

如以 C 表示染色体的全长; l , 为长臂; s , 为短臂。长臂和短臂的臂比为 r ; 长臂和短臂的差分为 d , 则可得下面一些简单的公式表示:

$$r = \frac{l}{s} \quad d = l - s$$

两臂之间的比例还可用“着丝点指数”(i) 表示:

$$i = \frac{100s}{C}$$

他们根据臂比(r) 的数值, 将染色体的着丝点位置划分出两点和四区: 中间点(M), r 值(臂比) 为1.0; 中间区域(m), 1.0—1.7; 近中区域(sm), 1.7—3.0; 近端区域(st), 3.0—7.0; 末端区域(t), 7.0— ∞ ; 和末端点(T), r 值为 ∞ 。

作染色体组型分析时, 除了上述的鉴定特

征以外, 尚需观察染色体是否具有随体和副缢痕(如存在) 的位置。

染色体组型分析, 多用体细胞有丝分裂中后期的染色体。这可用根尖压片进行观察, 也可用茎端(实际为叶原基或幼叶) 的分裂细胞, 这在树木的细胞分类学中应用较广。另外也可利用小孢子分裂成二核时的染色体图象, 由于这时染色体数目只有体细胞中的一半, 更便于观察。还有裸子植物可利用其胚乳(雌配子体) 的单倍染色体。至如被子植物的幼胚和胚乳(三倍体) 等, 近年也已常用作分析。当然, 如玉米还可利用减数分裂粗线期的染色体进行分析, 并可作基因定位等等。

上面只简单的谈了一些染色体形态的组型分析, 有关染色体形态的还有倍性分析, 以及其他各种变化, 例如性染色体, B-染色体等等, 拟待以后介绍。

活试管—应用蛙卵活细胞系统研究基因表达

陆荣华 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

当人们提到实验胚胎学时, 总是要联系到两种有贡献的生物材料: 蛙卵和海胆卵。尤其是前者, 对发育生物学的基本问题如极性、梯度、场区、诱导、再生、分化以及核质关系等研究作出了贡献。对这些问题的研究, 蛙卵系统有其独特的优点, 这是众所周知的。

当今, 生物大分子功能的研究是分子生物学的一个重要课题。但是, 研究生物大分子的功能及其在细胞内的行为, 仅藉无细胞系统是不能完全解决的, 这就需要有一个理想的活细胞系统。在温育培养的条件下, 生物大分子能进入活细胞, 但进入量少并且易于分解。如用显微注射的方法将纯化的生物大分子注入一个活细胞内, 则是探求生物大分子生物学功能及其

在细胞内行为的一个理想途径。

Gurdon 等(1971)^[1] 首先应用爪蟾(*Xenopus*) 卵子和卵母细胞作为活细胞系统研究信息核酸的转译。爪蟾卵体积大, 适于显微注射及定量导入所要研究的物质, 发育的卵更适宜作特殊问题的研究, 它们的发育潜力使得注入的分子能分布于不同类型的特殊细胞中。而且, 对导入的物质无种属局限。蛙卵系统的独特优点被人们充分地利用。近几年来, 通过显微注射将生物大分子DNA、mRNA以及蛋白质导入蛙卵内, 观察到DNA的复制和转录, mRNA的转译以及蛋白质(如组蛋白) 在活细

本文承陈瑞铭教授热情指导和帮助, 谨致感谢。

胞内的生物学行为。最近, Gurdon等(1976)^[2]将HeLa细胞核注入爪蟾卵母细胞内,他们在注入核的卵内检测到来源于HeLa细胞的几种蛋白,同时导入转录阻抑物,证明了这些蛋白是由于HeLa细胞核的基因转录进而在卵内转译所致。近年来,很多实验证明蛙卵是研究基因表达、调控的较为满意的活细胞系统,所以被誉为“活试管”也理所当然。本文拟从上述的问题作一简述。

卵细胞生物学特征

两栖类卵子发生已被深入研究,尤其是爪蟾卵子发生的形态学和生化学的研究资料更为丰富。我们通常所说的卵母细胞(oocyte)有生长卵母细胞(growing oocyte)和成熟卵母细胞(maturation oocyte)之分。生长卵母细胞是长在卵巢内的,以包含一个大的核(生发泡)和卵周裹有数千个很小的卵泡细胞为特征。其核内具有RNA合成非常活跃的成千个核仁和灯刷状染色体。成熟卵母细胞是指已从卵巢内跌出、暂存腹腔或进入输卵管的卵母细胞,卵周已无卵泡细胞包裹,其核处于第一次成熟分裂状态,进入输卵管后卵周被裹上胶膜。这类卵母细胞由母体排出体外后即称卵子(egg),等待受精。Dumont(1972)^[3]将发育的卵母细胞按其体积大小分成六个时期,每个时期有其独特的形态特征和生化特征。卵内含有DNA聚合酶、RNA聚合酶、tRNA、丰富的氨基酸以及90%呈游离状态的核糖核蛋白体。卵母细胞主要合成RNA,卵子主要合成DNA。因此,蛙卵活细胞系统为外源基因和信息分子的复制、转录及转译提供了良好的条件。

应用卵母细胞作注射实验,多数工作者是采用Gurdon等(1971)^[1]的方法:将卵母细胞置于载玻片上,在气相内进行注射。我们将卵母细胞置于一小片生理盐水湿润的粗滤纸上进行注射,这样可避免卵表面干燥而受损伤,也有利于手术后卵母细胞的搬迁。卵子的注射

操作在液相内进行。卵母细胞的生发泡和裹在卵周的卵泡细胞, RNA合成十分旺盛,将卵母细胞的卵泡细胞去除并进一步藉显微手术排除生发泡,从而为注入核或DNA的转录研究提供一个RNA合成背景低的实验系统(Ford等, 1977)^[4]。

毒性实验确定了能被卵母细胞及卵子所接受的外源大分子的剂量。受精卵比卵母细胞敏感,一般取决于其是否能发育成正常的蝌蚪来确定注入分子的剂量极限。一个爪蟾卵所耐受的最大剂量范围, DNA约为1-4ng, 蛋白和RNA为10-20ng($\sim 10^{11}$ 分子), 注入液体的体积一般在40-50nl^{[5][6]}

卵细胞系统能以正常的方式接受注入的生物大分子并且这些注入的生物大分子(核酸和蛋白)在卵内活跃地表现出生物功能。某些注入的mRNA连接到多聚核糖核蛋白体上。珠蛋白mRNA在卵内的转译功能竟达两周以上。将 ^{125}I 标记的组蛋白注入卵母细胞和卵内,通过放射自显影追踪,对组蛋白在卵细胞内正常分布趋势进行了观察。证明标记的组蛋白在卵母细胞的核内呈现惊人的积聚,注入后12小时,组蛋白在核内的浓缩大于细胞质100倍。在卵内的正在分裂的核和中期染色体上均能找到注入的 ^{125}I 标记的组蛋白。这些实验说明,注入的生物大分子大部分并不被卵排除或分解,而是在卵细胞系统内以正常方式表达其功能和行为。

真核细胞核基因转录

真核细胞的细胞核包含了细胞的极大部分的遗传物质,核内基因的表达决定了细胞的生物学特性。利用蛙卵细胞研究其他真核细胞核基因的表达是颇为巧妙的一个途径。

采用诱导细胞融合剂溶血卵磷脂(Lysol-ecithin)和牛血清白蛋白适当地控制细胞解体,可以制备大量具活性的、供注射用的HeLa细胞核。一次显微注射(40nl)即能给爪蟾卵母细胞导入200多个细胞核,注入卵母细胞的

HeLa细胞核, 体积逐渐增大, 染色质分散, 核仁消失。如将该核注入卵母细胞生发泡内或注入一个卵母细胞生发泡被刺破的核液中, 则注入核体积增大最甚, 有时可达500倍, 形态上相似卵母细胞生发泡⁷。随着注入的HeLa细胞核体积的增大, 其核内的RNA合成速率增加。HeLa细胞核内的RNA和蛋白向卵质内释放, 同时卵质内的非组蛋白以及注入的¹²⁵I标记的组蛋白被HeLa细胞核摄取, 卵质内蛋白与注入的HeLa细胞核内蛋白发生交换¹²。注入卵母细胞或注入去除生发泡的卵母细胞的HeLa细胞核所合成的RNA, 部分是mRNA, 这些mRNA从核内释放到卵质内, 从而进一步转译成新的蛋白。这些新合成的蛋白是专属于HeLa细胞的, 在爪蟾卵母细胞中从不出现¹⁸ (9)。他们从三个方面证实新蛋白的合成确实是由HeLa细胞核发生mRNA转录并进一步在卵质内转译所致。首先, HeLa细胞核注入后, 并不立即出现新蛋白合成。注核后的卵母细胞在培养三天后才见新蛋白的合成。这可以排除由于伴随核注入时, 核周所带的胞质mRNA之转译作用。其次, 新蛋白的合成可被转录的阻断物 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)所抑制。再则, 从HeLa细胞中分离RNA, 而且十倍过量注入卵母细胞内, 并未导致新蛋白的合成。

借助蛋白双向电泳技术业已确定爪蟾卵母细胞、爪蟾成体肾的体外培养细胞以及蝾螈(*Pleurodeles waltli*)卵母细胞的基因活性是不同的, 各自都有其专一蛋白的合成。将爪蟾的体外培养的成体肾细胞核注入蝾螈卵母细胞内, 培养数天后, 在蝾螈卵母细胞内检测到爪蟾卵母细胞的专一蛋白, 但未能检测到爪蟾体外培养的成体肾细胞专一蛋白。这一结果不仅显示了卵母细胞具有某些成分能使那些在正常发育过程中显然已不活跃的基因重新激活得以表达。而且提示了这种“开关”作用的选择性。因为并非注入核的所有基因均有表达。¹²⁰ Texanum蝾螈(*Ambystoma texanum*)肝细胞核注入美西螈(*Ambystoma mexicanum*)

卵母细胞后, 能合成肝细胞和卵母细胞的乳酸脱氢酶(LDH), 而不能合成肝细胞特有的产物——醇脱氢酶(ADH)。卵质显示了对注入核合成活性的调节。¹²¹

卵质对移植核活性的改变在另一些实验中也能见到。成体蛙脑细胞核经注入生长的爪蟾卵母细胞后, 注入的脑细胞核的体积增大并且合成RNA; 注入成熟卵母细胞内, 即见脑细胞核核膜消失, 染色体浓缩; 注入卵内, 脑细胞核合成DNA。这提示了一个已分化的细胞核被移植至发育程度不同的卵细胞系统内, 核活性的改变。这种核活性的改变可理解为受卵细胞质所控制¹²¹ (13)。

纯化基因(DNA)的复制和转染

基因表达调控机理的研究, 需要有效地检测纯化的基因(DNA)所携带的遗传信息, 以及调控分子对基因表达的影响。虽然已经有不少体外转录系统被设计和应用于该问题的研究, 但是, 由于某些原因, 仍不能满足研究的需要。蛙卵发生过程的生物化学研究说明卵母细胞能活跃地进行RNA的合成, 因而启发人们将遗传物质导入蛙卵细胞, 研究其复制和转录的特点。

Gurdon等(1969)¹⁴¹首先将纯化的DNA注入卵和卵母细胞, 证明卵中存在有DNA复制所需要的各种成分。De Robertis等(1977)¹⁵¹进一步研究证实外源DNA注入卵和卵母细胞后, 会促进转录, 并产生相应的转录产物。为了区别在卵母细胞内新合成的RNA究竟是注入的DNA模板的转录物, 还是内源遗传物质的转录物, Colman(1975)¹⁶¹用人工合成的多聚核苷酸进行研究, 他将分子量 $0.5-1.5 \times 10^6$, 含800—2400核苷酸对的Poly[d(A-T)·d(A-T)]注入爪蟾的卵和卵母细胞, 用高压电泳证明产生了新的转录物Poly[r(A-u)], 此转录物的长度为30—2000核苷酸。他们还证明Poly[d(I-C)·d(I-C)]注入卵内也被转录, 而Poly(dG)·Poly(dC), Poly(dA)·Poly(dT),

Poly(dA)均不能转录。

卵细胞中纯化 DNA 的转录具有很高的忠实性。将爪蟾红细胞 5S DNA (编码 5 SrRNA) 注入卵母细胞核内, 杂交实验证明, 所产生的 ^3H -RNA 能和 5S DNA 的编码链(L链)杂交, 而不能与非编码链(H链)杂交, 说明卵母细胞核能正确识别双链 DNA 中的编码链进行转录^[17]。小鼠卫星 DNA 在小鼠细胞内是不转录的, 此 DNA 在注入卵中后也不发生转录。 $\Phi\text{X174-RF1}$ 的 DNA 在卵母细胞中产生的专一转录物, 其 90-95% 是以 DNA 的“负”链为模板的, 这和 ΦX174 在 E·Coli 中转录相同, 说明卵细胞系统内, 外源 DNA 的转录, 具有正确的模板选择^[18]。实验已证明, 将 ^{125}I 标记的 DNA 注入受精卵后, 一部分放射性出现在某些卵细胞核内, 并结合到染色体上, 因而推测可能有部分注入的 DNA 浓集在卵细胞核内, 或是 ^{125}I 从注入的 DNA 上脱落, 被宿主细胞重新利用^[4]。

卵母细胞对外源 DNA 的转录可持续较长时间。将 SV40 的双链环状 DNA 注入卵母细胞核内, SV40 专一的 RNA 的合成至少可进行五天, 但如果将 SV40 DNA 注射在卵母细胞的胞质内, 则病毒专一 RNA 的合成不能发生^[18]。

卵母细胞系统不但能转录纯化的基因, 而且被卵母细胞转录产生的 mRNA 在卵内能被进一步转译成蛋白质, 成为外源 DNA 转录—转译偶联的实验系统。De Robertis 和 Mertz (1977)^[19] 将 SV40 DNA 注入卵母细胞核内, 经过培养、标记, 用等电点聚焦—凝胶双向电泳检测到两种病毒专一的蛋白 VP₁ 和 VP₃。De Robertis 还证明编码果蝇组蛋白的无性繁殖质粒 DNA 在卵内能产生类组蛋白。Rungger 和 Türler (1978)^[20] 进一步证明 SV40 DNA 在卵母细胞中通过转录—转译偶联作用产生病毒专一的肿瘤抗原: T 抗原和 t 抗原; 多瘤病毒 DNA 在卵母细胞中通过转录—转译产生两种多瘤病毒专一的肿瘤多肽抗原和一种外壳蛋白。

Trendelenburg 和 Gurdon (1978)^[21] 用电镜直接观察了爪蟾核糖体基因 (rDNA) 在卵母细胞核内的转录。他们将无性繁殖的 rDNA 和质粒 PMBg 重组分子注入卵母细胞核内, 电镜观察到重组 DNA 分子成环状, 并装配成染色质, 而且有串珠状的核小体结构。同时, 在电镜下观察到一些染色质环上出现逐渐加长的新生 rRNA 纤维。最近, De Robertis 和 Olson (1979)^[22] 利用蛙卵母细胞研究酵母酪氨酸 tRNA 基因表达的分子生物学。无性繁殖的酵母酪氨酸 tRNA 基因, 在卵母细胞核内被转录和加工。其转录的初级产物在 5' 端有一个引伸的片段, 但酪氨酸 tRNA 基因家属的各个成员的转录产物之 5' 端引伸片段, 其长度和核苷酸顺序不完全相同, 有的可能是 19 核苷酸长, 以 pppA 为开头核苷酸。此初级转录产物在卵母细胞内继续接受加工, 包括碱基修饰, 在 3' 端加上 ccA 末端, 插入顺序的切除和 tRNA 分子的重新连接。实验还说明蛙卵内生产 tRNA 的酶不是种属专一的, 它们也能正确识别酵母基因。这些酶包括 RNA 聚合酶 III, RNA 酶 P, RNA 甲基化酶, tRNA 核苷酸转移酶 (CCase) 和连接酶。

信息核糖核酸 (mRNA) 的转译

信息核糖核酸 (mRNA) 的转译受到多种因子的控制, 这种转译水平的调节是基因表达调控的重要环节之一。利用活细胞系统转译外源 mRNA, 并研究各种转译控制分子的作用, 是一个颇受重视的途径, 而爪蟾和其他蛙的卵细胞是一个合适的材料。

Lane 等 (1971)^[23] 将从兔网织细胞分离的 4S、5S、9S、18S 和 28S RNA 及多聚核糖体分别注入爪蟾卵母细胞, 在含标记氨基酸的培液中培养后, 检查卵母细胞中新合成的蛋白质性质, 发现 9SRNA 和多聚核糖体能在卵母细胞内转译产生血红蛋白样的蛋白, 此转译产物在 Sephadex G-100 凝胶层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳中具有与血红蛋白相同的层析、电

泳行为,在羧甲基纤维素层析中可分离到珠蛋白的 α 链及 β 链,将此转译产物经胰蛋白酶消化后,在阳离子交换树脂上层析分离,可以得到与载体血红蛋白消化液基本重合的图形。9S RNA在卵母细胞中是极为稳定的,甚至在二个星期之后仍能始动转译,在此期间内,mRNA能被转译 10^5 次以上,所以说,蛙的卵母细胞系统是外源mRNA的非常有效的翻译机器。

卵母细胞对mRNA转译的忠实性早就得到多种mRNA实验的证实,如牛晶状体14S RNA,鸭珠蛋白mRNA,小鼠免疫球蛋白轻链mRNA等。卵母细胞不但能转译脊椎动物的mRNA,还能转译诸如鸟类、鱼类以及某些昆虫与病毒的RNA,例如鸭网织红血球聚核糖体RNA,鱒鱼睾丸4—5S RNA,蜂后腺体总RNAE,MC病毒RNA等。〔24〕

mRNA 3'末端的PolyA尾巴曾被认为与珠蛋白mRNA在卵母细胞中的稳定性有关。但最近Sehgal等〔25〕得到不同结果,他们用从E. coli分离的多核苷酸转核糖苷酶将人成纤维细胞干扰素mRNA的3'末端PolyA切除,结果仍能在卵母细胞中转译出有生物活性的人的干扰素。

由于卵母细胞系统的高效转译能力,所以可被用来鉴定分离的mRNA的性质。李文裕等〔26〕从小白鼠肝脏分离出mRNA,注入蛙卵母细胞后,在转译产物中检测到新合成的小鼠白蛋白,因而证明分离的mRNA具有小鼠白蛋白mRNA的活力。

受精卵的发育潜力使得注入的信息分子分布于胚胎的不同类型的分化细胞,这就提供了另一类型问题的研究。Woodland等〔27〕曾将兔或小鼠的珠蛋白mRNA注入受精卵内。待卵发育至蝌蚪时,把胚胎切割成两部分:一部分包括肌肉、神经和脊索,但不包含血细胞;另一部分为胚胎的其余部分。将这两部分分别培养在含有标记氨基酸的培液内。然后分析这两部分胚胎组织所合成的蛋白。有趣的是,仅包含肌肉、神经和脊索细胞的胚胎部分合成了兔

或小鼠的珠蛋白,而且其合成的量与胚胎的另一部分相同。这证明了纯化的外源mRNA在卵和胚胎内相当稳定,但更重要的是,提示了卵子和胚胎不含有调节mRNA转译的控制因子。

卵细胞系统的估价和应用

如前所述,卵细胞作为实验系统,在鉴定遗传物质和信息分子的表达方面,具有无细胞系统所不及的特点:第一,卵细胞体积大,适宜于微量注射导入信息分子(mRNA)、纯化的基因(DNA),甚至完整的细胞核,这样,为遗传信息的表达提供了一个理想的活细胞环境。第二,卵细胞系统对注射的外源遗传信息具有较强的转录或转译能力,能产生较大量的转录或转译产物,有利于对产物的分析,如果采用较为灵敏的核酸分子杂交检测转录的RNA分子,用双向电泳分析转译的蛋白质,则仅需少量的卵母细胞材料。第三,纯化的DNA或外源核在卵母细胞内的转录,对低浓度的 α -鹅膏蕈碱非常敏感,这说明转录过程是依赖于RNA聚合酶II活力的。因为分离纯化的RNA聚合酶II在体外系统失去始动双链DNA转录的活力,所以常用的无细胞转录系统不能反映RNA聚合酶II的转录功能,而卵母细胞系统弥补了这一不足。

鉴于上述特点,卵细胞系统已被细胞生物学、胚胎生物学工作者应用于遗传信息分子功能及其表达的研究,并将受到更为广泛的重视,成为真核细胞基因表达调控研究的重要手段。

卵细胞系统对mRNA的转译,不受信息分子来源生物的种属差异之限制,但它对被注入核的基因密码之表达却有高度选择性,一系列实验证明,卵细胞质对注射进来的核之基因活性具有重新“规划”的能力,使某些原来被阻抑的基因得到表达,而一部分原先表达的基因却封闭了,达种重新“规划”的作用,似乎是发生在转录和转录后调节的水平上,而不是在转译水平上。核质关系的研究是涉及生物发育、分化的重要课题,利用卵细胞系统研究细胞质对外源核基因表达的调节作用是一个引人入胜的

领域。

外源DNA在卵细胞中的转录以及转录—转译偶联,是研究纯化基因表达的很好途径,尤其是可以通过第二次注射导入基因表达的调控物质,以追查基因表达的改变,研究调控机理。

除了纯化基因和信息分子的表达研究之外,利用卵细胞系统研究染色体或染色质的基因表达也将受到重视。它将有可能为染色体的基因定位,重组染色质中组蛋白和非组蛋白对基因表达的作用等方面的研究增添新的知识。

参 考 文 献

- [1] Gurdon, J.B. et al., 1971, *Nature*, 233: 177—182.
- [2] Gurdon, J. B. et al., 1976, *J. Embryo. exp. Morph.*, 36: 541—553.
- [3] Dumont, J.N., 1972, *J. Morph.*, 136: 153—164.
- [4] Ford, C.C. and Gurdon J.B., 1977, *J. Embryo. exp. Morph.*, 37: 203—209.
- [5] Gurdon, J.B. 1974, *Nature*, 248: 772—776.
- [6] Gurdon, J.B. and D.D. Brown, 1977, in "The Molecular Biology of the Mammalian Gene Apparatus", V. 2: P. 111.
- [7] Gurdon, J.B. 1976, *J. Embryol. exp. Morph.*, 36: 523—540.
- [8] Gurdon, J.B. et al., 1976, *Nature*, 260: 116—120.
- [9] De Robertis, E.M. et al., 1977, *J. Embryol. exp. Morph.*, 40: 199—214.
- [10] De Robertis, E.M. and J.B. Gurdon, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2470—2474.
- [11] Etkin, L. D., 1976, *Devel. Biol.*, 52: 201—203.
- [12] Graham, C.F. et al., 1966, *Devel. Biol.*, 14: 349—381.
- [13] Gurdon, J. B., 1968, *J. Embryol. exp. Morph.*, 20: 401—414.
- [14] Gurdon, J.B. et al., 1969, *Biochim. Biophys. Acta*, 174: 614.
- [15] De Robertis, E.M. et al., 1977, in "The Biochemistry of Cell Nuclei", *Biochem. Soc. Symp.*, V. 42: 181—191.
- [16] Colman, A., 1975, *Eur. J. Biochem.*, 57: 85—96.
- [17] Brown, D. D. and Gurdon J. B., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2064—2068.
- [18] Mertz, J. E. and Gurdon, J.B., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 1502—1506.
- [19] De Robertis, E. M. and Mertz, J. E., 1977, *Cell*, 12: 175—182.
- [20] Rungger, G. and Türler, H., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 6073.
- [21] Treendelenburg, M. F. and Gurdon, J. B., 1978, *Nature*, 276: 292—296.
- [22] De Robertis, E. M. and Olson, M. V., 1979, *Nature*, 278: 137—143.
- [23] Lane, C. D. et al. 1971, *J. Molecul. Biol.*, 61: 73—91.
- [24] Lane, C. D. and Knowland, J., 1975, in "The Biochemistry of animal development" P. 145.
- [25] Sehgal, P. B. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5030—5033.
- [26] 李文裕等, 1978, *实验生物学报*, 11: 109—124.
- [27] Woodland, H. R. et al., 1974, *Devel. Biol.*, 39: 134—140.

植 物 组 织 培 养

陈 季 楚

(中国科学院上海植物生理研究所, 细胞生理研究室)

早在1902年Haberlandt [6]曾进行了多种植物的叶肉细胞、髓细胞等的培养试验。1921—1922, Molliard, Kott与 Robbins等先后在离体根尖及茎尖培养方面取得进展。直到1930

年左右,由于美国的White等人及法国的Gautheret等人的工作,植物组织培养才真正地建立并发展起来,在这期间建立了许多种植物的愈伤组织,开始了形态建成和生理学方面工