

# 不同荧光波长的双光子共焦成像分析\*

杨初平<sup>1,2</sup> 唐志列<sup>2</sup> 裴红津<sup>2</sup>

(1 华南农业大学理学院, 广州 510642)

(2 华南师范大学物理系, 广州 510631)

**摘要** 研究了双光子共焦显微镜中不同荧光波长对成像特性的影响, 导出了不同荧光波长的三维脉冲响应函数和三维光学传递函数并进行数值计算. 研究表明: 不同荧光波长对双光子共焦显微镜的三维光学传递函数、三维脉冲响应函数和空间截止频率产生明显的影响, 随着荧光波长的增大, 分辨率明显下降, 但不会出现单光子共焦显微镜中的失锥现象, 选取适当的荧光波长进行成像, 有利于进一步改善图像分辨率和成像质量.

**关键词** 双光子; 共焦显微镜; 不同荧光波长

**中图分类号** TH742.65 **文献标识码** A

## 0 引言

近年来, 双光子共焦显微镜在生物医学研究<sup>[1-3]</sup>、三维高密度存储<sup>[4]</sup>以及三维微细加工<sup>[5]</sup>等领域取得了许多突破性进展, 已成为光学及其交叉学科的研究热点. 在理论研究方面, 虽然 Sheppard 和 Gu Min 等多种类型的单光子共焦显微镜成像系统作过全面和系统的研究<sup>[6-9]</sup>, 给出了比较完整的理论, 并导出了各种共焦显微成像系统的三维光学传递函数, 但不适用于双光子共焦显微镜. 对于双光子共焦显微镜的成像规律, 文献[10]给出了双光子共焦显微镜的三维点扩散函数和三维光学传递函数, 但只分析了荧光波长等于激发光波长这一特殊情况. 由于双光子荧光波长分布较宽, 不同的荧光波长会对成像质量和分辨率产生很大的影响, 本文研究一般情况下, 即激发波长不等于荧光波长时的双光子共焦显微镜的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数和三维光学传递函数; 研究了不同荧光波长对双光子共焦显微镜的三维脉冲响应函数的横向与纵向分布的影响, 并与单光子三维脉冲响应函数的横向与纵向分布比较; 得出双光子共焦显微镜的三维光学传递函数的截止空间频率.

## 1 双光子共焦显微镜中不同波长的荧光功率传输函数

文献[10]导出了如图1所示的双光子共焦显微镜成像系统的荧光功率传输函数. 考虑到荧光波长各不相同, 分布很宽, 不同波长的荧光对成像系统

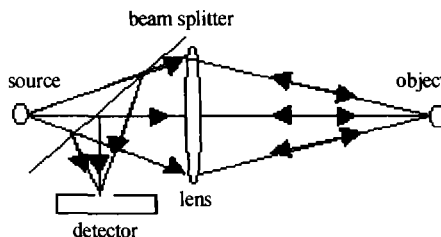


图1 共焦显微镜的原理图

Fig. 1 The diagram of confocal microscopy

的分辨率及成像质量有很大影响, 本文在文献[10]的基础上导出了能准确描述不同波长荧光的功率传输函数. 对于点源、点探测器的双光子共焦显微镜, 根据文献[10]的结论, 激发光  $S$  在物面上产生的双光子荧光强度分布可以写为

$$I_1(\mathbf{v}_p, \mathbf{v}_e) = \left| \iint_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{v}_i) h_e(\mathbf{v}_e - \mathbf{v}_i) d\mathbf{v}_i \right|^4 \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_e) \quad (1)$$

式中,  $h_e(\mathbf{v}_e - \mathbf{v}_i)$  是激发光经过物镜  $L$  的三维脉冲响应函数;  $\mathbf{v}_p$  是扫描点的位置矢量.

从物面上的双光子荧光经物镜  $L$  和分束镜  $BS$  聚焦到探测器平面上的成像过程属于非相干光成像过程, 因此可以写出探测器平面上的双光子荧光强度分布为

$$I_2(\mathbf{v}_d, \mathbf{v}_p) = \iint_{-\infty}^{\infty} \left| \iint_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{v}_i) h(\mathbf{v}_e - \mathbf{v}_i) d\mathbf{v}_i \right|^4 \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_e) \left| h_f(\mathbf{v}_d - \mathbf{v}_f) \right|^2 d\mathbf{v}_f \quad (2)$$

考虑到探测器有一定的大小  $D(\mathbf{v}_d)$ , 最后可以写出图1所示的光学系统的双光子荧光功率传输函数为

$$I_3(\mathbf{v}_p) = \iint_{-\infty}^{\infty} \left| \iint_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{v}_i) h_e(\mathbf{v}_e - \mathbf{v}_i) d\mathbf{v}_i \right|^4 \cdot O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_e) \left| h_f(\mathbf{v}_d - \mathbf{v}_f) \right|^2 d\mathbf{v}_f D(\mathbf{v}_d) d\mathbf{v}_d \quad (3)$$

一般来说, 以激发光波长  $\lambda_e$  为单位的数学坐标矢量  $\mathbf{v}_e$  和以荧光波长  $\lambda_f$  为单位的数学坐标矢量  $\mathbf{v}_f$  的关系为:  $\mathbf{v}_f = \lambda_e / \lambda_f \mathbf{v}_e$ . 略去积分号前的系数同时交换  $d\mathbf{v}_e$  和  $d\mathbf{v}_d$  的积分次序后得

\*广东省自然科学基金、华南农业大学校长基金资助项目  
(项目号: 980046, 010207)  
Tel: 020-85280324  
收稿日期: 2003-04-07

$$I_4(\mathbf{v}_p) = \iint_{-\infty}^{\infty} \{ |\iint_{-\infty}^{\infty} S(\mathbf{v}_s) h_e(\mathbf{v}_e - \mathbf{v}_s) d\mathbf{v}_s|^4 \cdot \iint_{-\infty}^{\infty} |h_f(\mathbf{v}_f - \mathbf{v}_d)|^2 D(\mathbf{v}_d) d\mathbf{v}_d \} O(\mathbf{v}_p - \mathbf{v}_e) d\mathbf{v}_e = \{ |S(\mathbf{v}_e) \otimes_3 h_e(\mathbf{v}_e)|^4 [ |h_f(\mathbf{v}_f)|^2 \otimes_3 D(\mathbf{v}_f) ] \} \otimes_3 O(\mathbf{v}_p) \quad (4)$$

根据成像理论,成像系统中像的光强分布是物的光强分布函数与系统的脉冲响应函数的卷积,因此,由式(4)不难得到:图1所示的成像系统的三维脉冲响应函数为

$$F(\mathbf{v}) = \{ |S(\mathbf{v}_e) \otimes_3 h_e(\mathbf{v}_e)|^4 \cdot [ |h_f(\mathbf{v}_f)|^2 \otimes_3 D(\mathbf{v}_f) ] \} \quad (5)$$

## 2 焦斑的空间分布

对于点源、点探测器的共焦显微镜成像系统,有  $S(\mathbf{v}_s) = \delta(\mathbf{v}_s)$ ,  $D(\mathbf{v}_d) = \delta(\mathbf{v}_d)$ , 则由式(5)可得不同荧光波长的双光子荧光共焦显微镜的三维脉冲响应函数为

$$F_{\text{con}}^{\text{Two}}(\mathbf{v}_e) = |h_e(\mathbf{v}_e)|^4 |h_f(\mathbf{v}_f)|^2 \quad (6)$$

式中,  $h_e(\mathbf{v}_e)$ 、 $h_f(\mathbf{v}_f)$  分别为激发光、荧光经过物镜  $L$  的三维振幅脉冲响应函数<sup>[9]</sup>. 可表示为

$$h_e(\mathbf{v}_e) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -\frac{j u_e}{2} (\xi^2 + \eta^2) \right] \cdot \exp \left[ -j(\mathbf{v}_{ex} \xi + \mathbf{v}_{ey} \eta) \right] d\xi d\eta \quad (7)$$

$$h_f(\mathbf{v}_f) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -\frac{j u_f}{2} (\xi^2 + \eta^2) \right] \cdot \exp \left[ -j \left( \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ex} \xi + \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ey} \eta \right) \right] d\xi d\eta \quad (8)$$

式中  $P(\xi, \eta) = \begin{cases} 1 & (\xi^2 + \eta^2 \leq 1) \\ 0 & (\text{others}) \end{cases}$ ,  $P(\xi, \eta)$  为光学系统的光瞳函数,而  $\xi = x/a$ ,  $\eta = y/a$  为归一化直角坐标,  $a$  为光瞳半径.

### 2.1 横向分布

式(7)、(8)中,分别令  $u_e = 0$ ,  $u_f = 0$ , 即可分别得到激发光、荧光经过物镜  $L$  在焦面上的二维脉冲响应函数

$$h_e(\mathbf{v}_e) = h(\mathbf{v}_{ex}, \mathbf{v}_{ey}; 0) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -j(\mathbf{v}_{ex} \xi + \mathbf{v}_{ey} \eta) \right] d\xi d\eta = 2J_1(\sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}) / \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2} \quad (9)$$

$$h_f(\mathbf{v}_f) = h\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ex}, \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ey}; 0\right) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -j \left( \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ex} \xi + \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \mathbf{v}_{ey} \eta \right) \right] d\xi d\eta = \frac{2J_1\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}\right)}{\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}} \quad (10)$$

把式(9)、(10)代入式(6)即可得到共焦显微镜像面上双光子荧光的横向分布

$$F_{\text{con}}^{\text{Two}}(\mathbf{v}_{ex}, \mathbf{v}_{ey}, 0) = [2J_1(\sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}) / \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}]^4 \cdot$$

$$[2J_1\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}\right) / \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \sqrt{\mathbf{v}_{ex}^2 + \mathbf{v}_{ey}^2}]^2 \quad (11)$$

当荧光波长等于激发光波长时,共焦显微镜像面上双光子荧光、单光子荧光的横向分布分别为<sup>[10]</sup>

$$F_{\text{con}}^{\text{Two}}(\mathbf{v}_x, \mathbf{v}_y, 0) = \left[ \frac{2J_1(\sqrt{\mathbf{v}_x^2 + \mathbf{v}_y^2})}{\sqrt{\mathbf{v}_x^2 + \mathbf{v}_y^2}} \right]^6 \quad (12)$$

$$F_{\text{con}}^{\text{Singl}}(\mathbf{v}_x, \mathbf{v}_y, 0) = \left[ \frac{2J_1(\sqrt{\mathbf{v}_x^2 + \mathbf{v}_y^2})}{\sqrt{\mathbf{v}_x^2 + \mathbf{v}_y^2}} \right]^4 \quad (13)$$

对式(11)、(12)、(13)进行数值计算,结果如图2. 由图2可以得到以下结论:不同的荧光波长会影响双光子共焦显微镜的焦斑的横向分布,随着波长的增大,双光子共焦显微镜的焦斑的横向尺寸增大,横向分辨率降低;但双光子共焦显微镜的横向分辨率都优越于单光子共焦显微镜的横向分辨率,在极限情况即当荧光波长远大于激发波长时,双光子共焦显微镜的最低横向分辨极限为单光子共焦显微镜的横向分辨率.

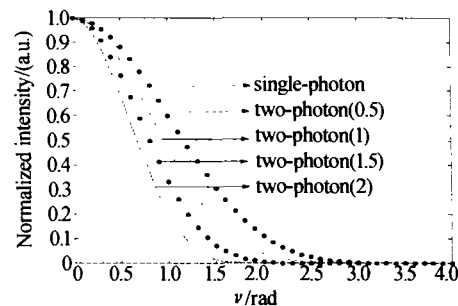


图2 不同  $\lambda_e/\lambda_f$  荧光强度的横向分布曲线

Fig. 2 The lateral fluorescence point spread function (PSF)

### 2.2 纵向分布

式(7)、(8)中,令  $\mathbf{v}_{ex} = 0$ ,  $\mathbf{v}_{ey} = 0$ , 即横向坐标为零,则可分别得到激发光、荧光经过物镜  $L$  的三维脉冲响应函数在光轴上的分布

$$h_e(u_e) = h(0, 0; u_e) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -j \frac{u_e}{2} (\xi^2 + \eta^2) \right] d\xi d\eta = \sin(u_e/4) / (u_e/4) \quad (14)$$

$$h_f(u_f) = h\left(0, 0; \frac{\lambda_e}{\lambda_f} u_e\right) = \iint_{-\infty}^{\infty} P(\xi, \eta) \exp \left[ -j \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \frac{u_e}{2} (\xi^2 + \eta^2) \right] d\xi d\eta = \sin\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \frac{u_e}{4}\right) / \left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \frac{u_e}{4}\right) \quad (15)$$

把式(14)、(15)分别代入式(6),可得不同荧光波长的双光子共焦显微镜焦斑的纵向分布

$$F_{\text{con}}^{\text{Two}}(0, 0; u_e) = [\sin(u_e/4) / (u_e/4)]^4 \cdot \left[ \sin\left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \frac{u_e}{4}\right) / \left(\frac{\lambda_e}{\lambda_f} \frac{u_e}{4}\right) \right]^2 \quad (16)$$

当荧光波长等于激发光波长时,共焦显微镜双光子荧光点像、单光子荧光点像在光轴方向的光强分布分别为<sup>[10]</sup>

$$F_{\text{con}}^{\text{Two}}(0,0;u) = \left[ \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right]^6 \quad (17)$$

$$F_{\text{con}}^{\text{Singl}}(0,0;u) = \left[ \frac{\sin(u/4)}{u/4} \right]^4 \quad (18)$$

对式(16)~(18)进行数值计算,结果如图3所示.由图3可以得到类似横向分辨率的结论:不同的荧光波长会影响双光子共焦显微镜的焦斑的纵向分布,随着波长的增大,双光子共焦显微镜的焦斑的

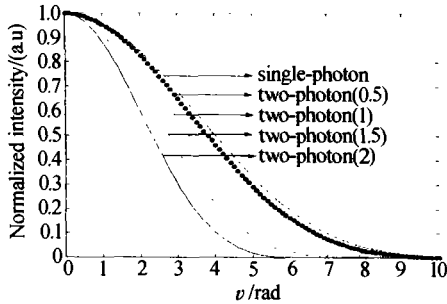


图3 不同  $\lambda_e/\lambda_f$  荧光的纵向分布曲线

Fig.3 The axial fluorescence point spread function (PSF)

纵向尺寸增大,纵向分辨率降低;但双光子共焦显微镜的纵向分辨率都优越于单光子共焦显微镜的纵向分辨率,在极限情况即当荧光波长远大于激发波长时,双光子共焦显微镜的最低纵向分辨极限为单光子共焦显微镜的纵向分辨率.

### 3 不同荧光波长的三维传递函数

通过研究不同荧光波长的双光子共焦显微镜的三维光学传递函数,表明:不同的荧光波长对应不同横向和纵向通频带.为讨论方便,引入归一化的空间频率:  $\nu_{ex} = \frac{\lambda_e}{\sin \alpha} f_x$ ,  $\nu_{ey} = \frac{\lambda_e}{\sin \alpha} f_y$ ;  $\mu_e = \frac{\lambda_e}{\sin^2 \alpha} f_z$ ,  $f_x, f_y$ ,  $f_z$  为空间频率.一般地,以荧光波长归一化的空间频率  $\nu_f$  与以激发波长归一化的空间频率  $\nu_e$  两者的关系为  $\nu_f = \lambda_f/\lambda_e \nu_e$ .对式(6)做三维傅里叶变换,即可得到不同荧光波长的双光子荧光共焦显微镜的三维光学传递函数

$$H_{\text{con}}^{\text{Two}}(\nu_{ex}, \nu_{ey}; \mu_e) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \{ [(m - \nu_{ex}/2)]^2 + [(n - \nu_{ey}/2)]^2 \}^{1/2} \cdot \\ \left[ \left( x + \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y + \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2} \}^{-1} \left\{ \left[ \left( x - \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y - \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2} \right\}^{-1} \cdot \\ \left\{ 1 - \left[ \frac{|z + \frac{(l + \mu_e/2)}{2}|}{\left[ \left( x + \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y + \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2}} + \frac{\left[ \left( x + \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y + \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2}}{2} \right]^2 \right\}^{1/2} \cdot \\ \left\{ 1 - \left[ \frac{|z - \frac{(l + \mu_e/2)}{2}|}{\left[ \left( x - \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y - \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2}} + \frac{\left[ \left( x - \frac{(m + \nu_{ex}/2)}{2} \right)^2 + \left( y - \frac{(n + \nu_{ey}/2)}{2} \right)^2 \right]^{1/2}}{2} \right]^2 \right\}^{1/2} \cdot \\ \left\{ 1 - \left[ \frac{|l - \mu_e/2|}{\left\{ [(m - \nu_{ex}/2)]^2 + [(n - \nu_{ey}/2)]^2 \right\}^{1/2}} + \frac{\left\{ [(m - \nu_{ex}/2)]^2 + [(n - \nu_{ey}/2)]^2 \right\}^{1/2}}{2(\lambda_e/\lambda_f^{-1})} \right]^2 \right\}^{1/2} dx dy dz dm dn dl \quad (19)$$

由式(19)可以求得不同荧光波长条件下,双光子共焦显微镜的纵向截止频率与横向截止频率分别满足

$$|\mu_e| \leq \frac{1}{2} \left( 1 + 2 \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \right), |\nu_e| \leq 4 + 2 \frac{\lambda_e}{\lambda_f} \quad (20)$$

当荧光波长远大于激发波长时,由式(20)可得

$$|\mu_e| \leq 1/2, |\nu_e| \leq 4 \quad (21)$$

式(21)的结果表明,当荧光波长远大于激发波长时,双光子共焦显微镜的纵向和横向截止频率分别等于单光子共焦显微镜的纵向和横向截止频率.这可以从卷积理论得到说明:根据卷积理论,几个函数卷积后的通频带约等于这几个函数各自的通频带之和,而双光子共焦显微镜的三维光学传递函数等于三个普通荧光显微镜的光学传递函数的卷积,其中两个为激

发光,另一个为荧光,当荧光波长远大于激发波长时,荧光的光学传递函数的通频带非常小,几乎为零,因而这时的双光子共焦显微镜的三维光学传递函数的通频带等于两个激发光光学传递函数的通频带之和.对式(19)进行数值计算,得到不同荧光波长情况下的三维光学传递函数,如图4(b)、(d),并与单光子的三维光学传递函数图4(a)、(c)相比较,从图4中可以明显的看出,随着激发波长与荧光波长的比值增大,双光子共焦显微镜的通频带越来越宽,三维OTF越来越饱满,成像质量越来越好.此外,双光子共焦显微镜的三维OTF不会出现单光子共焦显微镜中随着荧光波长增大而存在的失锥现象(图4(c)),这说明无论采用什么荧光波长成像,双光子共焦显微镜具有良好的横向和纵向分辨本领.

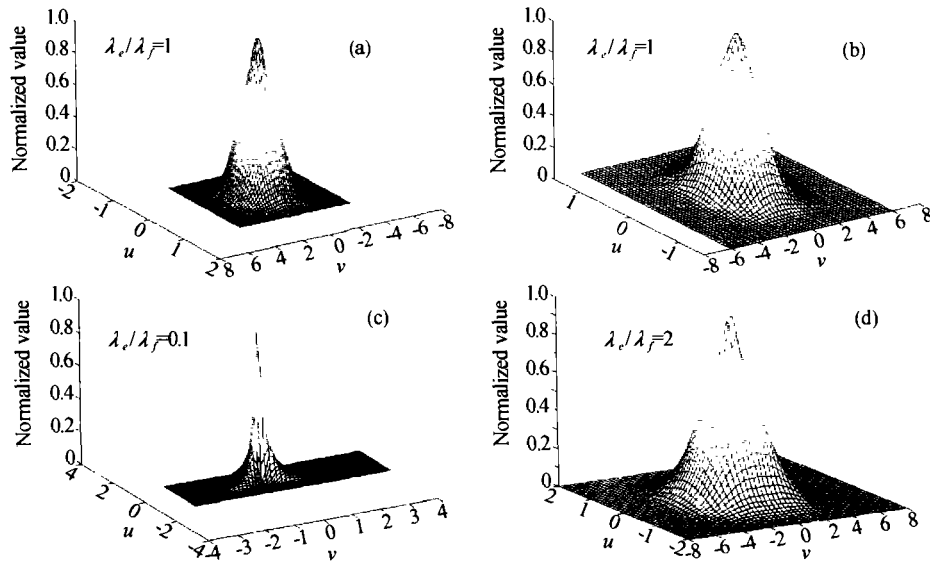


图4 (a)、(c)单光子共焦显微镜的 OTF;(b)、(d)双光子共焦显微镜的 OTF

Fig.4 Three-dimensional views of the normalized 3-D OTF

(a),(c)Single-photon confocal microscopy;(b),(d)two-photon confocal microscopy

## 4 结论

1) 本文推导了一般情况下即激发波长不等于荧光波长时的双光子共焦显微镜的荧光功率传输函数、三维脉冲响应函数和三维光学传递函数;计算了不同荧光波长与激发波长之比值时三维脉冲函数的横向与纵向分布,并与单光子三维脉冲函数响应的横向与纵向分布比较;得出三维光学传递函数的截止空间频率。

2) 数值计算结果显示,随着荧光波长的增大,双光子共焦显微镜中无论是横向分辨率还是纵向分辨率都降低;但双光子共焦显微镜的分辨率都超过或达到单光子共焦显微镜的分辨率;此外,随着荧光波长的增大,双光子共焦显微镜三维 OTF 不会出现单光子共焦显微镜中存在的失锥现象,这说明采用不同的荧光波长成像,双光子共焦显微镜具有良好的横向和纵向分辨率。

### 参考文献

- 1 Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248**(6): 73 ~ 76
- 2 Bewersdorf J, Pick R, Hell S W. Multifocal multiphoton microscopy. *Opt Letter*, 1998, **23**(9): 655 ~ 657
- 3 Sanchez E J, Novotny L, Xie X S. Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips. *Phys Rev Lett*, 1999, **82**(20): 4014 ~ 4017
- 4 Xia A D, Wada S, Tashiro H. Optical data storage in  $C_{60}$  doped polystyrene film by photo-oxidation. *Appl Phys Lett*, 1998, **73**(10): 1323 ~ 1325
- 5 Cumpstem B H, Ananthavel S P, Barlow S, et al. Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature*, 1999, **398**(4): 51 ~ 54
- 6 Sheppard C J R, Choudhurg A. Image formation in the scanning microscope. *Optic Acta*, 1977, **24**(10): 1051 ~ 1073
- 7 Sheppard C J R, Mao X Q. Three-dimensional imaging in a microscope. *J Opt Soc Am*, 1989, **6**(9): 1260 ~ 1269
- 8 Min Gu, Sheppard C J R. Three-dimensional image formation in confocal microscopy under ultra-short-laser-pulse illumination. *J Mod Opt*, 1995, **42**(4): 747 ~ 762
- 9 Min Gu. Principles of Three-dimensional Imaging in Confocal Microscopies, Singapore; World Scientific, 1996
- 10 唐志列, 梁瑞生, 常鸿森. 双光子和多光子共焦显微镜的成像理论. *物理学报*, 2000, **49**(6): 1076 ~ 1080  
Tang Z L, Liang R S, Chang H S. *Acta Physica Sinica*, 2000, **49**(6): 1076 ~ 1080

## Imaging Analysis of Two-photon Confocal Microscopy with Different Fluorescence Wavelength

Yang Chuping<sup>1,2</sup>, Tang Zhilie<sup>2</sup>, Pei Hongjin<sup>2</sup>

1 College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

2 Department of Physics, South China Normal University, Guangzhou 510631

Received date: 2003-04-07

**Abstract** The three-dimensional point spread function and three-dimensional optical transfer function of two-photon confocal microscopy with different fluorescence wavelength are studied and calculated. The results show that there are clear effects of different fluorescence wavelength on three-dimensional point spread function, three-dimensional optical transfer function and cut-off spatial frequency in two-photon confocal microscopy, and the resolution decreases as fluorescence wavelength increases, but no missing-cone appears. Using proper fluorescence wavelength can improve the resolution and imaging quality.

**Keywords** Two-photon; Confocal microscopy; Different fluorescence wavelength



**Yang Chuping** was born in 1970. He graduated from the physics major in 1993, received the M. S. degree in 1996 from South China Normal University. Now, he is working as an lecturer in South China Agricultural University.