

高等植物光系统 II 中强光照射产生超氧阴离子自由基的 ESR 探索*

刘科¹⁾ 孙健^{1,2)} 刘扬^{1)**} 张启元¹⁾ 匡廷云²⁾

(¹⁾中国科学院化学研究所, 北京 100080; ²⁾中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 利用自旋捕捉电子顺磁共振 (ESR) 的方法对从菠菜叶绿体中分离提纯的光系统 II (PS II) 颗粒产生 $O_2^{\cdot-}$ 的机理进行了直接检测. 通过对样品充氧、加入超氧化物歧化酶 (SOD) 抑制剂四氰乙烯 (TCNE) 以及原位光照检测 ESR 信号等手段, 在 PS II 中检测到 $O_2^{\cdot-}$ 与 DMPO 加合物的特征 ESR 信号. 而在没有 SOD 抑制剂的情况下, 光照时 PS II 中 $O_2^{\cdot-}$ 与 DMPO 加合物浓度显著下降. 进一步实验发现 PS II 中 $O_2^{\cdot-}$ 产率与氧分子浓度直接正相关. $O_2^{\cdot-}$ 产率还具有 pH 值依赖性, 在 pH 值为 6.0~6.5 范围内, $O_2^{\cdot-}$ 产率最高, 大于此范围时则呈显著下降趋势. 而 PS II 颗粒的 Tris 处理也将导致 $O_2^{\cdot-}$ 产率的急剧减少. 以上结果证实水裂解放氧十分活跃的 PS II 也是高等植物叶绿体在光照下产生活性 $O_2^{\cdot-}$ 的主要部位, 通常大部分的 $O_2^{\cdot-}$ 能被内源 SOD 清除, 且 $O_2^{\cdot-}$ 的生成与 PS II 的电子传递活性密切相关.

关键词 超氧阴离子自由基, 光系统 II, 活性氧, 自旋捕捉 ESR

学科分类号 Q945

超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 不仅具有重要的生理功能且与多种疾病密切关联, 它还常常是活性氧自由基链中所产生的第一个自由基, 可借助一系列反应诱发生成其他损伤生物体的活泼自由基^[1], 因而对它的研究有着重要的实际应用意义. 在高等植物中, $O_2^{\cdot-}$ 的产生被认为是机体在受到不利环境胁迫的应答反应^[2]. 高等植物的类囊体膜、叶绿体以及叶片具有还原氧分子并产生 $O_2^{\cdot-}$ 的能力, 这便是 Mehler 反应^[3]. 早期的研究结果还显示, 叶绿体中通过还原氧分子而形成 $O_2^{\cdot-}$ 的主要部位是 PS I 受体侧的铁氧还蛋白或 PS I 原初电子受体^[3]. 当叶绿体受到过度光照时, PS I 把电子传递给氧分子, 从而避免因电子传递链的过度还原而耗散过多的能量^[3]. 近年来, 人们又陆续从 PS II 中获得产生 $O_2^{\cdot-}$ 的证据. 例如最初发现 SOD 对 Tris 处理的 PS II 颗粒的放氧活性具有恢复作用^[4], 后来又采用细胞色素 c (Cyt c) 还原法检测到 PS II 中产生的 $O_2^{\cdot-}$ ^[5], 以及最近用伏安法进一步提供了在 PS II 中产生 $O_2^{\cdot-}$ 的实验证据^[6]. 尽管 Hideg 等^[7]也曾利用自旋捕捉 ESR 方法研究了光抑制条件下各类 PS II 亚复合物中自由基的生成情况, 但始终未能得到 $O_2^{\cdot-}$ 产生的电子顺磁共振 (ESR) 信号. 因而, 对于 PS II 产生 $O_2^{\cdot-}$ 的生理意义至今仍缺乏足够的了解.

本文利用自旋捕捉 ESR 方法和细胞色素 c 还原法研究了完整与供体侧失活的 PS II 颗粒中产生

$O_2^{\cdot-}$ 的情况, 在 PS II 颗粒中获得了 $O_2^{\cdot-}$ 与 DMPO 的加合物 DMPO-OOH 的电子顺磁共振信号, 并初步探讨了 SOD 抑制剂、氧浓度、pH 值以及 Tris 处理对 $O_2^{\cdot-}$ 生成的影响. 结果表明强光下 PS II 能有效地产生 $O_2^{\cdot-}$, 且该过程与 PS II 电子传递活性密切相关.

1 材料和方法

1.1 PS II 颗粒的制备及 Tris 处理

选用购自市场的新鲜菠菜, 采用 Kuwabara 等的方法^[8]制备 PS II 颗粒储存于液氮中. 叶绿素的定量采用 Arnon 方法^[9]. PS II 颗粒的 Tris 处理按 Mizusawa 等的方法^[10]: 将 PS II 颗粒 (叶绿素浓度为 0.4 g/L) 悬浮于含 1 mol/L Tris (pH 8.0) 和 1.25 mmol/L EDTA 的缓冲液中, 在冰浴内用室内光辐照 30 min, 然后用缓冲液 (0.4 mol/L 蔗糖, 50 mmol/L Hepes-NaOH pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂) 离心洗涤沉淀两次, 最终产物悬浮于上述缓冲液中.

1.2 细胞色素 c 还原法测定 $O_2^{\cdot-}$

480 μ l 样品置于 1 cm $\times$ 1 cm 的比色皿中, 边

* 国家重点基础规划项目 (G1998010100) 与国家自然科学基金资助项目 (39890390, 39870208).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62571074, E-mail: yliu@xxl.icas.ac.cn

收稿日期: 2000-06-15, 接受日期: 2000-08-23

搅动边光照. 光源为 He-Ne 激光器 (北京朝阳激光器厂, HN600L), 功率 25mW, 光斑直径 6 mm. 光照一定时间后通过测定样品在 550 nm 与 557 nm 处吸收差的变化来检测 Cyt c (Sigma 公司) 的还原速率^[11]. 实验所用吸收光谱仪为 UVICON 810.

为了抑制 PS II 颗粒中内源性 SOD 的活性, 相应实验在缓冲液 A 中加入 SOD 抑制剂四氰乙烯 (TCNE) 1 mmol/L. 此外, 实验中外加 SOD (Sigma 公司) 的浓度控制为 10 U/ml.

1.3 $O_2^{\cdot-}$ 的自旋捕捉 ESR 测定

将 PS II 颗粒悬浮于 1.1 所述缓冲液中, 叶绿素浓度为 0.6 g/L. 将 180 μ l 悬浮液与 60 μ l 浓度为 200 mmol/L 的 DMPO 溶液充分混匀. 在避光条件下通氧约 12 min, 然后将其转移至石英扁平池, 在电子顺磁共振仪 (Bruker ESP300) 的光学腔内用 He-Ne 激光器光照 60 s 后, 扫场并原位记录捕获自由基的 ESR 信号.

1.4 PS II 从 H_2O 到 DCIP 电子传递活性的测定

将 550 μ l 样品悬浮液 (其中 PS II 颗粒或 Tris 处理过的 PS II 颗粒的叶绿素浓度为 40 mg/L, 悬浮于含有 50 μ mol/L DCIP 的缓冲液中) 置于 1 cm $\times$ 1 cm 的比色皿中, 边搅动边用 He-Ne 激光器光照, 3 min 后测定 620 nm 处的吸收值. 所用吸收光谱设备参见 1.2.

2 实验结果

2.1 自旋捕捉 ESR 测定 PS II 颗粒中产生的 $O_2^{\cdot-}$

在自由基捕捉剂 DMPO (50 mmol/L) 存在条件下, 充氧饱和的 PS II 颗粒悬浮液经 633 nm 红光 (He-Ne 激光器) 光照后, 通过原位 ESR 检测可获得特征的 DMPO 和 $O_2^{\cdot-}$ 加合物 [DMPO- O_2H] $^{\cdot-}$ 的顺磁共振信号 (图 1b). 对比不同实验条件下捕获自由基加合物的 ESR 信号强度还可进一步发现: 当该体系中加入浓度为 1 mmol/L 的 SOD 抑制剂 TCNE 时, 加合物信号强度成倍增强. 以加 TCNE 后的信号强度作为参照值 (100%, 图 1 中 A), 对照实验组中无抑制剂存在时 $O_2^{\cdot-}$ 信号仅为 37% (图 1 中 B). 这显示出在 PS II 颗粒中为保护 $O_2^{\cdot-}$ 损伤作用, 的确存在相当数量的内源性超氧化物歧化酶 SOD. 当体系中添加 10 U/ml 的外源性 SOD 且又无抑制剂存在时, 信号强度就仅剩原强度的 8% (图 1 中 C), 几乎完全被清除. 这进一步确凿地说明所捕获的信号来源于 $O_2^{\cdot-}$. 此外, PS II 颗粒体系捕获物的时间相关实验还显示: 捕获产物

[DMPO- O_2H] $^{\cdot-}$ 停止光照后的半衰期很短, 仅为 1 min (图谱略). 该体系中捕获物稳定性差, 很可能正是到目前为止一直未能在 PS II 颗粒中获取 $O_2^{\cdot-}$ ESR 证据的主要缘由.

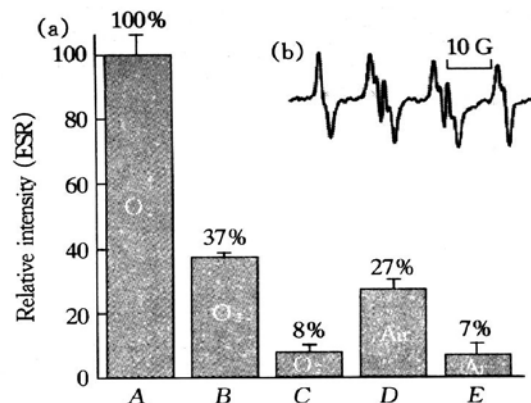


Fig. 1 Relative ESR signal intensity of adducts of superoxide and DMPO

(a) A: In the buffer containing TCNE (1 mmol/L); B: Without TCNE; C: Without TCNE but contain SOD (10 U/ml); From A to C, samples were saturated by pure oxygen. D: In the buffer containing TCNE (1 mmol/L), and saturated by air; E: In the buffer containing TCNE (1 mmol/L), and saturated by Ar; (b) ESR spectrum of the trapped superoxide radical anions by DMPO in PS II particles.

2.2 Cyt c 还原法测定 PS II 颗粒中产生的 $O_2^{\cdot-}$

为更加确切地验证 PS II 颗粒中 $O_2^{\cdot-}$ 的产生, 我们又对照应用了另一种常见的 $O_2^{\cdot-}$ 检测手段——Cyt c 还原方法. 由图 2 得知, 用 Cyt c 还原方法可检测到 PS II 颗粒中产生的 $O_2^{\cdot-}$. 并且当延长对 PS II 颗粒光照时间条件下, 还原型 Cyt c 的浓度随时间不断增加. 若体系中外加 10 U/ml 的 SOD, Cyt c 还原速率约下降 40%. SOD 未能更有效地抑制 Cyt c 的还原不外乎两种可能性: a. SOD 不能完全清除 PS II 颗粒在光照下产生的 $O_2^{\cdot-}$; b. 部分 Cyt c 的还原不是由 $O_2^{\cdot-}$ 引发. 对比 2.1 节中 SOD 清除效应的 ESR 实验结果, 第一种情况显然不是起主导作用. 换言之, 误差来源于 Cyt c 还原方法检测 $O_2^{\cdot-}$ 的局限性, 即: 某些条件下部分 Cyt c 的还原可能不是全部来自 $O_2^{\cdot-}$ 的作用.

为了抑制 PS II 颗粒中膜脂上的内源性 SOD, 在体系中加入比 CN^- 亲脂性更好的 SOD 抑制剂 TCNE^[5]. 在此条件下光照 5 min 的区间内 Cyt c 还原速率比无抑制剂时增加约 3~4 倍. 这个数值与 ESR 相应实验结果基本相符, 可以相互印证.

继续光照的实验还可以发现 Cyt c 还原速率转而逐步下降, 大约在 10 min 之后还原型 Cyt c 的浓度达到最高值. 然后再进行光照只能引起还原型的减少, 表明发生了部分还原型 Cyt c 的氧化. 但此现象的确切原因目前尚不清楚.

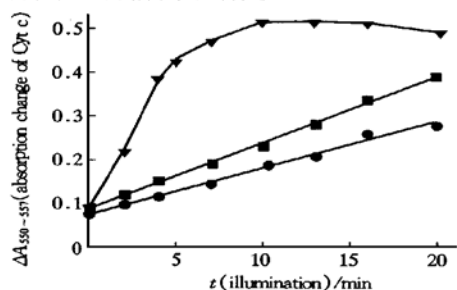


Fig. 2 Production of superoxide in illuminated PS II partial monitored by the reduction of Cyt c
 ▼ — ▼: + TCNE (1 mmol/L); ■ — ■: control;
 ● — ●: + SOD (10 U/ml).

Fig. 2 Production of superoxide in illuminated PS II partial monitored by the reduction of Cyt c
 ▼ — ▼: + TCNE (1 mmol/L); ■ — ■: control;
 ● — ●: + SOD (10 U/ml).

综合来看, Cyt c 还原法也可有效地探索 PS II 颗粒中 $O_2^{\cdot -}$ 的生成. 其研究的特色主要在于它能够动态地反映活性 $O_2^{\cdot -}$ 的变化情况. 但由于 PS II 在将光能转化为化学能和裂解水放氧过程中会伴随产生大量具有强氧化还原活性的中间产物^[12], 很可能直接参与对 Cyt c 的反应, 进而干扰用 Cyt c 还原法检测 PS II 体系中产生 $O_2^{\cdot -}$ 的准确性. 而且, 相对于 PS I 体系而言, PS II 颗粒产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力弱得多^[13], 检测过程更易受到其他活性物质的影响.

与 Cyt c 还原法对比, 自旋捕捉方法的本质是自由基加成反应, 而不是氧化还原过程. 因此, 它的优势在于即能有效地排除许多其他氧化还原物的干扰, 又可通过原位检测手段较特征地鉴别低浓度的 $O_2^{\cdot -}$ 自由基.

2.3 $O_2^{\cdot -}$ 生成因素的相关分析

除了 TCNE 能有效增强 $O_2^{\cdot -}$ 的信号外, 液相中溶解氧的含量对 $O_2^{\cdot -}$ 的产率也起着十分显著的影响作用. 图1中还对比了在 TCNE 存在条件下 PS II 颗

粒分别用氩气、空气和氧气饱和 (分别由图 1 中 E、D 与 A 代表) 后, 光诱导产生的 $O_2^{\cdot -}$ 与 DMPO 反应所生成的加合物信号强度. 显而易见, 相对于空气饱和样品而言, 氧饱和样品中生成 $O_2^{\cdot -}$ 的能力大幅升高. 而三者之间氩气饱和样品产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力最低, 仅存的微弱信号拟来源于光合作用条件下自身产生的氧分子.

如图 3 所示, 不同 pH 值下 PS II 颗粒产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力也有所不同. 当 pH 值为 6.0~6.5 时, $O_2^{\cdot -}$ 的产率呈现最高值. 而在有利于自旋捕捉 ESR 方法检测 $O_2^{\cdot -}$ 的高 pH 值条件下, $O_2^{\cdot -}$ 加合物信号强度反而显著下降, 这显然表明随着 pH 值升高 PS II 颗粒产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力在降低. 令人感兴趣的是这种下降趋势正与文献报道中 PS II 颗粒放氧活性随 pH 值升高而下降的趋势很相似^[8]. 至于在低 pH 值时, 由于 $O_2^{\cdot -}$ 本身和加合物 $[DMPO-OOH]^{\cdot -}$ 在低 pH 值时半衰期会大幅度降低^[14], 因而其 $O_2^{\cdot -}$ 加合物信号的减弱有着较复杂的原因. 为进一步验证光系统 II 电子传递活性与 $O_2^{\cdot -}$ 产生相关联, 将 PS II 颗粒用 1 mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液处理, 在此条件下将电子从水传递到 DCIP 能力减弱的程度与对应 $O_2^{\cdot -}$ 的生成浓度的降低百分率几乎完全一致 (表 1).

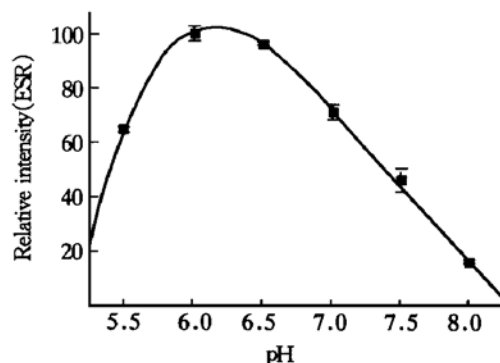


Fig. 3 Effects of different pH value on the generation of superoxide in PS II partials

The PS II particles were suspended in either Mes-NaOH (pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5) or Hepes-NaOH (pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0) during the measurement.

Table 1 Comparison between the decrease of electron transport activity of $H_2O \rightarrow DCIP$ and the reduce of superoxide generation in Tris washed PS II particles

Significance	Measurements	Signal intensities	
		Control	Tris washed
Electron transport activity	DCIP reduction	100% $\pm$ 1.5%	25.4% $\pm$ 0.3%
Superoxide generation	Spin trapping ESR	100% $\pm$ 0.1%	24.7% $\pm$ 0.1%

3 讨 论

长期以来, 人们对高等植物叶绿体通过 PS I 一价还原氧分子产生 $O_2^{\cdot -}$ 的机制和生理意义进行了大量细致的工作. 以顺磁共振法和 Cyt c 还原法为较常用的实验方法. Cyt c 还原法虽还原产物比较稳定, 相对简便易行, 但其结构特征性却远不如自旋捕捉顺磁共振方法^[1]. $O_2^{\cdot -}$ 与自旋捕捉剂的加成反应产物具有显著的特征性, 但该加合物不很稳定, 给在光系统 II 中捕捉 $O_2^{\cdot -}$ 带来了一定困难. 因此, 近年来针对 PS II 中产生的 $O_2^{\cdot -}$, 主要研究手段是 Cyt c 还原法以及最近由 Cleland 和 Grace^[6] 采用的 Q 伏安电极法. 而本文的工作特点在于采用原位 (*in situ*) 自旋捕捉 ESR 技术, 克服了加合物

[DMPO- O_2H] $^{\cdot -}$ 稳定性差的局限性, 首次在 PS II 颗粒中检测到了光诱导下产生的 $O_2^{\cdot -}$, 从而为 PS II 颗粒产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力和机理的研究提供了确凿的实验证据.

由于具有较好脂溶性的 SOD 抑制剂 TCNE 能有效增强 $O_2^{\cdot -}$ 生成浓度, 证实了 PS II 颗粒内结合有一定量的内源性 SOD, 也暗示着 PS II 在某些生理条件下也能产生 $O_2^{\cdot -}$, 而植物体则通过 PS II 内部的 SOD 来清除它, 以避免或减轻 $O_2^{\cdot -}$ 对机体的损伤. ESR 实验中另一点值得注意的是, 实测 $O_2^{\cdot -}$ 捕获信号强度近乎定量地对应着不同的氧分子浓度. 当扣除约 7% 的内源性光合放氧效应后, 空气条件下所捕获 $O_2^{\cdot -}$ 信号与氧饱和条件下所得信号的比值 γ 可用下式表示:

$$\gamma = \frac{\text{空气饱和条件下信号强度} - \text{内源性光合放氧效应}}{\text{氧气饱和条件下信号强度} - \text{内源性光合放氧效应}} = \frac{0.27 - 0.07}{1.00 - 0.07} = 21.5\%$$

很显然, 此值与空气中氧分子所占的百分比 (20.9%) 极为接近.

在 PS I 中产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力与其电子传递的活性密切相关. 本文实验则表明在 PS II 颗粒中也存在类似现象. 具有放氧活性的 PS II 颗粒中, 电子传递活性与放氧活性直接相关, 而放氧活性在 pH 值约等于 6.8 时呈现最强, 且随着 pH 值升高放氧活性显著下降^[8], 本实验中 $O_2^{\cdot -}$ 的产生也显示出非常相似的趋势. 再者, 当 PS II 颗粒的电子传递活性受到严重阻碍时, 其产生 $O_2^{\cdot -}$ 的能力也相应明显降低.

总之, 本文运用原位自旋捕捉 ESR 方法更加确凿地证实了强光照射下 PS II 颗粒中产生 $O_2^{\cdot -}$ 的推论, 并初步探讨了影响 $O_2^{\cdot -}$ 生成的诸多因素, 如氧分子浓度、SOD 与 SOD 抑制剂等. 实验结果明确表明: $O_2^{\cdot -}$ 的生成与电子传递链的活性直接相关. 这些结论为今后进一步研究与阐明强光下活性自由基产生的分子机理作用与破坏、损伤的生理意义提供可靠的实验依据, 并有助于逐步探索单线态氧、羟基自由基以及烷氧自由基等活泼物种的生成^[7, 13] 以及它们与 $O_2^{\cdot -}$ 的协同破坏作用.

参 考 文 献

- 1 赵保路. 氧自由基与天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社, 1999. 7~ 11
Zhao B L. Oxygen Free Radicals and Natural Antioxidant. Beijing: Science Press, 1999. 7~ 11

- 2 Kozi A, Tsuyoshi E, Junichi M, *et al.* Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. In: Kimiyuki S and Norio M ed. Stress Response of Photosynthetic Organism. Amsterdam: Elsevier Science B V, 1998. 37~ 52
- 3 Mehler A H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Arch Biochem Biophys, 1951, **33** (1): 65~ 77
- 4 Chen G X, Kazimir J, Cheniae G M. Photoinhibition of hydroxylamine extracted photosystem II membranes: Studies of the mechanism. Biochemistry, 1992, **31** (45): 11072~ 11083
- 5 Ananyev G, Renger G, Wacker U, *et al.* The photoproduction of superoxide dismutase activity of Photosystem II. The possible involvement of cytochrome b559. Photosynthesis Research, 1994, **41** (2): 327~ 338
- 6 Cleland R E, Grace S C. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. FEBS Letters, 1999, **457** (3): 348~ 352
- 7 Hideg É, Spetea C, Vass I. Singlet oxygen and free radical production during acceptor and donor side induced photoinhibition. Studies with spin trapping EPR spectroscopy. Biochim Biophys Acta, 1994, **1186** (3): 143~ 152
- 8 Kuwabara T, Murata N. Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polynucleotides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1982, **23** (3): 533~ 539
- 9 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol, 1949, **24** (1): 1~ 15
- 10 Mizusawa N, Miyao M, Yamashita T. Restoration of the high-potential form of cytochrome b-559 by electron transport reaction through Photosystem II in Tris-treated Photosystem II membrane. Biochim Biophys Acta, 1997, **1318** (1~ 2): 145~ 158
- 11 Kuthan H, Ullrich V, Estabrook R W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. Biochem J,

- 1982, **203** (3): 551~ 558
- 12 Diner B A, Babcock G T. Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II. In: Donald R O eds. Oxygenic photosynthesis: The Light Reactions. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 213~ 247
- 13 Asada K. Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Neil R B ed. Photosynthesis and the Environment. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 123~ 150
- 14 Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J. Spin trapping kinetics the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. J Am Chem Soc, 1980, **102** (15): 4994~ 4999

ESR Studies on the Superoxide Radicals Generated in Photosystem II of Higher Plant^{*}

LIU Ke¹⁾, SUN Jian^{1,2)}, LIU Yang¹⁾^{**}, ZHANG QiYuan¹⁾, KUANG Ting-Yun²⁾

¹⁾Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²⁾Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) produced in PS II particles separated from spinach has been investigated by spin trapping-electron spin resonance (ESR) technique. After bubbling with oxygen and incubating with tetracyanoethylene (TCNE) that acts as an inhibitor of superoxide dismutase (SOD) the experimental evidence of spin adduct of [DMPO- O_2H] $^{\cdot}$ can be obtained by *in situ* ESR measurements in PS II particles. In contrast, adduct of $O_2^{\cdot-}$ and DMPO produced under illumination is obviously decreased when SOD that usually performs as a scavenger of $O_2^{\cdot-}$ is present. Furthermore, it is evident to find that the generation of $O_2^{\cdot-}$ is positively correlated with the concentration of oxygen. The production of $O_2^{\cdot-}$ is also pH dependent, and $O_2^{\cdot-}$ concentration reaches maximum when pH is in the range of 6.0~ 6.5. Either high, or low pH value will lead it to descend steeply. In Tris-HCl washed PS II particles donor-side ET inhibition can causes the production of $O_2^{\cdot-}$ decreasing obviously. It can be concluded that the PS II that is active in splitting water and oxygen generation is also a reactive site responsible for the photoinduced $O_2^{\cdot-}$ generation in thylakoid of higher plant. In another word, the formation of $O_2^{\cdot-}$ is relevantly correlated to the electron transport activity of PS II.

Key words superoxide, photosystem II, reactive oxygen species, spin trapping ESR

^{*} This work was supported by grants from the State Key Plan for National Natural Science (G1998010100) and the National Natural Science of China (39890390 and 39870208).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62571074, E-mail: yliu@xxl.icas.ac.cn

Received: June 15, 2000 Accepted: August 23, 2000