

~~58.6055~~

~~1106~~

细胞与组织培养

向近敏 朱宝莲 編譯

上海科学技术出版社

Q954.6-331
9302

12
(6)

细胞与组织培养

向近敏 朱宝莲 編譯

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本书簡明扼要地闡述了細胞与組織培养的基本理論与技术操作,可供很多学科(植物学,动物学,昆虫学,細胞学,病毒学等等)中的組織培养工作者参考,亦可作为訓練組織培养技术人員的教材。

細胞与組織培养

向近敏 朱宝蓮 編譯

上海科学技术出版社出版 (上海瑞金二路 450 号)

上海市书刊出版业营业許可証出 093 号

上海市印刷三厂印刷 新华书店上海发行所发行

开本 850×1156 1/32 印张 9 8/32 插頁 2 排版字数 229,000

1965年3月第1版 1965年3月第1次印刷

印数 1-6,000

統一书号 13119·638 定价(科六) 1.40 元

編譯者例言

組織培养技术,在广大的科学领域中,应用相当广泛,已成为胚胎学,細胞学,病毒学,病毒诊断学,实验病理学,医学遗传学,肿瘤学等研究工作中必須掌握的工具。迄今为止,国内关于細胞与組織培养技术方面的著作或譯作,还只有一二种,远不能满足现实的需要。至于同时涉及到組織培养的基本理論与技术方法的书籍,則尤属罕见。John Paul 所著《細胞与組織培养》一书的特点是簡明扼要,既有基本理論的叙述,也有基本操作的介紹,是一本可供参考又可作为教材的书籍。因而略加删节,編譯成书,介紹給从事細胞与組織培养工作的同志們。由于編譯者学識短浅,錯誤之处,在所难免,尚希讀者給予批評指正。

向 近 敏

湖北医学院 中国科学院武汉微生物研究所

朱宝蓮

湖北医学院

1965年1月

15/7/704

目 录

第 一 章 組織培养技术的发展	1
现代技术	6
第 二 章 細胞	10
細胞分裂	14
細胞类型与組織	18
第 三 章 細胞及其环境	25
温度	26
渗透压	26
氢离子浓度	27
其他无机电解质	28
必需的代謝物质	28
輔助的代謝物质	31
激素	32
其他特殊因素	32
支柱	32
因素間的相互平衡	33
第 四 章 培养細胞的生长与代謝	39
碳水化合物的代謝	39
合成代謝机制	42
蛋白质代謝	43
类脂代謝	44
核酸	45
結構因素	45
細胞生长的动力学	45
影响生长与代謝的特殊因素	48
第 五 章 培养細胞和組織所用的培养基, I. 天然培养基	54

血浆	54
胶原	59
生物性液体	60
組織浸液	61
其他生物性来源的培养基	64
第 六 章 培养細胞和組織所用的培养基, II. 合成培养基	68
平衡盐溶液	72
“不完全”和“完全”合成培养基	75
其他合成培养基	87
第 七 章 培养植物、昆虫及冷血动物組織的培养基	91
冷血动物組織培养	91
昆虫組織培养	93
植物組織培养	96
第 八 章 器皿的准备	100
玻璃器皿	100
玻璃器皿的清洁方法	101
第 九 章 預防污染——消毒	105
消毒方法	105
无菌物品的貯存	112
第 十 章 預防污染——无菌操作	114
从組織来的污染	114
从空气来的污染	115
由操作者引起的污染	116
第十一章 組織培养实验室的設備与設計	119
实验室的設備	119
实验室的設計	124
第十二章 組織来源	127
胚胎組織	127
成体組織	131
冷血动物和昆虫組織	135
植物組織	135
第十三章 原始組織块培养法	136

玻片培养	136
克氏瓶培养	140
試管培养	143
支持細胞生长的立体支柱	145
器官培养	146
組織碎片培养法	151
全胚培养	153
冷血动物組織培养	155
植物組織培养	155
第十四章 新鮮組織的分散方法	157
从新鮮組織制备細胞悬液	157
第十五章 細胞株	164
从单层培养制备細胞悬液法	166
琼脂斜面培养法	170
深层悬液培养法	173
細胞純系法	177
細胞株的特性	181
第十六章 組織移植——机体内細胞或組織培养	184
胚胎内組織移植	187
耐受性、“嵌合性”机体的組織移植	189
遗传性近似的宿主之間的組織移植	189
血管缺乏部位的組織移植	189
渗透性培养小室	191
射綫照射或皮质酮处理后的动物的組織移植	192
腹水瘤	194
第十七章 活細胞組織的保管,儲存与輸送	197
第十八章 形态学研究	201
組織培养标本的固定染色技术	202
灌注培养室	210
定量光学检查法	214
第十九章 定量代謝研究与检查	219
实验設計	219

測定試驗物质的毒性·····	221
定量試驗中的材料准备法·····	223
定量标准·····	224
电动細胞計算器·····	226
細胞容积·····	227
湿重与干重的測定·····	227
細胞活力測定·····	228
代謝研究·····	229
培养基的分析·····	230
第二十章 病毒学及宿主和寄生物之間的关系 ·····	235
組織培养在病毒学方面的应用·····	235
应用組織培养法制备疫苗·····	242
附录:	
1. 动物与植物組織培养技术的发展·····	249
2. 昆虫組織培养的发展·····	250
3. 植物組織培养研究的现况和展望·····	253
4. 組織培养技术对几門生物学发展的貢獻·····	262

第一章 組織培养技术的发展

組織培养技术，是从上世紀所用的某些胚胎学技术发展而来的。1885年，W. Roux 以温盐水保存鸡胚髓板的活力达数天之久，可算是第一次組織块移植成功的例子。1887年，Arnold 以赤杨的髓质小块包埋于蛙体内，当此小块被白血球浸潤后，取出置于温盐水中，也观察到細胞的游走，并且能短时存活。

上述两个試驗的完成，是走在时代的前面的。关于离体动物組織在有利条件下能存活較长时间的可能性，到1898年才加以研究，当时 Ljunggren 証明人的皮肤組織在腹水中儲存后，取出进行移植，还能存活多日。

1903年，Jolly 成功地观察到培养細胞的存活与分裂，以悬滴法維持蝶螈白血球存活达一月之久。1906年，Beebe 与 Ewing 进一步运用玻片悬滴培养法以无敏感性动物的与有敏感性动物的血作培养基，成功地培养了有传染性的狗淋巴肉瘤細胞。

这些三四十年前所用过的試驗法，至今还很普遍地运用着。以前，由于不能得到滿意的培养基，所以試驗很难重复，因而对于健康組織的存活现象，是真正地生活着，还是細胞死亡的延迟，尙属疑問。

1907年，Ross Harrison 将蛙胚髓管部的小片組織，培养于蛙淋巴凝块中，观察到細胞的正常活动功能。在无菌条件下，移植組織能存活数周，并有神經軸索从細胞伸展出来，才公认为这是組織培养法真正的开始。此一試驗，不但解决了当时关于軸索起源不同意见的論爭，同时还开辟了試管内培养活組織这一实验方法的无限远景。

此后，組織培养技术有很快的发展与改进。Burrows 与 Harrison 一起进行研究时，应用血浆凝块代替淋巴凝块。Burrows 与

Carrel 对組織浸液与生长的关系进行了研究。Carrel 发现鸡胚浸液对多种細胞的生长有高度的促进作用，因而以血浆包埋組織块再輔以鸡胚浸液的方法，成为組織培养的标准技术。当时 Harrison 所用的凹玻片盖片悬滴法，简单方便，至今犹在应用。

过去組織培养中最困难的一点，是如何避免細菌污染的問題。Alexis Carrel，一个在实验外科上有成就的科学家，对組織技术的发展有不少卓越的贡献。他有丰富的无菌外科知識，他在进行組織培养工作时，如同作外科手术一样地小心翼翼，因而，能够經常获得成功的結果。典型的例子是他在沒有利用抗菌素的情况下，仅仅依靠他細致而緩慢的操作，使一个細胞連續传代，保持組織存活达 34 年之久，这是一种惊人的成績。Carrel 証明了动物細胞毫无疑问地可以在試管中无限制地永远生存下去。不幸，他所应用的这种严格的无菌外科学方法，使很多生物学者认为組織培养技术是非常困难的，因而不敢采用。这种畏难情緒，直至近年方才消除。

Carrel 学派的主要贡献之一，是能使生长分裂很快的細胞得到长时期的連續培养。这一成就指出了培养細胞和培养原生动动物或微生物一样，都具有可能性。这一思潮是特別吸引人的，有許多学者即应用了大量細胞，进行新陈代謝的研究。由 Wilton Earle 领导的美国国立肿瘤研究所的一个小組，对于当前細胞培养方法的完善，作出了較多的贡献。Earle 等首先使細胞直接在玻壁上大量地生长，并首先成功地完成单細胞培养及細胞深层悬液培养。

1914 年，David Thomson 着手进行了組織培养的另一種手段。以后，Strangeways 与 Fell 等又加以发展。他們改变了使細胞很快生长的办法，設法使小块組織活力的維持，尽可能接近于机体状态，这就是所謂器官培养法。这一方法，在許多方面都是 Harrison 原来試驗的直接延續。Fell 及其同事利用器官培养技术，在胚胎发生学及內分泌学方面，作出了很多重要的实验报告。

在动物組織培养发展的早期，Warren 与 Margaret Lewis 等开始了对細胞生长与存活所必需的营养素的研究(1911~1912)，

Baker 与 Carrel 也对培养基的組成进行了研究,并试图以分析的方法鉴定其重要成分。Fisher 也继续了这样的研究工作。近年来,有更多的学者如 Parker, Healy, Morgan, White, Waymouth, Eagle 等进行了培养基成份的研究,結果产生了当前所用的多种合成培养基。

植物組織培养与动物組織培养各自发展。只是在近年来,这两个領域才开始互通声气。植物組織培养,本来是 Haberlandt 于 1902 年首先提出的,但他的意图没有得到实现即被放弃。到 1921~1922 年才由 Molliard、Kotte 与 Robbins 等先后获得成功。他們成功地維持根的存活达数周之久。直到 1930 年左右,White 与 Gautheret 发明了适当的培养基,才能使植物組織培养技术有所发展,并且很快地創用了培养植物組織的合成培养基。

組織培养法的实际意义,即使在最早期,也未被忽视,它对形态发生学、肿瘤学和病毒学等方面的意义,也很早就得到重视。唯一的阻碍,还是由于技术本身的困难。虽然如此,胚胎学家及組織学家們从最初就累集了有价值的資料,而肿瘤学的研究工作,也在可靠的方法发展之前就开始了。在病毒学及生物化学方面,本来由于方法的困难而未获得早期的进步,但近来由于技术的改进,組織培养法的应用,在这两个領域中也有很快的发展。

Steinhardt, Israeli 与 Lambert 等在 1913 年即观察到牛痘病毒,能在培养的角膜組織中存活数周。1925 年 Parker 与 Nye 又証明牛痘病毒能在兔睪丸組織培养中生长繁殖。以后 Carrel、Rivers 等相继报告了牛痘病毒及 Rous 肉瘤病毒的培养情况。

1928 年, Maitland 与 Maitland 发明了培养病毒的最简单的組織培养法,即将組織块加入液体培养基中即可。这一简单方法,导致很多有趣的研究。但是,直到 1948 年,由于 Enders 等的报告,才使組織培养法在病毒学中发挥其最大的作用。他們証明脊髓灰白质炎病毒,在非神經組織的培养中,可以生长繁殖。这一报告刚好出现在組織培养法已有較大改进的时候,因此,在病毒学领域中,应用組織培养技术的人迅速增加,致使近十余年来,病

毒学有了突飞猛进的发展。

原始的組織培养技术,完全是一种試管內的組織块移植法。到1940年以后,人們对以活机体培养动物組織的方法即組織移植法,尤其是在肿瘤研究方面,发生了很大的兴趣。原始的机体組織移植术,在許多方面与試管內組織培养很相似。在1890年左右就有許多学者如 Born、Harrison、Morgan 等开始了这一工作。1912年 Murphy 接种絨毛尿囊膜于鸡胚获得成功,并应用X綫照射嚙齿动物,使异种間的組織移植也获得成功。与此同时,很多学者如 Ruben, Hegener, Keysser 等都将組織移植于动物眼前房获得成功,这是从前的研究者所未能做到的。这些实验直到近来才引起重視。Murphy 的技术在1930年及以后为 Goodpasture 及Dagg 与 Harris 等所发展, Greene 也使眼前房技术有所发展。Toolan 对組織移植作出了很大的贡献。她除了采用X綫照射外,还应用了考的松以抑制宿主对移植組織的反应。以后由于 Medawar 的研究,对于同种移植反应有了很多的了解。由于不少学者已经开始对培养的細胞与組織移植到动物体后的活动情况进行研究,因而使动物細胞的培养工作与移植工作,紧密地結合起来。

参 考 文 献

- ARNOLD, J. (1887). Ueber Theilungsvorgänge an den Wanderzellen, ihre progressiven und retrogressiven Metamorphosen. *Arch. mikr. Anat.* 30, 205.
- BEEBE, S. P. & EWING, J. (1906). A study of the biology of tumour cells. *Brit. med. J.* ii, 1559.
- BURROWS, M. T. (1910). The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body. *J. Amer. med. Ass.* 55, 2057.
- BURROWS, M. T. (1911). The growth of tissues of the chick embryo outside the animal body, with special reference to the nervous system. *J. exp. Zool.* 10, 63.
- BURROWS, M. T. (1912). A method of furnishing a continuous supply of new medium to a tissue culture in vitro. *Anat. Rec.* 6, 141.
- CARREL, A. (1912). The permanent life of tissue outside of the organism. *J. exp. Med.* 15, 516.
- CARREL, A. (1913). Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. *J. exp. Med.* 17, 14.
- CARREL, A. (1913). Neue Untersuchungen über das selbständige Leben der Gewebe und Organe. *Klin. Wschr.* 5, 1097.
- CARREL, A. & EBELING, A. (1922). Pure cultures of large mononuclear leucocytes. *J. exp. Med.* 36, 365.

- CARREL, A. & BAKER, L. E. (1926). The chemical nature of substances required for cell multiplication. *J. exp. Med.* **44**, 503.
- ENDERS, J. F., WELLER, T. H. & ROBBINS, F. C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* **109**, 85.
- GAUTHERET, R. J. (1934). Culture du tissu cambial. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **198**, 2195.
- GREENE, H. S. N. (1941). Heterologous transplantation of mammalian tumours. I. The transfer of rabbit tumours to alien species. *J. exp. Med.* **73**, 461.
- HABERLANDT, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *S.-B. dtsh. Akad. Wiss., Kl. med. Wiss.*, **111**, 69.
- HARRISON, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **4**, 140.
- HARRISON, R. G. (1912). The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study. *Anat. Rec.* **6**, 181.
- HARRISON, R. G. (1928). On the status and significance of tissue culture. *Arch. exp. Zellforsch.* **6**, 4.
- JOLLY, J. (1903). Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* **55**, 1266.
- KOTTE, W. (1922). Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitr. allg. Bot.* **2**, 413.
- LEWIS, MARGARET R. & LEWIS, W. H. (1911). The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl, and NaHCO₃. *Anat. Rec.* **5**, 277.
- LEWIS, MARGARET R. & LEWIS, W. H. (1911). The growth of embryonic chicken tissues in artificial media, agar and bouillon. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **22**, 126.
- LEWIS, MARGARET R. & LEWIS, W. H. (1912). The cultivation of sympathetic nerves from the intestine of chicken embryos in saline solutions. *Anat. Rec.* **6**, 7.
- LOEB, L. (1902). On the growth of epithelium in agar and blood-serum in the living body. *J. med. Res.* **8**, 109.
- MAITLAND, H. B. & MAITLAND, M. C. (1928). Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet* **215**, 596.
- MAXIMOW, A. (1925). Tissue cultures of young mammalian embryos. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **16**, 47.
- MOLLIARD, M. (1921). Sur le développement des plantules fragmentées. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* **84**, 770.
- MURPHY, J. B. (1913). Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. Its bearing on questions of tissue specificity and tumour immunity. *J. exp. Med.* **17**, 482.
- PARKER, F. JR. & NYE, R. N. (1925). Studies on filterable viruses. I. Cultivation of vaccine virus. *Amer. J. Path.* **1**, 325.
- RIVERS, T. M. & WARD, S. M. (1935). Jennerian prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccine virus. *J. exp. Med.* **62**, 549.
- ROBBINS, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.* **73**, 376.
- ROUX, WILHELM (1885). Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. *Z. Biol.* **21**, 411.
- STEINHARDT, E., ISRAELI, C. & LAMBERT, R. A. (1913). Studies on the cultivation of the virus of vaccinia. *J. infect. Dis.* **13**, 294.

- TOOLAN, HELENE, W. (1954). Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. 1; H.Ep. 1; H.Ep. 2; H.Ep. 3; and H.Emb.Rh. 1. *Cancer Res.* 14, 660.
- WHITE, P. R. (1932). Plant tissue cultures. A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems. *Arch. exp. Zellforsch.* 12, 602.

现代技术

现在应用的組織培养技术是各式各样的。现将其中最常用的表示如图1。最简单的一种是把一小块組織固定于盖片上,然后悬浮于凹载片上,盖片周围封以石蜡。这一技术非常容易,对于进行大量的小块新鮮組織培养的短程試驗,是极为方便的。应用含有刺激生长因素的培养基以及經常传代移植,这一方法能使組織一代一代的生长下去。Carrel 就以此法維持一个鸡胚的細胞株几乎达40年之久。但是应用这一方法維持組織长期存活,需要很大的耐心与很多的实际操作,并且很难維持組織細胞的緩慢生长,因为这样,培养基需要不断更换,但又要避免对組織的損害。为了使組織存活較长时期而不移植,可使用双层盖片法。应用凹玻片有一缺点,即不便进行显微鏡观察。所以曾設計多种特殊玻片,如穿孔玻片与金属載片等,以便于用分相显微鏡及干扰显微鏡等检查活細胞。

为了作器官培养,因而发展了特殊技术,特別是Strangeways与Fell等采用了表玻片培养技术,即將組織块固定于表玻片底部,将表玻片置于平皿內浸湿的棉花上。其他形式的器官培养技术,如应用拭鏡紙或人造纖維网作为組織生长的支架等,都是从上列方法演变而来的。

在鏡检要求不是非常必需的情况下,試管法也是很方便的。常用于保存組織細胞和病毒以及生化檢驗等。試管法或为靜止,或为轉动,两者都可。

如需作大量的組織培养,以便进行形态学的观察,則飞片試管法是很方便的。將組織块固定于长条盖片上,然后放入有适量培

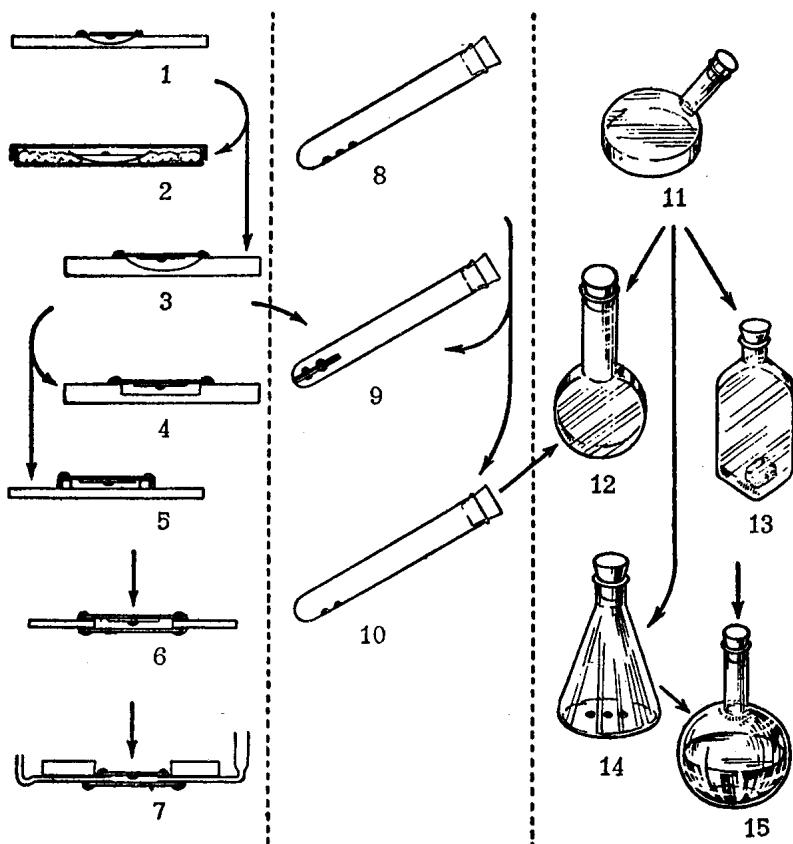


图1 用于细胞及组织培养的器皿

1. Harrison(1907)凹玻片； 2. Strangeways与Fell(1926)表玻璃； 3. Maximow (1925) 双盖玻片； 4. 位相玻片； 5. 玻璃或金属环； 6. 穿孔金属玻片； 7. Pomerat (1951) 灌注培养室； 8. Strangeways 与 Fell (1926) 简单试管； 9. 飞盖玻片(Pomerat)； 10. Carrel Gey (1933) 旋管； 11. Carrel (1923) 瓶； 12. Porter (1947) 旋转瓶； 13. Earle (1947) T 字瓶； 14. Parker (1936) 瓶； 15. Earle(1955)振荡瓶

养液的试管中，作转管或静止培养，这对于显微照相及摄制电影影片甚为方便。

为了不同的目的，设计了多种多样的试管。如便于进行同位素试验而用 Geiger 计算器时，则用旁边有一小窗的试管；如须作

培养組織的化学分析时,可用一端帶有微試管的試管。

原来的 Carrel 培养瓶, 目的在于維持組織存活一定的时间, 并使鏡检方便。现在 Carrel 培养瓶几乎只用于建立細胞株的起始, 其他方面已很少应用。其他形式的培养瓶則应用甚广。Earle 的 T 字瓶是为了培养大量細胞而設計的, 瓶的內面很平, 有良好的鏡检效果。一般的 Roux 瓶、Erlenmeyer 錐瓶及青霉素瓶, 皆可应用。

最近发明了用普通圓底瓶同时运用振蕩, 可作大量細胞的深层培养的方法。其他的方法, 如搅拌法或快速轉管法等, 也都有所应用。

除了以上的方法外, 还有很多其他的技术, 如各种不同的帶有微小培养室的載片, 非常便于在一定時間更換营养, 并連續不断地摄制电影照片。

所有上述技术, 在生物学研究中有广泛的应用。当然, 只能說, 某些技术在某些領域中是常用的。但不能說, 某一問題的研究, 只能应用某一技术。一般說来, 各种方法在某一特別領域中, 都有其一定的价值, 如 Harrison 的原始悬滴培养法, 在现代, 对电子显微鏡观察动物細胞方面, 仍是一种好的方法。同样, 器官組織培养技术, 本来是胚胎学者的一个典型方法, 但现在很广泛地应用于研究病毒与宿主細胞之間的关系問題上。

由于上列事实, 加以各种組織培养技术都有其共同的原理, 所以, 融各种各样技术于一炉的組織培养方法, 已成为生物技术科学中的一个主要支系。

参 考 文 献

- BISCEGLIE, V. & JUHASZ-SCHAFER, A. (1928). *Die Gewebezuchtung in Vitro*. Berlin: Springer.
- BUCHSBAUM, R. & LOOSLI, C. G. (1936). *Methods of tissue culture in vitro*. Chicago: University Press.
- CARREL, A. & LINDBERGH, C. A. (1938). *The culture of organs*. New York: Hoeber.
- CAMERON, GLADYS (1950). *Tissue culture technique*. 2nd ed. New York: Academic Press.
- CRACIUN, E. C. (1931). *La culture des tissus en biologie experimentale*. Paris: Masson.

- EARLE, W. R. (1948). *Tissue culture. Laboratory technique in biology and medicine*. Cowdry. Baltimore: Williams and Wilkins.
- EPHRUSSI, B. (1932). *La culture des tissus*. Paris: Gauthiers-Villars.
- FISCHER, A. (1946). *Biology of tissue cells*. New York: Hafner.
- FISCHER, ILSE (1942). *Grundriss der Gewebezuchtung*. Jena: Fischer.
- KIMURA, R. (1953). *Tissue Culture*. Copenhagen: Munksgaard.
- LEVI, G. (1928). Gewebezuchtung. In *Methodik der wissenschaftlichen Biologie*, ed. T. Peterfi. Berlin: Springer.
- LEVI, G. (1934). Explantation, besonders die Struktur und die biologischen Eigenschaften der in vitro gezüchteten Zellen und Gewebe. *Ergebn. Anat. EntwGesch.* **31**, 125.
- MERCHANT, D. J., KAHN, R. H. & MURPHY, W. H. (1960). *Handbook of Cell and Organ Culture*. Minneapolis: Burgess.
- MURRAY, MARGARET R. & KOPECH, GERTRUDE (1953). *A bibliography of the research in tissue culture*. New York: Academic Press.
- PARKER, R. C. (1950). *Methods of tissue culture*. 2nd ed. New York: Hoeber.
- PIGG-STRANGEWAYS, T. S. (1924). *The technique of tissue culture*. Cambridge: Heffer.
- POMERAT, C. M. (1951). *Tissue culture methods*. In *Medical Research*, ed. M. B. Visscher. Chicago: Year Book Publishers.
- SCHERER, W. F. ed. (1955). *An Introduction to Cell and Tissue Culture*. Minneapolis: Burgess.
- VERNE, J. (1937). *La vie cellulaire hors de l'Organisme*. Paris: Douin.
- WHITE, P. R. (1943). *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster, Pa.: Cattell Press.
- WHITE, P. R. (1954). *The cultivation of animal and plant cells*. London: Thames and Hudson. New York: Ronald Press.
- WHITE, P. R. ed. (1957). Decennial Review Conference on Tissue Culture. *J. nat. Cancer. Inst.* **19**.
- WILLMER, E. N. (1954). *Tissue culture; the growth and differentiation of normal tissues in artificial media*. Methuen's Monographs on Biological subjects. 2nd ed. London: Methuen. New York: Wiley.