

学 位 論 文 要 旨

氏 名 三浦 伸之

題 目 茶園土壌における有機態窒素の動態および茶樹への吸収
(Dynamics of Soil Organic Nitrogen in Tea Field and its Uptake by
Tea Plants (*Camellia sinensis* L.))

茶の収量・品質を損なわない窒素負荷低減施肥技術の確立を目的として、茶園における肥料や有機物の施用が、チャの収量・品質、地下水への窒素溶脱、土壌の窒素肥沃度へ及ぼす影響について検討した。

硝化抑制剤 Dd (ジシアンジアミド) 入り被覆尿素を茶園に年間通じて施用すると、アンモニア態窒素吸収量が増加し、二、三番茶の水色や滋味等の品質が向上した。さらに、処理 1, 2 年目は硝酸態窒素の溶脱が低減した。しかし、3, 4 年目は可給態窒素の増加等で硝酸態窒素の溶脱が増加した。また、有機物や有機質肥料を茶園に多量に施用すると、土壌中の無機態窒素は少ないが、茶の収量は多くなり、硝酸態窒素の溶脱も短期間で増加した。このことは、土壌中の無機態窒素の推移だけでは、茶の収量や窒素溶脱について説明できないことを示している。

そこで、茶園土壌中の可給態窒素の動態とチャ(茶樹)への吸収について検討した。有機物の施用来歴を異にする 3 種類の土壌を充填した深さ 20 および 60 cm カラムの表層に、発酵鶏ふんと菜種油粕を添加し、5 日毎に散水し、浸透水を採取した。その結果、多施用茶園土壌の 20 および 60cm カラムだけでなく、堆肥を 2 年連用した土壌や有機物施用来歴のない土壌の 20cm カラムの浸透水中でも、可給態窒素の本体である PEON (中性リン酸緩衝液で抽出される有機態窒素) が認められた。また、茶園うね間の地下 1m の土壌溶液やライシメーターの浸透水にも PEON が確認できた。このことから、肥料や有機物を多量に施用すると、PEON が生成して土壌に吸着されるが、その吸着容量を超えると、水溶性となり溶脱することが明らかになった。一方、有機物施用土壌あるいは無機栄養培地における導管液のサイズ排除高速液体クロマトグラフィー (HPSEC) 分析により、チャおよび 6 種の野菜類 (キュウリ, チンゲンサイ, リーフレタス, ブロッコリー, ホウレンソウ, トウモロコシ) が土壌 PEON を直接吸収する可能性が示された。以上のことから、土壌 PEON は、無機態窒素と同様に、茶の収量や窒素溶脱増加の直接的な要因であることが明らかになった。

さらに、土壌 PEON の溶脱を考慮しつつ、PEON 吸収を生かした有機物および有機質肥料の施用法ならびに施肥法を検討した。その結果、牛ふんペレット堆肥の硫酸に対する窒素肥効率を 100% と仮定して秋肥窒素を代替すると、土壌 PEON の増加により、収量・品質を低下させることなく、窒素溶脱を低減させることができた。また、寒肥を含めた春肥重点型の有機質肥料のみによる施肥を行うと、1, 2 年目は窒素供給不足により品質が低下したが、3, 4 年目は、土壌 PEON の増加により、窒素施肥量が同じ慣行栽培並の収量・品質にすることができた。これらの結果から、無機態窒素と同様に、PEON という地力窒素をコントロールすることは、茶の生産性や環境保全に大きく貢献していることが明らかになった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	NOBUYUKI MIURA
題 目	Dynamics of Soil Organic Nitrogen in Tea Field and its Uptake by Tea Plants (<i>Camellia sinensis</i> L.) (茶園土壌における有機態窒素の動態および茶樹への吸収)

The effect of the organic matter and fertilizer applications in the tea field on yield, quality of the tea, a nitrogen leaching and nitrogen of soil fertility was examined.

The application of coated urea and Dd(dicyandiamide, nitrification inhibitor) led to a rise in the recovery rate of fertilization nitrogen by the tea plants (*Camellia sinensis* L.), while the quality of the 2nd and 3rd tea crops improved and the concentration of nitrogen leaching was reduced. However, 3-4 years later, the concentration of nitrogen leaching was not reduced. Analysis of the tea field soils showed more PEON (Phosphate-buffer Extractable Organic Nitrogen; available nitrogen) following the application of the coated urea and Dd etc.

Much more mineral nitrogen was found in the surface soil of the standard fertilized tea field than in that of the heavy application organically fertilized tea field. On the other hand, the amount of nitrate leaching and yields of tea in the heavy application organically fertilized tea field was more than those of the standard fertilized tea field. These results appeared to be contradictory.

Leaching of PEON by heavy application of organic matter and fertilizer was examined using 20 cm and 60 cm long of columns which were filled with three different Andosols. These soil columns by heavy application were watered for every 5 days. In the percolating water from the 20 and 60cm columns filled with soil from a tea plantation field of heavy application, the 20cm column filled with soil from a field receiving organic matter for two years and 20cm column filled with soil from a field receiving no organic matter before, PEON was found. It was thought that detection of water-soluble PEON becomes an index which shows the limit quantity for application of organic matter.

HPSEC analysis of the xylem saps indicated that there was a possibility of a direct uptake of PEON in a soil by six vegetables (Cucumber (*Cucumis sativus* L.), Chingensai (*Brassica campestris* L.), Leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.), Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), Spinach (*Spinacia oleracea* L.) and Maize (*Zea mays* L.)).

When substituting the autumn application nitrogen with total nitrogen of the cow waste compost pellet without considering the recovery rate of nitrogen, equal yield and quality, and less leaching rate of nitrogen was found than in the prefecture standard fertilizer application. Moreover, The organic fertilizer method had almost no influence on yield, but the quality of the 1st, 2nd, and 3rd crops of green tea deteriorated during the 1st and 2nd years. However, in the 3rd and 4th years, the crop yield and quality was the same as that with the combined fertilizer method by the increase of PEON concentration in the soil.

Therefore, it developed that PEON became a direct factor in the yield of tea and leaching of nitrogen.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	三浦 伸之
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 境 雅夫
	副査 佐賀大学 教授 井上 興一
	副査 琉球大学 教授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 純夫
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
題目	茶園土壌における有機態窒素の動態および茶樹への吸収 (Dynamics of Soil Organic Nitrogen in Tea Field and its Uptake by Tea Plants (<i>Camellia sinensis</i> L.))
<p>緑茶はアミノ酸等の窒素含量が高いほど高品質とされるため、多くの茶園では、年間窒素施肥量が1000kg-N ha^{-1}を超えるような多量の施肥が行われてきた。しかし、1999年2月に硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の水質環境基準が10mg-N L^{-1}以下に設定されたことから、茶園においても窒素肥料低減対策が重要な課題となった。そこで、硝化抑制剤や有機質肥料の効果を明らかにするため、無機態窒素の動態を調査したが、茶園土壌中の無機態窒素の推移だけでは、茶の収量や窒素溶脱について説明することができなかった。本研究は、土壌の易分解性有機態窒素の本体であるPEON（中性リン酸緩衝液抽出有機態窒素）に着目し、その溶脱の仕組みと茶樹（<i>Camellia sinensis</i> L.）による直接的な吸収を利用して、持続可能な肥料および有機物の効率的施用法の確立を行った。</p> <p>まず、土壌中におけるPEONの動態（生成および溶脱）について検討した。有機物の施用来歴を異にする土壌充填カラムを用い、その表層に発酵鶏ふんと菜種油粕を多量に施用し、散水後の浸透水を経時的に採取・分析した。その結果、有機物を多量に施</p>	

用した来歴をもつ土壤ほど PEON の生成量が多く、また短期間で PEON が溶脱して行くことを明らかにした。さらに、実際の茶園土壤においても、土壤溶液やライシメーター浸透水の分析結果から、PEON が地下浸透水に溶脱していることを明らかにした。これらのことから、有機物や有機質肥料を多量に施用すると、PEON が生成して土壤に吸着されるが、その吸着容量を超えると、溶脱することを明らかにした。

次に、土壤中の PEON が茶樹に直接吸収される可能性について検討した。有機物施用土壤あるいは無機培養液で栽培した茶樹の導管液を採取し、高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) 分析により PEON の検出を行った。その結果、いくつかの野菜類で示されていた土壤 PEON の直接吸収が、茶樹においても生じている可能性をはじめて明らかにした。このことから、土壤 PEON は、無機態窒素と同様に、茶の収量および品質の直接的な要因になりうるものが推察された。

以上の結果は、茶園において土壤窒素の動態を考える場合、無機態窒素ばかりではなく、PEON の動態も合わせて考える必要性を示している。そこで、土壤 PEON の溶脱と茶樹による PEON 吸収を考慮した有機物および有機質肥料の施用法を検討した。その結果、牛ふんペレット堆肥の硫酸に対する窒素肥効率を 100% と仮定して秋肥窒素を代替すると、茶の収量・品質を低下させることなく、窒素溶脱を低減させることができた。また、寒肥を含めた春肥重点型の有機質肥料のみによる施肥を行うと、1, 2 年目は窒素供給不足により品質が低下したが、3 年目以降は窒素施肥量が同じ慣行栽培並の収量・品質にすることができた。

以上のように、本論文でまとめた茶園土壤における有機態窒素の動態および茶樹吸収に関する研究は、茶園土壤における窒素動態の特異性を有機態窒素で説明しただけでなく、茶園における有機物過剰投入の危険性や土壤地力窒素の有効性を明らかにしたことで、茶園における環境保全型施肥技術の新たな展開に貢献できるものと高く評価される。

したがって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	三浦 伸之
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 境 雅夫
	副査 佐賀大学 教授 井上 興一
	副査 琉球大学 教授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 純夫
	副査 鹿児島大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
実施年月日	平成 2 1 年 1 2 月 2 5 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答 	
<p>主査および副査は、平成 2 1 年 1 2 月 2 5 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者
氏名

三浦 伸之

[質問1] 土壌PEONのHPSEC分析では、どうして単一ピークしか検出できないのか。

[回答1] 確かに、分子量8000Daの単一ピークしか検出されないが、実はこのピークには幅があり、最近のWatanabeらの研究では4000~10000Daと様々な分子量の物質が含まれていることが証明されている。

[質問2] PEONはどのような物質で構成されているのか。

[回答2] 原田・丸本、樋口ら、松本らの研究で、PEONのアミノ酸組成から、PEONが細菌細胞壁に由来するペプチドグリカンであることが示された。つまり、PEONは細菌の遺体由来と考えられている。

[質問3] HPSECではなく、D体アミノ酸の存在を分析した方が、PEONがペプチドグリカン由来物質かどうかつきりするのではないか。また、山室らが行ったアイソトープ（同位体元素、 ^{15}N や ^{13}C ）の分析方法もあるができないのか。

[回答3] D体アミノ酸の分析は今後検討したい。また、山縣らが ^{15}N でイネが稲わら入り米ぬかの施用で無機態窒素が少ない条件下で窒素吸収量が多くなることを報告した。しかし、吸収した ^{15}N がPEONの分解産物である可能性を否定できなかった。ただし、吸収した ^{15}N と ^{13}C の比率からPEON吸収を証明する方法はある。

[質問4] 窒素溶脱の仕組みについて、カラム試験では茶園土壌の60cmカラムの浸透水の硝酸が3回目の散水でも減少しなかった。このことから、窒素施肥削減試験における現地茶園の暗きょ排水にPEONが検出されなかったのは、PEONが溶脱して、下層で吸着や硝化されて暗きょでは全て硝酸として排出されたと考えていいのか。

[回答4] 確かに暗きょ排水でPEONは検出されなかった。そのため、最初は下層に移動する過程で徐々に無機化していくと仮定した。しかし、その後ライシメーターやポラスカップの土壌溶液からPEONが検出されたことから、徐々に下層で無機化していくだけでなく、空気の出入りがある暗きょ付近の砂礫層でも無機化していた可能性が考えられた。結局、実際の地下水ではPEONは全て分解することになると思われる。

[質問5] PEONがリン酸で抽出できるのはなぜか説明してほしい。

[回答5] リン酸溶液中において、陰荷電のPEONは同じ陰荷電のリン酸にイオン交換され溶液中に溶出すると考えている。

[質問6] 土壌中においてPEONが増加する要因は何か。

[回答6] Hayashi and Haradaによれば、菌体由来のPEONは微生物の分解の影響を比較的受けにくい状態で土壌の有機無機コロイドに吸着されている。また、小田島らによれば、逐次抽出でPEONを抽出すると一緒に粘土鉱物のアルミニウムや鉄が抽出されることから、PEONは土壌コロイドの鉄やアルミニウムと結合して安定的に存在していると考えている。私の実験結果では、施肥削減試験の土壌PEONのグラフで示したように有機物や有機質肥料を投入することによりPEONが増加している。また、堆肥とアルミニウムの施用で、茶園土壌のPEONがさらに増加することも確かめている。

[質問7] 茶園土壌は酸性であるが、酸性条件ではアルミニウムと鉄はどうなるのか。

[回答7] 茶園の強酸性土壌では粘土鉱物が崩壊しており、アルミニウムが粘土鉱物の表面に露出して活性アルミニウムになっていることが伊藤らにより報告されている。アルミニウムや鉄は酸性条件ほど活性が高いと言われている。

[質問8] リン酸施用量と土壌PEONの動態に関係があるのではないかと。

[回答8] 先ほどのリン酸抽出法と同じ原理で、土壌中のリン酸が多いとPEONは土壌との結合が弱くなり、溶脱しやすくなると考えている。

[質問9] 茶園土壌でPEONが多いというのは定量されているのか。

[回答9] 茶園土壌でPEONが多いことは一般的に知られている。カラム試験の原土のグラフにおいても、堆肥連用土壌が化成肥料施用土壌よりPEONが多く、茶園土壌ではさらにPEONが多いことを示している。

[質問10] PEON吸収の証明はHPSEC分析におけるピークによる証明だけか。このピークが本当にPEONなのか証明できたと考えて良いのか。

[回答10] HPSEC分析によるPEON吸収の証明は、松本らがチンゲンサイやニンジンで行った方法であり、無機栄養栽培でピークが検出されないことで証明されている。また、松本らはさらなる裏付けとして、HPSECで画分した導管液のPEONピーク画分に窒素が多いこと、無菌条件下の培養実験で精製PEONを添加した作物の生育量が増加したこと等でもPEONの直接吸収を証明している。

[質問11] PEONのような高分子の植物による直接吸収は他でも証明されているのか。

[回答11] 西澤・森は、イネの根細胞がヘモグロビン（分子量64500Da）をエンドサイトシス（細胞膜の細胞内くびれ込みでとらえること）により、液胞内に取り込むことを報告している。PEONは8000Daとヘモグロビンより小さい物質なので、同様に吸収される可能性があると考えている。