

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420259

研究課題名(和文) ナノ秒極性反転パルス放電による農作物種子の発芽抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanism of germination control for crop seed subjected to pulsed discharge produced by polarity reversed voltage pulses in ns range

研究代表者

門脇 一則 (kadowaki, kazunori)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60291506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：極性反転パルス電圧によるバリア放電処理を施した後の農作物種子の発芽数と発根数を測定し、種子表面へのプラズマ照射が、その後の発芽勢に及ぼす影響について調べた。

代表的な嫌光性種子であるトマト種子にバリア放電処理を施した後、光照射保存にて栽培したときの発芽数と発根数の経日変化を調べた。本来嫌光性であるトマト種子は光照射保存下では発芽が困難なのに、放電処理を施すことにより、光照射下でも発芽するという事実を得た。放電処理時間の上昇と共に発芽勢も上昇する傾向が認められた。これらの結果から、嫌光性を司る光受容体が放電により変質していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Experimental studies on photosensitivity of crop seeds subjected to non-equilibrium plasma produced by polarity reversed voltage pulses in ns range are carried out. Dielectric barrier discharge repeatedly propagates along the surface of the seeds on a glass barrier between plane-plane electrodes. Regardless of the discharge treatment time, most part of the seeds starts to root within 4 days and then germinate within 1 week in dark-room condition. On the other hand, the seeds without discharge treatment have a lower ability for germination in irradiating condition because tomato is a heliophilous plant. However, the germination ratio of the seeds in irradiating condition increases with increasing the discharge treatment time. This interesting phenomenon implies that loss of sciophilous characteristics due to molecular structure change of photoreceptor in the seed coat is caused by the repetitive barrier discharges.

研究分野：高電圧パルスパワー工学

キーワード：高電圧パルスパワー プラズマ 農業応用 発芽促進 農作物種子 光形態形成

1. 研究開始当初の背景

植物や生体への高電圧応用研究は、農作物や加工食品の生産性向上につながる重要な研究である。これまでに本申請者は、電圧の極性が瞬時に反転する高電圧パルス繰り返し発生装置を用いた応用研究を進めてきた。これらの研究で培われたパルスパワー技術を他の分野にも応用できないかと考え、プラズマで発芽の勢いを制御する研究に着手した。ガラス板の隙間に *Arabidopsis* (シロイヌナズナ) 種子を並べた状態で、極性反転パルス電圧を繰り返し印加することにより種子表面をプラズマに曝露してから、インキュベータ内で栽培したときの種子の発芽率を測定した。その結果、極性反転パルスによるバリア放電処理は、発芽に対する促進作用と抑制作用の二面性を併せ持っていることを明らかにした。極性反転パルス電圧の特徴は、出力電圧の極性が 10ns 秒程度で反転するという点である。実用化研究を推進する前に、極性反転パルスにより引き起こされるバリア放電による発芽勢の制御機構を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬品や放射線を用いることなく、安心安全な、発芽制御技術の実用化に向けて、発芽促進効果あるいは抑制効果に対してパルスパワーが有効に作用する機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) はだか麦への局所高電界処理

種子の局所領域に高電界パルスを加えた場合の発芽勢を実験的に調べる。図1に、針対平板電極構成下での局所処理実験とその後の栽培手順を示す。処理後の発芽率測定結果と細胞死判別の結果から、種皮のどの領域の細胞をプラズマにより壊死させれば発芽抑制効果が出るのかについて実験的調査を進める。具体的には、胚近傍の種皮への電界処理と、それ以外の領域の種皮への電界処理との間で、処理後の発芽率を比較する。はだか麦の種子を実験試料として用いる。

(2) トマト種子へのバリア放電処理

図2のような反応器内に種子を敷き詰め、電極間に極性反転パルス電圧を繰り返し印加して種子表面を非平衡プラズマに所定時間曝すことを前処理とし、その後の発芽勢を測定する。パルスパワーを用いて大気圧プラズマを形成する場合、矩形波状の単一極性パルスを突起状の金属電極に印加することによりパルスストリーマ放電を進展させるのが一般的な方法である。これに対して、ガラスバリア間での放電を、急激な極性反転により種皮近傍で引き起こすという方法は他に例を見ない。処理容器を真横から撮影した写真と同じ位置から撮影した放電光の静止写真を図3(a)(b)に示す。このような放電処理を前段階で施した後にインキュベータ内で

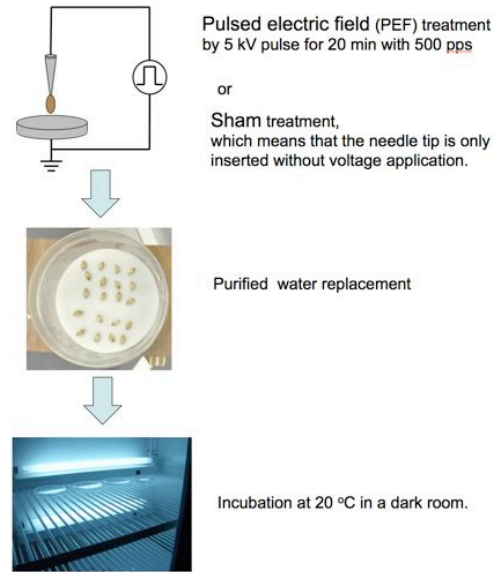


図1 局所処理実験の手順図

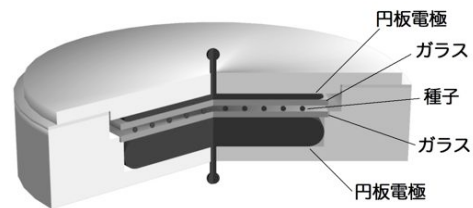


図2 バリア放電処理容器の内部構造

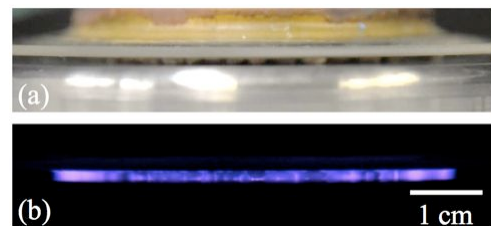


図3 処理容器と放電光の写真

栽培する。栽培時の光照射条件は、2種類(初期暗室保存もしくは光照射保存)のどちらかとした。初期暗室保存では、最初の3日間は暗室下で栽培した。光照射保存では、初日から16h/dayの比率で照明下においた。両栽培条件での発芽率を比較することにより、前処理が種子の光感受性に及ぼす影響を調べ、その結果をもとに光形態形成機構が放電処理によってどのように変化しているのかを明らかにする。本実験では、代表的な嫌光性種子のひとつであるトマト種子を実験試料として用いる。

4. 研究成果

(1) はだか麦への局所高電界処理

針電極先端部をはだか麦種子の胚の位置、または胚乳の位置に注意深く刺した状態で電界処理をした。電界処理された種子、針をさしただけで電界無印加の種子、および control の種子それぞれにおける栽培日数と発芽率との関係を図 4 (a) (b) に示す。図 4 (b) より電極位置胚乳側の発芽率は、針を刺しただけで電圧無印加の種子 (sham) も、針を刺してさらに電界を印加した場合 (pulse) のどちらも、control の発芽特性とほぼ変わらないことがわかる。それに対して胚側に針を

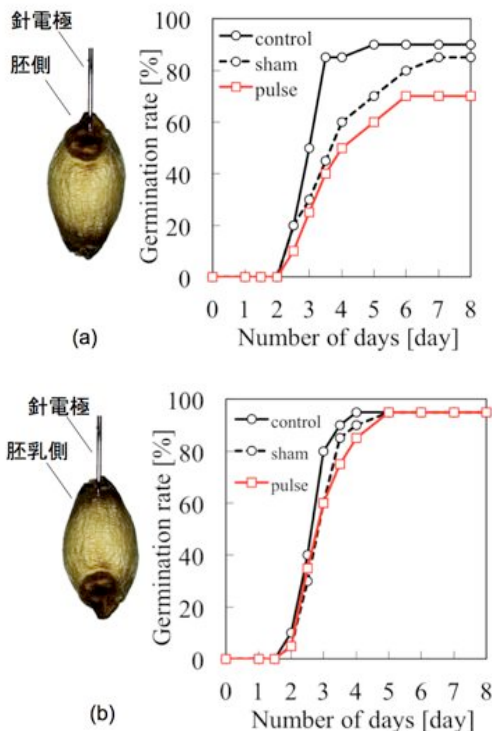


図 4 局所電界処理 (正パルス) されたはだか麦種子の栽培日数と発芽率との関係

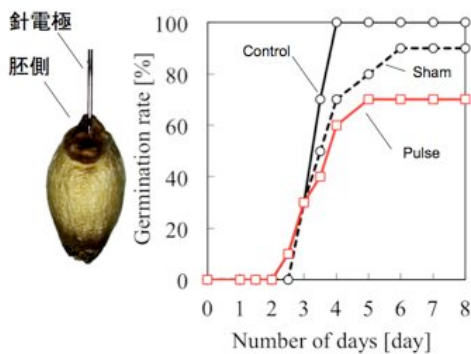


図 5 局所電界処理 (負パルス) されたはだか麦種子の栽培日数と発芽率との関係

刺した場合 (図 4 (a)), 8 日目の sham の発芽率は control よりも 10% 近く低い。さらに pulse の発芽率は, control のそれよりも 20% 近く低いことがわかる。胚には幼芽と幼根があり, 機械的ストレスはもちろんのこと, 電気的ストレスも発芽勢に影響を及ぼしていることがわかる。図 4 の実験で用いたパルス電圧は正極性である。パルス電圧の極性が負の場合での発芽率の経時変化を図 5 に示す。針先端は胚部に挿入されている。結果より, 局所高電界処理における極性効果は認められないことがわかる。

(2) トマト種子へのバリア放電処理

代表的な嫌光性種子であるトマト種子を試料とした。トマト種子の写真を図 6 に示す。この種子に, 極性反転パルス電圧によるバリア放電処理をしてから, 直ちに初期暗室保存にて栽培した場合における, 発根数および発芽数の経日変化を図 7 (a) (b) にそれぞれ示す。処理時間が 0 分のプロットは放電処理なし (control) の場合である。これを基準として, 放電処理時間が 5 分, 10 分, 20 分および 30 分間での測定結果を図中に示している。いずれの場合も, 栽培開始から 3 日目に根が出て, 遅れて 6 日目以降に芽が出ている。これらの結果からわかるように, 放電処理の発芽勢に対する影響は小さい。しかし, 発芽後の幼葉や幼根を観察したところ, 以下に示すような放電処理の影響が認められた。初期暗室保存条件下で二週間が経過した時点でのシャーレ内の種子の写真の一例を図 8 (a) (0 分), 6 (b) (10 分) および 6 (c) (20 分) にそれぞれ示す。目視にて芽と根の形状や色を観察したところ, 放電に曝されていない種子から出た幼葉は鮮やかな緑色であるのに対して, 放電処理された種子から出た幼葉は少し茶色がかっていることがわかった。また, 2 週間の栽培において, 放電処理した種子の入ったシャーレの中では黒カビが繁殖し易く, ろ紙を頻繁に交換する必要があった。図 8 (c) の写真中, 種子の殻の数が少ないのは, 日々の観察の過程において黒カビに侵蝕されて変色した種皮をこまめに取り除いたためである。種子に付着した菌が放電プラズマで死滅することはあり得るが, 放電により菌



図 6 トマト種子の顕微鏡写真

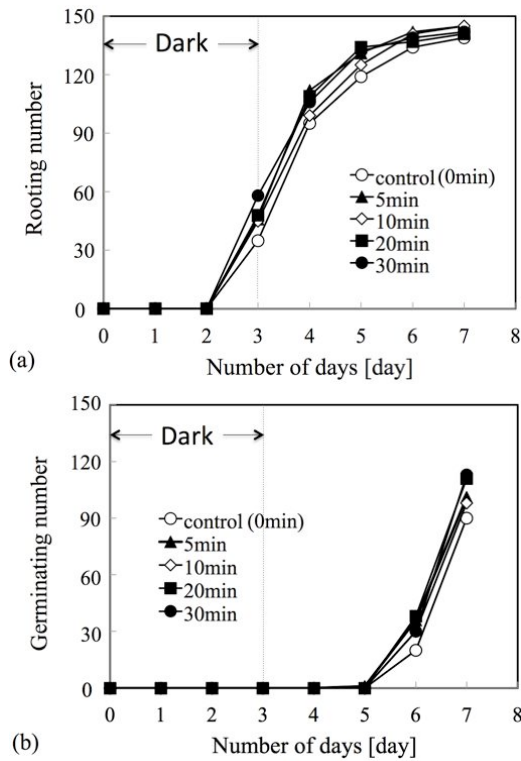


図7 様々な処理時間に対する(a)発根数, (b)発芽数の経日変化 (初期暗室保存, n=150)

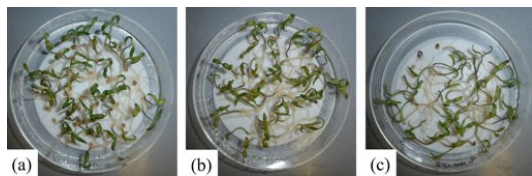


図8 初期暗室保存14日後の写真:
放電処理時間(a)0分,(b)10分,(c)20分

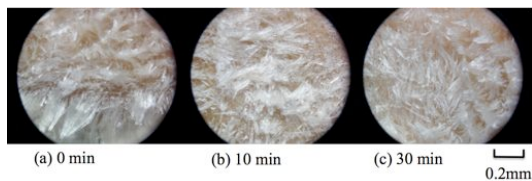


図9 放電処理後の種皮の顕微鏡写真:
処理時間(a)0分,(b)10分,(c)30分

が増殖することは考えにくい。おそらく放電処理により種子内部の養分が外部に漏れやすくなり、その結果、もともとシャーレ内の水に含まれていた菌が繁殖したために、幼葉や根の色が黒ずんだのではないかと考えている。

放電処理の前と後で、毛茸の形状を顕微鏡で観察した。放電処理されていない種子表面

の顕微鏡写真を図9(a)に示し、放電処理時間10分および30分の種子表面の顕微鏡写真を図9(b)および図9(c)にそれぞれ示す。一箇所だけでなく、多数の地点を観察したが、放電処理により毛茸が損傷したり変形したりする傾向は認められず、変色もしていなかった。一般に、種子の表皮は角皮(クチクラ)と呼ばれる堅い非細胞性の構造を有する組織で覆われている。毛茸細胞の構造についてその詳細はわからないが、表皮細胞に起源をもつ突起物である毛茸の細胞膜は非常に厚いので、放電処理によりそれが容易に損傷するようなことはないと考えられる。以上のように、初期暗室保存の栽培条件下では、放電処理の発芽勢に及ぼす影響は非常に小さい。しかし以下で説明するように、栽培条件を光照射保存に変えると、放電処理の影響が明瞭に現れる。

バリア放電処理を施した後、直ちに光照射保存(栽培初期から16h/dayの比率で照明下で栽培する条件のこと)にて栽培した場合の、発根数および発芽数のそれぞれの経日変化を図10(a)(b)にそれぞれ示す。本来、嫌光性種子であるトマトを光照射保存で栽培しても、なかなか芽や根は出ない。すなわちこの図が示すように、放電処理なしの種子が発芽しづらいのは、トマト種子が本来具備している嫌光性に起因しているためであり、種子自身が生命力を失っているわけではない点に注意を要する。ここで注目すべきは、放電処理時間の増加と共に、発芽勢が上昇しているという事実である。光照射保存にて二週間の栽培を終えた時点でのシャーレ内の種子の写真の一例を図11(a)0分, 11(b)10分, および11(c)20分, にそれぞれ示す。各シャーレ内の種子は、全て同一ロットで、同一日に放電処理をして、同じ日に栽培を開始している。これらの写真から、放電処理により嫌光性が失われ、その結果、光照射保存下でも発芽していることがわかる。

今回の実験で我々は、放電処理がトマト種子の光感受性に大きな影響を及ぼすことを発見した。嫌光性種子であるトマト種子を、あえて光照射下で栽培することにより、種子細胞の光受容体が放電プラズマにより変質していることを示唆する重要な結果を得ることができた。光照射が嫌光性種子の発芽促進もしくは抑制に及ぼす影響と、そのときの光受容体の働きについては未だ不明な点が多い。ましてや嫌光性種子の光受容体の構造変化に対する放電プラズマの影響に関する知見はほとんど無いのが現状である。放電処理による嫌光性喪失機構において、放電光、パルス電界、電子衝突、さらにはラジカルなどの影響を個別に検討することは機構解明のために重要である。光受容体の構造変化に対し、放電光が影響を及ぼしているのはおそらく間違いないと思われる。注目すべきは、それ以外の要因がどのような影響を及ぼしているのかである。一般的に、光照射による

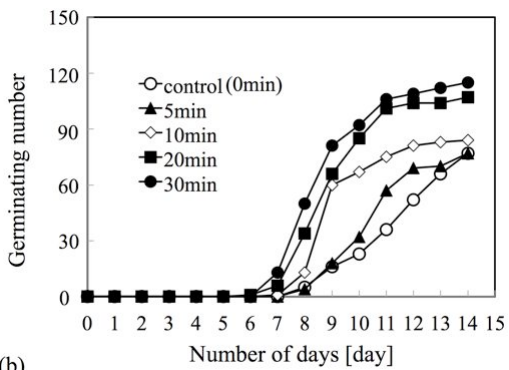
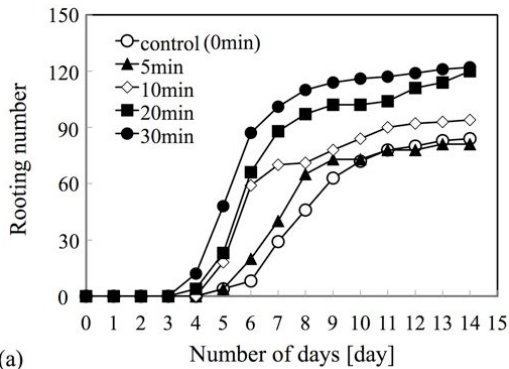


図10 様々な処理時間に対する(a)発根数, (b)発芽数の経日変化 (光照射保存, n=150)

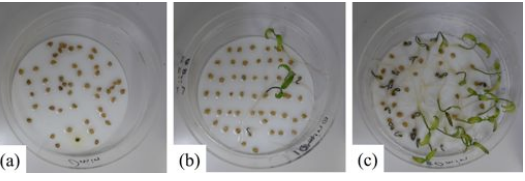


図11 光照射保存14日後の写真: 放電処理時間(a)0分,(b)10分,(c)20分

光受容体の構造変化は可逆性を有する。すなわち照射後の養生時間 (保存期間) を長くすると、その分子構造は元に戻る。これに対して、今回のような放電処理された種子の嫌光性喪失現象が可逆性を有しているのかどうかは、興味深い点である。仮に非可逆性であるとすれば、その原因のひとつとして、ラジカルや電子衝突による表皮細胞のエッチング作用が挙げられる。例えば葛谷は、プラズマに暴露されたアサガオ種子の種皮を電子顕微鏡観察し、種皮表面に多数の細孔が形成されていることを確認している。今回のトマト種子の場合、図9の顕微鏡写真で示したように、表面の毛茸に傷跡や細孔の存在を確認することはできなかった。しかし、放電処理特有の作用が表面組織を非可逆的に劣化させていることは明らかである。一方、プラズマ化学反応により、雰囲気中や種皮表面に付着した水分から生成された OH ラジカル

が、種子表面に付着した菌類を死滅させるために、種子の発芽率が向上するという報告例もある。本実験でも大気圧空気中の雰囲気中でプラズマを形成しているため、活性種の滅菌作用による発芽促進効果も期待できる。もしも今回の実験でも、滅菌作用による発芽促進効果が支配的であるならば、初期暗室保存、光照射保存の如何に関わらず、その効果が認められるはずである。しかし、少なくとも今回の結果においては、図7の発芽特性から明らかのように、滅菌による発芽促進の効果は認められない。以上より、図10での放電処理による発芽促進効果の要因は、滅菌作用ではなく、光受容体の構造変化に起因していると結論づける。

最後にパルス電界が嫌光性喪失に及ぼす影響について考察する。先にも述べたように、パルス電界下における種子は楕円状の誘電体とみなせるので、ガラスと種子との接点近傍の電界強度は、平均電界 (数十 kV/cm) よりも桁違いに高まると思われる。従って、その領域においてのみエレクトロポレーションによる効果が期待できる。ただし、この効果はあくまでも局所的であり、大部分の領域において電界の影響は小さいと思われる。

今後は、トマト種子に対して、電圧波形や雰囲気などをパラメータとして実験データを蓄積していく。さらに、代表的な嫌光性種子と好光性種子のそれぞれに対して、今回と同様な実験的研究を体系的に進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計3件)

(1) 門脇 一則, 野中 将輝, 中田 晃弘, 尾崎 良太郎, 辻田 泉, 栗坂 信之: 「ナノ秒極性反転パルス電圧によりバリア放電処理されたトマト種子の嫌光性喪失」, 電気学会論文誌 A, Vol. 136, No. 7 (2016) (採択済) (査読有)

(2) Kazunori Kadowaki, Teruki Abe, Ryotaro Ozaki, Izumi Tsujita, and Nobuyuki Kurisaka, "Effect of Electrical Stress Produced by Repetitive Pulsed Power on Germination of Naked Barley Seed between Point-Plane Electrodes", Proc. of 7th International Symposium on Electrical Insulating Materials [PA6] (June 3, 2014), Toki messe, Niigata, Japan, June 1-5, 2014 (査読有)

(3) 林 信哉, 猪原 哲, 門脇 一則, 高木浩一, 王 斗艶, 西村 亮: 「パルスパワー・プラズマによる農作物の収率改善」, プラズマ・核融合学会誌, Vol. 90, No. 9,

pp. 541-547(2014) (査読有)

[学会発表] (計5件)

(1) 中田 晃弘, 丸山 和行, 辻田 泉, 栗坂 信之, 尾崎 良太郎, 門脇 一則: 「極性反転パルス電圧を用いた DBD 処理による嫌光性種子の光感受性変化」 (A202-A2), 平成 28 年電気学会全国大会, 東北大学 川内北キャンパス (宮城県仙台市), 2016 年 3 月 16 日

(2) 中田 晃弘, 丸山 和行, 辻田 泉, 栗坂 信之, 尾崎 良太郎, 門脇 一則: 「嫌光性種子の光感受性に対するナノ秒極性反転パルス電圧による DBD 処理の影響」 (ED-15-151), 電気学会放電研究会「放電一般, バイオ応用」, 愛媛大学 城北キャンパス (愛媛県松山市), 2015 年 12 月 4 日

(3) 佐伯 侑磨, 尾崎 良太郎, 門脇 一則: 「周波数依存性のある伝送線路のパルス伝搬シミュレーション」(1-9), 平成 26 年度 電気関係学会四国支部連合大会, 徳島大学 常三島キャンパス (徳島県徳島市), 2014 年 9 月 13 日

(4) 安部 輝紀, 松田 晃賢, 辻田 泉, 栗坂 信之, 尾崎 良太郎, 門脇 一則: 「ハダカムギの局所電界処理による発芽影響」(2-16), 平成 25 年度電気関係学会四国支部連合大会, 徳島大学 常三島キャンパス (徳島県徳島市), 2013 年 9 月 21 日

(5) 佐伯 侑磨, 尾崎 良太郎, 門脇 一則: 「CIP 法による極性反転パルスの数値シミュレーション」(2-15), 平成 25 年度電気関係学会四国支部連合大会, 徳島大学 常三島キャンパス (徳島県徳島市), 2013 年 9 月 21 日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://hv.ee.ehime-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 一則 (KADOWAKI, Kazunori)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 60291506

(2) 研究分担者

尾崎 良太郎 (OZAKI Ryotaro)
愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 90535361

(3) 連携研究者

辻田 泉 (TSUJITA Izumi)
愛媛県農林水産研究所・農業研究部・研究員
研究者番号: 50558202