

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656192

研究課題名(和文) 大気圧放電プラズマによる植物成長促進法の開発

研究課題名(英文) Development of plant growth process by atmospheric pressure plasmas

研究代表者

金澤 誠司 (KANAZAWA, Seiji)

大分大学・工学部・教授

研究者番号：70224574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大気圧放電プラズマが植物の栽培過程に及ぼす影響を調査することを目的とする。研究では主にモデル植物とされるシロイヌナズナを用いた。シロイヌナズナの種子に春化处理を施した後にプラズマジェットを照射することで発芽後の生長促進が現れる。一方、発芽後の葉にプラズマ照射すると、照射された葉の部分だけが枯れた。葉のクロロフィル蛍光の測定より、プラズマ照射により光化学系 II の最大量子収率が減少していることが確認された。また、葉の表面の元素分析より、プラズマ処理された葉からは細胞中の無機塩類が検出されたことから、プラズマ照射により細胞壁が壊され、ネクロシスが起きていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the effect of plasma irradiation on the plant growth process. An Arabidopsis was selected as a target plant. The LF plasma jet was used as a plasma source. The growth enhancement of Arabidopsis was observed for the samples of plasma irradiation onto the seeds after vernalization treatment. On the other hand, after the germination the blast of the leaf was observed for the samples irradiated by the plasma onto the leaves. From the chlorophyll fluorescence diagnostic, the maximum photochemical quantum yield of photosystem II was decreased for the leaves treated by the plasma. Moreover, the elemental analyses of the leaves implied that inorganic salt was detected from the surface of the leaf treated by the plasma, resulting in the occurrence of necrosis.

研究分野：放電プラズマ工学

キーワード：大気圧放電プラズマ 活性酸素 プラズマジェット 植物 シロイヌナズナ カイワレ大根 グルコース クロロフィル蛍光

### 1. 研究開始当初の背景

活性酸素、特にヒドロキシラジカルは、動物や植物のDNA損傷を引き起こすことが知られている。最近、植物では、その際に異常なDNAを閉じ込め、細胞が肥大化する作用があることがわかってきた。大気圧放電プラズマを植物や生体に作用させる研究が注目をあつめ、プラズマによる電界、荷電粒子、ラジカル、光などの物理刺激が及ぼす作用についての解明が重要な課題となっている。特に、筆者は、ヒドロキシラジカルが遺伝情報を制御するDNAに作用することに着目し、放電プラズマを利用すれば比較的簡単にラジカル導入が行えるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、大気圧放電プラズマを用いて、そのプラズマ中の活性酸素や活性窒素を植物の栽培過程に導入するための新規な手法を開発して、その効果を明らかにすることを目的とする。特に、ヒドロキシラジカルが微生物の不活性化やDNA損傷に影響することを利用して、その特異的回復や突然変異を誘発し、植物の成長促進や増産あるいは成長抑制を人工的に行うことを試みる。さらにそれらの発現に関わる基礎現象の調査を行った。

### 3. 研究の方法

大気圧非平衡放電プラズマを植物の種子や発芽後の葉に照射してその後の生育状況の観測を行った。植物としては、全ゲノムが解析されているモデル植物であるシロイヌナズナと、種子が比較的大きくて短時間で生長するカイワレダイコンの2種類を用いた。プラズマ源としては大気圧LFプラズマジェットを使用した。図1にシロイヌナズナの種子への照射の様子を示す。プラズマジェットは、20kHzの交流電源によりHeガスをプラズマ化している。プラズマの温度は手でも触れられる程度の低温プラズマである。成長促進に関する実験では春化处理とプラズマ処理の組み合わせによる効果を統計処理して調べた。さらにカイワレダイコンの種子においては種子内部のグルコース濃度の測定を行った。発芽後の影響については、プラズマ処理によるクロロフィル蛍光を測定し、光合成器官への影響を調べた。

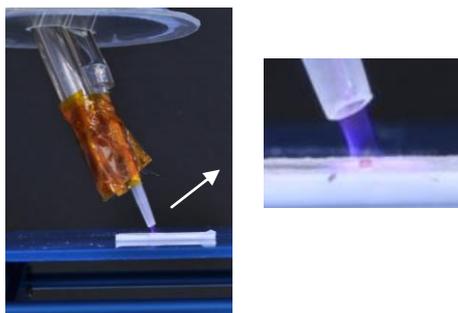


図1 プラズマジェットによる植物種子の処理

### 4. 研究成果

#### (1) プラズマの生長促進への影響

シロイヌナズナの種子にプラズマ照射したあと4週間後の葉面積の測定結果を図2に示す。この実験では、種子に春化处理を施した後にプラズマ照射することで発芽後の生長促進が現れることがわかった。カイワレダイコンの実験では、図3に示すように前処理に水浸漬を行い、休眠状態を解除してプラズマ照射することで生長(茎長の長さ)の促進が見られた。これらの効果は、コントロールの試料とのt検定による比較により、統計的な有意差があることが実証された。

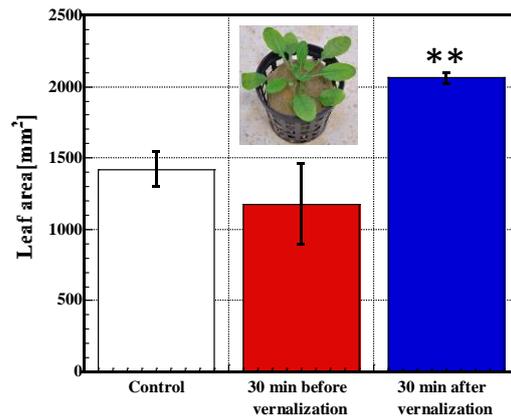


図2 シロイヌナズナの葉面積の比較 (発芽4週間後、\*\* :  $P < 0.01$  by P-test)

カイワレダイコンの種子では、デンプンの分解物であるグルコースの濃度の増加が見られた(表1)。これはプラズマが種子中のアミラーゼ等のデンプン分解酵素の活性化に寄与していることが考えられる。



(a) コントロール



(b) 水浸漬後プラズマ照射

図3 播種から7日後のカイワレダイコンの様子

表1 グルコースの濃度の測定結果

	グルコース濃度 [μM]
コントロール	156 ± 17
プラズマ照射のみ	166 ± 13
水浸漬後プラズマ照射	187 ± 5 **
水浸漬のみ	157 ± 12

## (2) プラズマの生長抑制への影響

発芽後のシロイヌナズナの葉にプラズマ照射すると、照射された葉の部分だけが枯れた。そこで植物の状態や光合成機能の状態を調査するのに有効なパラメータであるクロロフィル蛍光に着目した。図4に励起光として連続光を用いた場合の葉のクロロフィル蛍光の様子を示す。図5は生育3週間後の葉にプラズマジェットを照射したあとの蛍光強度の時間経過特性である。わずか10秒のプラズマ照射でも処理から1日経つと蛍光はほとんど発生しなくなり、プラズマが光合成器官や光化学系に作用していることが考えられる。

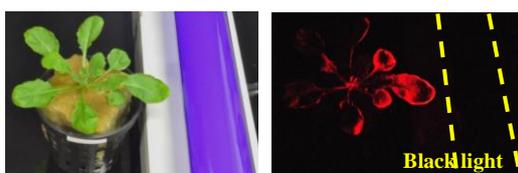


図4 シロイヌナズナの葉とクロロフィル蛍光（励起光：ブラックライト）

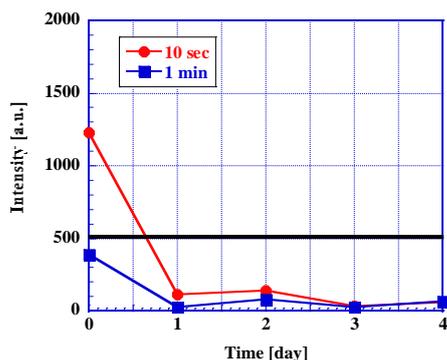


図5 プラズマ照射後のクロロフィル蛍光  
励起光：LED 455 nm, 蛍光：683 nm(中心波長)  
0 dayのプロットは照射直後を示す  
(黒実線：同一試料内の未照射部分の蛍光強度)

さらにクロロフィル蛍光の特性を調べるためにパルス変調光を用いた測定を行った。植物の健康状態と相関のある光合成の最大量子収率を示す  $F_v/F_m$  を測定した。ここで  $F_m$  は蛍光強度の最大値で、 $F_v$  は  $F_m$  から蛍光強度の最小値  $F_0$  を引いた値である。高等植物では一般的に  $F_v/F_m$  は  $0.8 \sim 0.83$  程度であり、健康状態が悪化すると  $0$  に収束することが知られている。生育したシロイヌナズナの  $F_v/F_m$  は  $0.76$  程度であった。図6は3週間後の葉にプラズマジェットの照射時間を変えて処理を行った場合の結果である。これよりプラズマ照射により光化学系IIの最大量子収率が減少していることが確認された。照射時間を長くすると  $F_v/F_m$  の減少は顕著になり、健康状態が阻害されて葉が枯れることになる。葉の表皮をSEMで観測した結果を

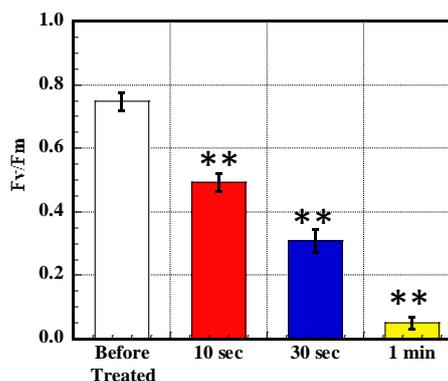
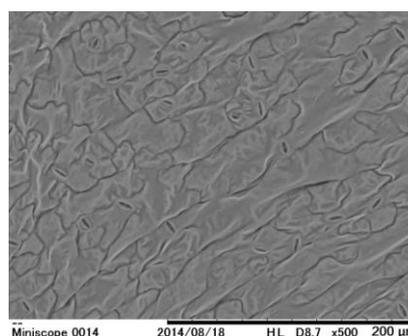
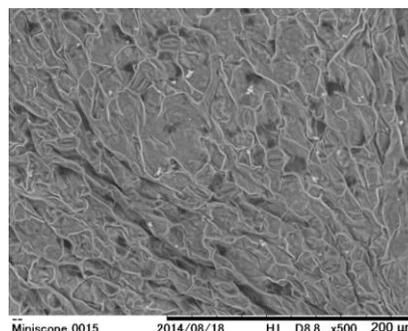


図6  $F_v/F_m$  のプラズマ照射時間特性



(a) 処理前



(b) 処理後

図7 プラズマによる処理前と処理後のシロイヌナズナの葉の表面SEM画像

図7に示す。EDXによる元素分析からは、プラズマジェットで処理された葉からは細胞内液に含まれる無機塩類が検出された。これはプラズマジェットによって葉の細胞壁や細胞膜が損傷したことを示唆するものである。プラズマ照射により細胞壁が壊され、アポトーシス、さらにはプラズマの照射時間が長くなるとネクローシスが起きていることが示唆される。

## (3) まとめ

本研究より、プラズマの植物への作用として、休眠を解除した種子にプラズマ照射すると生長の促進が見られ、発芽後ではプラズマ照射は葉が枯れるような健康状態の悪化になることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① S. Kanazawa, T. Furuki, T. Nakaji, S. Akamine, R. Ichiki, "Measurement of OH Radicals in Aqueous Solution Produced by Atmospheric-pressure LF Plasma Jet", International Journal of Plasma Environmental Science & Technology, 査読有, Vol.6, No.2, pp.166-171, 2012  
<http://www.iesj.org/html/service/ijpest.html>
- ② 金澤誠司、プラズマ生成法と放電過程および化学種計測、機械の研究、査読無、第 67 巻、第 8 号、pp.3-5, 2015  
[http://www.yokendo.com/julbook/kikai/k\\_67\\_8.htm](http://www.yokendo.com/julbook/kikai/k_67_8.htm)

[学会発表] (計 22 件)

- ① 衛藤啓、大気圧 LF プラズマジェットの植物への照射による影響、第 38 回静電気学会全国大会、2014 年 9 月 9 日、広島国際大学 (広島県東広島市)
- ② 蛭原健治、Sterilization Characteristics of Ozone-mist Spray for Chemical Free Agriculture, ISEHD 2014, 2014 年 6 月 24 日、ザ・ビーチタワー沖縄 (沖縄県中頭郡北谷町)
- ③ 金澤誠司、実用大気圧プラズマの生成法と特徴 (招待講演)、一般社団法人 プラズマ・核融合学会 第 26 回専門講習会「プラズマの農業応用の現状と将来」、2013 年 12 月 16 日、九州大学 (福岡県福岡市)
- ④ 衛藤 啓、大気圧プラズマジェットのカイワレ大根の種子への照射とその後の生長への影響、2013 年 (平成 25 年度) 応用物理学会九州支部学術講演会、2013 年 11 月 30 日、長崎大学 (長崎県長崎市)
- ⑤ 衛藤 啓、大気圧 LF プラズマジェットの植物種子への照射による生長への影響、第 37 回静電気学会全国大会、2013 年 9 月 11 日、千葉大学 (千葉県千葉市)
- ⑥ 金澤誠司、大気圧放電プラズマによるラジカル作用 - 水処理から殺菌まで -、平成 24 年度 大分大学異業種交流会 (第 4 回異業種交流会) 2013 年 3 月 26 日、レンブラントホテル大分 (大分県大分市)
- ⑦ 金澤誠司、Pulsed Electrical Discharges at Atmospheric Pressure - Fundamentals and Applications - (Plenary Presentation), The 15<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on the Applied Electromagnetics, 2013 年 2 月 1 日、Sungkyunkwan University, (ソウル特別市、韓国)
- ⑧ 金澤誠司、液体作用プラズマにおける放電のダイナミクスとラジカルの計測 (招待講演)、第 28 回九州・山口プラズマ研究会資料集、2012 年 11 月 10 日、由布院倶楽部 (大分県由布市)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: ヒドロキシラジカルの測定装置及び測定方法  
発明者: 金澤誠司、市來龍大  
権利者: 国立大学法人 大分大学  
種類: 通常  
番号: 特願 2010-245242  
特許第 5740138 号  
出願年月日: 平成 22 年 11 月 1 日  
取得年月日: 平成 27 年 5 月 1 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://elecls.cc.oita-u.ac.jp/plasma/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 誠司 (KANAZAWA, Seiji)

大分大学・工学部・教授

研究者番号: 70224574

(2) 研究分担者

市來 龍大 (ICHIKI, Ryuta)

大分大学・工学部・助教

研究者番号: 00454439