
PPM - Plant Preservative Mixture

产品名称：PPM - Plant Preservative Mixture（植物组织培养抗菌保护剂）

货号：PPM

保存条件：4 °C

运输条件：常温

物理性质：溶液

性状：无色至琥珀色透明液体

pH 值：3.8

有效期：见瓶身标签说明

产品描述：

1. PPM 是一种热稳定的抗菌剂，用于植物组织培养中植物的微生物污染防治与清除；
2. 在合理的使用剂量下，PPM 是一种非常有效的植物组培抗菌剂与保护剂，不会对植物的生长（如种子萌发，愈伤增殖、再生等）产生任何影响，可视为培养基标准配方成份；
3. PPM 主要用于预防和消除来自空气、水源或者人体接触等外界因素导致的植物组培过程中的微生物污染，同时对于植物内生菌也同样具有非常好的抑制效果；
4. PPM 广泛适用于绝大多数被子植物和裸子植物，但是不推荐用于蕨类植物、藻类等水生植物；
5. PPM 具有热稳定性，能直接加入培养基高温灭菌而不会影响使用效果，使用更加方便；
6. PPM 相对于常规抗生素而言，性价比更高。

作用机理：

PPM 的活性成分能渗透细菌或者真菌细胞壁，抑制呼吸作用中三羧酸循环和电子传递链过程中关键酶的活性，同时，也能阻断细菌和真菌吸收和利用培养基中单糖和氨基酸的过程，从而实现预防和清除植物组织培养过程中的微生物污染。

相对抗生素的优势：

1. PPM 能广泛抑制和清除细菌和真菌的污染，并防止真菌孢子的萌发；
2. PPM 是通过抑制多种酶的活性而达到抑菌效果，从而能避免耐药突变体的发生；
3. PPM 具有热稳定性，无需过滤灭菌，能直接加入培养基高温灭菌而不会影响使用效果，使用更加方便；
4. PPM 性价比更高，可更加广泛的应用于更多的科学研究、作物育种、组培苗工厂化生产中。

产品专利说明：

PPM - Plant Preservative Mixture 是专利产品，其商品名称，配方及使用方法等都受专利保护，专利号 5,750,402。

常规使用简介：

以下使用指南是针对大多数情况下的常规使用说明，特殊情况可做适当调整。

使用指南	污染预防	消毒灭菌	抑制农杆菌
浓度 (v/v)	0.05-0.2%	5.0%	0.05%
处理时间	持续	4-12h	持续
说明	<ol style="list-style-type: none"> 1. 具体使用浓度根据处理样本有所不同; 2. 原生质体和愈伤组织处理浓度建议为 0.05%; 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 将组织加入到含 5%的 3*MS 溶液中, 搅拌 4-12h; 2. 处理过程中无需其他灭菌方法同时使用, 不能添加酸碱试剂, 调节 pH, 也不能加入 Tween-20 等; 3. 处理完成以后将组织移到含有 0.05%PPM 的培养基中; 	与其他抗生素配合使用效果更佳

说明: MS 溶液是泛指, 如样本的培养基溶液不是 MS, 以具体适合的培养基溶液为准;

操作说明:

以下操作说明是针对大多数情况下的常规使用说明, 必要时, 可根据具体植物样本情况进行适当调整。

1. 常规用量:

一般推荐使用浓度为 0.05%-0.2%, 愈伤增殖, 器官形成, 胚性组织发育等使用浓度为 0.05%-0.075%。

说明:

(a) 含有 PPM 的培养基无需在超净工作台中分装, 在培养基凝固以后将培养瓶/皿盖子盖好即可。如使用自动灌装系统, 建议在灌装前后将分装管用高压灭菌热水处理;

(b) 如果培养基储存液保存在无菌容器中并未经污染的情况下, 加入 PPM 配制的培养基无需再次过滤或者高温灭菌。如果是营养培养基, 如含有 200mg/L 甚至更高浓度氨基酸或者蛋白质的培养基, 建议过滤灭菌。

2. 植物内生菌污染处理:

(a) 种子: PPM 不推荐用于直接处理含有大量的细菌或真菌孢子的种子灭菌, 对于种子离体萌发, 建议先采用传统方法消毒, 然后置于含 2-3%PPM 的全培养基基础盐溶液中, 轻轻搅拌 4-12 小时, 此过程千万不能添加 Tween20 和调节 pH, 处理完成以后直接插入含有 PPM(草本植物 0.05-0.1%, 木本植物 0.2%)的培养基里;

(b) 外植体: 以 1cm 外植体为例, 将外植体置于含 4-5%PPM 的全培养基基础盐溶液中, 轻轻搅拌 4-12 小时, 此过程千万不能添加 Tween20 和调节 pH, 处理完成以后直接插入含有 PPM(草本植物 0.05-0.1%, 木本植物 0.2%)的培养基里;

(c) 对于块茎, 球茎和鳞状物的观赏植物样本: 将其整体放入消毒剂中搅拌消毒处理以后, 用水冲洗干净, 将材料切成薄片, 置于含 4-5%PPM 的全培养基基础盐培养液中, 轻轻搅拌 4-12 小时, 此过程千万不能添加 Tween20 和调节 pH, 处理完成以后无需冲洗直接插入含有 0.1-0.2% 的 PPM 的培养基里进行培养。

3. 如果厚的外植体、污染严重的植株、种子等样本经过以上处理仍得不到理想效果，可尝试以下操作：

- (a) 将材料浸泡在水中持续搅拌处理(松软组织搅拌 1 小时，硬实组织搅拌 2 小时)；
- (b) 将材料在含 50%的 PPM 全培养基基础盐溶液中搅拌处理 5-10 分钟，此过程千万不能添加 Tween20 和调节 pH；
- (c) 无需冲洗，将处理过的材料直接加入到培养基中即可。对于真菌污染，可在培养基中加入适当浓度的 PPM。对于真菌细菌混合性污染，建议在培养的第一个月的培养基中加入 0.05%-0.2% 的 PPM。

4. 严重污染材料污染去除与抢救（重污染不超过一周）：

- (a) 将污染的材料至于流水中用软刷刷洗，然后置于含 50% PPM 的无菌水溶液中搅拌 5-15 分钟，对于细菌或者混合性污染，建议使用 100% PPM 与 0.6g/L 的柠檬酸无菌水溶液按 1: 1 混合的低 pH(2.8-3.2)的酸性溶液处理；
- (b) 处理后的材料无需清洗，直接插入含 0.05%-0.25 的 PPM 的培养基中培养至少一个月以上，其中前 10 天需要弱光培养；对于一些真菌、孢子和细菌污染隐藏较深，PPM 无法接触到的部位，建议在初步的清洗以后，将材料切开，然后再放入含 50% PPM 的无菌水溶液中搅拌 5-15 分钟处理。

5. 农杆菌的去除：

共培养以后，将样本用无菌水清洗，然后将样本浸没在 100% PPM（补充 4X 的培养基盐溶液）中处理 2 分钟，取出后用无菌纸吸干后并置于常用抗性培养基中培养，3 周后，更换到只含有 0.05%-0.075% PPM(无常用抗生素)的培养基中培养。

使用注意事项：

1. 在所有 PPM 消毒处理外植体的过程中，尽量保证容器的体积足够大，并使外植体材料所有面积与含 PPM 的处理溶液充分接触，以保证消毒效果；
2. 如果外植体出现高度氧化现象，不要丢弃，大约 50%的外植体在 4-6 周内即可恢复；
3. 50% PPM 的处理溶液可以重复使用但是不推荐，因为使用次数和效果受外植体的体积与接种密度的影响。将 50% PPM 的处理溶液保存在 4℃ 可适当延长其活性，一般可使用不超过 10 次。如果必要，建议配制 2 份 50% PPM 溶液，一份用于外植体消毒内生菌污染，另一份用于消除培养过程中的轻度污染材料抢救，第二份溶液在每次处理过后需要用 0.2mm 滤器过滤；
4. 如果 50% PPM 溶液处理效果不理想，可采用 100% PPM 溶液进行处理，处理方法相同，但使用次数不得超过 10 次。

安全说明：

1. 虽然 PPM 是无毒性的，但是在使用过程中还需尽量避免直接与人体皮肤等直接接触，建议使用时佩戴手套，保持空间空气流通，如不慎吸入，先马上用大量纯净水后立即就医，如不慎入眼，立刻用大量水冲洗眼睛 15 分钟，用肥皂清洗 PPM 接触过的皮肤部位；
2. 含 PPM 的培养基垃圾处理与常规培养基处理方法相同。

使用发表文章：

1. Miyazaki J, Tan BH, Errington SG. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM). PCTOC. 2010;102(3):365-372.

-
2. Miyazaki J, Tan BH, Errington SG, Kuo JS. Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. *Aust J Bot.* 2011;59(4):363-368.
 3. Lata H, Chandra S, Khan IA, ElSohly MA. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. *Phys and Mol Biol of Plants.* 2009;15(1):79-86.
 4. Greer SP, Rinehart TA. Dormancy and Germination In Vitro Response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* Seed to Light, Cold-Treatment and Gibberellic Acid. *J. Environ. Hort.* 2010;28(1):41-47.
 5. Moghaddam S, et al. Optimization of an Efficient Semi-Solid Culture Protocol for Sterilization and Plant Regeneration of *Centella asiatica* (L.) as a Medicinal Herb. *Molecules.* 2011;16(11):8981-8991
 6. Çolgecen H, Koca U, Toker G. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk J Biol.* 2011; 35:513-520
 7. Pouvreau J, et al. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* 2013;9:32
 8. Marecik R, Bialas W, Cyplik P, Lawniczak L, Chrzanowski L. Phytoremediation Potential of Three Wetland Plant Species Toward Atrazine in Environmentally Relevant Concentrations. *Pol. J. Environ. Stud.* 2012;21(3):697-702
 9. Pérez Flores J, Aguilar Vega ME, Roca Tripepi R. Assays for the in vitro establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2012;14(1)
 10. Nesterenko-Malkovskaya A, Kirzhner F, Zimmels Y, Armon R. *Eichhornia crassipes* capability to remove naphthalene from wastewater in the absence of bacteria. *Chemosphere.* 2012;87(10):1186-1191.
 11. Kieffer M, Fuller MP. In Vitro Propagation of Cauliflower Using Curd Microexplants. *Meth Mol Biol.* 2013;994:329-339.
 12. Kodym A, Temsch E, Bunn E, Delpratt J. Ploidy stability of somatic embryo-derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, Cyperaceae). *Aust J Bot.* 2012;60(5):396-404.
 13. Peña-Ramírez YJ, et al. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *PCTOC.* 2011;105(2):203-209.
 14. Haddadi F, Adb Aziz M, Saleh G, Abd Rashid A, Kamaladini H. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from In Vitro Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortScience.* 2010;45(3):453-456.
 15. Jimenez VM, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *PCTOC.* 2006;86:389-395.
 16. Compton ME, Koch JM. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in Melon, Petunia, and Tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 2001;37:259-261