



植物组织培养抗菌剂
(Plant Tissue Culture Preservative Agents, PPA)

货号	规格	贮存
PPA001	20ml	4-8 °C
PPA002	100ml	4-8 °C

植物组培抗菌剂 PPA (Plant Preservative Agents) 是为商业及研究用植物组织培养实验室和植物种植者开发、生产的旗舰产品。

作用机理

它是一种广谱抗微生物剂，可以杀死细菌和真菌细胞，防止真菌孢子的萌发，并在较高浓度下能消除内源性污染的外植体。研究表明 PPA 活性成分可以渗透过真菌或细菌细胞壁，抑制柠檬酸循环和电子传递链等中心代谢循环中的关键酶的活性，并且可以抑制培养基中的单糖和氨基酸向真菌和细菌细胞的运输。PPA 能有效地抑制植物细胞和植物组织培养中的通过空气、水、人传播的微生物污染及内源性污染，而不会影响体外种子发芽、愈伤组织增殖和愈伤组织的再生。

优点（与抗生素相比）：

- ★是一广谱、高效抗细菌/抗真菌剂。
- ★比常用抗生素价格更低廉，可以作为植物组织培养基的标准成分，并可作为常规使用。
- ★它的靶标是抑制多种酶，所以产生抗耐药性的突变体是不可能的。
- ★具有热稳定性，可以和培养基一起灭菌。

操作流程（注意：以下所述的操作流程是通用的，根据您的具体物种可能需要稍微改动。）

PPA 简化地组织培养工作流程如下：

- 1、含有 PPA 的培养基可以在超净台外面分装，即无需无菌操作，等琼脂凝固后把盖子盖好。如果是自动分装培养基装置，我们建议在分装前后先用高压灭菌热水处理分装管。
- 2、如果储存在灭菌的容器中或在此之前储备液没有污染，含有 PPA 的热敏感或热稳定的液体培养基无需经微孔滤膜或高压灭菌。含有 200mg/L 或更多氨基酸或蛋白质丰富培养基，建议加入 PPA 后一起滤灭。

- 3、超净工作台里的器具（镊子或解剖刀）无需在火焰上烧，只要定期地在 70%酒精里蘸一下即可。超净工作台无需验证，可以在超净工作台外面的干净台面上操作，不超过一小时即可。
- 4、PPA 是酸性的溶液(pH 3.8)。应 4 度保存。低接种密度下推荐剂量 0.05-0.2%(v/v)(0.5-2.0 ml PPM/L 培养基) 在灭菌前或灭菌后加入培养基防止通过空气传播污染或内源性污染。处理内源性污染或获得无农杆菌的植物材料需要高剂量的 PPA 。
- 5、对于高密度的细菌或种子表皮的真菌孢子，PPA 的灭菌效率不是太高。对于体外萌发，种子应该按照传统的方法先用漂白剂进行表面消毒。因此，在含有 PPA 的萌发培养基里，在一个非灭菌的容器中种子可以在自来水下冲洗然后在超净台中吹干。如果所使用的器具末端接触到活性细菌、真菌组织或其它怀疑被污染的东西，这些器具应该通过高压或电子加热设备进行灭菌。
- 6、一般剂量水平。对于内源性污染，推荐剂量是 0.05-0.2%。对于愈伤增殖、器官形成和胚胎形成，推荐的剂量范围是 0.05-0.075%。在培养基灭菌前或灭菌后加入 PPA，低密度情况下可防止通过空气传播的污染和内源性污染或延缓细菌的生长。要消除高密度污染，需要增加 PPA 的剂量（参考下面第七段）。
- 7、内源性污染：
 - (a) **对于种子**：添加 2~3% PPA 在一般习惯使用的培养基里，但千万不要添加 Tween 20 和 pH 调整剂，轻轻地搅拌 8~12 小时，之后直接拿出放入含有 PPA 的培养基里，若是草本植物换至 0.05~0.1% PPA 的萌发培养基即可；而木本植物则换至 0.2% PPA 的萌发培养基。对于种皮较硬的种子（比如芦笋、羽扇豆属植物、观赏棕榈、玫瑰等）应该在用 PPA 灭菌前先在水中浸泡 2-4 个小时。
 - (b) **对于外植体**：以 1cm 外植体为例，添加 4~5% PPA 到全 MS 基盐中，但千万不要添加 Tween 20 和 pH 调整剂，搅拌 4~12 小时之后直接拿出，插入含有 PPA 的培养基里，若是草本植物换至 0.05~0.1% PPA 的萌发培养基即可；而木本植物则换至 0.2% PPA 的萌发培养基。

注意：以下从第 7 段 (c) 到 10 用于观赏植物，并非仅北美用户。
 - (c) **对于块茎，球茎和鳞状物**：把整个块茎/球茎/鳞状物在漂白剂里摇或搅拌。然后用水冲洗（可以在非无菌条件下操作）。把块茎/球茎切成小片，在含有 4-5% PPA 的全基盐中摇或搅拌 12-24 h，不要加 pH 调整剂和 Tween 20。不用冲洗直接插入到含有 0.1-0.2% PPA 的培养基中。
- 8、如果按照以上操作流程没有取得满意的结果（尤其是厚的和非常密集的外植体，

种子) 我们建议以下流程:

- (a) 在水中摇或搅拌外植体 (较软的组织 1 h, 较坚硬的组织 2 h)
- (b) 在含有 50% PPA 的全 MS 基盐中(不加 pH 调整剂和 Tween 20)摇或搅拌 5-10 min。
- (c) 无需冲洗, 直接把处植体插入到培养基中。如果真菌污染, 可以选择额外再加入 PPA 到培养基中。然而, 细菌或混合污染, 第一个月在培养基中加入 0.05-0.2% 的 PPA 是必要的。不要丢弃高度氧化的外植体, 大约 50%的外植体在 4-6 周内即可恢复。

注意: 请参考第 9 段下面的注意事项 2 和 3.

9、 为了消除“组培中” 污染的植物材料 (抢救措施):

(注意: 明显地污染不超过一周的组织)

- (a) 在自来水细水流下面用牙刷清洗材料。在含有 50% PPA (用灭菌水稀释) 中摇或搅拌 5-15 min。对于细菌或混合污染, 我们建议用低 pH 值 2.8-3.2 的溶液, 即 100% PPA 与 0.6g/L 的柠檬酸溶液 (用灭菌水) 按 1: 1 混合。
- (b) 不用冲洗直接把处理好的材料插入到含有 0.05-0.2% PPA 的培养基里, 培养至少一个月。前 10 天弱光培养, 像上面提到的一样, 不要丢弃高度氧化的外植体, 等 4-6 周以后将有约 50%的材料恢复。

如果真菌孢子或细菌位于外植体的内部而 PPA 无法接触到的情况下, 把材料在水中浸泡一段时间, 然后沿着外植体切片, 在 50% PPA 中摇或搅拌 5-15 min。

通过以上消毒步骤, 保证 PPM 能够充分接触到外植体的整个表面。

一般注意事项:

- 1、 采用 PPA 消毒后首次转移的材料, 我们建议把外植体完全地插入半固体培养基中。
- 2、 50% PPA 溶液能重复利用大约 5-10 次。重复利用的次数取决于所处理外植体的体积和接种密度。保存 50% PPA 在 4℃ 以延长它的活性。如果必要, 准备两种 PPA 消毒液: 一种是灭菌内源性污染, 第二种是灭菌“组培中”的污染。用第二种消毒溶液处理材料后都要用 0.2 μm 的滤膜滤灭, 滤灭过程可以非无菌条件下完成。一个滤器能用于溶液滤灭的整个过程。
- 3、 如果用 50% PPA 处理材料效果仍不佳, 可以用 100% PPA。处理方法跟 50% PPA 相似, 但处理时间不要超过 10 min。

10、 消除农杆菌:

共培养之后, 用水冲洗叶盘。然后把转染的叶盘在含有 100% PPA 的全基盐中蘸 (整个叶

盘) 约 2 min。用两张无菌纸巾吸干放到含有常用抗生素的培养基上。三周后, 转到只含有 0.05-0.075% PPA 的培养基上。

结论:

PPA 必将为任何一个组织培养实验室带来便利, 并极大地提高技术人员和实验室的工作效率。但每个实验室的条件不同可能影响 PPA 的效力。

参考文献:

- 1、 Hail Z. Rihan, Mohammed Al-Issawi, Fadil Al-swedi, Michael P. Fuller. 2012. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia Horticulturae* 141 (2012) 47 – 52.
- 2、 Junji Miyazaki, Beng H. Tan, Stephen G. Errington and John J. S. Kuo .2011. Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. *Australian Journal of Botany* 59(4) 363-368.
- 3、 Wenhao Dai, Yuanjie Su, Cielo Castillo and Olivier Beslot. 2011. Plant regeneration from in vitro leaf tissues of *Viburnum dentatum* L. *PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE*. Volume 104, Number 2 (2011), 257-262.
- 4、 Giuseppe Barraco, Isabelle Sylvestre, Florent Engelmann. 2011. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. *Scientia Horticulturae*. Volume 130, Issue 1, Pages 320–324
- 5、 Sina Siavash Moghaddam , Hawa Binti Jaafar , Maheran Abdul Aziz , Rusli Ibrahim , Asmah Bt Rahmat and Elizabeth Philip. 2011. Optimization of an Efficient Semi-Solid Culture Protocol for Sterilization and Plant Regeneration of *Centella asiatica* as a Medicinal Herb. *Molecules* 2011, 16(11), 8981-8991.
- 6、 E. BONCALDO, G. BRUNO, G. SICOLI, F. TOMMASI, & L. MASTROPASQUA. Germinability and fungal occurrence in seeds of *Abies alba* Mill. populations in southern Italy. *Plant Biosystems* Vol. 144, No. 3, September 2010, pp. 740–745.
- 7、 Junji Miyazaki • Beng H. Tan • Steve G. Errington. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2010) 102:365–372.
- 8、 Claudia Ruta & Irene Morone-Fortunato. In vitro propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* (2010) 46:172–179.
- 9、 Hemant Lata, Suman Chandra, Ikhlas A. Khan and Mahmoud A. ElSohly. Propagation through



-
- alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. – an important medicinal plant. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(1) – January, 2009.
- 10、 J. K. Rowntree. Development of novel methods for the initiation of in vitro bryophyte cultures for conservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2006) 87:191–201.
 - 11、 V. M. Jimenez., J. Castillo., E. Tavares., E. Guevara., M. Montiel. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (2006)86:389–395.
 - 12、 Anna-Lisa Paul · Charles Semer, Thomas Kucharek · Robert J. Ferl. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabidopsis plants for a Space Shuttle flight experiment. *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 55:480–485.
 - 13、 In M.P. Fuller and T. Pizzey., *Vitro Cult. & Hort. Breeding*, Eds. S. Sorvari et al. *Acta Hort* 560, ISHS 2001 "Teaching Fast and Reliable Plant Tissue Culture Using PPM and Brassicas".
 - 14、 Sandra M. Reed *J. Environ. Hort.* 2000 18(1) 34-39
 - 15、 M. Babaoglu & M. Yorgancilar *Plant Cell. Tissue. Organ. Culture* 2000 440 : 31-34.
 - 16、 Randall P. Niedz *HorTechnology* 1998 8(4) 598-601