

닭의장풀의 분리표피에서 H₂O₂에 의한 기공 닫힘기작

이준상 · 전방욱*
상지대학교 생물학과, *강릉대학 생물학과
(1996년 6월 26일 접수)

The Mechanism of Stomatal Closing by H₂O₂ in Epidermal Strips of *Commelina communis* L.

Joon-Sang Lee and Bang-Ook Jun*

Department of Biology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea;

*Department of Biology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea.

(Manuscript received 26 June 1996)

The mechanism of stomatal closing in response to O₃ was indirectly investigated by using H₂O₂ which is the intermediate product of O₃ metabolites. Stomata in epidermal strips close in response to H₂O₂. The effect of H₂O₂ on stomatal closing was dependent on the concentration of H₂O₂. 10 ppm H₂O₂ showed a clear effect on stomatal closing and 1000 ppm H₂O₂ induced complete stomatal closing after the treatment of 3 hours. Stomatal closing by H₂O₂ in intact leaf was also observed by measuring the diffusion resistance with porometer. It was found that the stomatal closing by H₂O₂ was not mediated by Ca²⁺, and that was a different result observed in stomatal closing by water stress. Reversely, Ca²⁺ showed a great inhibition on stomatal closing. The leakage of K⁺ in epidermal strips was doubled in response to H₂O₂ when it was compared to the control. 10 ppm H₂O₂ decreased photosynthetic activity. Fv/Fm representing the activity of Photosystem II was reduced about 4 % in 10 ppm H₂O₂ and 8 % in 100 ppm H₂O₂ in the treatment of 1.5 hour. However, stomatal closing by 10 ppm H₂O₂ was reduced about 56 %. Accordingly, it can be suggested that stomatal closing by H₂O₂ is related with the decrease of photosynthetic activity, but it was chiefly induced by the change of the membrane permeability.

Key words : *Commelina communis*, stomatal closing, H₂O₂, Ca²⁺, photosynthesis.

1. 서론

최근 세계적으로 환경오염에 의한 식물생태계 및 농작물 수확량의 피해에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지표면의 오존 농도는 산업화, 공업화 및 자동차 수의 급증에 의하여 꾸준히 증가되어 왔다. 실제로, 북아메리카, 유럽 및 산업화된 국가에서는 오존에 의한 공기

오염이 심각하다 (Reich et al., 1985). Hewitt et al. (1990)은 지난 100년간 중위도 지방의 오존 농도는 2배 증가하였다고 보고하였다. 국내에서도 환경백서에 따르면 오존의 경우 시간당 100 ppb를 초과한 지역이 93년의 13곳에서 94년에는 모두 28곳으로 2배 이상 늘었다 (환경처, 1994).

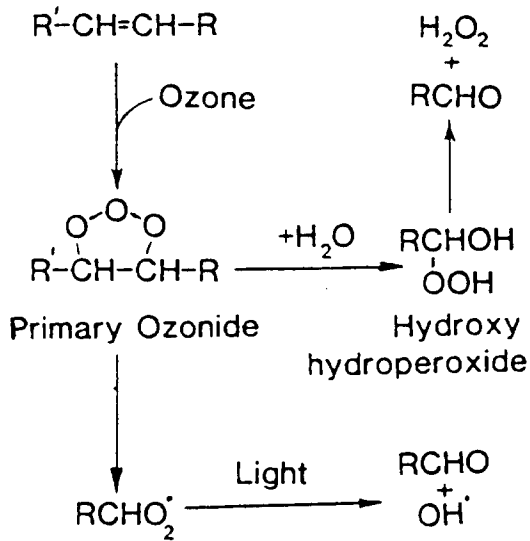


Fig. 1. The basic sequence of reactions associated with the process of ozonolysis. The main points to note are the presence or absence of water dramatically affects the possible reactions.

특히, 오존에 의한 식물의 피해는 다른 공해 요인인 이산화황, 이산화질소 및 일산화탄소에 비해 훨씬 심각한 것으로 알려졌다. 공해물질에 의한 곡물생산량 감소의 90%가량이 오존 및 다른 공해원의 복합작용에 의하여 이루어짐이 알려졌다 (Reinert, 1984). 오존이 곡물생산량에 미치는 영향은 광합성량의 감소와 연관되어 있다 (Reich and Amundson, 1985). 오존에 의한 광합성의 감소는 두 가지 요인에 의해 일어나는 것으로 추측된다. 첫번째로, 오존이 엽육세포의 광합성 기작에 직접적으로 손상을 초래하는 경우와 두번째로, 기공단합을 통해서이다. 기공은 광합성을 위한 이산화탄소와 그 외의 오존 및 다른 공해물질의 식물내 유입을 조절하는 중요한 역할을 한다. 식물이 오존에 노출되어 있을 경우, 기공은 손상을 받을 수가 있으며, 이로 인해 CO₂의 공급이 저해를 받기 때문이다.

200 ppb이하의 오존농도에서는 기공은 다양한 반응을 보이는데, 2종에서는 기공열림이 관찰되었고, 4종에서는 기공단합이 그리고 일부종에서는 아무런 변화를 보이지를 않았다.

또한 200 ppb이하의 오존 농도에서는 stomatal conductance는 매우 변이가 크며 종의 종적인 것으로 발표하였다 (Darrall, 1989). 최근 논문의 경우 100 ppb (Sanders et al., 1992; Saxe and Murali, 1989) 또는 160 ppb (Moldau et al., 1990) 이하의 오존 농도에서도 장기간 노출되면 기공컨덕턴스가 감소함이 알려져있다. 200 ppb 이상에서는 대부분의 종에서 기공단합이 관찰되었다 (Darrall, 1989). 그러나, 어떻게 기공이 오존에 의하여 닫히는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 실정이다.

Fig. 1은 오존이 생체막의 탄화수소 이중결합에 반응하여 이중결합을 깨고 탄화수소 사슬을 절단하며, 그 결과 파생되는 H₂O₂와 OH·을 보여준다. 이와 같은 이유로 H₂O₂는 O₃의 효과를 간접적으로 이해하는데 사용이 된다. 따라서, 본 연구는 H₂O₂에 의한 기공단합 기작을 조사함으로써, 간접적으로 오존에 의한 기공단합 기작을 이해하고자 한다.

2. 재료 및 연구방법

2.1 재료

닭의장풀 (*Commelina communis* L.) 종자를 질석과 부엽토 혼합물(3:1 비율)에 심어 10/14 시간의 명암주기, 20 °C, 60 %의 습도, 80 μm²s⁻¹ (metal halide lamp)의 광도로 재배하였다. 일주일에 한번의 주기로 복합비료 (원더그로 2호)를 1g/L의 농도로 주었으며, 발아 후 4주 동안 자란 식물의 3~4번째 잎을 사용하였다.

2.2 분리한 표피의 기공 개폐 측정

잎을 따서 증류수로 채운 plastic petri-dish에 잎의 아랫면이 위로 향하도록 한 다음, 기공단합을 유도하기 위해서 암실에 1시간 가량 놓는다. 그 후 면도칼과 핀셋을 이용하여 Lee and Bowling (1992)에 따라 표피를 분리한 다음, 10 mM MES-KOH buffer (50mM KCl, pH 6.15)를 포함하는 직경 5 cm의 plastic petri-dish에 띄운다. 이들 petri-dishes는 온도 (25 ± 2 °C)와 광도 (200 μm²s⁻¹)가 일정하게 유지되며, normal air 또는 CO₂ free air를 지속적으로 공급받을 수 있는 표피 배양탱크에 설치하였다. CO₂ free air는 실험실 공기를 2

M KOH 용액을 통과시켜서 얻었다.

배양 후 표피는 슬라이드 글라스 위에 놓고 비디오 카메라를 거쳐 모니터와 연결시킨 현미경을 통하여 관찰하였다. 기공의 크기는 모니터상에서 보정을 한 자를 이용하여 40~60 개의 기공을 측정 한 후 평균한 값으로 하였다.

2.3 K⁺ 방출량의 측정

분리표피를 petri-dish에 담겨있는 MES-KOH buffer (50 mM KCl, pH 6.15) 5 ml에 넣은 후 일정한 온도 (245 ± 2 °C)와 광도 (200 μm²s⁻¹) 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 이때 기공을 열게하기 위해 CO₂ free air를 지속적으로 공급하였다. 2시간 후에 H₂O₂를 농도별로 처리하고 1.5h 동안 암처리하였다. 그 다음 petri-dish에 있는 분리표피를 제거한 후 방출된 K⁺의 양을 Atomic Absorption Spectrometer (A.A.S., GBC)를 이용하여 측정하였다.

2.4 확산저항 (Diffusion Resistance)의 측정

H₂O₂가 온전한 잎의 기공개폐에 미치는 영향을 조사하기 위하여 확산저항을 측정하였다. H₂O₂를 농도별 (control, 10 ppm, 100 ppm)로 비이커에 준비하였다. 오전 8시에 Growth Chamber 내에 있는 암처리된 닭의장풀의 잎을 준비한 H₂O₂ 용액에 1분간 담그어 침투시켰다. 1시간 후에 빛을 준 후 30분이 지나서 확산저항을 측정하였다. 그 후 2시간 간격으로 p.m. 7시 30분까지 계속해서 확산저항을 측정하였다.

확산저항은 LI-1600 steady state porometer (Leica)를 이용하여 측정하였으며, 각각 잎의 다른 부위를 4번 측정하여 평균을 구하였다.

2.5 엽록소 형광의 측정

H₂O₂ 처리시 광합성능을 알 수 있는 형광량 측정은 Plant Efficiency Analyser (Hansa Tech.)을 이용하였다. H₂O₂를 엽육세포로 효과적으로 침투시키기 위해 잎을 딴 후에 아랫면의 표피 (abaxial epidermis)를 제거하여 엽육세포를 노출시킨 다음 엽육세포를 H₂O₂ 농도별로 배양하면서 공기를 계속해서 공급하였다. 형광량은 H₂O₂처리 1시간 30분 후에 측정

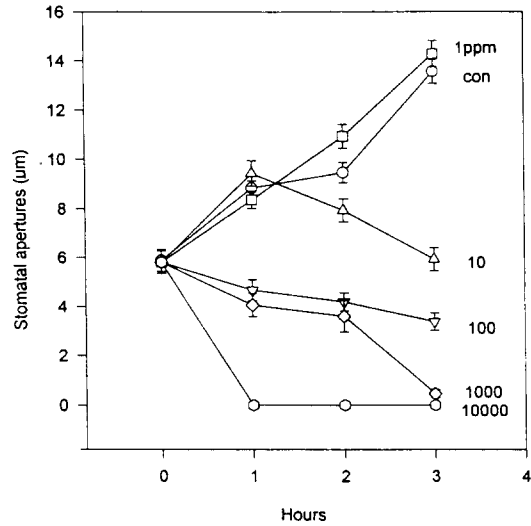


Fig. 2. The effect of H₂O₂ on stomatal closing. Each point is the mean (± s.e.m) of 80 stomatal apertures.

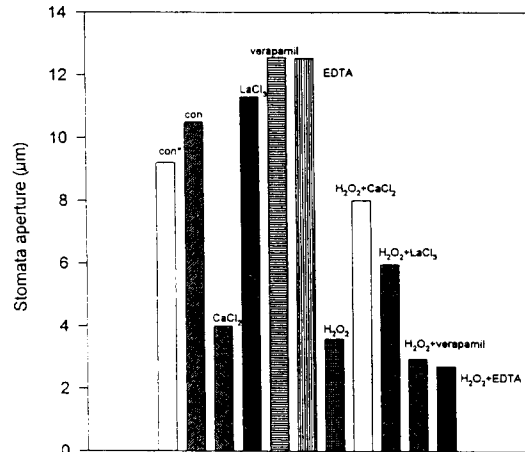


Fig. 3. The effect of H₂O₂ on diffusion resistance in intact leaves of *Commelina communis* L. Each point is the mean of 4 measurements.

하였다.

3. 결과 및 고찰

농도별로 처리한 H₂O₂가 기공닫힘에 미치는 영향은 Fig. 2에 나타내었다. 10,000 ppm을 처리한 경우 1 시간 배양 후에 완전한 기공닫힘이 유도되었다. 1000 ppm의 경우 3시간 후에 완전한 기공닫힘이 관찰되었으나, 그 효과

는 1 시간에서도 뚜렷이 관찰되었다. 1 ppm의 경우 대조구와 큰 차이가 없었으며 오히려 약간 기공열림을 촉진하였다. 10 ppm의 경우 1 시간에서는 효과가 없었으나 2 시간에서는 14 % 그리고 3 시간에서는 55 % 기공닫힘이 촉진되었다. 100 ppm의 경우 3시간 배양 후에 약 72% 기공닫힘이 촉진되었다. 사실상 ppm단위는 매우 높은 농도로 O₃의 경우 100 ppb이상에서 그 효과가 관찰이 된 것에 미루어 볼 때 H₂O₂가 O₃에 비해 기공닫힘에 미치는 효과는 작은 것으로 보인다. 이는 O₃는 H₂O₂ 외에도 다른 강력한 산화제를 만드는 반면에 H₂O₂는 세포내에 존재하는 지구상에서 가장 활성이 높은 카탈라아제 (1초에 약 10만 개의 H₂O₂를 분해)에 의해 쉽게 분해되기 때문으로 사료된다.

10 ppm과 100 ppm의 H₂O₂ 농도에서 기공닫힘이 적절하게 유도되어 본 실험에서는 이 두 농도의 H₂O₂를 가지고 기공닫힘기작을 조사하였다. 분리한 표피에서와 마찬가지로 온전한 잎에서도 H₂O₂에 의한 기공닫힘이 관찰되는지 비교해 봄으로써, *in vivo*에서의 H₂O₂ 효과를 조사하였다 (Fig. 3). 어두운 조건에서 밝은 조건으로 변할 경우 각 농도별로 확산저항이 크게 감소하여 기공이 열렸다는 것을 알 수가 있었다. 반면에 밝은 조건에서 어두운 조건으로 변할 때에는 확산저항이 크게 증가하여 기공이 닫혔음을 알 수가 있었다. 전반적으로 온전한 잎에 H₂O₂를 처리한 경우에도 분리 표피에서 관찰된 것과 마찬가지로 농도가 높을수록 확산저항이 커서 기공닫힘이 유도된 것으로 보인다.

Ca²⁺이 H₂O₂에 의한 기공닫힘에 미치는 영향은 Fig. 4에 표시하였다. 식물이 수분스트레스를 받으면 기공이 닫히는데, 이때는 엽시스산이 공변세포로 이동하여 세포질내의 Ca²⁺ 농도를 증가시키기 때문이다. 증가된 Ca²⁺은 Cl⁻의 방출을 유도하며, 이로 인해 형성된 탈분극 (hyperpolarization)은 K⁺의 방출을 촉진하고 K⁺ 흡수채널의 활성을 억제한다. 그 결과 공변세포는 팽압을 잃고 기공이 닫힌다. 따라서, H₂O₂에 의한 기공닫힘이 엽시스산에 의한 기공닫힘에서와 같이 Ca²⁺를 매개로 하는지 조사하는 것은 매우 의미가 있다. Fig. 4에서 1 mM의 CaCl₂을 첨가하였을 때 기공의 크기

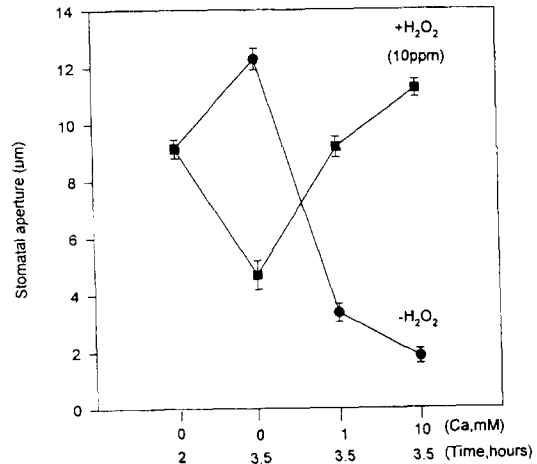


Fig. 4. The effect of Ca²⁺ on stomatal closing induced by H₂O₂. Each point is the mean of 80 stomatal apertures.

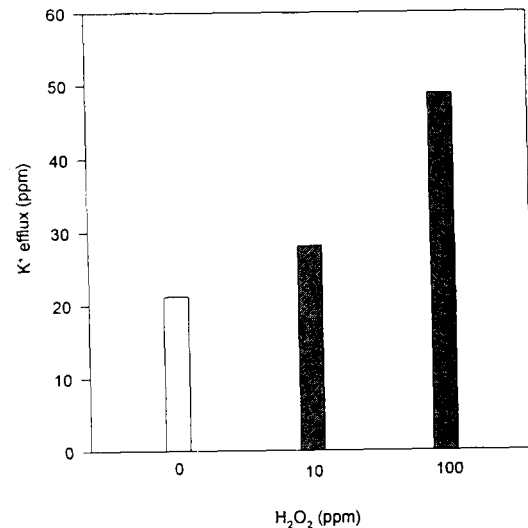


Fig. 5. The effect of Ca²⁺ concentration on stomatal closing induced by H₂O₂. Each point is the mean of 80 stomatal apertures.

는 3.36 µm였다. 이는 De silva et al. (1985)이 0.25 mM의 CaCl₂ 처리시 14 µm에서 6 µm로 기공닫힘을 관찰한 결과와 유사하다. Calcium channel blocker인 LaCl₃와 verapamil 및 chelater인 EDTA를 처리하여 세포질내의 Ca²⁺ 농도를 감소시킬 경우 기공열림이 촉진됨을 확인 할 수가 있었다. 반면에 H₂O₂와

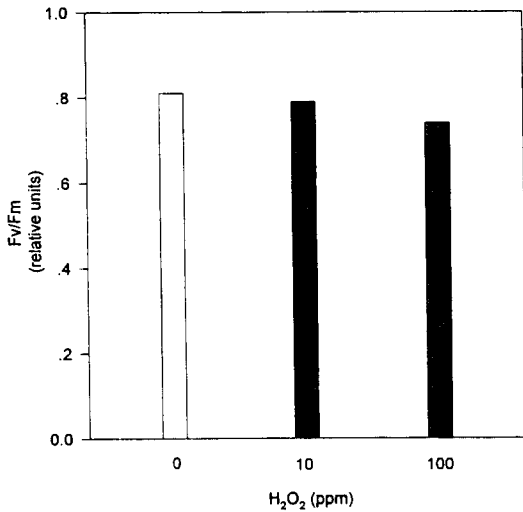


Fig. 6. The effect of H₂O₂ on K⁺ efflux in epidermal strips. Each point is the mean of two separate experiments.

CaCl₂를 같이 처리할 경우 H₂O₂에 의한 기공 닫힘이 크게 억제되었다.

기공닫힘에 영향을 주는 H₂O₂와 CaCl₂와의 관계를 Fig. 5에 표시하였다. H₂O₂와 CaCl₂를 각각 처리하였을 경우에는 기공이 닫혔었다. 그러나, 이들을 같이 처리할 경우에는 기공닫힘이 현저히 억제되는 것을 알 수가 있었다. 1 mM의 Ca²⁺을 H₂O₂와 같이 처리할 경우 기공이 H₂O₂를 단독으로 처리할 때에 비해 2 배 가까이 열렸으며, 10 mM의 Ca²⁺ 처리시에는 기공닫힘이 완전히 저해를 받아 기공이 control과 같은 수준으로 열렸다. 이와 같은 결과는 H₂O₂에 의한 기공닫힘은 Ca²⁺를 매개로 하지 않는다는 것을 보여준다. 오히려 Ca²⁺은 H₂O₂에 의한 막의 산화로부터 막을 보호해주는 역할을 하는 것으로 추측되며 그 결과 공변세포의 팽압을 조절하는 이온의 방출을 억제하여 기공닫힘을 억제하는 것으로 보여진다. 그러나, 문제는 Ca²⁺이 H₂O₂에 의한 기공닫힘을 억제하는 것으로 나타났으나, 실제로 *in vivo* 상황하에 H₂O₂가 세포질내에 Ca²⁺의 농도를 증가시키는지, 그리고 증가된 Ca²⁺이 기공기작에 실제로 관여하는지의 여부는 미지수이다.

H₂O₂에 의한 K⁺의 누출은 Fig. 6에 표시하였다. 대조구에서 21.14 ppm의 K⁺이 누출되

었다. 이와 같은 결과는 배양액에 K⁺을 첨가하지 않았기 때문에 세포내·외의 K⁺ 농도 기울기가 형성되어 확산을 통해 누출된 것으로 추측되어진다. 실제로 이와 같은 이온의 손실 외에도 포도당 및 기타 유기물의 손실도 일어나는 것으로 알려졌다 (Thorpe and Milthorpe, 1984). H₂O₂를 처리할 경우에는 누출된 K⁺의 양이 급증하였는데, 대조구에서는 21.14 mg/L의 K⁺이 누출되었으며, 10 ppm에서는 28.08 mg/L 그리고 100 ppm에서는 48.8 mg/L가 누출되었다. 이를 백분율로 나타내면, 10 ppm에서는 대조구에 비해 33 %가 증가하였으며 100 ppm에서는 2 배 이상 누출이 증가하였다. 실제로 기공이 닫혔을 때 공변세포내의 K⁺의 양은 3.1 g/L이며 열렸을 때는 12.3~24.8 g/L가 함유되어 있다 (MacRobbie, 1987). 따라서, 대조구의 경우 누출된 양은 기공이 닫혔을 때를 기준으로 하면 원래 K⁺의 양의 약 7 % (21.14/3100)만 누출된 것으로 추측할 수 있다. 반면에 10 ppm에서는 9.1 % 그리고 100 ppm에서는 16 %가 누출된 셈이다. 이와 같이 누출된 K⁺의 양이 기공이 열렸을 때와 닫혔을 때의 농도 기울기에 비해 적은 이유는 대부분의 K⁺이 배양액 속에 누출되었기 보다는 세포벽 또는 표피세포로 이동하였기 때문으로 추측되며, 실제로 *in vivo* 상태에서는 K⁺이 세포벽 및 표피세포로 이동하는 것으로 알려졌다 (Bowling, 1977). 위 결과로부터 H₂O₂에 의한 기공닫힘은 K⁺의 누출과 직접적으로 연관된 것으로 사료된다. 그러나, H₂O₂에 의한 기공닫힘의 시간과 K⁺ 방출의 시간과의 관련성은 앞으로 밝혀져야 할 부분이다. H₂O₂에 의한 기공닫힘은 O₃에 의한 기공닫힘과 비슷한 과정을 거쳐 일어나는 것으로 보여진다. O₃의 초기 반응 부위는 세포질의 이온 농도와 pH 변화를 유도시키는 원형질막에서 이루어진다고 보고되고 있다 (Heath and Frederick, 1979; Dominy and Heath, 1985). O₃에 의한 기공닫힘도 막 투과성의 변화로 인한 K⁺ 및 Cl⁻의 방출을 촉진하며 이온 수송을 맡고 있는 ATPase의 활성에 영향을 주어 전반적인 이온의 불균형을 초래하여 일어나는 것으로 추측된다.

오존에 의한 기공닫힘은 이와 같이 직접적으로 공변세포에 작용하여 이온 농도의 변화를 초래하여 일어날 수도 있으며, 그 외에 오존이

엽육세포의 광합성기작에 손상을 주어 간접적으로 기공의 반응에 영향을 줄 수가 있다. 간접적인 영향은, 광합성양이 감소할 경우 세포 내강속의 CO_2 농도가 증가하게 되며, 이로 인해 기공이 닫힐 때 관찰된다. 위의 결과로부터 10 ppm과 100 ppm의 H_2O_2 농도에서 기공이 닫혔는데, 과연 그 농도에서 엽육세포의 광합성이 억제되는지 살피는 것은 매우 중요하다. 광합성능의 측정은 Plant Efficiency Analyser를 이용하여 형광을 측정하였다 (Fig. 7). Fv/Fm 비율은 광화학 반응의 광양자 수율에 비례하며 (Demmig and Bjorkman, 1987), 또한 광계 II 반응 중심의 수와 비례하는 것으로 보고되고 있다 (Oquist et al., 1992).

Fv/Fm이 10 ppm에서 약 4 % 감소하였고, 100 ppm에서는 약 8 % 감소하였다. 반면에 10 ppm에서 기공닫힘은 처리 1.5 시간 후에 약 56 % 감소하였다. 따라서, H_2O_2 에 의한 기공닫힘은 광합성의 감소와도 관련이 있으나, 주로 직접적인 막투과성에 영향을 주어 기공을 닫게 유도하는 것으로 보여진다. 광합성적 활성이 기공개폐에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 광합성 억제제인 DCMU를 분리표피에 직접 처리하거나 또는 온전한 잎의 엽육세포에 침투시킨 후 기공이 열릴 수 있는 조건을 주어 기공개폐를 측정하면 보다 더 정확히 광합성 활성과 기공개폐와의 관계를 규명할 수 있으며, 이는 앞으로 진행할 과제 중의 하나이다.

4. 요약

O_3 의 중간 대사산물인 H_2O_2 를 이용하여 O_3 에 의한 기공 닫힘기작을 간접적으로 조사하였다. 분리한 표피에 H_2O_2 를 처리하면 기공은 닫힌다. 그 효과는 H_2O_2 농도에 의존적으로 나타났고, 10 ppm에서부터 기공닫힘의 효과가 뚜렷하게 관찰되었으며 1000 ppm에서는 처리 3 시간 후에 기공이 완전히 닫혔다. Porometer를 이용하여 확산저항을 측정한 결과 H_2O_2 에 의한 기공닫힘은 intact leaf에서도 관찰되었다. H_2O_2 에 의한 기공닫힘은 수분스트레스에 의한 기공닫힘기작과는 달리, Ca^{2+} 에 의해 기공닫힘이 크게 억제되었다. H_2O_2 에 의한 K^+ 의 누출은 10 ppm에서는 대조구에 비해

33 %가 100 ppm에서는 대조구에 비해 약 100 % 이상의 K^+ 누출을 유도하였다. H_2O_2 가 광합성기작에 미치는 실험을 한 결과, 10 ppm의 H_2O_2 에서도 광합성능의 감소가 확인되었다. 광화학반응계 II의 활성을 나타내는 Fv/Fm은 H_2O_2 를 10 ppm으로 1.5 시간 동안 처리시 약 4 % 감소하였고, 100 ppm으로 처리하면 약 8 % 감소하였다. 반면에 10 ppm을 1.5 시간 처리할 경우 기공닫힘은 약 56 %가 감소하였다. 따라서, H_2O_2 에 의한 기공닫힘은 광합성의 감소와 관련이 있다기보다, 주로 직접적인 막투과성에 영향을 주어 기공을 닫게 유도하는 것으로 보여진다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었으며, 본 실험을 위해 Porometer를 빌려주신 충북대학교 생물교육과의 강 상준교수님과 식물 관리를 도와준 상지대학교 생물학과 어 현선, 오 현주, 이 현진양에게 감사드린다.

참 고 문 헌

- Bowling, D.J.F., 1987, Measurement of the apoplastic activity of K^+ and Cl^- in the leaf epidermis of *Commelina communis* in relation to stomatal activity. *J. Exp. Bot.*, 38, 1351-1355.
- Darrall, N.M., 1989, The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell and Environ.*, 12, 1-30.
- Demmig, B. and O. Bjorkman, 1987, Comparison of the effect of excessive light of chlorophyll fluorescence (77 k) and photon yield of O_2 evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171, 171-184.
- DeSilva, D.L.R., A.M. Hetherington and T. A. Mansfield, 1985, Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *The New Phytologist*, 100, 473-482.
- Dominy, P.J. and R.L. Heath, 1985, Inhibition of the K^+ stimulated ATPase

- of the plasmalemma of pinto bean leaves by ozone. *Plant Physiol.*, 77, 43-45.
- Heath, R.L. and P.E. Frederick, 1979, Ozone alteration on membrane permeability in *Clorella*. I. Permeability of potassium ion as measured by rubidium tracer. *Plant Physiol.*, 64, 455-459.
- Hewitt, C.N., P. Lucas, A.R. Wellburn and R. Fall, 1990, Chemistry of ozone damage to plants. *Chemistry & Industry*, August, 478-481.
- Lee, J.S. and D.J.F. Bowling, 1992, Effect of the mesophyll on stomatal opening in *Commelina communis*. *J. Exp. Bot.*, 43, 951-957.
- MacRobbie, E.A.C., 1987, Ionic relation of guard cells. In *Stomatal Function*. E. Zeiger, G.D. Farquhar and I.R. Cowan (eds.), Stanford, California, pp. 125-162.
- Moldau, H., J. Sber and A. Sber, 1990, Differential sensitivity of stomata and mesophyll to sudden exposure of bean shoots to ozone. *Photosynthetica*, 24, 446-458.
- Oquist, G., W.S. Chow and J.M. Anderson, 1992, Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta*, 186, 450-460.
- Reich, P.B., 1984, Loss of stomatal function in ageing hybrid poplar leaves. *Annals of Botany*, 53, 691-698.
- Reich, P.B. and R.G. Amundson, 1985, Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science*, 230, 566-570.
- Reinert, R.A., 1984, Plant responses to air pollution mixtures. *Ann. Rev. Phytobiology*, 22, 421-442.
- Sanders, G.E., J.J. Colls and A.G. Clark, 1992, Physiological changes in *Phaseolus vulgaris* in response to long-term ozone exposure. *Annals of Botany*, 69, 123-133.
- Saxe, H. and N.S. Murali, 1989, Diagnostic parameters for selecting against novel spruce (*Picea abies*) decline: III. Response of photosynthesis and transpiration to O₃ exposures. *Physiol. Plant.*, 76, 356-361.
- Thorpe, N. and F.L. Milthorpe, 1984, Transport of metabolites between the mesophyll and epidermis of *Commelina cyanea* R.Br. *Australian J. Plant Physiol.*, 11, 59-68.