



面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

作物育种生物技术

陈佩度 主编

作物遗传育种 生物技术等专业用

中 国 农 业 出 版 社

面向 21 世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

作物育种生物技术

陈佩度 主编

作物遗传育种 生物技术等专业用

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

作物育种生物技术/陈佩度主编. —北京: 中国农业出版社, 2001.5

面向 21 世纪课程教材

ISBN 7-109-06709-2

I. 作... II. 陈... III. 生物技术—应用—作物育种—高等学校—教材 IV. S33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 07527 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 徐建华

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2001 年 5 月第 1 版 2001 年 5 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 11.25

字数: 194 千字 印数: 1~5 000 册

定价: 16.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内容简介

本书主要介绍植物细胞与组织培养、植物原生质体培养和融合、植物染色体工程、植物基因工程、分子标记辅助育种的基本原理、常用技术、主要方法及其在作物育种中的应用。本书可作为高等农业院校农学专业和生物技术专业本科生、硕士生的通用教材，也可作为作物遗传育种、生物技术及相关领域教学、科研人员的一本参考书。

主 编 陈佩度（南京农业大学）
参编人员 李 欣（扬州大学农学院）
 李新燕（南京农业大学）
 王国英（中国农业大学）
 张天真（南京农业大学）
 郭旺珍（南京农业大学）
 高友军（华中农业大学）
主 审 简玉瑜（华南农业大学）
参 审 刘大钧（南京农业大学）

前 言

本书以“作物育种生物技术”为书名，是因为本书讲的是作物育种中的生物技术。它不像一般的“生物技术”书涉及面那么广。但它又有别于作物育种学的某一个篇章，因为现有的“作物育种学”教材对生物技术介绍得不够全面也不够深入。随着生物技术的发展，它与农业的联系愈来愈密切，尤其它在作物育种中的应用已愈来愈广泛。就作物育种而言，随着遗传学理论和方法的迅速发展，作物育种的技术和方法亦发展得很快。20 世纪 70 年代，许多原先仅在少数实验室使用的高新技术现已普及推广，例如组织培养与脱毒快繁、花药培养与单倍体育种已成为作物育种的常用技术。到 20 世纪 90 年代，分子生物学研究中的一些新技术、新方法一问世便迅速向作物育种中渗透，如转基因植物和分子标记辅助育种。生物技术与作物育种的紧密接合，产生了一种需要，即编一本专门的教材来全面系统地介绍与作物育种有关的生物技术，介绍它们的基本原理和主要方法，以及它们在作物育种中的应用。之所以想编这本书，另一个出发点是面向 21 世纪的高等教育，对学生要求知识更新、知识面拓宽、鼓励学科交叉，一些农业院校开设了生物技术专业，一些综合性大学和师范院校的生命科学类专业需要现代农业和现代作物育种方面的知识。为适应新时代的新需要，我们组织几位多年从事遗传学、作物育种学教学和亲身参加生物技术和作物育种研究的教师参与本教材的编写。

本书共分五章，第一章绪论，介绍农业生物技术发展简史及其与作物育种的关系（由陈佩度编写）。第二章植物细胞与组织培养在作物育种中的应用，介绍植物细胞的全能性及细胞组织培养的基本原理和方法，包括外植体、培养基、培养方法、愈伤组织的诱导和分化、原生质体分离培养和体细胞杂交等内容，并重点介绍了快繁、脱毒、花培单倍体育种、胚培养和体细胞杂交技术及其在作物育种中的应用（由李欣和李新燕编写）。第三章植物染色体工程，介绍了在染色体组、染色体和染色体片段水平上如何进行染色体遗传操纵来创造双倍体、异附加系、代换系和易位系，以及如何有效地在作物育种中加以利用。染色体微切割和人工染色体虽然与作物育种不直接相关，但作为染色体工

程的一个部分，本章也作了简要介绍（由陈佩度编写，牛吉山和秦跟基参与了染色体微切割和人工染色体一节的编写）。第四章植物转基因技术，介绍了植物转基因技术的一般原理和主要方法，包括基因载体及其重新构建、外源基因转化方法、转基因植物的鉴定、转基因植物的进一步改造以及转基因植物的安全性问题（由王国英编写）。第五章分子标记辅助育种，介绍了几种常用的分子标记原理、分子标记与遗传作图、分子标记和遗传图谱在作物育种中的应用（由郭旺珍、张天真编写，高友军参加了初稿部分编写工作）。这一章内容对许多作物育种工作者来说或许更感新鲜，由于分子生物学理论和技术在作物育种中的应用正刚刚开始，因此，应用并不普遍，成功的实例也远不如细胞工程、染色体工程中那么多而明显，但即便如此，它已显示出巨大的优越性和生命力。随着分子生物学技术的进一步发展及其在作物育种中实用化研究的深入，可以预料它也会像组织培养、花药培养等方法一样，成为作物育种工作者使用的一种常规方法和手段在作物育种中广泛应用。本来我们还想专设一章来介绍雄性不育和杂种优势利用，考虑到有关杂种优势及其利用的书已很多，并且在遗传学、作物育种学等书中已讲得很详细，所以，最后未单列成章，但有些内容已分别在体细胞杂交创造核—质杂种、雄性不育基因转化、利用异附加系保持隐性雄性核不育等部分作了很简要的介绍。

本书主要供高等农业院校农学类专业和生物技术专业本科生和硕士研究生使用，也可作为综合性大学或师范院校生物专业师生和作物遗传育种工作者的参考书。

本书由长期从事生物技术与作物遗传育种教学、科研工作的华南农业大学简玉瑜教授主审，南京农业大学刘大钧教授参审，他们对本书内容和结构提出了不少建设性意见。本书初稿编写成后，曾请南京农业大学王华忠、杨宝军等部分师生通读并提出修改意见。在编写过程中，李新燕、袁春霞女士参与了插图编排和文字校核工作。本书得到中华农业科教基金会资助，得到农业部高等农业教学指导委员会作物学科组的指导、鼓励和支持。农业部科教司和中国农业出版社的领导及有关同志对本书的编写、出版给予了热情关怀和帮助。在此一并致以衷心的感谢。

由于编者水平所限及时间仓促，本书在内容、文字、图表等方面可能会有不少错漏之处，敬请读者提出修正意见。

编 者

2001年1月

目 录

前 言

第一章 绪论	1
第一节 生物技术概述	1
第二节 生物技术与现代作物育种	2
一、生物技术与种质资源的开拓创新	3
二、采用现代生物技术加快育种进程, 提高育种效率	4
三、生物技术与种子生产	5
第二章 植物组织和细胞培养技术在作物育种中的应用	6
第一节 植物组织和细胞培养的基础知识	8
一、组织培养的基本程序	8
二、组织培养实验室	9
三、培养基	9
四、外植体	12
五、无菌操作	13
六、培养方法和培养条件	14
第二节 植物细胞的全能性与组织培养原理	14
一、植物细胞全能性及其表达	14
二、愈伤组织的诱导、增殖和形态建成	15
三、愈伤组织诱导及其形态建成的调控	18
第三节 植物组织培养技术	21
一、植物快速繁殖技术	21
二、植物脱毒技术	23
三、花药和花粉培养	25
四、植物的胚胎培养	30

第四节 植物细胞培养和原生质体融合	32
一、植物细胞培养	32
二、植物原生质体培养	35
三、原生质体融合和体细胞杂交	43
第五节 植物组织与细胞培养在作物改良上的应用	49
一、植物组织培养在品种改良上的应用	49
二、植物组织培养在无性系的快速繁殖上的应用	52
三、组织培养在工业上的应用	53
四、组织培养在植物基因工程中的应用	53
五、低温贮藏植物组织以保存种质资源	54
第三章 染色体工程与作物育种	56
第一节 染色体工程的一般概念和主要研究内容	56
一、狭义的染色体工程和广义的染色体工程	56
二、染色体组和部分同源群	57
三、染色体操纵的三个水平	58
四、亲缘关系远近与遗传操作策略	58
第二节 染色体组水平的操纵技术	59
一、远缘杂交障碍及克服途径	60
二、染色体数加倍和二倍体化	61
三、异源多倍体	62
四、同源多倍体	63
第三节 染色体水平的细胞遗传学操纵	64
一、异附加系	64
二、异代换系	73
三、染色体片段的转移	76
第四节 染色体微切割和人工染色体	82
一、染色体微切割 (Chromosome microdissection)	82
二、人工染色体 (Artificial chromosome)	83
第五节 染色体工程与作物育种	87
一、目标性状	88
二、初始亲本和回交亲本	88
三、育种群体大小	88
四、目标性状追踪和分子、细胞学标记辅助选择	89

五、加速世代, 缩短育种年限	89
第四章 转基因育种技术	91
第一节 植物遗传转化的受体系统和载体系统	91
一、用于转化的受体系统	91
二、植物转化载体	92
第二节 农杆菌介导的基因转移	97
一、农杆菌转化载体的改造	98
二、农杆菌转化技术	100
第三节 其他植物转基因方法	101
一、基因枪转化系统	101
二、原生质体转化系统	105
三、生殖细胞转化 (Germline transformation)	107
四、病毒载体法	108
第四节 转化体的鉴定和分析	108
一、转化体的选择	108
二、转化体的鉴定	109
三、外源基因的整合特性	111
四、外源基因在转化体中的表达情况	112
五、外源基因在转化体中的传代分离及其稳定性	112
第五节 转基因育种	113
一、转基因植物在育种上的应用	114
二、转基因植物新品种的培育	115
第六节 转基因植物的商品化和生物安全性	116
一、转基因植物的商品化	116
二、转基因植物的安全性	117
第五章 分子标记技术与作物育种	121
第一节 植物中常用的遗传标记	122
一、形态标记	122
二、细胞学标记	124
三、生化标记	125
四、分子标记	126
第二节 分子标记的类型及原理	126

一、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	127
二、RAPD (Random Amplification Polymorphism DNA)	129
三、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)	132
四、SSR (Simple Sequence Repeat)	134
五、SCAR (Sequence Characterized Amplification Region)、CAPs (Cleaved Amplification Polymorphism Sequence-tagged Sites) 和 STS (Sequence- tagged Sites)	138
六、上述各标记间联系及标记间相互转化	141
七、In Situ Hybridization (ISH)	143
第三节 分子标记技术在基因作图中的应用	144
一、分子遗传图谱的构建	144
二、分子标记与比较基因组作图	147
三、分子标记用于基因定位	150
第四节 分子标记技术在作物育种中的应用	155
一、分子标记辅助选择的遗传基础和应具备的主要条件	155
二、进行 MAS 选择的限制因素及改进措施	157
三、提高分子标记的筛选效率	158
四、分子标记技术在作物育种中成功应用的实例	159
五、用于分子标记辅助选择的育种策略	163

第一章

绪论

第一节 生物技术概述

生物技术是指应用生物科学和工程学原理，依靠微生物、动物、植物体作为反应器，将原材料进行加工生产生物产品的技术。传统的生物技术可追溯到公元前的原始酿造技术。人类有意识地利用酵母进行大规模发酵生产则在 19 世纪，主要生产乳酸、酒精、面包酵母和柠檬酸等初级代谢产物。1928 年 Flemming 发现青霉素，开创了以获取细菌次生代谢产物——抗生素为主的抗生素工业，到 20 世纪五六十年代，氨基酸、酶制剂工业得到蓬勃发展。自 1953 年 Watson 和 Crick 发现 DNA 的双螺旋结构及 20 世纪 60 年代遗传密码被破译，分子生物学发展迅速，以重组 DNA 技术为基础的动植物基因工程、人类遗传疾病诊断和基因药物的诞生与开发应用，使现代生物技术成为当代医学、药学革命的重要组成部分。农业生物技术的历史也源远流长，最早可追溯到 2000 多年前的植物扦插、嫁接繁殖和养蚕产丝。自 1866 年孟德尔进行豌豆杂交试验和 1900 年孟德尔三大遗传定律被重新发现以来，遗传学的发展推动了植物育种学的建立和发展。20 世纪二三十年代广泛开展植物远缘杂交，开创了有意识地从野生远缘植物向栽培作物转移染色体及所携有用基因的工作。20 世纪 30 年代开始、五六十年代迅速发展的植物组织和细胞培养技术引发了一场花卉产业革命。六七十年代原生质体培养和体细胞融合成功，不仅使物种间的杂交突破了科、属界限，产生了番茄—马铃薯等体细胞杂种，甚至还获得了一人—鼠杂种细胞那样的“怪物”。由这种“怪物”获得的附加有各条人类染色体的人—鼠细胞系，及随后发展起来的单条染色体分离技术、染色体微切割、微克隆和人工酵母染色体、DNA 快速测序等技术，有力地推动了人类基因组研究计划，并将引发人类遗传学和医药学进行一场深刻的革命。而植物的细胞、组织培养技术和重组 DNA 技术相结合，开创了植物基因工程时代，它不仅可以将来自不同植物中的基因导入栽培植物，而且可以从细菌、真菌、病毒

等微生物，甚至昆虫和高等动物中分离、克隆基因，并将其导入栽培作物，完全突破了物种之间的界限，使整个生物中的基因资源得以共享。这必将引起一场现代农业革命。

随着生物学的发展，生物技术的研究内容和涉及领域愈来愈广。按研究对象由小到大，它可以分为基因工程、染色体工程和细胞工程。按研究对象与产业来分，现代生物技术可包括农业生物工程、医学生物工程、海洋生物工程、环境生物工程、酶工程、发酵工程等。由于生物技术涉及的面是如此之广，发展速度是如此迅猛，值得介绍的东西很多，在这本书里我们仅就农业生物工程中与现代作物育种有关的生物技术作简要的介绍。

第二节 生物技术与现代作物育种

20 世纪 60 年代墨西哥和印度由于推广种植了矮秆抗倒、抗锈病、耐水肥高产的小麦良种，产量提高了 5 倍，由粮食进口变为粮食出口。菲律宾推广半矮秆、抗倒伏、耐肥高产水稻良种，实现了大米自给。这场由培育推广矮秆、抗病、高产品种促进粮食大幅度增产的品种更新工程被誉为“绿色革命”。它对缓和贫穷、落后的不发达国家和地区人口众多与食品短缺的矛盾作出了重要贡献。然而就全球范围而言，人类正面临人口不断增加、可耕地面积继续减少、可利用资源日趋贫乏和生存环境日趋恶化的形势。因此，解决全球，尤其是发展中国家和地区的人口与粮食矛盾，对现代作物育种提出了更高的要求。它不仅要求高产量，而且还需要品质优良、抗病虫、抗逆境、省成本、高效率，尽量减少对化学农药、化学肥料的依赖，减少对环境的污染。在 21 世纪，人类将面临一场新的“绿色革命”，而生物技术在第二次绿色革命中将担任重要角色。

作物育种的主要任务是按照人们预定目标，采取相应的育种程序和方法，诱发、创造和重组遗传变异，选育出适应当地自然气候条件，符合社会、生产需要，在遗传组成上相对稳定一致的优良基因型，并繁殖出足够数量个体（种子苗木）供生产上应用。根据作物育种的任务，作物育种的成效主要取决于三个方面：一是亲本，亲本中必须包括育种目标所需的基因资源，并且这种基因资源是可供育种家方便利用的；二是采用合理先进的育种方法，将优良基因重组在一起；三是准确、可靠的鉴定技术，把优良基因型挑选出来并鉴定出它在一定的自然气候、生产条件下的适应能力和生产潜力。现代生物技术在这些方面已经发挥重要作用，并将继续发挥愈来愈重要的作用。

一、生物技术与种质资源的开拓创新

“巧妇难为无米之炊”。作物育种离不开基因资源。没有育种目标所必需的基因资源，再优秀的育种家也育不出所需要的优良品种。优良基因资源首先考虑从种内寻找。地方品种是长期自然选择和人工选择的产物，具有良好的适应性，但往往产量潜力较低，国内外改良品种生产潜力较高，但往往适应性较差。用这两类品种做亲本杂交，可选育出产量高、适应性好的品种。但对一些新生病害和新产生的流行病新生理小种，在种内常常找不到很好的抗病基因资源。在这种情况下，除了从大量搜集、保存的地方品种和国内外引种材料中鉴定筛选外，首先想到的就是亲缘物种。开展远缘杂交，采用杂种幼胚培养、染色体加倍和染色体操纵技术，可以将亲缘物种中的有用基因通过创造双倍体、异附加系、异代换系和易位系等方式转移到受体品种中去。对亲缘关系远，难于进行有性杂交的，可以通过原生质体培养和体细胞融合，通过创造体细胞杂种或不对称体细胞杂种的方式，将亲缘关系较远物种中的基因资源转移过来。对亲缘关系更远，连体细胞杂交都不可能的物种中的基因资源，则还可以借助DNA重组技术，将目标基因分离、克隆，重新构建，通过转化将新基因导入栽培作物。这使作物育种的基因资源范围极大拓宽，不仅超过了种、属界限，更扩大到了细菌、真菌、动物乃至人类，甚至还可以人工合成基因，它极大地丰富了作物育种的基因资源库。这些全新基因资源的利用毫无疑问将对未来的作物育种发挥深刻的影响。将苏云金杆菌中的Bt杀虫蛋白基因导入棉花、玉米育成的抗棉铃虫和玉米螟的转基因棉花和玉米，将抗除草剂基因导入大豆、玉米，育成的抗除草剂大豆和玉米就是最好的例证。它不仅影响作物种植制度，而且对化学工业也发生了重大影响。

运用生物技术还可以创造作物新类型。通过核置换创造核—质杂种，由核—质互作引起的细胞质雄性不育开创了杂交种利用的新时代，使水稻、高粱等自花授粉和常异花授粉作物的杂种优势利用成为现实，并在生产中发挥了巨大作用。利用远缘杂交，再连续回交创造核—质杂种需经历十来个世代，采用体细胞杂交（亲本一方的细胞核失活，另一方的细胞质失活）可很快地人工合成核—质杂种，并可利用更广的核—质资源。利用基因工程方法，可以把别的物种中的雄性不育基因和恢复基因转移过来，获得新的不育类型和新的恢复系。使一些原先没有雄性不育系和恢复系的作物可通过杂交种的方式利用杂种优势，大幅度提高生产潜力和显著增强对生物、环境胁迫的抗性水平。

二、采用现代生物技术加快育种进程，提高育种效率

优良基因资源是作物育种的基础。但如何将优良基因重组在一起，尽快纯合并准确可靠地把它们挑选出来，则更是一门科学艺术。为加快基因型纯合，以往主要采用温室和异地加代实现一年多代。现代生物技术为加速杂种后代的稳定、纯合开辟了一条捷径，通过花药培养诱导单倍体花粉植株，再用秋水仙碱处理使染色体加倍，可直接获得纯合个体，并可使一些隐性性状个体提早出现并大大增加其在杂种后代中的出现频率。使用单倍体细胞或组织作转基因受体，可加快转基因植物纯合。在细胞组织培养过程中，在培养基中给培养材料施加某种选择压力（如高盐浓度、病原菌毒素、除草剂等）可较快地筛选出耐盐、抗病、抗除草剂等有益变异。

在育种实践中经常可以看到这种情形：采用两个相同的亲本进行杂交，从同一杂交组合有些人选出了品种，而另一些人则一无所获。这是什么原因呢？道理很简单，每个亲本有许多性状，两个亲本杂交，其后代可出现成千上万种基因组合。如何将最好的基因型挑选出来，这不仅取决于育种家的理论知识和正确的育种方案，更重要的是育种家敏锐的眼光和育种经验。与此同时重要的是还需要具备使优良基因型充分表达的外界环境条件。这正是为什么同一杂交组合在不同地方和不同单位可以选出大不相同的品种和取得截然不同的结果。传统的杂交育种方法靠基因重组。基因型纯合靠一代代自交需经历至少8~10个世代。各种性状的选择鉴定主要靠当地天然环境条件和多年多点试验，对病虫害和旱涝、盐碱抗性常靠人工诱发鉴定和连续多代表型选择。而不同年份、不同地点、不同田块甚至于同一田块中的不同部位，条件总不会完全相同，这势必影响试验的客观性、公正性和可重复性。为提高选择效率，加快育种进程，育种家们想方设法探究基因型与表型之间的关系，研究各种性状之间的相关，寻找准确可靠的鉴定方法和最佳选择方法。

近十年来，分子生物学技术的发展为植物育种提供了一种基于DNA变异为基础的新型遗传标记，与形态标记、细胞学标记和生化标记相比，分子标记具有种类多（如RFLP、RAPD、SSR、SCAR、AFLP、STS……等，详见第五章分子标记与作物育种），数量多，分子标记多态性可以在植物各生育时期检测，特别是在苗期就可以用叶片提取DNA对多个性状进行分子标记检测，不必等到某个性状到一定发育阶段才表达方能鉴定。分子标记不受外界环境条件的影响，不需要人为创造诱发鉴定或特殊生长条件对某些性状进行鉴定。这大大方便了对抗病性和抗逆性的检测，尤其对一些检疫性病害的检测显示出更多

优越性。分子标记呈显性或共显性，可利用分子标记鉴定各种基因型，确定与之相连锁的性状是杂合还是纯合，这些分子标记对重要经济性状无不良影响，不像有些形态标记对产量、品质和抗性可能有负面影响而影响其利用。分子标记不仅对质量性状适用，现在已有办法找到与数量性状有关的 QTL 标记，这将大大提高由多基因控制的数量性状的选择效率。在育种中为达到高产、优质、抗多种病虫害和抗不良环境等目标，需要将控制这些性状的基因组合、聚集在一起，传统的方法需要在不同生育阶段分别对不同性状进行鉴定选择，倘若我们找到了与这些性状连锁的分子标记，那么就有可能在作物生长早期，仅用几张叶片提取 DNA，进行分子标记检测，就可能以很快的速度挑选出所需要的基因型。因为分子标记辅助选择是直接在 DNA 分子水平上进行的，它不受环境条件影响，也不受其它因子干扰，因此它比表型选择更准确、更可靠。

分子标记研究推动了分子作图，日益增多的分子标记使遗传图的密度不断增加、图谱更加精细和完善。物理图谱的建立和不同物种间比较作图研究的成果，使人们对一些重要性状的遗传规律及相互关系了解得更清楚，这些知识为选配亲本、制订育种方案、确定育种群体大小、采用相应的选择方法提供了理论依据，使作物育种的目标更明确、育种方案更可行、选择更有效，结果更可靠。

三、生物技术与种子生产

一个优异基因型选出来了，并不等于一个优良品种选育成功。这个优良植株还需要尽快繁殖，产生出遗传性稳定的数量足够多的优质种子，供育种家进行品种比较鉴定、生产试验、示范推广。利用传统的种子生产方法繁殖系数较低，由于组织培养的外植体不限于种胚，许多作物的营养器官均可作为外植体诱导产生愈伤组织，愈伤组织又可以反复继代扩繁，因此，利用组织培养方法，可以成千成万倍地增加，且世代周期也可大大缩短。除通过组织培养生产大量种苗外，还可利用茎尖培养生产脱毒苗，采用工厂化生产人工种子等等。

综上所述，现代作物育种从育种目标的制订、种质资源的搜集、鉴定、利用和创新、亲本组配、杂种后代的选择、鉴定、加代，直至试验、示范、推广、种子生产、种子鉴别、种性更新等各个环节，都与生物技术密切相关。本书在编写时，采用从组织细胞—染色体—基因，又从基因—分子标记—性状—辅助育种来介绍作物育种涉及到的几种主要生物技术。但在阅读每个章节时，编者则希望读者能时时与作物育种的各个环节相联系，并随时吸取当代生物技术发展的最新成果，使现代作物育种理论和技术更快发展。

第二章

植物组织和细胞培养技术在作物育种中的应用

组织培养技术的蓬勃发展虽然是近四十年以来的事，但它的整个历史可以追溯到 20 世纪初。早在 1902 年，德国植物学家 Haberlandt 根据细胞学说就提出植物体细胞有再生完整植株的潜在能力，并首次作了离体植物细胞在人工培养基上进行培养的尝试，但由于所用培养基成分过于简单以及选用的实验材料都是已经高度分化了的细胞，Haberlandt 以及他的合作者经长期探索未能成功。20 世纪 30 年代末期，White 用烟草杂种，Gautheret、Nobecourt 用胡萝卜培养均获得了可继代培养的愈伤组织，由于这些实验揭示了生长素和 B 族维生素在组织培养中的作用，由此奠定了组织培养发展的基础。1941 年 Ovebeek 把椰子汁作为培养基的补加物，使曼陀罗幼胚培养至成熟，以后这一物质在植物组织培养中得到广泛的应用。从 50 年代开始，植物组织培养进入一个十分活跃的时期，Skoog 和 Tsui 等（1951 年）发现腺嘌呤或腺苷不仅可以促进愈伤组织的生长，而且发现腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。1956 年，Miller 等由鲱鱼精子 DNA 中分离出 6- 呋喃氨基嘌呤并定名为 Kinetin（激动素），后来人们将与激动素活性类似的合成或天然的一类化合物总称为细胞分裂素（cytokinin），细胞分裂素可诱导已经成熟并高度分化的组织或器官发生细胞分裂。1953 年 Muir 首次将烟草愈伤组织转移到液体培养基中进行振荡培养，获得单细胞和小细胞团的细胞悬浮液，并提出“看护培养”技术，揭示了单细胞培养的可能性。1958—1959 年，Steward 和 Reinert 分别报道用胡萝卜愈伤组织培养形成了体细胞胚并获得了完整的再生植株，从而使早年由 Haberlandt 提出并经 White 阐明的植物细胞全能性假设得到了科学的证明。至今已有不同科、属 600 多种植物的组织和细胞培养都获得了完整的再生植株。