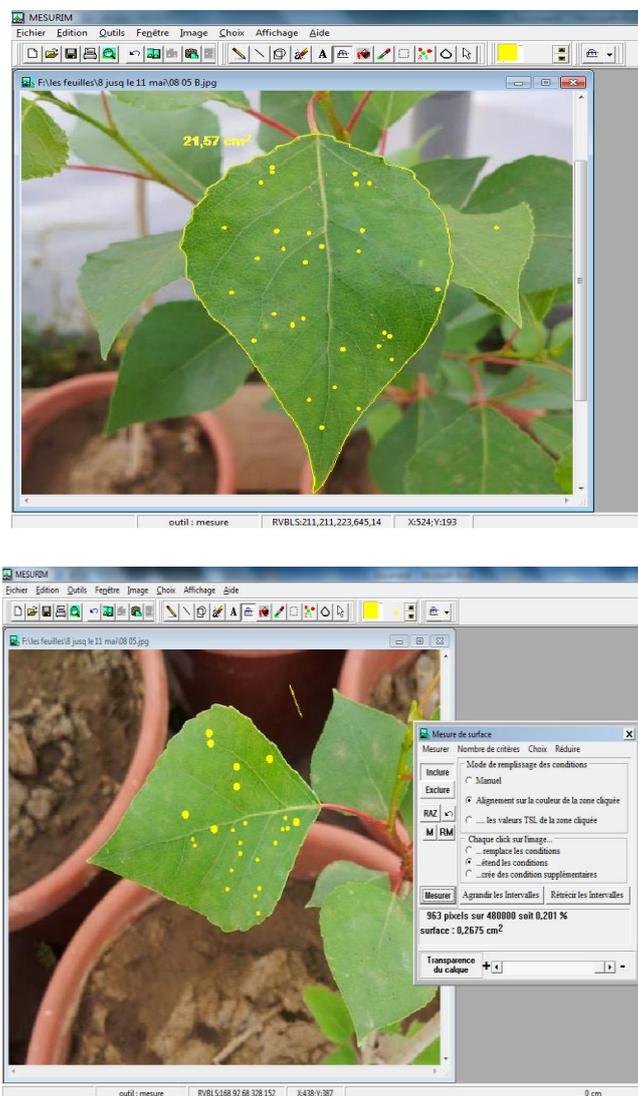
**Figure 14** : Différents stades de développement des nécroses produites par l'Ozone produit par l'Ecobox sur les feuilles du peuplier ( cliché Maamar Benchohra, 2015).

La figure au-dessus montre les différents stade de développement des nécroses caractéristique de l'effet de l'ozone sur le plan physiologique, l'ozone altère le fonctionnement normal de la plante et détruit petit à petit la structure du limbe, ceci est traduit par l'apparition de tâches chlorotique connues communément sous le nom de nécroses, qui sont des tâches de couleur bronze. Nous avons remarqué que malgré la dose d'ozone est faible mais la surface des nécroses ne cessait à accroître et prendre de l'ampleur.

L'accroissement des dégâts de la dose d'ozone est probablement dû à l'effet chronique que subissent les plantes du peuplier.

## 2. Calcul de surface des nécroses

Après la fumigation, des blessures visibles ont été évalués comme étant le pourcentage de la feuille blessée à l'aide d'un logiciel de calcul de surface *Mesurim*. Des photos numériques, de haute qualité et d'une manière très précise, sont prises sur chaque feuille de la plante (Figure 15).



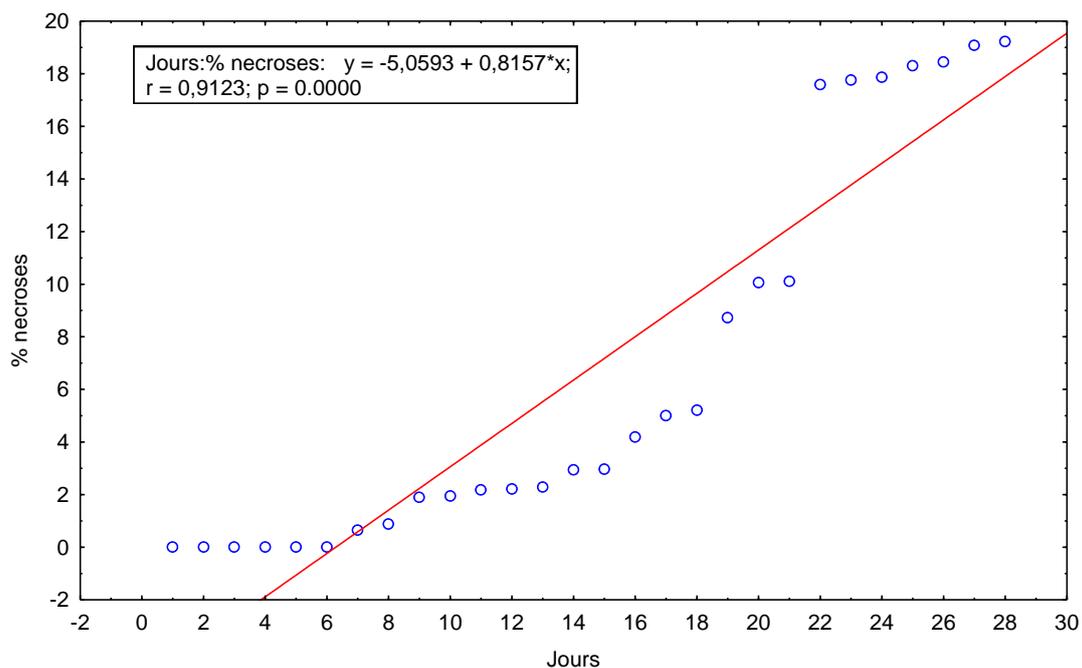
**Figure 15 :** Les étapes de calcul des pourcentages de blessures à l'aide de logiciel *Mesurim* (cliché MAAMAR Benchohra, 2015).

Le calcul de pourcentages des nécroses commençait par :

Calcul de la surface total du limbe, ensuite, calcul de la surface des tâches de nécroses en l'attribuant des couleurs spécifiques qui vont être reconnues par le logiciel. Les résultats sont exprimés en  $\text{cm}^2$  pour les surfaces.

### 3. Développement des nécroses en fonction du temps

Afin d'établir le lien entre de le durée de fumigation en jours et l'effet de l'ozone sur les plantes, nous avons enchainé avec un graphe qui illustre cette relation suivi avec un test de régression.



**Figure 16 :** Développement de la surface des nécroses en fonction du temps.

D'après la lecture du graphe nous remarquons que l'apparition des nécroses ne commence qu'au-delà du sixième jour. Les taches des nécroses gagnent de plus en plus de surface en fonction du temps. Une aggravation continue de l'état des limbes est remarqué jusqu'à l'atteinte d'un pourcentage maximal d'environ 20% de surface de la feuille est entièrement nécrosée, après environ un mois de fumigation sous chambre à ciel ouvert (*Open Top Chamber*).

### 4. Corrélation des nécroses en fonction du nombre des jours de fumigation

Les résultats de la corrélation des pourcentages des surfaces nécrosées, en fonction des nombre du jour et l'intensité du lien est vérifié par une matrice de corrélation, les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau N° 9** : Matrice de corrélation entre le nombre de jours et le pourcentage des nécroses

	<b>% necroses</b>
<b>Jours</b>	<b>0,91</b>
	<b>p=,000***</b>

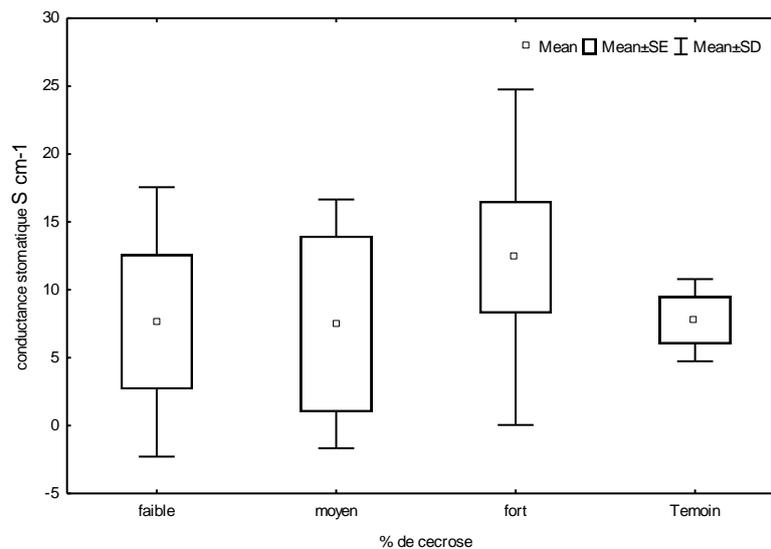
\*\*\* Très hautement significatif

Les résultats du tableau confirme qu'il existe une liaison étroite entre le nombre jours de fumigation et le développement des surface nécrosées ( $p < 0,000$ ), plus le nombre des jours est important plus les dégâts sont grave, ces résultats confirme l'effet de la dose critique qui suppose que même si la dose est faible et la durée de contact est importante les dégâts peuvent être catastrophiques.

## 5. Mesures de paramètres physiologiques en fonction des doses

### a. La conductance stomatique

Les résultats de cette analyse se figurent dans la figure en dessous



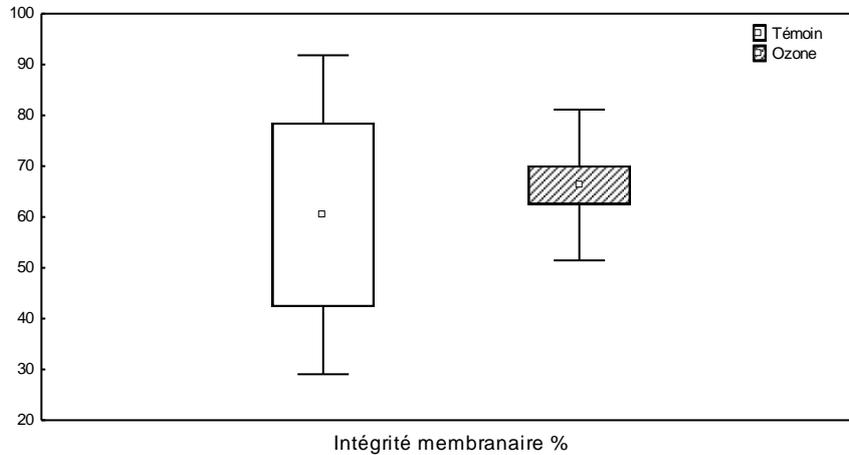
**Figure 17** : Comparaison de la conductance stomatique des plantes fumigées avec le témoin.

L'analyse de la figure montre les feuilles à faible et moyen recouvrement de taches de nécroses ont quasi semblablement à la même conductance stomatique que celle enregistré dans les feuilles des plantes témoin. Ceci est explicable par la faible altération des feuille ainsi que la lente réaction de la plante.

Contrairement à ces résultats, les feuilles ou il y'a une grande surface nécrosée plus la conductance stomatique est important

## b. L'intégrité membranaire

La figure 18 représente une comparaison entre les résultats de l'intégrité membranaire trouvée chez les plantes témoins et chez les plantes fumigées.



**Figure 18** : Comparaison de l'intégrité membranaire des plantes fumigées avec le témoin.

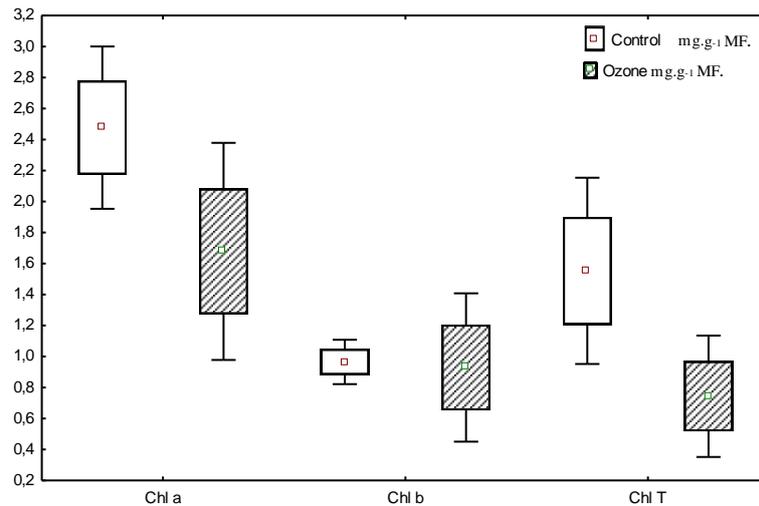
Il est clair qu'il existe une différence entre les pourcentages de l'intégrité membranaires chez les différentes plantes du peuplier, la figure montre que le pourcentage est important dans les plantes soumises à la fumigation d'ozone.

Cette fumigation a pu engendrer des dégâts au niveau cellulaire en libérant des constituants de la membrane cellulaire, tandis que les cellules témoins sont restées intactes.

## 6. Paramètres liés à la photosynthèse

### a. Les pigments photosynthétiques

Une comparaison entre les teneurs des Chlorophylle a, b et total chez les plantes stressées par l'Ozone et les témoins est faite dans la figure suivante :



**Figure 19:** Comparaison des teneurs en chlorophylle a, b et T des plantes fumigées avec le témoin.

Suite à cette description, nous notons que les niveaux des pigments chlorophylliens dans les plantes soumises à la fumigation sont en nette dégradation et strictement inférieure à celle épargnées (Témoin).

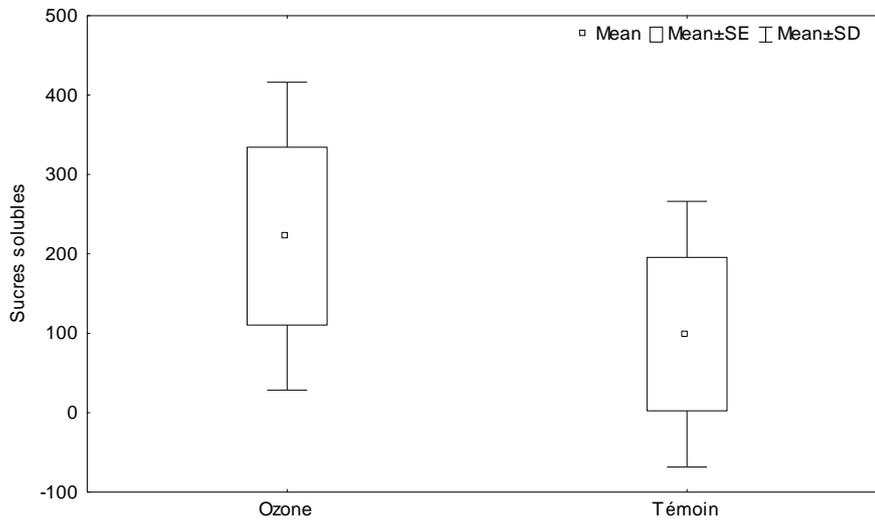
La chlorophylle a, a subit des altérations sérieuses ou l'écart entre ces teneurs dans le témoin et dans les plantes seines est flagrant, comparée à la chlorophylle b qui a été légèrement affectée par le stress induit par l'Ozone.

La chlorophylle totale T, quant à elle, aussi comme la chlorophylle a n'est pas mis en isolation des effets destructeurs des molécules d'Ozone.

Les pigments photosynthétiques sont le siège des réactions photochimiques et sont la source de la couleur verte des feuilles, de ce fait l'atteinte de ces pigments conduira à la baisse de l'activité photosynthétique et au changement de couleur. L'effondrement du mésophile autour des cellules stomatique suite à la réaction de l'Ozone est la principale cause d'apparition des nécroses.

## b. Les sucres solubles

Les résultats obtenus lors de l'analyse des sucres solubles sont illustrés dans la figure 20



**Figure 20 :** Comparaison des teneurs en sucre solubles des plantes fumigées avec le témoin.

Comme au cas précédents des autres paramètres, nous remarquons que la teneur en solubles est plus élevée dans les plantes fumigées que celle des plantes témoins, l'amidon présent à ce niveau n'a pas été épargné par l'ozone, en le solubilisant pour donner une nette supériorité en matière de quantité comparé à celle du témoin.

## **8. Discussions**

### **a. La conductance stomatique**

La conductance stomatique s'avère plus importante dans les feuilles de la plante témoin que celles enregistrées chez les feuilles nécrosées, les valeurs les plus hautes ont été enregistrées dans les feuilles les plus atteintes de nécroses tandis que plus la feuille est saine, plus la valeur de la conductance est proche à celle du témoin. Ces résultats sont en concordance aux résultats trouvés par (Gerosa et al, 2003).

### **b. L'intégrité membranaire**

L'analyse de l'intégrité membranaire des cellules a été évaluée par les mesures de la conductivité électrique. Cette analyse montre un pourcentage important chez les individus sous traitement, leurs cellules perdent de leur intégrité membranaire après fumigation par l'Ozone et libèrent les électrolytes dont l'augmentation du pourcentage. Par ailleurs, la membrane du témoin garde sa structure intacte.

Après l'apparition des tâches chlorotiques, une augmentation évidente des fuites du soluté des membranes dans les plantes traitées a été observée. Tel que rapporté dans d'autres espèces, une courte exposition à l'Ozone peut induire un effet délétère sur la fonction (Guidi et al, 2001). L'intégrité (Calateyud et al, 2003 ; Francini et al, 2007). Conformation (Ranieri et al, 2001) et la capacité de transport de la membrane (Plazek et al, 2000).

## **9. Paramètres liés à la photosynthèse**

### **a. Les pigments photosynthétiques**

La dégradation de la chlorophylle est l'une des effets négatifs confirmant l'impact d'Ozone sur les espèces comme l'indique la baisse de la teneur en chlorophylle dans certains feuillus Quercus (Broadmeadow et Jackson, 2000 et Bussotti et al, 2007).

De nombreux types de stress causent des dommages aux complexes protéine-chlorophylle situés dans les thylakoids, en particulier dans les centres réactionnels du PSII (Photo Système II). L'activité du PSII est étroitement associée à la peroxydation lipidique. A la fin de la fumigation et pendant le temps de récupération, nos plantes ont montré une diminution significative de la teneur en chlorophylle. Il y'a un débat en ce qui concerne le mécanisme principal de cette diminution du taux de photosynthèse, avec des preuves d'effets directs d'une exposition à l'O<sub>3</sub> sur les réactions claires ou sombres de la photosynthèse ou les

deux (**Power et Ashmore, 2002**) ou par un effet de fermeture des stomates indirect (**Noormets et al, 2001**).

#### **b. Les sucres solubles**

**Wellburn and Wellburn (1994)** ont fumigé le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) avec de l'Ozone et ont découvert qu'en été, les plantes montraient une importante accumulation d'amidon (particulièrement dans l'endo-derme), avec simultanément un écrasement des cellules du phloème. L'accumulation de l'amidon le long des nervures de la feuille a également été observée au sein des espèces d'arbustes, comme par exemple chez le Betula (**Landolt et al, 1997**). Les auteurs des deux études ont conclu qu'une telle accumulation d'amidon était probablement due à un chargement altéré du phloème, une interprétation qui pourrait être également appropriée pour expliquer nos résultats.

# Conclusion générale

L'émission de précurseurs en raison non réglementée du développement industriel et de l'utilisation croissante rapide des véhicules automobiles dans les pays en développement; peut aggraver l'impact prévu de la hausse des concentrations de l'O<sub>3</sub>. Il est essentiel d'améliorer notre compréhension des processus physiologiques et de développement qui sous-tendent les effets néfastes de l'O<sub>3</sub> sur les plantes, afin d'améliorer les prévisions de l'impact probable, sur la sécurité alimentaire et l'élaboration de stratégies pour minimiser les pertes de rendement.

Cette étude vise à caractériser la réponse physiologique de deux cultivars de tomate De Colgar et Rechaiga II, soumises à des concentrations d'Ozone troposphérique (50, 80 et 100 ppb) pendant 04 heures, pour une durée de 07 jours pour chaque concentrations. Les résultats obtenus indiquent une sensibilité de la variété Rechaiga II envers même la plus faible dose (50ppb) par rapport à l'autre variété qui restait asymptotique.

Cette sensibilité se manifesta par l'apparition de tâches nécrotiques qui apparaissaient peu de temps après la fumigation « 24 heures plus tard ». Ces nécroses gagnaient de surfaces foliaires avec l'augmentation de la durée de contact avec l'Ozone.

Le deuxième objectif escompté à travers cette étude a été la caractérisation de la réponse physiologique des plantes vis-à-vis de l'Ozone, qui agit directement, sur la fermeture des stomates en réduisant la conductance stomatique.

En outre, il joue défavorablement en faveur de l'intégrité membranaire, l'O<sub>3</sub> détruit la membrane cellulaire. Des pertes du liquide cellulaire ont été enregistrées.

La photosynthèse n'a pas été épargnée, une baisse de la teneur en chlorophylle a, b et totale ainsi, que la teneur en caroténoïdes, qui affirme les effets négatifs de l'Ozone. On remarquait que nos plantes aient une tendance à s'affaiblir suite à la mort cellulaire programmée « l'apoptose » et la dégradation de l'amidon en libérant des sucres solubles. Cet événement a affecté aussi la teneur en ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> au niveau cellulaire.

Cette étude, affirme que la variété Rechaiga II (*Solanum lycopersicum*) est sensible à l'Ozone, nous suggérons qu'elle peut être utilisée comme un bioindicateur efficace du polluant au future. De même, il apparait que les différences dans l'expression des symptômes peuvent être liées aux différentes gammes de concentrations d'O<sub>3</sub>. Finalement, la vérification de certaines fonctions comme la respiration, photosynthèse, teneur en sucres et en ions peut être utiles dans la prédiction des symptômes visibles qui seront dans les jours suivants (au delà de 07 jours).

Le contenu foliaire en sodium et en potassium ainsi que les teneurs en sucres solubles et en chlorophylles, peuvent servir comme biomarqueurs intéressants pour indiquer la tolérance ou la sensibilité.

L'autre variété, tomate De Colgar peut être utilisée pour l'amélioration des qualités de tomate Rechaiga II ; en matière de résistance, nécessitant un *crossing-over* ou d'autres procédés génétiques convenables.

Il est important de noter que les résultats obtenus dans la première partie de nos expériences, sur la fumigation de la tomate, surtout pour les paramètres physiologique est confirmé par la deuxième partie, la fumigation du peuplier, ou pratiquement nous avons obtenu des résultats similaires.

Ce qui nous mène à conclure que l'ozone agit de la même façon sur le plan physiologique, en induisant des modifications du contenu de la chlorophylle, la conductance stomatique, le contenu en ions et les sucres solubles.

Ces paramètres peuvent être un atout important dans la détection d'effets négatives d'ozone, soit un stade primaire, soit pour la confirmation.

A la lumière de cette étude, le peuplier peut être considéré comme une espèce bio indicatrice de l'Ozone, et joue donc un puissant rôle dans les opérations de surveillance de la qualité de l'air parallèlement et en complémentarité avec les capteurs physicochimiques.

L'importance de ces plantes réside dans l'aspect visuel de l'effet des polluants sur les feuilles. Cet aspect est important dans les campagnes de sensibilisation, ou nous pouvons indiquer directement les dégâts.

Les plantes donc peuvent être un atout pédagogique, peu onéreux qui implique la population dans l'amélioration de la qualité de l'air et un moyen indirect de mesure soit par indication soit par bio accumulation des polluants.

Les précurseurs d'ozone sont en augmentation flagrante ; les émissions des véhicules à essence et à GPL sont les plus grands émetteurs de CO<sub>2</sub>. D'autres part, les émissions du CO sont pratiquement égales pour les véhicules à essence et à GPL ; alors que les véhicules à Diesel dégagent une forte émission en NO<sub>2</sub> comparativement aux véhicules à essence et à GPL, les principaux émetteurs des oxydes de carbone (CO, CO<sub>2</sub>) sont les véhicules à essence, alors que les oxydes d'azote sont fortement émis par les moteurs Diesel (**Maatoug et al,**

**2008).** Une politique d'environnement qui encourage l'utilisation du GPL, et qui doit imposer plus d'impôts sur l'utilisation des véhicules à moteurs Diesel, doit être adoptée.

## Références bibliographiques

- Aguayo, E., Escalona, V.H., Artes, F., 2006. Effect of cyclic exposure to Ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 39 (2), 169–177.
- Albert, Z.T., Beverley, A. M., Douglas, P. O., 1990. Recovery of tomato plants from ozone injury. *Hort. Science.* 25, 1230-1232.
- APPA (Agence Pour La Prévention De La Pollution Atmosphérique), 2004. Réseau régional de bioindication de l'Ozone par les plantes de Tabac en Nord-pas de Calais. Rapport, 76.
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of Ozone on vegetation. *Plant Cell Environ.* 28, 949–964.
- Ashmore, M.R., Emberson, L., Karlsson, P.E., Pleijel, H., 2004. New directions: a new generation of Ozone critical levels for the protection of vegetation in europe. *Atmos. Environ.* 38, 2213–2214.
- Basha M., Groos K., Gwizdala C. (1994). Bronchoalveolar Lavage Neutrophilia in Asthmatic and Healthy Volunteers after Controlled Exposure to Ozone and Filtered Purified Air Chest. *106(6)*, 1757-1765.
- Bennett, J.P., Oshima, R.J., 1976. Carrot injury and yield response to Ozone. *J. Am. Soc. Horti. Sci.* 101 (6), 638–639.
- Benton, J., Fuhrer, J., Gimeno, B.S., Skarby, L., Palmer-Brown, D., Ball, G., Roadknight, C., Mills, G., 2000. An international cooperative programme indicates the widespread occurrence of Ozone injury on crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* 78 (1), 19–30.
- Betzelberger, A.M., Gillespie, K.M., McGrath, J.M., Koestler, R.P., Nelson, R.L., Ainsworth, E.A., 2010. Effects of chronic elevated Ozone concentration on antioxidant capacity, photosynthesis and seed yield of 10 soybean cultivars. *Plant Cell Environ.* 33, 1569–1581.
- Black, V.J., Stewart, C.A., Roberts, J.A., Black, C.R., 2007. Effects of Ozone on the physiology, growth and reproduction of *Brassica campestris L* (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol.* 176, 150–163.
- Bliefert, C., Perraud, R., 2008. *Chimie De L'environnement*. Ed. De Boeck. 205-207
- Booker, F., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A., Grantz, D., 2009. The Ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 337–351.
- Broadmeadow, M.S.J., Jackson, S.B., 2000. Growth responses of *Quercus petraea- Fraxinus excelsior* and *Pinus sylvestris* to elevated carbon dioxide, Ozone and water supply. *New Phytologist* 146, 437-451.
- Brook, R. D., Urch, B., Vincent, R., Silverman, F., 2002. Inhalation of fine particulate air pollution and Ozone causes acute arteriale vasoconstriction in healthy adults circulation. *105(13)*, 1534-6
- Bussotti, F., Desotgiu, R., Cascio, C., Strasser, R.J., Gerosa, G., Marzuoli, R., 2007. Photosynthesis responses to Ozone in young trees of three species with different sensitivities, in a two-year open-top chamber experiment (Curno, Italy). *Physiologia Plantarum.* 130, 122-135.

- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M., Barreno, E., 2003. Effects of 2-month Ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 839–845.
- Calatayud, A., Iglesias, D.J., Talon, M., Barreno, E., 2004. Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) to Ozone measured by gas exchange, chlorophyll a fluorescence, antioxidant systems, and lipid peroxidation. *Photosynthetica.* 42 (1), 23–29.
- Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C., Nunes, M.A., 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Plants. J. Plant Physiol.* 160, 283–292.
- Cascio, C., Schaub, M., Novak, K., Desotgiu, R., Bussotti, F., Strasser, R.J., 2010. Foliar responses to Ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environ. Exp. Bot.* 68, 188–197.
- Castagna, A., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., Ranieri, A., 2001. Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants. *New Phytol.* 152, 223–229.
- Cerana, M., Bonza, M.C., Harris, R., Sanders, D., Michelis, M.I.D., 2006. Abscisic acid stimulates the expression of two isoforms of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Biology* 8, 572e578.
- Chaux C et Foury C., 1994 – Production légumière .Tome 3 .Ed Tech et Doc Lavoisier .563p.
- Chaux C.L et Foury C.L., 1994. Cultures légumières et maraichères. Tome III. Légumineuses potagères, légumes et fruits. Tec et Doc Lavoisier, Paris. 563p.
- Corbineau, F., Core, A., 2006. Dictionnaire de la biologie des semences et des plantules. Edition Tec et Doc. Lavoisier.
- Crous, K.Y., Vandermeiren, K., Ceulemans, R., 2006. Physiological responses to cumulative Ozone uptake in two white clover (*Trifolium repens* L. cv Regal) clones with different Ozone sensitivity. *Environ. Exp. Bot.* 58 (1–3), 169–179.
- Day, R., 1999. Enquête préliminaire sur l'impact de la décharge publique de Boulmat (BEJAIA) Sur La Santé Humaine. PFE Ecologie. Université Abderrahman Mira- BAJAIA.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Dumont, J., Spicher, F., Montpied, P., Dizengremel, P., Jolivet, Y., & Le Thiec, D. (2013). Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO<sub>2</sub> and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* × *Populus nigra* genotypes. *Environmental pollution*, 173, 85-96.
- El melki. T., 2007. Inversions thermiques et concentrations de polluants atmosphériques dans la basse troposphère de Tunis.
- Elägoz, V., Manning, W.J., 2005. Responses of sensitive and tolerant bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to Ozone in open-top chambers are influenced by phenotypic differences, morphological characteristics, and the chamber environment. *Environ. Pollut.* 136, 371–383.
- Elkiey, T., Ormrod, D.P., 1979. Ozone and/or sulphur dioxide effects on tissue permeability of petunia leaves. *Atmospheric Environment.* 13, 1165-1168.

- EPA., 1996. Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants. U.S. Environmental Protection Agency. Research Triangle Park, NC, National Center for Environmental Assessment, RTP Office.
- EPA., 2006. Les composés organiques volatils dans l'air ambiant au Québec bilan 1989-1999. Environmental Protection Agency.
- Evans, L.S., Ting, I.P., 1974. Ozone Sensitivity of leaves: relationship to leaf water content, gas transfer resistance, and anatomical characteristics. *American Journal of Botany*. 61, 592-597.
- Fagnano, M., Merola, G., 2007. Ozone and water stress: effects on the behavior of two white clover biotypes. *Italian Journal of Agronomy*. 2, 3–12.
- Faoro, F., Iriti, M., 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of Ozone injury. *Biologia Plantarum*. 49, 585-592.
- Fares, S., Barta, C., Brilli, F., Centritto, M., Ederli, L., Ferranti, F., ... & Loreto, F. (2006). Impact of high ozone on isoprene emission, photosynthesis and histology of developing *Populus alba* leaves directly or indirectly exposed to the pollutant. *Physiologia Plantarum*, 128(3), 456-465.
- Filleul, L., 2001. Les effets sur la santé de la pollution atmosphérique: aspects épidémiologiques. *Laboratoire santé, travail, environnement*. 4-5.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L., Burkey, K.O., 2005. Crop responses to Ozone; uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell Environ*. 28, 997–1011.
- Francini, A., Nali, C., Picchi, V., Lorenzini, G., 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to Ozone. *Environ. Exp. Bot*. 60, 11–19.
- Francois, R., 2005. *Elément D'écologie Tom*. Ed. Tec & Doc. Paris.
- Francois, R., 2007. *Introduction à L'écotoxicologie*. Ed. Tec & Doc. Paris.
- Fumagalli, I., Gimeno, B.S., Velissariou, D., De Temmerman, L., Mills, G., 2001. Evidence of Ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmos. Environ*. 35 (14), 2583–2587.
- Gallais A., Bannerot H., 1992 - Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed : INRA, 768p.
- Gentile, A.G., Feder, W.A., Young, R.E., Santner, Z., 1971. Susceptibility of *Lycopersicon spp.* to Ozone injury. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 96, 94-96.
- Gerosa, G., Cieslik, S., Ballarin-Denti, A., 2003. Micrometeorological determination of time-integrated stomatal Ozone fluxes over wheat: a case study in Northern Italy. *Atmospheric Environment*. 37, 777-788.
- GIEC, (2007), « Bilan 2007 des changements climatiques : Rapport de synthèse GIEC », R.K. Pachauri, & A. Reisinger, (sous la direction de), GIEC. [http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4\\_syr\\_fr.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_fr.pdf), Genève, Suisse.
- Gimeno, B.S., Bermejo, V., Reinert, R.A., Zheng, Y.B., Barnes, J.D., 1999. Adverse effects of ambient Ozone on watermelon yield and physiology at a rural site in Eastern Spain. *New Phytol*. 144 (2), 245–260.
- Grulke, N.E., Paoletti, E., Heat, R.L., 2007. Comparison of calculated and measured foliar O<sub>3</sub> flux in crop and forest species. *Environmental Pollution*. 146, 640–647.
- Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Martinelli, F., Piras, M., 2009. Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and insensitive *Phaseolus* cultivars. *Environ. Exp. Bot*. 66, 117–125.

- Guidi, L., Nali, C., Lorenzini, G., Filippi, F., Soldatini, G.F., 2001. Effect of chronic Ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environ. Pollut.* 113, 245–254.
- Hayes, F., Jones, M.L.M., Mills, G., Ashmore, M., 2007. Meta-analysis of the relative sensitivity of semi-natural species to Ozone. *Environ. Poll.* 146, 754–762.
- Heggestad, H.E., 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C, and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of Ozone. *Environmental Pollution.* 74,264-291.
- Hermans, C., Deneys, V., Bergamaschi, E., Bernarad A., 2005. Effects Of Ambient Ozone On The Procoagulation Status And Systemic Inflammatory Reponse. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis.* 3 (9). 2102-2103.
- INRS. 2007. "benzène", fiche toxicologique. Institut National De Recherches Scientifiques. 49. 12.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G., Faoro, F., 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environ. Pollut.* 141, 275–282.
- Jacubowicz, I., 2000. Chapitre 2, le dioxyde de soufre : sources, effets nocifs et normes de rejets. 1.
- Jenkine, E. M., et Clemisthaw, K. C., 2000. Ozone and other secondary photochemical pollutants chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer *Atmospheric Environment.* 34 (16), 2499-252
- Kim, A., Maude, B., 2002. La pollution atmosphérique. Université de Laval. 3-4.
- Klusener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., Schroeder, J.I., 2002. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiology.* 130, 2152-2163.
- Kolev N., 1976 - Les culture maraichères en Algérie : Légumes fruits. Ed. Ministère de l’agriculture et de la réforme agraire, T.1, 207 p.
- Landolt W., Gunthardt-Goerg M.S., Pfeninger I., Eining W., Hampp R., Maurer S. & Matyssek, R. 1997. Effect of fertilization on Ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. –*New Phytologist.* 137, 389-397.
- Larsen, R.I., Heck, W.W., 1976. An air quality data analysis system interrelating effects, standards and needed source reduction. Part 3, Vegetation injury. *Journal of the Air Pollution Control Association.* 26, 325-333.
- Lefèvre, F., Kajba, D., Heinze B., Rotach, P., de Vries, S.M.G., Turok, J., 2001. Black poplar: A model for gene resource conservation in forest ecosystems. *The Forest Chronicle,* 77 (2) : 239-244
- Lichtenthaler, HK and AR Wellburn (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions.* 11, 591 - 592.
- Lorenzini, G., Saitanis, C., 2003. Ozone: a novel plant “pathogen”. In: Saniti di Toppi, L., Pawlik-Skowronska, B. (Eds.), *Abiotic Stresses in Plants.* Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands, 205–229.

- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol* 127:1781–1787.
- Maatoug, M., Zarrouki, D., Ait hammou, M., 2008. Estimation des émissions des véhicules en CO, CO<sup>2</sup> et NO<sup>2</sup> à l'aide d'un détecteur multigaz « MX2100 » dans la ville de Tiaret. *Ecolo-Environ.* 88, 38-48.
- Machler, F., Wasescha, M.R., Krieg, F., Oertli, J.J., 1995. Damage by Ozone and protection by ascorbic acid in barley leaves. *J. Plant Physiol.* 147 (3/4), 469–473.
- Manes, F., De Santis, F., Giannini, M.A., Vazzana, C., Capogna, F., Allegrini, I., 2003. Integrated ambient Ozone evaluation by passive samplers and clover biomonitoring mini-stations. *Sci. Total Environ.* 308 (1–3), 133–141.
- Manning, W.J., Godzik, B., Musselman, R., 2002. Potential bioindicator plant species for ambient Ozone in forested mountain areas of central Europe. *Environ. Poll.* 119, 283–290.
- Marre, M.T., Amicucci, E., Zingarelli, L., Albergoni, F., Marre, E., 1998. The respiratory burst and electrolyte leakage induced by sulfhydryl blockers in *Egeria densa* leaves are associated with H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> production and are dependent on Ca<sup>2+</sup> influx. *Plant Physiology.* 118, 1379-1387.
- Massey S W. (1999). The effects of Ozone and NO<sub>x</sub> On the deterioration of calcareous stone. Ed. the science of The Total Environment. 227, 109-121
- Matyssek, R., Weiser, G., Nunn, A.J., Kosovits, A.R., Reiter, I.M., Heerd, C., Winkler, J.B., Baumgarten, M., Härberle, K.-H., Grams, T.E.E., Werner, H., Fabian, P., Havranek, W.H., 2004. Comparison between AOT40 and Ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. *Atmos. Environ.* 38, 2271–2281.
- Micquel, G., 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. 94.
- Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L., Pleijel, H., 2007. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of Ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmos. Environ.* 41, 2630–2643.
- Moura, B. B., Alves, E. S., de Souza, S. R., Domingos, M., & Vollenweider, P. (2014). Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. *Environmental Pollution*, 192, 65-73.
- Naika S, Juede J, Goffau M, Hilmi M, Dam V, (2005). “ Cultivation of Tomato” Production, processing and marketing, Agromisa/ CTA. Revised edition, 2005 Agrodok- series No 17.
- Noormets, A., Sober, A., Pell, E.J., Dickson, R.E., Podila, G.K., Sober, J., Isebrands, J.G., Karnosky, D.F., 2001. Stomatal and non stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides Michx.*) clones exposed to elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Plant Cell Environ.* 24, 327–336.
- OFEV., 2008. Office Fédérale De L'environnement, division protection de l'environnement, fiche technique "les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) à la loupe".
- Olson, M., 1995. Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and antioxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 547–553.
- Orvar, B.L., McPherson, J., Ellis, B.E., 1997. Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level Ozone exposure prevents necrotic injury. *The Plant Journal.* 11, 203-212.

- Paoletti, E., 2005. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. *Environmental Pollution*. 134, 439–445.
- Płaz'ek, A., Rapacz, M., Skoczowski, A., 2000. Effects of Ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue, and winter rape. *Photosynthetica*. 38, 409–413.
- Pleijel, H., Danielsson, H., Emberson, L., Ashmore, M. R., 2007. Ozone risk assessment for agriculture crops in Europe: further development of stomatal flux and flux-response relationships for European wheat and potato. *Atmospheric Environment*. 41 (14), 3022–3040
- Pleijel, H. (Ed.), 2000. *Air Pollution and Climate Series. Ground-level Ozone. A Problem Largely Ignored in Southern Europe*. The Swedish NGO Secretariat on Acid Rain, Sweden.
- Porra, R.J., 2002; The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*. 73: 149 - 156.
- Power, S.A., Ashmore, M.R., 2002. Responses of fen and fen-meadow communities to Ozone. *New Phytol*. 156, 399–408.
- PPA., 2005. *Plan de Protection de l'atmosphère dans l'agglomération Lyonnaise*.
- PRQA., 2004. *Plan Régional De La Qualité De L'air En Région Centre, partie I, les connaissances générales*.
- Ranieri, A., Serini, R., Castagna, A., Nali, C., Baldan, B., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 2000. Differential sensitivity to Ozone in two poplar clones: analysis of thylakoid pigment–protein complexes. *Physiol. Plant*. 110, 181–188.
- Rossard, S., Luini, E., Perault, J.-M., Bonmort, J., Roblin, G., 2006. Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *Journal of Experimental Botany*. 57, 1245–1252.
- Royal Society, 2008. *Ground Level Ozone in the 21st Century: Future Trends, Impacts and Policy Implications*. Science Policy Report 15/08. Royal Society, London, UK, ISBN 978-0-85403-713-1.
- Rubin, M.B., 2001. The history of Ozone. The Shonbein period, 1839–1868. *Bull. Hist. Chem.* 26, 41–56.
- Sandermann, H. (Jr.), 1996. Ozone and plant health. *Phytopathology*. 34, 347–366.
- Schindler, C., Lichtenthaler, H.K., 1994. Is there a correlation between light-induced zeaxanthin accumulations and quenching of variable chlorophyll a fluorescence? *Plant Physiol. Biochem.* 32, 813–823
- Shankara N., Joep Van Lidt J., Marja de Goffau, Martin H. et Barbara V., 2005 - *La culture de la tomate production, transformation et commercialisation*. Ed. Prota, 105 p
- Singh, P., Agrawal, M., Agrawal, S.B., 2009. Evaluation of physiological, growth and yield responses of a tropical oil crop (*Brassica campestris L. var Kranti*) under ambient Ozone pollution at varying NPK levels. *Environ. Pollut.* 157, 871–880.
- Sportisse, B., 2008. *Pollution atmosphérique " des processus à la modélisation "*, Ed. Springer-Verlag, Paris.
- SRCAE., 2011. *Contribution du comité (gaz à effet de serre polluants atmosphériques et leur impact)*. Schéma Rhone Climat Air Energie.

- Stéphanie, I., 200. Cours de la pollution atmosphérique, inventaire d'émission. Ecole nationale des ponts et chaussées. Centre D'enseignement Et De La Recherche Sur L'environnement Atmosphérique, 19-20
- Tonneijck, A.E.G., Franzaring, J., Brouwer, G., Metselaar, K., Dueck, ThA., 2004. Does interspecific competition alter effects of early season Ozone exposure on plants from wet grasslands? Results of a three-year experiment in open-top chambers. Environ. Pollut. 131, 205–213.
- Van Dingenen, R., Dentener, F.J., Raes, F., Krol, M.C., Emberson, L., Cofala, J., 2009. The global impact of Ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. Atmos. Environ. 43, 604–618.
- Villar M., O. Forestier. 2009. Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? Rev. For. Fr. LXI - 5 : 457-467
- Vogel, A.L., 1955. A text book of quantitative inorganic analysis, Theory and Practice, 2nd edition, 94–9. Longmans, Green and Co., London, Newyork, Toronto.
- Wellburn, F.A.M., Wellburn, A., 1994. Atmospheric Ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness in *Pinus halepensis* (Mill.). Journal of Experimental Botany. 45, 607-614.
- Zafirio, Oc., Andrews, S., Wei, W., 2003. Concordant estimates of oceanic carbon monoxide source and sink processes in the pacific yield a balanced global blue-water co budget.Global. Biogeoch. Cycles 17 (1), 15, 1-15,13 in Francois R., 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Ed. Tec & Doc. Paris.

### **Webographie :**

- 1. Webmaster1 :** [http://perso.numericable.fr/~frgheusi/UPS/figures/atm\\_struc\\_vert.gif](http://perso.numericable.fr/~frgheusi/UPS/figures/atm_struc_vert.gif) Consulté le : 10/07/2013.
- 2. Webmaster 2:** [www.Ozone-poitoucharentes.org](http://www.Ozone-poitoucharentes.org). Consulté le : 17/08/2010.
- 3. Webmaster 3:** [Fr.Wikipedia.org/Wiki/Amidon](http://fr.wikipedia.org/wiki/Amidon). Consulté le 28/08/2013.
- 4.** [www.joradp.dz](http://www.joradp.dz). journal officiel de la république Algérienne Démocratique et Populaire.loi 96-1236 du 30 décembre 1996. Consulté le 19/08/2011.
- 5.** FAO. 2005. Web site database. <<http://www.fao.org>>.consulté le 13/05/2012.





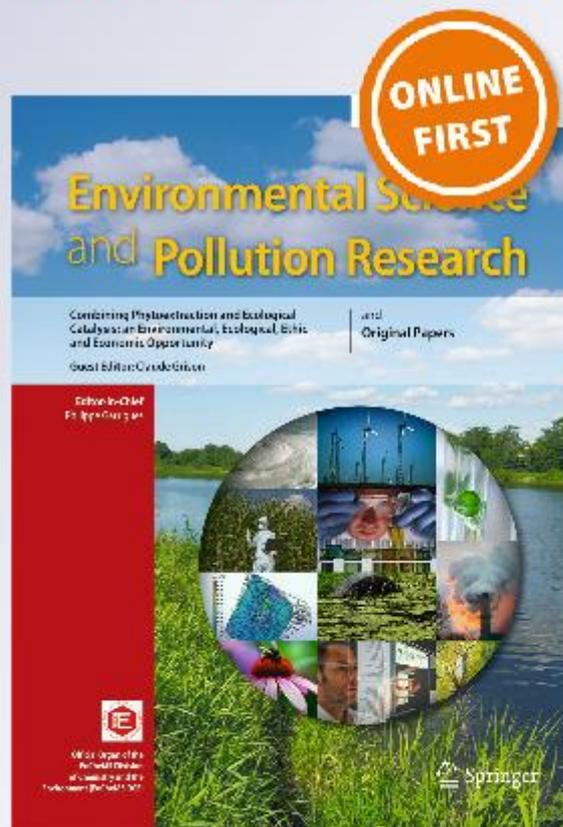
*Physiological effects of ozone exposure  
on De Colgar and Rechaiga II tomato  
(Solanum lycopersicum L.) cultivars*

**Benchohra Maamar, Mohamed  
Maatoug, Marcello Iriti, Abdelkader  
Dellal & Mohammed Ait hammou**

**Environmental Science and Pollution  
Research**

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res  
DOI 10.1007/s11356-015-4490-y



 Springer

## Physiological effects of ozone exposure on De Colgar and Rechaiga II tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars

Benchohra Maamar<sup>1</sup> · Mohamed Maatoug<sup>1</sup> · Marcello Iriti<sup>2</sup> · Abdelkader Dellal<sup>1</sup> · Mohammed Ait hammou<sup>1</sup>

Received: 20 October 2014 / Accepted: 5 April 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** The sensitivity of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars, Rechaiga II and De Colgar, to 50, 80, and 100 ppb ozone (O<sub>3</sub>) exposures was assessed in fumigation chamber, during 4 h per day over a period of 7 days. The Rechaiga II variety was shown to be sensitive to the dose of 50 ppb, showing chlorotic spots on the adaxial leaf surface and alterations of some physiological parameters. During 1-week fumigation, ozone caused a decrease in stomatal conductance, chlorophylls *a* and *b*, total chlorophylls, and carotenoids, although soluble sugars and membrane integrity were significantly increased in fumigated plants compared to controls. This trend was similar for the three pollutant doses used in fumigation. The De Colgar tomato remained asymptomatic.

**Keywords** *Solanum lycopersicum* L. · Chlorotic spots · Physiological parameters · Tropospheric ozone · Fumigation

### Introduction

Tropospheric ozone (O<sub>3</sub>) is one of the most important phytotoxic air pollutants in many parts of the world (Ashmore 2005; Van Dingenen et al. 2009). Crop losses are estimated to be

\$14–26 billion per year worldwide (Van Dingenen et al. 2009) and \$17–18 billion in the year 2030 (Avnery et al. 2011). Even with the implementation of legislation to control emissions of its precursors, the primary air pollutants, ozone ambient concentrations are rising in much of the world during this century. The Royal Society predicted that ambient concentrations may increase by 20 to 25 % between 2015 and 2050, and again from 40 to 60 % in 2100. Accordingly, it is expected that ozone pollution may represent a relevant threat to global food security and climate changes in 2030 (Royal Society 2008).

The toxic effects of O<sub>3</sub> on vegetation have been studied for over 50 years (Elägoz and Manning 2005), and it is well established that chronic exposure to relatively high concentrations can (i) cause oxidative stress and cellular alterations (Iriti and Faoro 2008; Faoro and Iriti 2009); (ii) produce leaf chlorotic, necrotic, and bronzing symptoms (Manning et al. 2002; Faoro and Iriti 2005); (iii) decrease photosynthetic efficiency, plant growth, and yield (Hayes et al. 2007; Mills et al. 2007; Booker et al. 2009; Guidi et al. 2009; Singh et al. 2009; Cascio et al. 2010); and (iv) induce premature senescence (Tonnejck et al. 2004) in a wide range of cultures and species in the (semi)natural communities.

The severity of O<sub>3</sub> injury during the vegetative growth is affected both by extrinsic factors, such as the ozone concentration, duration and timing of exposure, environmental conditions that influence the stomatal uptake of the pollutant, and the intrinsic sensitivity of individual species or genotypes. Furthermore, the impact of O<sub>3</sub> is greatly influenced by a series of acclimation and tolerance mechanisms, including antioxidant defenses and secondary metabolites (Ashmore et al. 2004; Matyssek et al. 2004; Fiscus et al. 2005; Black et al. 2007; Iriti and Faoro 2008, 2009; Betzelberger et al. 2010).

The effects of ozone pollution on vegetation have been reported on different plant species such as tomato (Calatayud and Barreno 2001), tobacco, bean, clover (Manes et al. 2003;

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Benchohra Maamar  
Benchohra\_19@hotmail.fr

<sup>1</sup> Laboratory of Agro-Biotechnology and Nutrition on Semi-arid Areas, Faculty of Natural and Life Sciences, Ibn khaldoun University of Tiaret, Tiaret, Algeria

<sup>2</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, Milan, Italy

Crous et al. 2006), watermelon (Gimeno et al. 1999; Benton et al. 2000; Fumagalli et al. 2001), and spinach (Calatayud et al. 2004). Due to ozone exposure, the leaves may present a typical bronzing pigmentation on adaxial (upper) leaf surface (EPA 1996; Pleijel 2000; Iriti et al. 2006), and they can also age prematurely, as in the case of wheat and other cereal species (Machler et al. 1995; Pleijel 2000). Detrimental physiological effects, such as reduced photosynthetic rate, may also occur without any visible symptom (Pleijel 2000). A decrease of yield has also been documented in a number of crops including carrots (Bennett and Oshima 1976) and tomatoes (Aguayo et al. 2006).

The use of bioindicator plant species is considered an inexpensive and reliable method in ozone monitoring. Bioindicators have the advantage to indicate a specific symptomatology that reflects the absorbed concentration of ozone, which is not necessarily correlated with  $O_3$  levels present in ambient air, because favorable conditions for ozone injury to occur are dependent on plant stomatal conductance and susceptibility to the pollutant, its concentration, and duration of exposure (Smith 2012; Pellegrini et al. 2014).

In the present work, carried out in fumigation chamber, we aimed to study the effects of three doses of ozone on two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) widely cultivated varieties: Rechaiga II still largely used by farmers as a local variety, and De Colgar, the most commercialized tomato cultivar in Algeria. Visible leaf symptoms were recorded and some physiological parameters were measured, such as stomatal conductance, membrane integrity, potassium and sodium contents, amount of photosynthetic pigments, and soluble sugars, in order to assess the level of sensitivity/tolerance of both varieties. Indeed, as previously reported, these traits are relevant factors determining ozone sensitivity of selected plant cultivars (Faoro and Iriti 2005; Brosché et al. 2010; Tiwari and Agrawal 2011). Information on the effects of ozone on Algerian tomato varieties is still scarce and, to the best of our knowledge, this issue was not previously investigated in Algeria.

## Materials and methods

### Plant material

Two tomato (*S. lycopersicum* L.) cultivars were used in this study, De Colgar and Rechaiga II, the latter a local variety, both commercially available. Plants were grown in a greenhouse, in pots of 12×21 cm (2373 cm<sup>3</sup>) with a mixture of sand/ground/organic matter (1:1:1), at 24±2 °C, 60±5 % relative humidity (RH), and 16-h light/dark cycle. Plants were manually irrigated 3 days per week. After 6 to 9 weeks of planting up to six-leaf stage, the plants were transferred to the growth chamber for fumigation experiments.

### Ozone fumigation

Ozone fumigation was carried out in a controlled chamber (~13.5 m<sup>3</sup>), at 26±1 °C, 20±5 % RH, and 500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux density at plant height. Ozone is generated by an electric discharge, passing pure oxygen through an ozone generator Ecobox (DBG Investments Group, LLC, Bristol, VA, USA). Ozone concentration in the fumigation chamber was continuously monitored with a photometric  $O_3$  analyzer (A-21ZX, Eco Sensors, Inc, Boudry, Switzerland), operating on UV absorption and interfaced with a personal computer. Control plants were kept in a growth chamber with filtered air, under the same conditions of temperature and RH. Greenhouse plants were pre-adapted to the conditions of the chamber for 48 h. Twelve plants for each cultivar were fumigated with 50 ppb of ozone, 4 h/day for 7 days, which are considered urban conditions (Heath 1994), simulating episodes of elevated ozone concentrations (Saitanis et al. 2014; Thwe et al. 2014a). Similar experiments were conducted with higher ozone concentrations, 80 and 100 ppb, while untreated plants were used as controls.

### Calculation of necrotic areas

The leaves were examined at 0, 2, and 24 h after beginning of fumigation and, then, daily until the end of experiments (7 days). The percentage of necrotic symptoms on leaves was calculated from pictures recorded by high-resolution camera; the photos were processed by the MesurimPro<sup>®</sup> software that allows area calculation by assigning specific colors. The percentage of necrosis was calculated as  $NP (\%) = NA/TA \times 100$ , where  $NA$ =necrotic area and  $TA$ =total area.

### Physiological parameters

Physiological parameters were determined at the end of each one of the three fumigations, i.e., after 7 days of ozone exposure.

#### Stomatal conductance

This parameter was measured using a porometer (AP4DELTA-T Devices, Cambridge, UK), which includes a portable unit for monitoring and analysis of stomatal conductance. The measurements were performed both on fumigated and control leaves, at 8 to 10 a.m., in fumigation chamber at 26±1 °C, 20±5 % RH, and 500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux density at plant height.

#### Membrane integrity

The membrane integrity was assessed by the method of Campos et al. (2003), to verify the transmembrane flow. Disks

of freshly cut leaves ( $0.5 \text{ cm}^2$ ) were rinsed three times (2–3 min) with deionized water; they were then floated on 10 mL of deionized water in Petri dishes. The leakage of electrolytes in the solution was measured after 22 h at ambient temperature, using a conductivity meter (pH-LF 3001-2). The total conductivity was obtained after maintaining the plates in a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  oven for 2 h. The results are expressed in percentage of the total conductivity. The percentage of membrane integrity was calculated as  $MI (\%) = (1 - CC/TC) \times 100$ , where  $CC$  = clear (free) conductivity and  $TC$  = total conductivity.

#### Photosynthetic pigments

The method of Lichtenthaler and Wellburn (1983), slightly modified by (Porra 2002), was used for determination of photosynthetic pigments. Leaf tissues (100 mg) were ground in a mortar and diluted in 8 mL of 80 % acetone. The mash was filtered in a test tube, using a Whatman paper 22. The volume of the tube was filled to 10 mL, by adding acetone. The absorbance was recorded with a flame spectrophotometer at wavelengths of 470, 645, and 663 nm. The results on the contents of chlorophyll *a* (chl *a*), chlorophyll *b* (chl *b*), total chlorophylls (chl *T*), and carotenoids are expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  fresh weight (FW). Quantification of chlorophylls and calculation of the extinction coefficient were performed according to the Lambert-Beer law.

#### Soluble sugars

Soluble sugars were determined by the method of Dubois et al. (1956). Two milliliters of 80 % ethanol was added to leaf tissues (100 mg) in a test tube at room temperature in the dark. After 48-h extraction, ethanol was evaporated in a water bath at  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . After cooling, each tube was filled with 20 mL distilled water. Then, 1 mL of this solution was transferred into another tube, adding 1 mL of 5 % phenol and 5 mL of concentrated sulfuric acid and vortexing to homogenize the solution. After 10 min, tubes were placed again in the water bath for 15 min at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . The absorbance of the solution was recorded at 490 nm and the results expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW.

#### Determination of $\text{K}^+$ and $\text{Na}^+$

The collected leaf samples were washed in distilled water to remove salt and any external debris and dried at  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  for 48 h. The dry samples were ground to a fine powder using a mortar and pestle. The samples (1 g) were ashed at  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  in an electric furnace for 4 h. Five milliliters of 2 N HCl was added to cooled ash samples, which were then dissolved in boiling deionized water, filtered, and adjusted to a final volume of 50 mL.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ions were measured using the standard procedure flame photometer (Vogel 1955), and the results were expressed as ppm.

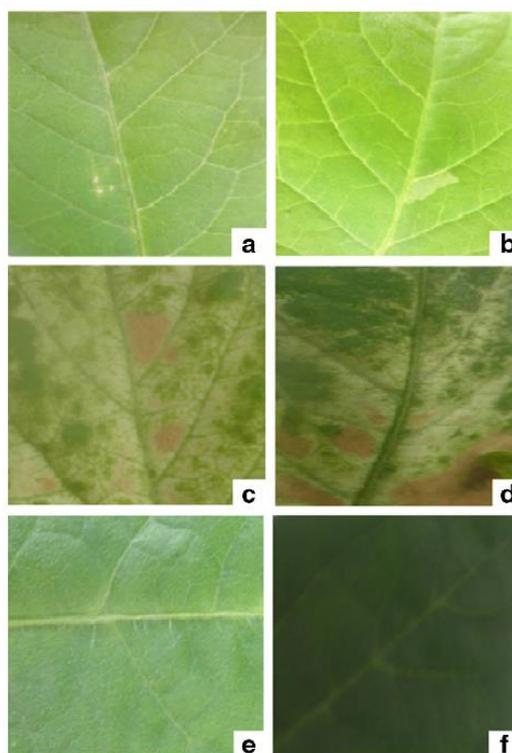
#### Statistical analysis

The statistical treatment of the results was performed using the STATISTICA software. A description of the data is performed using the box plots to compare the percentage of necrotic leaves or physiological parameters of tomato (*S. lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II depending on the dose of  $\text{O}_3$ . ANOVA used to study the effect of  $\text{O}_3$  exposure on physiological parameters. Finally, a correlation was conducted with physiological parameters, necrotic lesions, and the ozone concentration; only important data has been shown.

## Results

#### Leaf symptoms

The  $\text{O}_3$  exposure (50 ppb for 4 h) caused the appearance of visible symptoms on Rechaiga II cultivar, but not in De Colgar one (Fig. 1a). Shortly after the end of fumigation, Rechaiga II



**Fig. 1** Visible symptoms induced by a pulse of  $\text{O}_3$  (50 ppb for 4 h) on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II leaves: **a** small chlorotic spots, **b** chlorotic lesions, **c**, **d** necrosis, **e** tomato cv. De Colgar leaves at the beginning of experiment, **f** no symptom was observed in cv. De Colgar

plants showed interveinal small chlorotic spots on the adaxial leaf surface, less than 1 mm in diameter (Fig. 1a), which widened and flowed together to form chlorotic and ivory lesions in the next 24 h (Fig. 1b). Necrosis appeared after further 24 h (Fig. 1c, d). After 7 days of fumigation, no symptom was observed in cv. De Colgar (Fig. 1e, f). The concentration of 80 ppb caused more intense symptoms, with reddish brown necrosis reaching a diameter of 2 mm (data not shown). Noteworthy, foliar injuries increased with increasing O<sub>3</sub> concentration (Fig. 2).

#### Physiological parameters of tomato Rechaiga II as a function of the O<sub>3</sub> dose

Both the concentrations of 50 and 80 ppb ozone modified some physiological parameters in fumigated plants (Fig. 3). In particular, the pollutant reduced stomatal conductance compared to control plants, as well as the levels of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, chl *a*, chl *b*, chl *T*, and carotenoids (Fig. 3a–g). In contrast, membrane integrity and soluble sugars were higher in fumigated plants than in the control ones (Fig. 3h, i). At 100 ppb, similar trends were observed for all the assessed physiological parameters, apart from K<sup>+</sup>, which increased after O<sub>3</sub> fumigation.

#### Effect of ozone dose on physiological parameters

The “dose effect” was assessed by ANOVA analysis (Table 1). A highly significant effect of ozone concentration was observed on the content of K<sup>+</sup> ( $p \leq 0.01$ ), soluble sugars ( $p \leq 0.01$ ), and carotenoids ( $p \leq 0.001$ ).

#### Correlation analysis

Results showed a significant positive correlation between the ozone dose and K<sup>+</sup> ( $p \leq 0.05$ ), as well as between the ozone concentration and the levels of soluble sugars ( $p \leq 0.01$ ) and

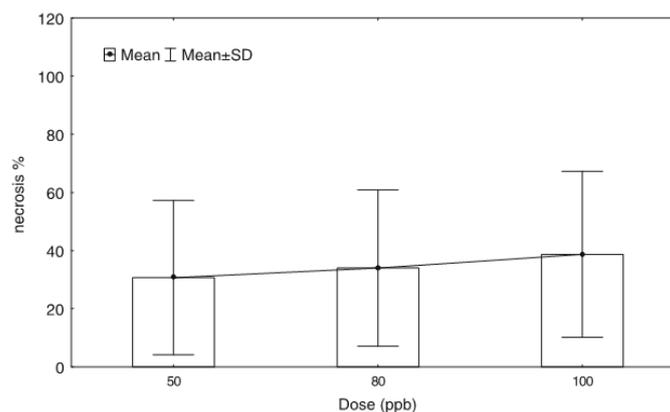
carotenoids ( $p \leq 0.001$ ) (Fig. 4). A significant negative correlation was reported between the percentage of necrosis and both chl *a* and chl *T* ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 4).

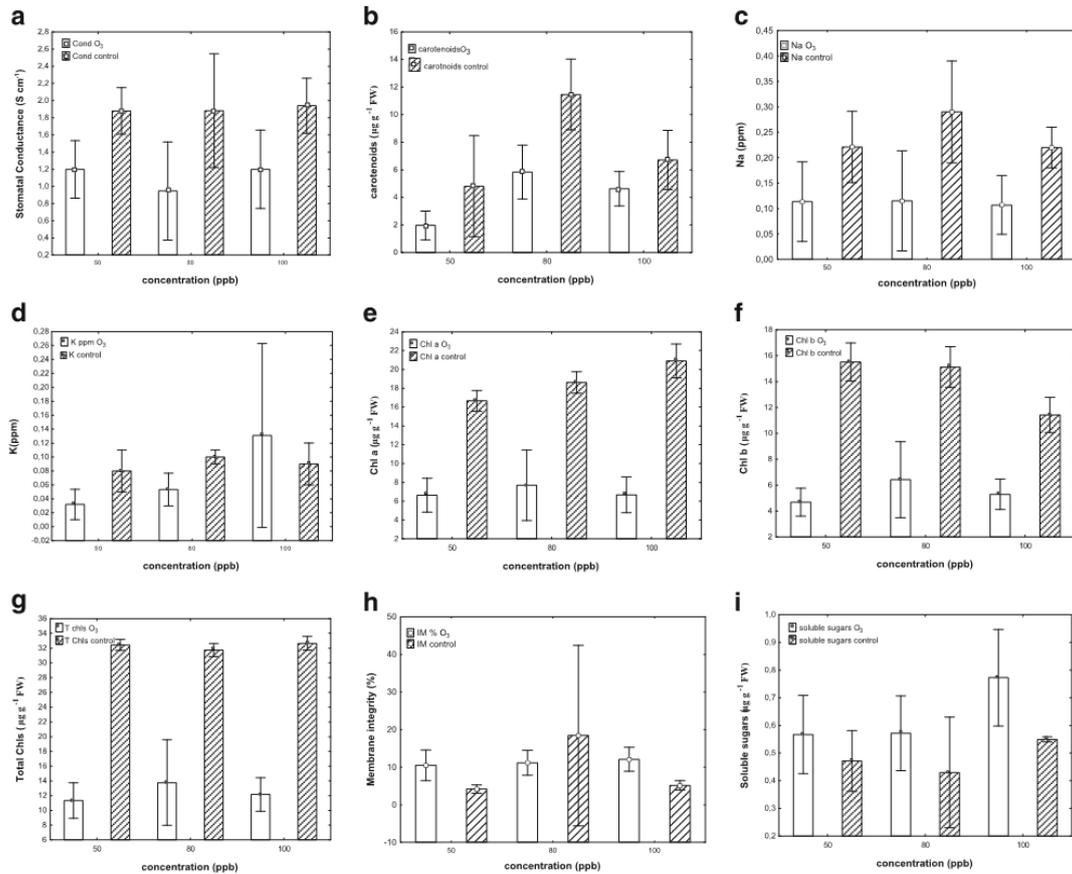
#### Discussion

Early visible symptoms on Rechaiga II tomato leaves appeared 24 h after fumigation with 50 ppb of ozone, the lowest dose used in our experiments. In these conditions, stomatal conductance decreased, compared with control plants, possibly reducing the stomatal uptake of the pollutant. Nonetheless, stomatal closure represents a main defense mechanism in tolerant plants (Gerosa et al. 2003). With 80 ppb ozone, stomatal conductance further decreased, even if this mechanism was saturated with the highest ozone concentration (100 ppb), possibly due to the damage of guard cells. These results are in accordance with our previous data on currant tomato (*Solanum pimpinellifolium*) (Iriti et al. 2006), a bioindicator species of the pollutant, showing that, in controlled fumigation experiments, leaf symptoms increased with ozone concentrations (50, 80, and 100 ppb).

After the appearance of chlorotic spots, an obvious increase in ion leakage due to damaged cell membrane was observed in fumigated plants. As reported in other species, a short exposure to ozone can induce a deleterious effect on this parameter (Plázek et al. 2000; Guidi et al. 2001; Calatayud et al. 2003; Francini et al. 2007). Accordingly, the mineral balance was affected by the pollutant, with lower levels of both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in fumigated plants than in the control ones. These changes may be explained by the alteration of the cell membrane integrity which can, in turn, generate an ion leakage (Marre et al. 1998; Rossard et al. 2006). It was shown that ozone altered plasmalemma permeability by the oxidation of membrane lipids and protein sulfhydryl groups (Guidi et al. 1999).

**Fig. 2** Box plot of the percentage of necrotic lesions on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II leaves as a function of the O<sub>3</sub> dose





**Fig. 3** Box plots of the effects of O<sub>3</sub> exposure on physiological parameters of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II: **a** stomatal conductance (S cm<sup>-1</sup>), **b** membrane integrity (%), **c** Na<sup>+</sup> ions (ppm), **d** K<sup>+</sup> ions (ppm), **e** chlorophyll *a* (mg g<sup>-1</sup> fresh weight, FW), **f** chlorophyll *b* (mg g<sup>-1</sup> FW), **g** total chlorophylls (mg g<sup>-1</sup> FW), **h** total carotenoids (mg g<sup>-1</sup> FW), **i** soluble sugars (mg g<sup>-1</sup> FW)

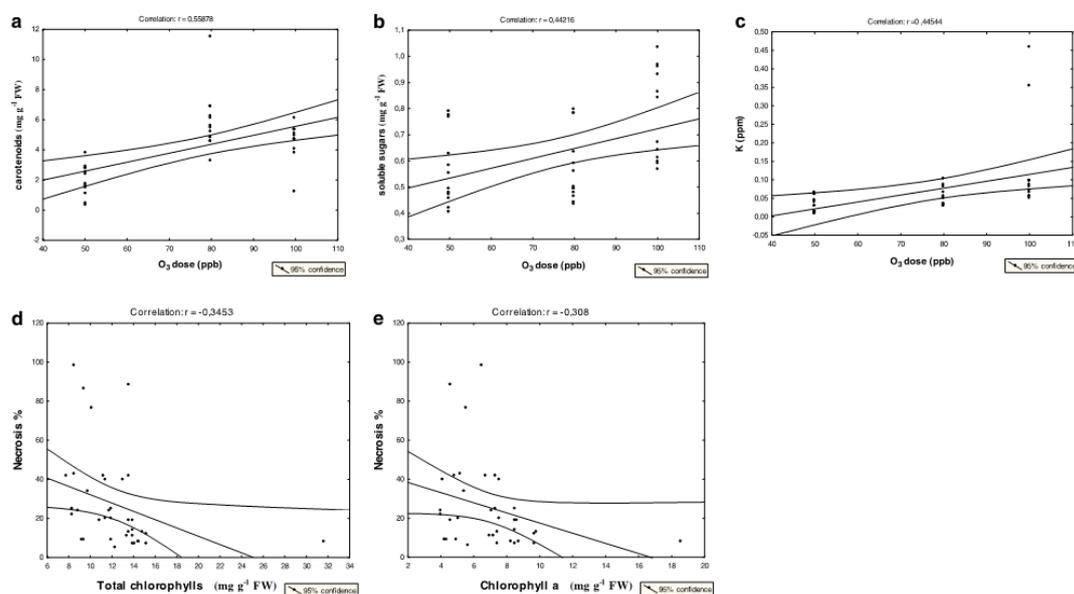
**Table 1** ANOVA analysis on the effect of ozone dose on physiological parameters of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II (*N*=12)

Physiological parameters	<i>F</i>	<i>p</i> value
Stomatal conductance (S cm <sup>-1</sup> )	2.48	0.099
Membrane integrity (%)	0.61	0.546
K <sup>+</sup> (ppm)	5.50**	0.008
Na <sup>+</sup> (ppm)	0.10	0.904
Chlorophyll <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> FW)	0.01	0.980
Chlorophyll <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> FW)	2.03	0.146
Total chlorophylls (mg g <sup>-1</sup> FW)	0.59	0.556
Carotenoids (mg g <sup>-1</sup> FW)	30.80***	0.000
Soluble sugars (mg g <sup>-1</sup> FW)	6.84**	0.003

FW fresh weight

\*\**p*≤0.01; \*\*\**p*≤0.001

The decrease of chlorophylls documented in our study was in accordance with previous data (Della Torre et al. 1998; Saitanis et al. 2001). The chlorophyll degradation is one of the main and more rapid detrimental effect of ozone on the photosynthetic apparatus, as indicated by the decrease in chlorophyll content in other plant species (Broadmeadow and Jackson 2000; Bussotti et al. 2007). Many types of abiotic stress, closely associated with lipid peroxidation, can cause damage to chlorophyll-protein complexes located in thylakoids, particularly in the PSII reaction center. At the end of the fumigation and during the recovery, our plants showed a significant reduction in the chlorophyll and carotenoid contents, and, possibly, in the photosynthesis rate. There is some debate regarding the primary mechanism(s) involved in the decrease of photosynthesis, with evidence of direct effects of ozone exposure on light and/or dark reactions of



**Fig. 4** Correlation analysis among ozone concentration, physiological parameters, and necrotic lesions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rechaiga II; ozone concentration versus **a** total carotenoids; **b** soluble sugars; **c** K<sup>+</sup> ions; necrosis versus **d** total chlorophylls; **e** chlorophyll *a*

photosynthesis (Power and Ashmore 2002) or indirect effects on stomatal closure, as previously introduced (Noormets et al. 2001). The loss of chlorophylls and carotenoids may impair the light absorbing capacity of the light harvesting complexes, thus affecting the capacity of thermal dissipation under O<sub>3</sub> exposure. Furthermore, carotenoids are pivotal antioxidant molecules able to scavenge the harmful singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS) (Mikkelsen et al. 1995; Telfer et al. 1994). Therefore, the reduction in the levels and biosynthesis rate of carbohydrates are the result of the decrease of photosynthesis under elevated O<sub>3</sub> conditions (Sun et al. 2014).

Wellburn and Wellburn (1994) fumigated the Aleppo pine (*Pinus halepensis*) with ozone and found that, during the summer, the plants showed significant accumulation of starch (especially in the endoderm), with a simultaneous crushing of phloem cells. Starch accumulation along the ribs of the shoot was also observed in other species, such as in birch (*Betula pendula*) (Landolt et al. 1997). The authors of both studies concluded that such starch accumulation was probably due to an altered phloem loading, an interpretation that may also be appropriate to explain our results. The response of tomato plants to acute ozone stress varied depending on the phenological stage. Leaf injuries were higher in the younger plants than in the older ones, whereas recovery processes were more efficient in the younger plants compared with the older ones (Thwe et al. 2013). Even if, in similar exposure conditions,

tomato fruit yield was not significantly affected, fruit quality was influenced. In agreement with our results, total soluble sugars increased in fruits harvested from ozone-fumigated tomato plants, as well as organic acids and ascorbic acid, with a lower sugar/acid ratio mostly due to increased content of malic acid (Thwe et al. 2014b). Finally, in accordance with our data, the same authors reported a decrease of stomatal conductance and photosystem II efficiency in tomato plants after acute ozone fumigation (Thwe et al. 2014a).

## Conclusions

This study aimed to investigate the physiological response of two tomato cultivars, De Colgar and Rechaiga II, exposed to different ozone concentrations (50, 80, and 100 ppb) 4 h per day over a period of 7 days. Our results showed a higher sensitivity of cv. Rechaiga II to even the lowest dose of the pollutant, compared with the other variety which remained asymptomatic. Ozone-sensitive species have been tested to be used as bioindicators for tropical conditions, as recently emphasized (Alves et al. 2011; Ferreira et al. 2012; Moura et al. 2014). Therefore, we suggest that, in the future, high-sensitivity species, as the tomato cv. Rechaiga II, may be also used as a potential and an effective bioindicator species of ozone pollution. Furthermore, some physiological parameters may be useful in detecting earlier sensitivity to ozone.

However, our experiments were carried out in fumigation chamber, where climatic parameters are controlled, and for a short period of time. Hence, new surveys in open field conditions are necessary to correctly evaluate the potential of tomato cv. Rechaiga II as bioindicator to be used in Algeria, as well as the predictive potential of some physiological parameters as biomarkers of tolerance/sensitivity to the pollutant.

**Ethical statement** The authors declare that:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously, partly or in full.
- The manuscript has not been split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to other journals or to one journal over time.
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support our conclusions.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own.

Maamar Benchohra in behalf of Authors

## References

- Aguayo E, Escalona VH, Artes F (2006) Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharv Biol Technol* 39(2):169–177
- Alves ES, Moura BB, Pedrosa AN, Tresmondi F, Domingos M (2011) The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histochemical techniques. *Environ Pollut* 159(12):3309–3315
- Ashmore MR (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ* 28:949–964
- Ashmore MR, Emberson L, Karlsson PE, Pleijel H (2004) New directions: a new generation of ozone critical levels for the protection of vegetation in Europe. *Atmos Environ* 38:2213–2214
- Avnery S, Mauzerall DL, Liu J, Horowitz LW (2011) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O<sub>3</sub> pollution. *Atmos Environ* 45(13):2297–2309
- Bennett JP, Oshima RJ (1976) Carrot injury and yield response to ozone. *J Am Soc Hortic Sci* 101(6):638–639
- Benton J, Fuhrer J, Gimeno BS, Skarby L, Palmer-Brown D, Ball G, Roadknight C, Mills G (2000) An international cooperative programme indicates the widespread occurrence of ozone injury on crops. *Agric Ecosyst Environ* 78(1):19–30
- Betzberger AM, Gillespie KM, McGrath JM, Koestler RP, Nelson RL, Ainsworth EA (2010) Effects of chronic elevated ozone concentration on antioxidant capacity, photosynthesis and seed yield of 10 soybean cultivars. *Plant Cell Environ* 33:1569–1581
- Black VJ, Stewart CA, Roberts JA, Black CR (2007) Effects of ozone on the physiology, growth and reproduction of *Brassica campestris* L. (Wisconsin Fast Plants). *New Phytol* 176:150–163
- Booker F, Muntifer R, McGrath M, Burkey K, Decoteau D, Fiscus E, Manning W, Krupa S, Chappelka A, Grantz D (2009) The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *J Integr Plant Biol* 5:337–351
- Broadmeadow MSJ, Jackson SB (2000) Growth responses of *Quercus petraea*-*Fraxinus excelsior* and *Pinus sylvestris* to elevated carbon dioxide, ozone and water supply. *New Phytol* 146:437–451
- Brosché M, Merilo E, Mayer F, Pechter P, Puzorjova I, Brader G, Kangasjarvi J, Kollist H (2010) Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant Cell Environ* 33(6):914–925
- Bussotti F, Desotgiu R, Cascio C, Strasser RJ, Gerosa G, Marzuoli R (2007) Photosynthesis responses to ozone in young trees of three species with different sensitivities, in a two-year open-top chamber experiment (Curmo, Italy). *Physiol Plant* 130:122–135
- Calatayud A, Barreno E (2001) Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environ Pollut* 115(2):283–289
- Calatayud A, Iglesias DJ, Talon M, Barreno E (2003) Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation. *Plant Physiol Biochem* 41(9):839–845
- Calatayud A, Iglesias DJ, Talon M, Barreno E (2004) Response of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) to ozone measured by gas exchange, chlorophyll a fluorescence, antioxidant systems, and lipid peroxidation. *Photosynthetica* 42(1):23–29
- Campos PS, nia Quartin V, chicho Ramalho J, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J Plant Physiol* 160(3):283–292
- Cascio C, Schaub M, Novak K, Desotgiu R, Bussotti F, Strasser RJ (2010) Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environ Exp Bot* 68:188–197
- Crous KY, Vandermeiren K, Ceulemans R (2006) Physiological responses to cumulative ozone uptake in two white clover (*Trifolium repens* L. cv Regal) clones with different ozone sensitivity. *Environ Exp Bot* 58(1–3):169–179
- Della Torre G, Ferranti F, Lupattelli M, Poceschi N, Figoli A, Nali C, Lorenzini G (1998) Effects of ozone on morpho-anatomy and physiology of *Hedera helix*. *Chemosphere* 36:651–656
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Elägoz V, Manning WJ (2005) Responses of sensitive and tolerant bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to ozone in open-top chambers are influenced by phenotypic differences, morphological characteristics, and the chamber environment. *Environ Pollut* 136:371–383
- EPA (1996) Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants. U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, National Center for Environmental Assessment, RTP Office
- Faoro F, Iriti M (2005) Cell death behind invisible symptoms, early diagnosis of ozone injury. *Biol Plant* 49(4):585–592
- Faoro F, Iriti M (2009) Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: key studies in Mediterranean conditions. *Environ Pollut* 157:1470–1477
- Ferreira ML, Esposito JBN, de Souza SR, Domingos M (2012) Critical analysis of the potential of *Ipomoea nil* 'Scarlet O'Hara' for ozone biomonitoring in the sub-tropics. *J Environ Monit* 14(7):1959–1967
- Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO (2005) Crop responses to ozone; uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell Environ* 28:997–1011
- Francini A, Nali C, Picchi V, Lorenzini G (2007) Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environ Exp Bot* 60:11–19
- Fumagalli I, Gimeno BS, Velissariou D, De Temmerman L, Mills G (2001) Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmos Environ* 35(14):2583–2587

- Gerosa G, Cieslik S, Ballarin-Denti A (2003) Micrometeorological determination of time-integrated stomatal ozone fluxes over wheat: a case study in Northern Italy. *Atmos Environ* 37:777–788
- Gimeno BS, Bermejo V, Reinert RA, Zheng YB, Barnes JD (1999) Adverse effects of ambient ozone on watermelon yield and physiology at a rural site in Eastern Spain. *New Phytol* 144(2):245–260
- Guidi L, Bonghi G, Ciompi S, Soldatini GF (1999) In *Vicia faba* leaves photoinhibition from ozone fumigation in light precedes a decrease in quantum yield of functional PSII centres. *J Plant Physiol* 154: 167–172
- Guidi L, Nali C, Lorenzini G, Filippi F, Soldatini GF (2001) Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environ Pollut* 113:245–254
- Guidi L, Degl'Innocenti E, Martinelli F, Piras M (2009) Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and insensitive *Phaseolus* cultivars. *Environ Exp Bot* 66:117–125
- Hayes F, Jones MLM, Mills G, Ashmore M (2007) Meta-analysis of the relative sensitivity of semi-natural species to ozone. *Environ Pollut* 146:754–762
- Heath RL (1994) Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynth Res* 39:439–451
- Iriti M, Faoro F (2008) Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollut* 187:285–301
- Iriti M, Faoro F (2009) Chemical diversity and defence Metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int J Mol Sci* 10: 3371–3399
- Iriti M, Belli L, Nali C, Lorenzini G, Gerosa G, Faoro F (2006) Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environ Pollut* 141:275–282
- Landolt W, Gunthardt-Goerg MS, Pfeninger I, Eining W, Hampp R, Maurer S, Matyssek R (1997) Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. *New Phytol* 137:389–397
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11:591–592
- Machler F, Wasescha MR, Krieg F, Oertli JJ (1995) Damage by ozone and protection by ascorbic acid in barley leaves. *J Plant Physiol* 147(3/4):469–473
- Manes F, De Santis F, Giannini MA, Vazzana C, Capogna F, Allegrini I (2003) Integrated ambient ozone evaluation by passive samplers and clover biomonitoring mini-stations. *Sci Total Environ* 308(1–3): 133–141
- Manning WJ, Godzik B, Musselman R (2002) Potential bioindicator plant species for ambient ozone in forested mountain areas of central Europe. *Environ Pollut* 119:283–290
- Marre MT, Amicucci E, Zingarelli L, Albergoni F, Marre E (1998) The respiratory burst and electrolyte leakage induced by sulfidryl blockers in *Egeria densa* leaves are associated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and are dependent on Ca<sup>2+</sup> influx. *Plant Physiol* 118:1379–1387
- Matyssek R, Weiser G, Nunn AJ, Kosovits AR, Reiter IM, Heerd C, Winkler JB, Baumgarten M, Härberle K-H, Grams TEE, Werner H, Fabian P, Havranek WH (2004) Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. *Atmos Environ* 38:2271–2281
- Mikkelsen TN, Dodell B, Lütz C (1995) Changes in pigment concentration and composition in Norway spruce induced by long-term exposure to low levels of ozone. *Environ Pollut* 87:197–205
- Mills G, Buse A, Gimeno B, Bermejo V, Holland M, Emberson L, Pleijel H (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmos Environ* 41:2630–2643
- Moura BB, de Souza SR, Alves ES (2014) Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environ Sci Pollut Res* 21(6):4220–4227
- Noormets A, Sober A, Pell EJ, Dickson RE, Podila GK, Sober J, Isebrands JG, Karnosky DF (2001) Stomatal and non stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones exposed to elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Plant Cell Environ* 24:327–336
- Pellegrini E, Campanella A, Lorenzini G, Nali C (2014) Biomonitoring of ozone: a tool to initiate the young people into the scientific method and environmental issues. A case study in Central Italy. *Urban For Urban Green*. doi:10.1016/j.ufug.2014.05.005
- Plazek A, Rapacz M, Skoczowski A (2000) Effects of ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue, and winter rape. *Photosynthetica* 38: 409–413
- Pleijel H (2000) Ground-level ozone. A problem largely ignored in southern Europe. *Air Pollut Climate series* (12)
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res* 73:149–156
- Power SA, Ashmore MR (2002) Responses of fen and fen-meadow communities to ozone. *New Phytol* 156:399–408
- Rossard S, Luini E, Perault JM, Bonmort J, Roblin G (2006) Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *J Exp Bot* 57:1245–1252
- Royal Society (2008) Ground level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications. *Science Policy Report 15/08*. Royal Society, London. ISBN 978-0-85403-713-1
- Saitanis CJ, Riga-Karandinos AN, Karandinos MG (2001) Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere* 42:945–953
- Saitanis CJ, Lekkas DV, Agathokleous E, Flouris F (2014) Screening agrochemicals as potential protectants of plants against ozone phytotoxicity. *Environ Pollut*. doi:10.1016/j.envpol.2014.11.013
- Singh P, Agrawal M, Agrawal SB (2009) Evaluation of physiological, growth and yield responses of a tropical oil crop (*Brassica campestris* L. var. Kranti) under ambient ozone pollution at varying NPK levels. *Environ Pollut* 157:871–880
- Smith G (2012) Ambient ozone injury to forest plants in Northeast and North Central USA: 16 years of biomonitoring. *Environ Monit Assess* 184(7):4049–4065
- Sun J, Feng Z, Ort DR (2014) Impacts of rising tropospheric ozone on photosynthesis and metabolite levels on field grown soybean. *Plant Sci* 226:153–155
- Telfer A, Bishop SM, Phillips D, Barber J (1994) Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as sensitizer for the formation of singlet oxygen. *J Biol Chem* 269:13224–13253
- Thwe AA, Vercambre G, Gautier H, Pagès L, Jourdan C, Gay F, Kasemsap P (2013) Dynamic shoot and root growth at different developmental stages of tomato (*S. lycopersicum* Mill.) under acute ozone stress. *Sci Hortic* 150:317–325
- Thwe AA, Vercambre G, Gautier H, Gay F, Phattaralerphong J, Kasemsap P (2014a) Effects of acute ozone stress on reproductive traits of tomato, fruit yield and fruit composition. *J Sci Food Agric*. doi:10.1002/jsfa.6798
- Thwe AA, Vercambre G, Gautier H, Gay F, Phattaralerphong J, Kasemsap P (2014b) Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to acute ozone stress in tomato (*S. lycopersicum* Mill.). *Photosynthetica* 52(1):105–116
- Tiwari S, Agrawal M (2011) Assessment of the variability in response of radish and brinjal at biochemical and physiological levels under similar ozone exposure conditions. *Environ Monit Assess* 175(1–4):443–454
- Tonneijck AEG, Franzaring J, Brouwer G, Metselaar K, Dueck TA (2004) Does interspecific competition alter effects of early season ozone exposure on plants from wet grasslands? Results of a three-year experiment in open-top chambers. *Environ Pollut* 131:205–213
- Van Dingenen R, Dentener FJ, Raes F, Krol MC, Emberson L, Cofala J (2009) The global impact of ozone on agricultural crop yields under

- current and future air quality legislation. *Atmos Environ* 43: 604–618
- Vogel AL (1955) A text book of quantitative inorganic analysis, theory and practice, 2nd edn. Longmans, London
- Wellburn FAM, Wellburn A (1994) Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness in *Pinus halepensis* (Mill.). *J Exp Bot* 45:607–614