

## 観察・実験の注意点やポイント、教材の工夫など

### 教材の工夫

効果的な観察を行うために、オオカナダモをできる限り各観察に適した状態で準備することが重要である。今回の授業プランでは、以下の3種類を準備する。詳細な栽培方法は別紙にて紹介する。

	特徴	栽培の主なポイント
A) 通常	葉緑体が散らばっている	直射日光や強い光があたらないようにする
B) 葉緑体凝集用	葉緑体が凝集している	強めの光を一定方向から照射する
C) ヨウ素デンプン反応用	葉緑体がデンプンを蓄えている ヨウ素デンプン反応が見られる	エアレーションをしながら、3日間蛍光灯照射を続ける

### 顕微鏡観察の注意点

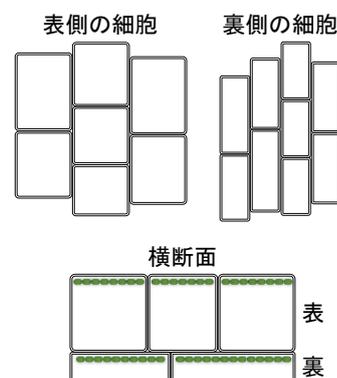
#### (1) プレパラートの作製

- できるだけ葉のたわみを小さくするため、カバーガラスをかけた後、ペンの頭などで葉の上から軽く押さえるとよい。その後に余分な水分だけをろ紙で吸い取る。最初からろ紙を重ねて指で押すと、必要以上の水分が吸い取られ、カバーガラス内に空気が入りやすい。
- AとBの2種類のオオカナダモを観察する時は、スライドガラスの左側にA、右側にB（それぞれにカバーガラスをかける）というように、1枚のスライドガラスで2種類の観察を行うとよい。
- 1枚のカバーガラス内に2~3枚の葉を入れて観察することも可能である。



#### (2) 倍率・ピント調整

- 400倍程度（対物レンズ40倍）での観察がのぞましいが、100倍程度（対物レンズ10倍）でも葉緑体の存在や凝集は十分に観察できる。原形質流動についても、ある程度は確認できる。
- オオカナダモの葉の細胞は、2層構造である。葉の表側の細胞は、横幅が大きく厚みもある。一方、裏側の細胞は、長細い形をしており薄い。どちらからでも葉緑体の観察はできるので、特に表裏の指定をする必要はないが、ピントを合わせる際には少し注意が必要である。特に、表側の細胞は厚みがあり、葉緑体の配置によってはピントが合わせづらい。通常は、葉緑体が表面上に散らばっていることが多いため、細胞の表面（上側）にピントを合わせると観察しやすい。また、どちら側から観察していても、下側の細胞にピントを合わせてしまうと観察しにくいので注意が必要である。なお、2層構造に気付くことは丁寧に顕微鏡観察をしている証であり、発展的な学習につなげられる余地もある。

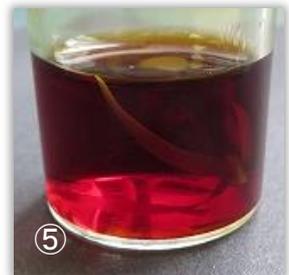


#### (3) しぼり調整

- 染色をしていない葉緑体の観察では、しぼりをおよそ半分しぼった方が、葉緑体の輪郭などがはっきり観察できる。一方、ヨウ素デンプン反応後の観察では、しぼりを開いて視野を明るくした方が、葉緑体の青紫色（赤紫色）がわかりやすい（ただし、少し輪郭がぼやけてしまう）。しぼりをしぼった状態では、色がわかりにくく染まっているように感じられないことがある。

## <オオカナダモを用いたヨウ素デンプン反応の観察方法>

1. 300ml 三角フラスコに水を 300ml 程度入れる（他の容器でも可）。
2. 5~10cm 程度に切り取ったオオカナダモを入れる。  
※ 茎頂部に近い方がよいが、真ん中付近でも構わない。
3. エアレーション（水中に空気を送り込むこと）をする。
4. 20W 前後の蛍光灯（顕微鏡照明装置）で、横側から 3 日間照射し続ける（写真①）。室温（10~25℃）で構わない。  
※ 距離は 10cm 程度とする。LED 電球ではあまり反応が見られないようである。  
※ 状態によっては、光照射後に葉緑体の凝集が起きている場合がある。熱湯処理・脱色処理によりある程度解消され、観察にはそれほど影響しない。気になる場合は、3 日間の光照射後に 1 日程度室内に放置しておく、凝集がある程度は解消される。光照射を終えて 2 日程度までは、ヨウ素デンプン反応が観察できる（徐々に反応はうすくなっていく）。
5. 必要に応じた長さにオオカナダモを切り取り、熱湯に 30 秒~1 分ほどつける（写真②）。
6. 水分を軽くふき取り、エタノール（原液）に入れ、湯せんしながら 5 分程度で脱色する（写真③、液の緑色は脱色された色素の色）。エタノールは再利用が可能である（脱色されなくなるまで）。  
※ 前の処理で用いた熱湯をそのまま湯せん用に使うと便利。  
※ 5 分で脱色が弱ければ時間を長くする（完全に脱色されなくても観察に支障はない）。
7. 葉を水洗いし（写真④）、水分を軽くふき取り、ヨウ素液につける（写真⑤、再利用が可能）。  
※ ヨウ素液は 0.05mol/L（原液）を 20 倍程度に希釈して用いる（ビールの色）。ヨウ素系のうがい薬を使う場合は、5 倍程度に希釈する（ヨウ素液の原液の色に近い）。ただし、溶液の状態によって適切な希釈の程度は異なる。特にヨウ素液は、必要以上に濃くすると、褐色が強く青紫色が確認できない。  
※ 上述の濃度では、ヨウ素液の方が素早く反応し、色も濃く染まる。  
※ すぐに染色をしない場合は、脱色の処理をした後、そのままエタノール中で冷蔵保存が可能（約 1 週間程度は反応が見られるが、徐々に組織が硬くなるので注意）。



8. 濃く染まっている葉を選び（写真⑥）、顕微鏡で観察する（写真⑦）。

※ 濃く染まっている葉でも、葉緑体におけるヨウ素デンプン反応が顕微鏡で観察しにくいこともある。そのため、葉を大きめに切り取って広範囲で観察するか、複数枚を観察するとよい。



※ しぼりを開いて視野を明るくした方が、葉緑体の青紫色（赤紫色）がわかりやすい。

### ～ヨウ素デンプン反応のばらつきについて～

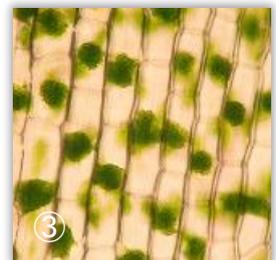
オオカナダモの葉のヨウ素デンプン反応は、光や温度条件を適切に管理してもうまく結果が現れないことが多い。実験に用いるまでにどのような環境で生育していたか（飼育履歴）が、影響しているようである。つまり、日頃から好条件で光合成をしているオオカナダモは、各細胞にデンプンが十分蓄えられており、ヨウ素デンプン反応が起こりやすい。一方、水槽内で飼育しているようなオオカナダモは、日常的にデンプンの蓄積が少なく、実験直前に数時間光照射をしたところで、反応が明確に確認できる程度にまでデンプンが合成されていないように感じる（光合成を始めてからデンプンが蓄積されるまでに、一定の時間がかかっていることも予想される）。

本方法は、その飼育履歴に関わらず一定以上の効果を期待できるが、それでもオオカナダモの状態によって結果は変動する。光照射が3日間も必要ない場合もあれば、時には3日間照射をしても適切な反応が見られる葉が少ないこともあるので、複数のサンプルを用意する方がよい。

対照実験として光をあてないオオカナダモを使用する場合も注意が必要である。通常であれば半日程度の暗処理により、全体的なヨウ素デンプン反応は見られなくなるが、中肋（葉脈）付近にだけ反応が見られることが少なくない（貯蔵デンプンと推測される）。生徒が観察した際に、混乱を招く可能性があることは把握しておくべきである。

### <葉緑体凝集用のオオカナダモの飼育方法>

1. シャーレに水を入れる（7～8割程度）。
2. 2～3節（約1cm）程度に切ったオオカナダモを、垂直に立つようにして水中に入れる（写真①）。光を一定方向から効率よく受けやすくなる。  
※ 葉が重なっている茎頂部の先端は避ける（光が当たりにくい）。
3. 葉の真上から光が当たるように、スタンド（蛍光灯 20W 前後）を設置し、2～3時間以上光を照射する（写真②）。室温（10～25℃）で構わない。  
※ 距離は10～15cm程度。  
※ 1時間程度で凝集が起きる場合もある。  
※ 強い光照射であれば葉緑体の凝集（写真③）は起きるため、直射日光でも可（青色光を多く含む光の方が、効果が高いようである）。また、シャーレではなくピーカー等でも可能だが、葉によって光の当たり方に差が出るため、条件が悪ければ凝集が起きていない可能性もある。



### 観察時の注意点

- できるかぎり授業の直前まで光を当てておく。光が弱まると徐々に凝集が解消される（半日～1日程度でおおよそ解消される場合もある）。
- 光照射の際、炭酸水素ナトリウム 0.1g 程度を溶かし込んでおくと、凝集の解消が起きにくくなる。
- 凝集させないサンプルは、少なくとも実験1日前から直射日光や強い蛍光灯の光が当たらない暗めの場所に置いておくとよい（葉が濃い緑色になっているものを選ぶとよい）。また、実験中も顕微鏡照明装置などの強い蛍光灯の光があまり当たらないように注意する。強い光が当たった直後から葉緑体の運動が見られ、早ければ1時間程度で凝集してしまうこともある。