

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材

高等师范院校生物学系列实验教材

植物生理学

实验指导

主编 石连旋 颜 宏



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

全国高等学校“十二五”生命科学规划教材
高等师范院校生物学系列实验教材

植物生理学 实验指导

Zhiwu Shenglixue Shiyan Zhidao

主编 石连旋 颜 宏

编者 (按姓氏笔画排序)

由继红 李长有 朱长甫 张丽辉 杨春武
胡勇军 郭 瑞 盛彦敏



高等教育出版社·北京

HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

中国植物学大典

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验指导 / 石连旋, 颜宏主编. -- 北京:
高等教育出版社, 2013. 7

ISBN 978 - 7 - 04 - 037503 - 9

I. ①植… II. ①石… ②颜… III. ①植物生理学—
实验—高等学校—教材 IV. ①Q945 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 145972 号

策划编辑 吴雪梅 责任编辑 李 融 封面设计 张雨微
责任印制 朱学忠

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	三河市骏杰印刷厂	网上订购	http://www.landraco.com
开 本	787mm×1092mm 1/16		http://www.landraco.com.cn
印 张	8.5	版 次	2013 年 7 月第 1 版
字 数	220 千字	印 次	2013 年 7 月第 1 次印刷
购书热线	010-59581118	定 价	19.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 37503-00

数字课程

植物生理学 实验指导

登录以获取更多学习资源!

登录方法:

1. 访问<http://res.hep.com.cn/37503>
2. 输入数字课程账号（见封底明码）、密码
3. 点击“LOGIN”、“进入4A”
4. 进入学习中心

账号自登录之日起一年内有效，过期作废。

使用本账号如有任何问题，

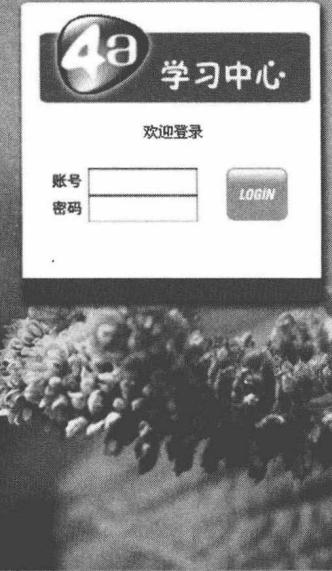
请发邮件至：lifescience@pub.hep.cn

全国高等学校“十三五”生命科学规划教材
高等师范院校生物学系列实验教材

植物生理学实验指导

石连旗 颜宏 主编

| 内容介绍 | 纸质教材 | 相关资源 | 版权信息 | 联系方式 |



内容介绍

本数字课程主要包括植物生理学实验的多媒体教学课件、实验结果彩色照片、视频与动画资料、实验室安全知识等。

为配合师范生教育，本数字课程还设置了与中学生物学实验教学相关的数字化教学资源，并采用动态开放、不断完善更新的建设模式，主要包括对现有中学实验局限性的分析、实验背景知识的补充、实验设计的拓展、实验注意事项、实验中常见问题的解析以及中学生物学综合性、研究性实验教学案例等。

高等教育出版社版权所有 2013

<http://res.hep.com.cn/37503>

高等师范院校生物学系列实验教材

编 委 会

主任委员 王丽 周义发

副主任委员 魏民 孙晖

委员 (按姓氏笔画排序)

王丽 孙晖 张丽萍

陈珊 肖洪兴 胡建

曾宪录 魏民

编委王丽、孙晖、张丽萍、胡建、魏民、陈珊、肖洪兴、曾宪录、周义发

王丽、孙晖

序

东北师范大学生命科学学院 生物学实验教材编写组著

东北师范大学生命科学学院的生物学实验课程经过多年的建设与实践,已经形成自己的特色。在实验课程建设方面,我们一直本着水平和特色两兼顾的原则。首先,实验课程是生物学教学过程中的一个必要而且重要的环节,应该保证其先进性。随着实验手段的进步和更新,实验课程的内容也不断扩展和完善。第二,实验课程设计应该有它的特色,这种特色主要体现在对实验内容的选择和教学方式的使用。这两个基本原则是我们编写这套实验教材的指导思想。

本套实验教材涵盖了生物学基础实验核心课程,其特色有三:①实用性。本套实验教材是在学院多年实验教学实践的基础上编写的,具有较好的实用性。②立体化。主要表现在教材内容分为两个部分,一部分呈现在纸质教材中,另一部分以网络版的数字课程形式展示给读者,这样大大丰富了教材的知识体系。③师范性。本套教材体现了本科实验教学对中学生物学实验教学的直接指导和全面拓展。师范大学生物学教学与中学生物学教学的脱节是长期存在的问题,在实验教学中也存在同样的现象。在本套教材中,我们尝试着将本科生物学教学与中学生物学教学的知识相关联,为学生将来从事中学生物学实验教学打下基础,起到一定的指导作用。与中学生物学相关内容的衔接和指导主要是在数字课程中体现。这样,既保证了教材中实验知识体系的完整性,也可以利用立体化教材的特点,在互联网上以多种媒体形式体现,对中学生物学教学进行指导。希望这些新的尝试能够促进生物学实验教学的改革。

“高等师范院校生物学系列实验教材”编委会

2011年8月

前言

植物生理学是研究植物生命活动规律的科学。植物生理学的任务就是研究和了解植物在各种环境条件下进行生命活动的规律和机制，并将这些研究成果应用于一切利用植物进行生产的事业中。这显示出该学科最重要的特点在于密切联系农业生产实践。随着现代生命科学理论和实验技术的迅猛发展，以植物生理学为基础已经形成植物生理生态学和植物生理分子生物学两门重要前沿学科，植物生理学实验技术也越来越受到人们的关注和重视。植物生理学实验是与植物生理学理论课相配套的基础实验课程，是植物生理学教学的重要组成部分。实验课程的学习，不仅可以验证和加深学生对基础理论的理解和记忆，同时也使其掌握植物生理学的基本实验技能，并在培养学生的动手能力、综合分析能力、创新能力、科学思维能力及严谨的工作作风等方面起着重要的作用。

师范院校的植物生理学实验具有与综合性大学不同的要求和目标。为提高实验课堂教学的有效性，加强学生综合素质的训练，国内许多大学的生物学专业教师进行了多年改革与探索，积累了宝贵的教学经验和教学资料。为培养既具备系统理论知识，又具有较强动手能力和实验技能的高素质人才，以适应植物生理学的发展趋势和社会对人才的需求。本书编者根据多年的实验课教学及科学硏究中积累的经验和素材，在学习兄弟院校实验教材和实践经验的基础上，编写了具有师范特色的《植物生理学实验指导》。本实验教材内容分为4篇，即常用植物培养技术、植物生理学基础性实验、植物生理学综合性实验、中学相关生物学实验指导（植物生理学篇）。

第1篇“常用植物培养技术”：本篇依据植物生理学的学科特点，选取了常用的植物培养方法和技术。这些培养技术是获得植物实验材料的基础，是学习和研究植物生理学的重要前提。通过本篇的学习，使学生熟练掌握植物材料培养的基本操作和基本技能，为以后的学习和工作过程中自己获得实验材料打下良好的基础。

第2篇“植物生理学基础性实验”：本篇是针对植物生理学教材的内容，选取了植物生理学中的经典实验，代表了本学科基础的实验技术和方法。通过本篇的

学习，使学生掌握植物生理学的基本实验技能，更好地理解植物生理学理论知识和概念，并养成良好的实验习惯以及对植物生理学产生兴趣。

第3篇“植物生理学综合性实验”：本篇是在植物培养技术和基础性实验的基础上，结合教师的科学研究，有机整合了多个基础性实验，围绕着一个关键性植物生理学核心问题开展的。通过本篇的学习，提高学生对所学知识和实验技术的综合运用能力以及对实验结果的综合分析能力。

第4篇“中学相关生物学实验指导（植物生理学篇）”：本篇总结了植物生理学科在《全日制义务教育生物课程标准》和《普通高中生物课程标准》中的相关实验内容，对实验的设计、操作、改进等方面提出指导性建议，对实验中常见的问题进行解析和指导。

本书为立体化教材，包括纸质教材和数字课程两部分。数字课程主要包括多媒体教学课件、视频资料、实验结果照片和参考资料等，并将采取动态开放、不断完善和更新的建设模式。

本书所选取的实验内容具有较强的实用性和可操作性，易于进行植物生理学实验课程的教学。参加本书编写的人员有：东北师范大学石连旋、颜宏、杨春武、由继红，长春师范学院盛彦敏、朱长甫、胡勇军、张丽辉，中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所郭瑞，吉林师范大学李长有。书中插图由东北师范大学吴志学绘制。本书在编写出版过程中，得到了东北师范大学生命科学学院和高等教育出版社领导的大力支持和帮助，在此表示诚挚的感谢。

本书在编写过程中难免有疏漏和不足之处，真诚欢迎同行及读者提出批评和改进意见。

编者

2013年3月

目 录

第1篇 常用植物培养技术

实验 1 植物溶液培养及砂基培养技术	3
实验 2 黄化苗实验材料培养技术	5
实验 3 植物无性繁殖（组织培养）技术	6

第2篇 基础性实验

实验 4 植物组织水势、渗透势的测定	13
实验 5 蒸腾作用和保卫细胞运动机制	16
实验 6 矿质营养元素缺乏症	20
实验 7 植物灰分元素的分析鉴定	23
实验 8 单盐毒害和离子间颉颃作用	26
实验 9 呼吸强度的测定	27
实验 10 丙酮酸激酶活性的测定	32
实验 11 放射自显影法观测蔗糖的转运	34
实验 12 原花色素的测定方法	37
实验 13 生长素的生物鉴定	39
实验 14 赤霉素的生物鉴定	41
实验 15 细胞分裂素含量的测定	42
实验 16 乙烯的产量和花的衰老	44
实验 17 植物激素对叶片脱落的影响	46
实验 18 黄瓜子叶的转绿研究	49
实验 19 光和激素对种子萌发的影响	51
实验 20 种子发芽率的快速测定	53
实验 21 谷类种子中淀粉酶活性的测定	55
实验 22 硼对花粉管生长的影响	58
实验 23 激素在叶片衰老过程中的生理作用分析	60
实验 24 高温和低温对植物的伤害	62

第3篇 综合性实验

实验 25 硝酸还原酶诱导及活性的测定	67
实验 26 C ₃ 植物、C ₄ 植物的实验鉴定	70

I	叶肉细胞观察法鉴定 C ₃ 植物、C ₄ 植物	71
II	淀粉产生部位观察法鉴定 C ₃ 植物、C ₄ 植物	73
III	测定光合速率法鉴定 C ₃ 植物、C ₄ 植物	74
实验 27	植物光合生理大实验	76
I	光合色素含量的测定	77
II	光合作用产物含量测定	78
III	植物叶片净光合速率的测定	84
IV	叶绿素荧光产量测定	86
V	CO ₂ (光) 响应曲线测定	89
实验 28	盐碱胁迫下禾本科植物幼苗抗盐碱机制的探讨	90
I	植物生长参数的测定	91
II	植物根系活力测定	92
III	植物抗氧化酶系统测定	94
IV	渗透调节物质的积累	100
V	不同相对分子质量蛋白亚基的积累	104

第 4 篇 中学相关生物学实验指导 (植物生理学篇)

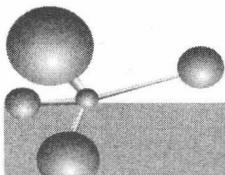
一、中学生物课程标准中的植物生理学实验内容概述	109
二、中学植物生理学实验指导与设计分析	110
参考文献	114
附录	115
I 常用酸碱的浓度	115
II 常用缓冲液的配制方法	115
III 一些常用酸碱指示剂	118
IV 常用固态化合物溶液配制参考表	119
V 乙酸在水溶液中的电离度和离解常数 (25 ℃)	119
VI 不同浓度和温度下 KCl 溶液的电导率	120
VII 无限稀释离子的摩尔电导率和温度系数	120
VIII 标准电极电位及温度系数 (25 ℃)	121
IX 不同质量摩尔浓度下一些强电解质的活度系数 (25 ℃)	121
X 常用植物激素	122
XI 植物组织和细胞培养液常用培养基成分	122
XII 常用培养基附加成分	123
XIII 常用化学试剂的分级及配制方法	124

第1篇

常用植物培养技术

本篇依据植物生理学的学科特点,选取了常用的植物培养方法和技术。这些基本实验培养技术是获得植物生理学实验材料的基础,是学习和研究植物生理学的重要前提。通过本篇的学习,使学生熟练掌握植物材料培养的基本操作和基本技能,为以后的学习和工作过程中获得特定实验材料打下良好的基础。本篇内容包括:植物溶液培养及砂基培养技术,黄化苗实验材料培养技术,植物无性繁殖(组织培养)技术。

本篇实验内容在教学过程中,既可以单独开展实验,也可以整合到某一个基础性实验过程中讲授。同时,还可以供实验教师在准备实验过程中参考。



实验 1

植物溶液培养及砂基培养技术

【实验背景】

植物在生长发育过程中,除了需要水分、阳光外,还需要从环境中吸收多种矿质元素。但要确定植物必需矿质元素的必需性,单靠分析元素的含量是不够的,由于土壤环境的复杂性、随机性,其所含元素组成、含量无法有效控制,因此可靠的方法是借助人工无土栽培(溶液培养或砂基培养)进行分析。近年来,无土栽培不仅作为一种研究手段,而且成为新的生产方式,在蔬菜、花卉生产中开始大规模应用。本实验学习溶液培养、砂基培养的技术,并证明氮、磷、钾、钙、镁和铁等元素对植物生长发育的重要性。

溶液培养法也称水培法,是指在含有全部或部分营养元素的溶液中培养植物的方法。砂基培养法简称砂培法,是利用洗净的河沙、石英砂或玻璃球、蛭石等基质以固定植物根系,加入含有全部或部分营养元素的溶液来培养植物的方法,与溶液培养法并无实质性的不同。但是溶液培养中根部通气的问题不易解决,砂基培养可以较好地解决该问题。

本实验的目的在于了解不同元素对植物的必需性,为配方施肥、实验材料的培养奠定基础。用植物必需的矿质元素按一定的比例配成营养液来培养植物,可使植物正常生长发育。

【实验材料、仪器、试剂】

1. 材料

植物种子(小麦、西红柿种子)。

2. 仪器

直径 20 cm 花盆,1 000 mL 培养缸,河沙或石英砂(直径为 1.5~2 mm),尼龙网。

3. 试剂

各种化学纯矿质盐。

【实验步骤】

1. 完全培养液的配制

表 1-1 常用 Hoagland 营养液配方

编号	药品名称	100 倍储备液 /(g · L ⁻¹)	1 倍用量 /mL	500 倍储备液 /(g · L ⁻¹)	1 倍用量 /mL
1	Ca(NO ₃) ₂	82.07	10	410.35	2
2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	61.62	10	308.10	2
3	KH ₂ PO ₄	27.22	10	136.10	2
4	KNO ₃	50.56	10	252.80	2
5	Fe - EDTA(1 000 倍储 备液)		Na - EDTA 7.45 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 5.57 g		1
6	微量元素(1 000 倍储 备液)		H ₃ BO ₃ 2.860 g, MnSO ₄ 1.015 g, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0.079 g, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.220 g, H ₂ MoO ₄ 0.090 g		1

按表 1-1 的配方配制完全培养液, 定容 1 000 mL, 调节 pH 5.0 ~ 6.0。

2. 容器准备

砂基培养法: 将河沙或石英砂洗净, 用蒸馏水冲洗后, 装入直径为 20 cm 的花盆中(花盆底部要放置沙网)。向花盆中加入石英砂, 石英砂的体积不超过花盆体积的 4/5。

3. 材料消毒

将植物种子用 5 % 的次氯酸钠溶液灭菌 15 ~ 20 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次。

4. 材料的培养和管理

(1) 溶液培养法: 将消毒后的西红柿、小麦等种子按适当密度放在配有尼龙网的 1 000 mL 培养缸中, 在适宜的温度、光照下培养。及时补充每天蒸发的水量, 用鱼缸打气泵保证每天的正常通气。每隔一定时间(一周左右, 根据植株大小而定)更换培养液。

(2) 砂基培养法: 将消毒后的西红柿、小麦等种子按适当密度(株距 2 cm, 深度 0.7 ~ 1 cm)放入上述盛有石英砂的花盆中, 置于温室内光照充足处培养。每隔 1 ~ 3 d 加蒸馏水一次, 每隔一周更换一次培养液。

【注意事项】

1. pH 的急剧改变会造成实验的失败, 因此从实验开始就必须注意保持 pH 在 5.5 ~ 6.0 之间, 可用 HCl 溶液和 NaOH 溶液进行调整。

2. 经常补充盆内因蒸发或植物蒸腾造成的水分损失, 每隔 1 ~ 3 d 加蒸馏水一次, 每隔一周更换一次培养液。

3. 溶液培养要注意保证每天 30 min 的通气。

4. 实验前记录幼苗发育状态(茎高、根长、叶片大小、颜色等), 实验期间随时记录生长发育的情况及病症等, 结束时记录植株的鲜重、高度、叶片数、叶片颜色, 必要时测定内部元素含量。

【思考题】

1. 分析无土栽培的重要性。

2. 比较溶液培养和砂基培养的优缺点。

3. 查阅资料比较不同植物材料以及不同实验要求所用营养液的配方。

实验 2

黄化苗实验材料培养技术

【实验背景】

在黑暗条件下,多数植物在生长时呈现黄色和其他变态特征的现象称之为黄化现象。黄化现象是植物对环境的一种适应。

黄化现象在被子植物中广泛存在,在苔藓植物和裸子植物中不明显。发生黄化现象的幼苗因为在黑暗中不能合成叶绿素,显现出类胡萝卜素的黄色,节间伸长很快,叶片不能充分展开和生长。当种子或其他延存器官在无光的土层下萌发时,可使储存量有限的有机营养物质最有效地用于胚轴或茎的伸长,保证幼苗出土见光。人们常用遮光的方法生产黄化幼苗作为食品,如韭黄、蒜黄和豆芽等,这些食品因其根系、维管束和机械组织不发达,纤维素少而柔嫩可口。

【实验材料、仪器、试剂】

1. 材料

小麦种子。

2. 仪器

培养箱,培养皿,滤纸。

3. 试剂

(1) 无菌水。

(2) 5 % 次氯酸钠或者 0.1 % 升汞溶液。

【实验步骤】

- 将小麦种子在 5 % 的次氯酸钠溶液浸泡灭菌 15 ~ 20 min,用无菌蒸馏水冲洗 4 ~ 5 次。
- 在无菌滤纸上吸干种子表面的水分,置于含无菌水的培养皿中,在 26 ℃ 培养箱中避光萌发。萌发 30 h 后,每隔 24 h 加无菌蒸馏水冲洗。
- 相同条件下,培养箱中暗培养,黄化苗长至 8 ~ 10 cm 可直接取用。

【注意事项】

- 种子要用 5 % 的次氯酸钠溶液或者 0.1 % 升汞溶液灭菌。
- 培养过程中注意避光。

【思考题】

1. 什么是黄化现象？产生黄化现象的机制是什么？
2. 黄化现象有什么应用？
3. 黄化幼苗与正常生长幼苗主要区别是什么？

实验 3**植物无性繁殖(组织培养)技术****【实验背景】**

植物的无性繁殖技术是基于植物细胞具有全能性这一基本原理建立起来的植物繁殖方法，具体是指在人工控制的营养和环境条件下快速繁殖植物的一种方法。1902年，德国植物学家哈伯兰特预言，植物体的任何一个细胞都有长成完整个体的潜在能力，这种潜在能力就叫植物细胞的“全能性”。为了证实这个预言，他用高等植物的叶肉细胞、髓细胞、腺毛、雄蕊毛、气孔保卫细胞、表皮细胞等多种细胞放置在相应的培养基上，这些细胞在培养基上可生存相当长一段时间，但他只发现有些细胞增大，却始终没有看到细胞分裂和增殖。以后许多科学家为证实这位德国科学家的论断做了诸多的努力。1958年，Steward等将高度分化的胡萝卜根的韧皮部组织细胞放在合适的培养基上培养，发现根细胞会失去分化的结构特征，发生反复分裂，最终分化成具有根、茎、叶的完整植株。1964年，Cuba和Mabeswari利用毛叶曼陀罗的花药培育出单倍体植株。1969年，Nitch将烟草的单个单倍体孢子培养成了完整的单倍体植株。1970年，Steward用悬浮培养的胡萝卜单个细胞培养成了可育的植株。至此，经过科学家们50余年的不断试验，植物分化细胞的全能性得到了充分论证，并以此为基础建立了植物组织培养技术和无性繁殖技术。我国学者陆文棵等提出了“植物细胞全能性部分表达”的概念，认为当胚性细胞分化胚状体发育成为植株并完成个体发育时，这种表达是完全的。在更多的情况下，胚性细胞往往只分化营养芽或根。最近的实验已无可辩驳地证实，它还可以分化花芽、性器官甚至果实性结构。

无性繁殖植物是这一理论应用的典型例子。这种方法与常规营养繁殖方法相比，具有繁殖数量多、速度快、不受季节和气候条件影响的优点，因此已被用于大规模工厂化、商品化生产各种园艺作物的种苗业。在其繁殖过程中，前代与后代的各个个体之间变异少，但有时如病毒侵染、营养条件不均一也会造成变异，特别是退化的植株较多。因此，为了保证无性繁殖植物品种纯正的种性，株系在留种时也要进行严格选择。通常采用的选择法有营养系单株(穴)选择法和营养

系混合选择法。这两种方法的选择程序与有性繁殖植物的单株选择法和混合选择法基本相同,差别之处,只是每一代用以繁殖下一代的不是种子,而是无性繁殖器官,如块茎、鳞茎、球茎等。有些植物在生产栽培中虽采用无性繁殖,但也能开花结籽,或经某种处理后,能开花结籽。对这类植物,可利用它们的有性后代的分离变异,经过选择,获得优良植株,再经无性繁殖,使其优良性状在后代固定下来。无论采用哪种选择方法选择出来的种株,都应该将其尽快繁殖出足够数量的播种材料,扩大鉴定群体,以便在生产上发挥作用。植物的快速繁殖技术包括无菌培养物的建立、芽的增殖、根的诱导与试管苗移栽4个环节。

【实验材料、仪器、试剂】

1. 材料

胡萝卜。

2. 仪器

超净工作台,高压灭菌锅,人工气候培养箱,微波炉,冰箱,pH计,手术刀,长柄镊子,组织培养瓶,25 mL、50 mL、500 mL、1 000 mL容量瓶,1 mL、2 mL、5 mL、10 mL移液器,培养皿,下口杯,1 000 mL烧杯,酒精灯。

3. 试剂

- (1) 75 % 乙醇:量取 75 mL 无水乙醇,定容至 100 mL。
- (2) 1 % 次氯酸钠:称取 1 g 次氯酸钠,溶解于 100 mL 蒸馏水中。
- (3) 1 mol · L⁻¹ HCl:量取 85.5 mL 浓盐酸,定容至 1 000 mL。
- (4) 琼脂。
- (5) 6 - 苷基腺嘌呤。
- (6) 蔗乙酸。
- (7) MS 培养基中各种化合物,参阅附录 XI。

【实验步骤】

1. 无菌培养物的建立

(1) 外植体(植物的离体部分)的选择:根据不同的植物种类可取用植物的根、茎、叶或花器官部分作为外植体。通常外植体的大小、取材植株的生理状态和植株年龄及取材部位等都影响培养的结果。在自然界中,能够产生不定芽的植物器官常优先用于植物无性快繁的外植体,如非洲紫罗兰、大岩桐的叶片。有些植物可取用子叶、下胚轴作为外植体,有些可取用花器官部分,如萱草、非洲菊等的花托可作为外植体。具储存器官的植物如百合等可取用鳞片作为快繁的外植体。

(2) 植物材料的消毒:植物材料的消毒常用一次消毒程序。先将采集的植物材料用纱布或尼龙网扎紧瓶口,置于流水条件下冲洗数小时,以去除附于植物材料表面的尘土。接着用70 % ~ 75 % 的乙醇漂洗植物材料数秒至半分钟,以破坏有些植物材料蜡质化表面的张力。根据植物材料的幼嫩程度,选择合适的消毒剂浓度和消毒时间对植物材料进行消毒。常用的消毒剂有5 % ~ 10 % 安替福民(含有效氯5 %)、漂泊精片(每片含有效氯0.2 %),一般100 mL水中加20片。为降低材料的表面张力达到更有效的消毒目的,常在消毒剂中加1至数滴吐温-20或吐温-80等表面活性剂。0.1 % 的升汞也是常用的极佳的消毒剂(升汞剧毒,使用时务必小心,使