

激光扫描共聚焦显微镜观察水稻双受精过程

代西梅, 黄群策, 李国平, 胡秀明, 秦广雍
(郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 利用激光扫描共聚焦显微镜对水稻双受精过程进行了观察。结果表明: 开花后0.5 h可见花粉粒在柱头上萌发, 形成一定长度的花粉管, 但仍未进入胚囊; 开花后1~2 h花粉管进入胚囊, 但尚未释放精细胞, 此时, 在卵器内有两条肌动蛋白冠的形成, 肌动蛋白冠起始于助细胞的基本部, 1条终止于卵细胞核的位置, 另一条终止于极核附近; 开花后2~3 h花粉管释放精细胞, 精细胞在肌动蛋白冠的作用下分别进入极核及卵细胞; 开花后3~4 h, 精核的染色质向卵核扩散, 极核内的雄性核仁逐渐变大, 最后增大至与极核的核仁差不多大小; 开花后4~5 h, 精核与极核完成受精作用, 形成初生胚乳核, 而此时在卵核内出现1个雄性核仁; 开花后6 h左右, 卵核核仁仍未完成与精核核仁的融合, 此时初生胚乳核已分裂1~2次; 开花后12 h, 精核核仁与卵核核仁融合形成1个较大的核仁, 至此合子形成; 开花后24 h, 合子有丝分裂1次, 形成2个细胞的原胚, 此时初生胚乳核已分裂形成8~16个游离核, 绕胚囊周缘分布。水稻双受精作用属于有丝分裂前配子融合类型。

关键词: 水稻; 胚囊; 双受精; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)06-0025-06

Observation on the Process of Double Fertilization in Rice Using Laser Scanning Confocal Microscopy

DAI Xi mei, HUANG Qun ce, LI Guo ping, HU Xiu ming, QIN Guang yong
(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering,
Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Absrtact: The processes of double fertilization in rice were observed using laser scanning confocal microscopy. The results showed that, in 0.5 hour after flowering, pollen with two sperm cells germinated in the stamen; in 1-2 hours, pollen tube reached to the embryo sac of ovule. Meanwhile, two actin coronas were formed in the ovule. Coronas started from the base of the synergid, one of which ended near the egg nucleus and the other near the polar nuclei. After 2-3 hours of flowering, the sperm cells were released at the site of the degenerated synergid. When sperm cells were deposited near the base of the corona, sperm cells in the synergid subsequently migrated toward the point of fusion. In 3-4 hours after flowering, the chromatin of the sperm nucleus diffused in the egg nucleus. At the same time, the male nucleolus became larger and larger, as big as the female one. About 4-5 hours after flowering, polar nuclei were completed fertilized, forming the primary endosperm nucleus, while a small male nucleolus appeared in the egg nucleus. After 5-6 hours of flowering, the male and female nucleolus were still not fused completely, but the primary endosperm nucleushad mitosed for 1-2 times. In 12hours after flowering, the male and female nucleolus fused and formed a large nucleolus, a symbol for the formation

收稿日期: 2007-01-10

基金项目: 国家“863”项目(SZ-01-01-03); 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 代西梅(1974-), 女, 河南开封人, 讲师, 博士, 主要从事植物遗传育种研究。

of zygote. In 24 hours after flowering, zygote completed its first mitosis, forming the two cell proembryo. At the same time, the primary endosperm nucleus has divided into 8-16 free nuclei, distributing around the embryo sac. The double fertilization of rice belongs to the type of premitotic syngamy.

Key words: Rice; Embryo sac; Double fertilization; Laser scanning confocal microscope (LSCM)

受精作用是植物生殖生物学中的重要问题之一,自从1898年俄国植物学家 Nawaschin 首次在欧洲百合和细弱贝母中发现双受精作用以来,人们对各种植物的双受精作用进行了广泛的研究,积累了较为丰富的资料。水稻是重要的农作物之一,国内外对其雌配子体及雄配子体的发育过程作了大量形态学及细胞学研究。有关其双受精过程的研究,虽然也有过一些报道¹⁻³,但由于以往研究受制片技术及观察手段的限制,对其双受精过程,包括受精前雌配子体内各个细胞的存在状态,雌、雄核融合过程及受精时间都有待于进一步的研究。激光扫描共聚焦显微镜是20世纪80年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技产品,是当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器。它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,利用紫外或可见光激发荧光探针,从而可以得到细胞或组织内部较清晰的荧光图像。激光扫描共聚焦显微镜比一般光学显微镜具有更高的分辨率,同时具有深度识别能力(最大深度一般为200~400 μm)及纵向分辨率,因而可以看到较厚生物标本中的细微结构。利用激光扫描共聚焦显微镜可以对活的或固定的细胞及组织进行无损伤的系列光学切片,得到其各层面的信息。这种功能也被形象地称为“显微CT”⁴。此外,利用激光扫描共聚焦显微镜还可以对样品材料进行连续扫描,通过电脑处理从而获得其三维立体结构,对其样品内各细胞的空间分布有更清晰的认识。利用激光扫描共聚焦显微镜观察水稻胚囊结构、形成及发育过程等方面的研究已有一些报道^{7,8}。但目前尚未见到利用激光共聚焦扫描显微镜观察水稻双受精过程的报道。本研究利用激光扫描共聚焦显微镜对水稻双受精过程进行了较为系统的观察,获得了清晰的图片及大量资料,从而为水稻生殖生物学及遗传育种的研究提供新的资料。

1 材料和方法

试验材料为水稻地方品种紫粳。2004~2005年将材料种植于新乡市农业科学研究所

的试验田内,采用常规管理。在紫粳开花前1d,于开花后0.5,1,2,3,4,5,6,12及24h分别取其颖花用FAA固定液固定,并保存于固定液中。每个时期约取颖花50个。观察前用70%的酒精冲洗一下,接着在解剖镜下分离出子房,保存于70%酒精中备用。染色前,各个时期的水稻子房经50%,30%,15%乙醇下行至蒸馏水,每次20min。然后用1mol/L的NaOH溶液软化1h,蒸馏水冲洗几次,用pH8.2磷酸盐缓冲液预处理2h,然后用0.005%水溶性苯胺蓝溶液染色2h。蒸馏水冲洗2~3次,然后再用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DAPI溶液染色12h。用蒸馏水冲洗2~3次,乙醇梯度(15%,30%,50%,70%,85%,95%)脱水,每级20min,随后将子房放入无水乙醇中脱水2次,每次的脱水时间为2h,接着,再转入无水乙醇中过夜。第2天将已经脱水的材料放入由无水乙醇和水杨酸甲酯(1:1)组成的混合液中过渡1h,再用水杨酸甲酯透明处理3次。在前2次透明处理时,每次2h,最后一次的时间为15h。所有的试验材料经过水杨酸甲酯透明处理后可以在水杨酸甲酯中保存备用。观察前,有镊子轻轻将处理好的子房夹出,置于凹玻片上,用丁香油封片(注意加盖玻片时,不要挤压,防止子房变形或破裂)。将制备好的载玻片倒置于Leica SP2激光共聚焦扫描显微镜上,用488nm波长的激光激发,扫描获得双受精各个时期的清晰图片,并用Leica相关软件对系列扫描图片进行3D重建。

2 结果与分析

2.1 受精前雌配子体及雄配子体的结构状态

2.1.1 受精前雌配子体的结构状态 水稻雌配子体(胚囊)属于蓼型胚囊,具7个细胞8个核结构,即1个卵细胞,2个助细胞,1个中央细胞(含2个极核)和3个反足细胞。

珠孔端由1个卵细胞和2个助细胞共同构成卵器。在受精前,其中的1个助细胞退化,因此,在成熟胚囊中,往往只能见到1个助细胞。在助细胞的珠孔端可见到丝状器的存在(图版1)。一般助细胞的细胞核较小,位于助细胞的偏珠孔端,具1个较小

的核仁。卵细胞呈梨形,珠孔端较小,合点端较大。细胞核往往位于近珠孔端,其中有1个较大的、染色较深的核仁,在合点端有1个大的液泡(图版1-1)。在成熟胚囊中,卵细胞的细胞质一般较稀薄,至受精前,在细胞核外围形成较浓厚的细胞质。

中央细胞为1个高度液泡化的细胞,形状较大,几乎充满整个胚囊。2个极核紧靠在一起,各有1个较大的核仁。受精前,极核在细胞骨架系统的牵引下,移动到卵器的上端,紧靠在卵细胞的上端。2个极核在受精前并不融合成次生核(图版1-2)。

反足细胞位于胚囊的合点端,在受精前已增殖为多个细胞,每个细胞往往有多个细胞核。(图版1-3)反足细胞的染色质浓厚,染色往往较深。反足细胞在胚囊内存在的时间较长,往往在受精后48h~72h退化。

2.1.2 受精前雄配子体的结构 水稻雄配子体(花粉粒)在受精前由3个细胞组成,即1个较大的营养细胞和2个精细胞。营养细胞占据了花粉粒内的大部分空间,具有1个较大的圆形的细胞核,有浓厚的细胞质,细胞质内充满了淀粉粒等内含物。精细胞有1个较大的椭圆型的细胞核,细胞质少而稀薄。2个精细胞悬浮在营养细胞的细胞质中(图版1-4)。在水稻的花粉粒上,有1个萌发孔,一旦花粉粒落在柱头上,花粉管就会从萌发孔的位置长出,运送精细胞进入胚囊,为双受精作用的发生做准备。

2.2 双受精过程

被子植物的双受精过程在有些植物中已有一些报道。水稻双受精过程与其他被子植物基本相同,即一个精子与卵细胞融合形成合子,另一个精子与极核融合形成初生胚乳核。

2.2.1 精核与卵核的融合及合子的分裂 开花后0.5h,可观察到花粉粒在柱头上萌发,形成花粉管。花粉管形成后,进入柱头组织,并在柱头组织中伸长(图版1-5)。在开花后1~2h,可见花粉管经珠孔进入胚囊,但此时未观察到花粉管内精子的释放。在开花后2~3h,花粉管在退化助细胞的位置释放出2个精子以及其他一些内含物(图版1-6)。在此之前,另一个助细胞也逐渐退化,其内的肌动蛋白形成2个冠状结构。冠状结构始于退化助细胞的基础,1条在极核的位置终止,另一条在卵细胞核的位置终止(图版1-7),在图7中只显示了1条肌动蛋白冠状结构。另一个不在一个光学切面上。由于实验方法的局限性,吴素萱等曾将形成的肌动蛋白冠状结构误认为是进入的花粉管^[4]。形成的肌动蛋白冠与精

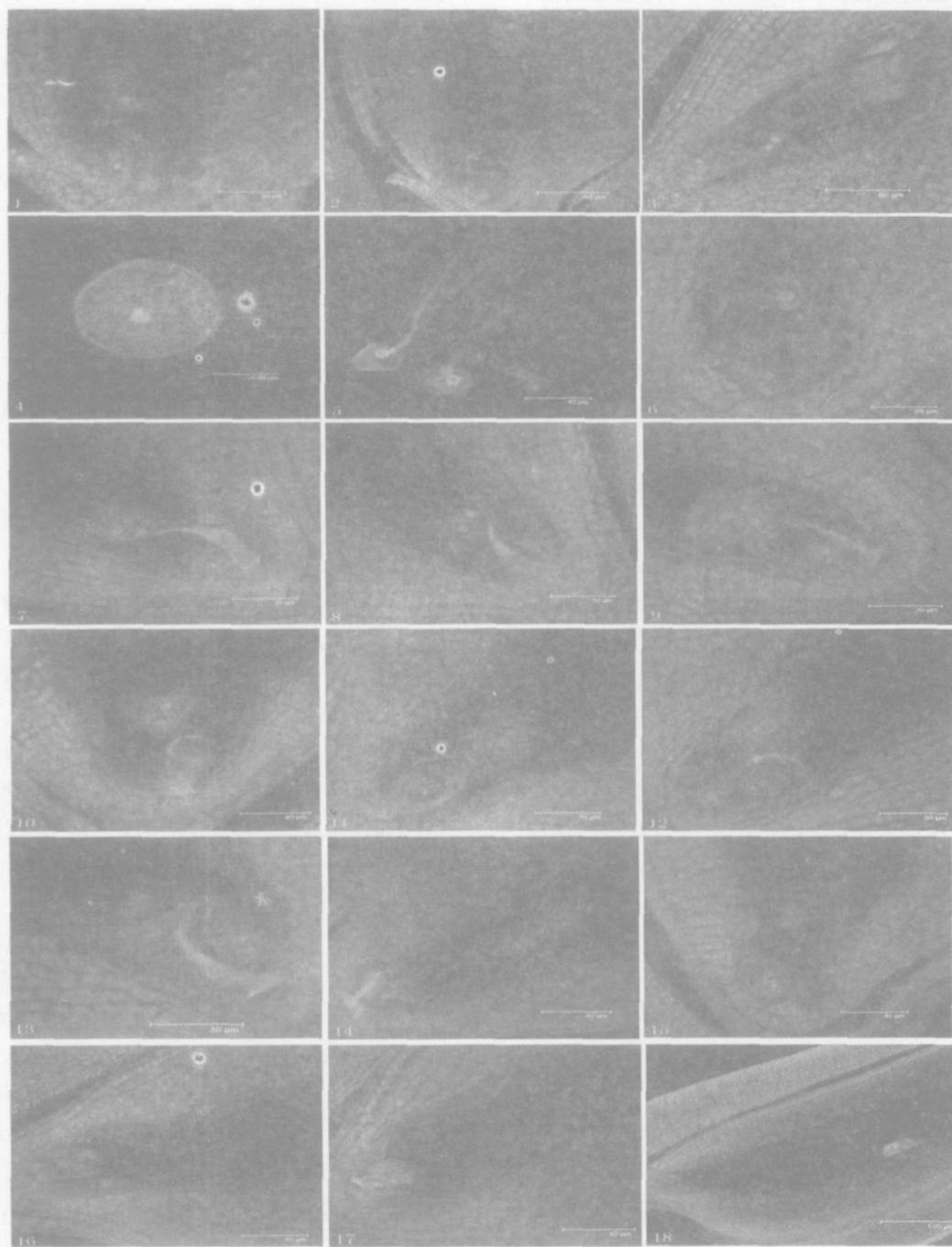
子表面的肌球蛋白相互作用,引导精核分别进入极核与卵细胞(图版1-8)。进入卵细胞的精核慢慢移动到卵核的位置,在开花后4~5h,可见精核的内容物慢慢进入卵细胞核(图版1-9),随后在卵核内出现1个雄性核仁(图版1-10,1-11,1-12)。在开花后6h,卵细胞核内的雌性核仁与雄性核仁仍未融合,而此时,极核已完成受精作用,形成的初生胚乳核已经分裂1~2次(图版1-14)。在开花后12h,雌性核仁与雄性核仁才完成融合。至此,卵细胞与精子的融合完成而形成1个合子。在合子内只有1个较大的核仁(图版1-15)。此时,在卵细胞核周围有浓厚的细胞质围绕。雄性核仁与卵核仁的融合一般发生在合子发裂之前,合子以一个大核仁的形式进入分裂期。

合子一般在开花后16~18h进行第一次有丝分裂,至开花后24h,合子完成第一次分裂,形成2细胞原胚。水稻大多数合子的第一次分裂为横分裂(图版1-16),但也有进行纵分裂的(图版1-17)。在通常情况下,第一次分裂形成的2个细胞在形态上大小比较均等。

2.2.2 精核与极核的融合及初生胚乳核的分裂 精核与极核的融合过程类似于精核与卵核的融合过程,只是前者的融合速度比后者的融合速度要快得多。

在观察过程中发现,大部分精核是与1个极核融合后再与另1个极核发生融合的,偶尔可见到精核与次生核的融合。在开花后3h左右,可观察到精核首先与一个极核的核膜接触,进行核膜的融合。随后,精核的染色质向极核内分散。随后,在极核内出现一个小的雄性核仁(图版1-8)。雄性核仁会慢慢变大,最后增大至与极核的核仁差不多大小(图版1-9)。在开花后4h左右,1个精核与极核完成融合,形成初生胚乳核。初生胚乳核分裂前,核仁一直保持不融合状态,这与申家恒等在玉米中观察到的情况相同^[9](图版1-10)。有时雄性核仁与1个雌性核仁融合,即将分裂的初生胚乳核呈现出2个核仁的情况(图版1-11)。这种情况类似于卫星等在羊草双受精过程中观察到的现象^[10]。

初生胚乳核形成后,很快进行分裂。在开花后5~6h,可观察到初生胚乳核已经进行有丝分裂(图版1-12,图版1-13)。到合子完成第一次有丝分裂时,已经形成8个或更多的游离核,形成的游离核绕胚囊周缘分布(图版1-18)。水稻胚乳的发育类型为核型胚乳^[11]。



1. 成熟胚囊, 示珠孔端的卵细胞、助细胞(可见明显的丝状器结构)及 2 个极核; 2. 成熟胚囊的完整结构, 示中央细胞; 3. 成熟胚囊, 示合点端的反足细胞团; 4. 成熟花粉粒, 示营养细胞与 2 个精细胞; 5. 开花 0.5 h 后, 花粉粒在柱头上萌发形成花粉管, 花粉管在柱头中伸长; 6. 开花后 2~3 h, 花粉管在退化助细胞的位置释放出 2 个精细胞, 精细胞呈卵圆形; 7. 精子释放前, 在助细胞中所形成的冠状结构; 8. 肌动蛋白冠引导精核分别进入卵细胞与极核, 在一个极核内出现一个小的雄性核仁; 9. 开花后 3~4 h 左右, 精核的染色质在卵核内扩散, 与此同时, 极核内的雄性核仁逐渐变大, 最后差不多与极核核仁一样大; 10. 开花后 4 h 左右, 在卵核内出现 1 个雄性核仁; 极核核膜与雄性核膜融合, 形成具 3 个核仁的初生胚乳核; 11. 1 个极核的核仁与雄性核仁完成融合, 形成具有 2 个核仁的初生胚乳核; 12. 初生胚乳核处在第一次分裂中期; 13. 初生胚乳核处于第一次分裂后期; 14. 开花后 6 h, 卵核内雌性核仁与雄性核仁尚未融合, 初生胚乳核已分裂 1~2 次; 15. 开花后 12 h 左右, 卵核内的雌性核仁与雄性核仁完成融合, 形成一个较大的核仁, 卵细胞完成受精作用; 16-17. 开花后 24 h 左右, 合子完成第一次分裂(16 示横裂; 17 示纵裂); 18. 开花后 24 h, 合子完成第一次有丝分裂时, 已经形成 8 个或更多的游离核, 形成的游离核绕胚囊周缘分布。

图版 1 水稻双受精过程 LSCM 观察

水稻受精作用属于有丝分裂前的配子融合类型^[11]。精核与卵核的融合过程和精核与极核的融合过程相似,但是精核与极核的融合速度比其与卵核的融合速度快。精核与极核融合形成的初生胚乳核不经静止期直接进入分裂,而精核与卵核融合形成合子后一般有6~8h的静止期,然后才启动第一次有丝分裂过程。

3 讨论

3.1 关于花粉管进入胚囊及发生受精作用的时间

Akimine^[1]和Terada^[2]曾报道过水稻的受精时间是在开花后12h进行的。Noguchi也对水稻花粉粒的萌发和花粉管的生长过程进行了观察,认为开花后9h花粉管才能到达珠孔,因而受精时间与上述作者的观察结果一致,即在开花后12h进行。Cho^[3]对不同温度条件下水稻花粉粒萌发及花粉管生长速度进行了观察,认为温度对花粉粒的萌发及花粉管生长的速度影响很大,一般在30℃的田间条件下,花粉粒萌发和花粉管生长的速度相当快,水稻开花后30min,花粉管已达到珠孔,有一些已经进入胚囊,并释放出其中的内含物于卵细胞的上部。吴素莹等^[4]对水稻双受精过程也进行了较为详细的观察,观察结果与Cho所观察到的一致。本研究用激光共聚焦扫描显微镜对水稻花粉粒的萌发、花粉管的生长及受精时间进行了系统的观察,在开花后0.5h,花粉粒在柱头上萌发,并长出一定长度的花粉管延伸到在花柱及子房中,但未见到花粉管到达珠孔端及进入胚囊。开花后1~2h,花粉管进入胚囊。在开花后4~5h,极核完成受精作用;开花后12h,卵细胞完成受精作用。

3.2 关于精细胞在胚囊中的移动

关于精子释放后是如何在胚囊中移动而最终到达卵细胞与极核的,一直是一个疑点。以前,有人认为精子是依靠花粉管释放时的冲力而移动的,也有人认为精子可以象动物精子及低等植物的精子一样可以在胚囊中游动而到达卵细胞与极核。最近,有的研究人员提出精细胞的移动可能与胚囊中独特的微丝分布有关^[12]。在花粉管到达之前,在精细胞至受精靶区的道路上存在2个肌动蛋白冠状结构,肌动蛋白冠从助细胞的中部延伸,1条在卵细胞核附近结束,另一条在极核附近结束^[13~17]。

肌动蛋白冠的形成,最初在不具有助细胞的白花丹的研究中发现,在花粉管进入胚囊的过程中,肌动蛋白束聚集在花粉管生长途径附近和精细胞传

送部位,结果在卵细胞与中央细胞之间的受精靶区形成“冠状”结构^[13]。后来,在其他一些具有助细胞的被子植物如烟草^[12]、玉米^[14,15]、蓝猪耳^[15,16]、和兰花^[17]等植物的研究中均有发现。肌动蛋白冠的形成对于促使卵细胞核和中央细胞核相互靠近配子融合部位,并使2个精细胞核分别与相应的雌配子核融合具有重要作用^[18]。

Zhang等^[19]认为,在精细胞由花粉管释放到胚囊后就与营养核分离,失去花粉细胞的内质膜,其表面仅存精细胞质膜,可以通过电荷引力吸附花粉管破裂所释放的肌球蛋白,它们与肌动蛋白冠相互作用而将精细胞运送至融合部位。

本研究在水稻胚囊中观察到的肌动蛋白冠状结构同以上所描述的冠状结构的形成的位置不太一样。当花粉管到达胚囊之前,在第二个助细胞(第一个已退化)内开始有肌动蛋白聚集,逐渐形成2个冠状结构。肌动蛋白冠起始与助细胞的基部,1条终止于靠近卵细胞核的位置,另一条终止于极核附近。花粉管通过珠孔进入退化助细胞的基部(靠近肌动蛋白冠的基部),释放出2个精细胞及其他一些内含物。精细胞最终通过肌动蛋白带的作用而被运送到靶区分别与卵细胞和极核完成受精作用。肌动蛋白冠将精细胞运送到靶区后,从助细胞的基部开始逐渐解体,助细胞也随之退化。

参考文献:

- [1] Akeminev M. Ueber das blühen des reises und einige sich daran anknüpfende erscheinungen[J]. Zeitschr f. Pflanzenzucht, 1914, 2: 339-375.
- [2] Terada S. Embryological studies in *Oryza sativa* L. [J]. J Coll Agric Hokkaido Imp Univ, 1928, 19: 245-260.
- [3] Cho J. Double fertilization in *Oryza sativa* L and development of the endosperm with special reference to the aleuron layer[J]. Bull Nat Inst Sci Ser D, 1956, 6: 61-101.
- [4] 吴素莹, 蔡起贵. 水稻双受精过程的细胞学观察[J]. 植物学报, 1965, 13(2): 114-121.
- [5] 黄群策, 向茂成, 季彪俊. 同源四倍体水稻双受精过程的细胞学观察[J]. 湘潭师范学院学报, 2000, 21(6): 84-87.
- [6] 李楠, 尹岭, 苏振伦. 激光扫描共聚焦显微术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1997: 1-11.
- [7] 任宏, 刘永胜, 孙敬三. 用共聚焦扫描显微镜检测观察水稻胚囊发育[J]. 植物学报, 1998, 40(9): 786-789.

- [8] 张华华, 冯九焕, 卢永根, 等. 利用激光扫描共聚焦显微镜观察同源四倍体水稻胚囊的形成与发育[J]. 电子显微学报, 2003, 22(5): 380-384.
- [9] 申家恒, 李慧荣, 李玉芬, 等. 玉米双受精过程的细胞学观察[J]. 植物学报, 1987, 29(5): 480-485.
- [10] 卫星, 申家恒. 星星草受精作用及其胚与胚乳早期发育的观察[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 31-37.
- [11] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 103-135.
- [12] Huang B Q, Russell S D. Fertilization in *Nicotiana tabacum*. cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. a hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion[J]. *Planta*, 1994, 194: 200-214.
- [13] Huang B Q, Pierson E S, Russell S D, *et al.* Cytoskeletal organization and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilization in *Phumbago zeylanica*[J]. *Zygote*, 1993, 1: 143-154.
- [14] Huang B Q, Sheridan W F. Actin coronasin normal and *Indeterminate gametophyte* L embryo sacs of maize[J]. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11: 257-264.
- [15] Huang B Q, Fu Y, Zee S Y, *et al.* Three dimensional organization and dynamic changes of the actin cytoskeleton in embryosacs of *Zea mays* and *Torenia fournieri*[J]. *Protoplasma*, 1999, 209: 105-119.
- [16] Fu Y, Yuan M, Huang B Q, *et al.* Changes in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization[J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12: 315-22.
- [17] Ye X L, Yeung E C, Zee S Y. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant[J]. *Phaius tankervilleae* *Planta*, 2002, 215: 60-66.
- [18] 邱义兰, 刘如石, 田惠桥. 被子植物受精过程中细胞骨架的动态变化[J]. 生命科学研究, 2005, 9(2): 105-110.
- [19] Zhang Z, Russell S D. Sperm cell surface characteristics of *Plumbago zeylanica* L. in relation to transport in the embryo sac[J]. *Planta*, 1999, 208: 539-544.

(上接第24页)

- [16] Smith M A L, Spomer L A. Vessel gels, liquid media and support system[C] // Aitken Christie J, Kozai T, Smith M A L. In *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 1995: 371-404.
- [17] Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*[J]. *Acta Horti*, 1995, 393: 111-118.
- [18] Tanaka M, Yoneyoma M, Minami T, *et al.* Micropropagation of phalaenopsis by using synthetic seeds in film culture vessel[M]. UK Glasgow: HMSO Publications Centre, 1993.
- [19] 何松林, 任凝辉, 潘会堂, 等. 高分子树脂膜培养容器在文心兰试管苗培养中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2002, 42(4): 93-96.
- [20] 陈青瑛, 范国成, 陈景耀. 植物组织培养节省成本的初步试验[J]. 福建果树, 1997(1): 3-7.
- [21] 吴毅明. 植物组织培养的环境调节研究进展[J]. 生态农业研究, 2000, 8(1): 73-75.
- [22] 古在丰树. 植物组织培养的新阶段[M]. 日本东京: 农山渔村文化协会, 1998.
- [23] 丁永前. 组培苗微生态环境中 CO₂ 控制的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.
- [24] 肖玉兰. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
- [25] 李传业, 滕光辉, 曲英华. 基于 PLC 的无糖组培微环境控制系统[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 30-34.