बिरुवा उत्पादनको लागि तन्तु प्रजनन् प्रविधि

Plant Tissue Culture Technology

प्राविधिक लेख

लेखन तथा सम्पादन

अशोक लिम्बु

जैविक प्रविधि प्राविधिक अधिकृत

शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ्ग

पुनरावलोकनः

प्रा. डा. धुर्व प्रसाद गौचन

विभागीय प्रमुख, जैविक प्रविधि विभाग

काठमाडौं विश्वविद्यालय, धुलिखेल, काभ्रेपलाञ्चोक

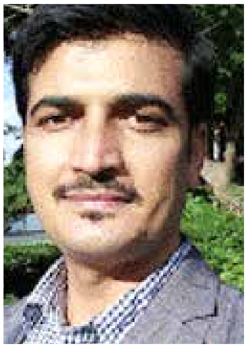
पद्मनाथ आत्रेय

केन्द्र प्रमुख,

शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ्ग

२०८१

मन्तव्य



नेपाल विविध हावापानी र भौगोलिक विविधताले भरिपुर्ण भएको देश हो। यहाँ उष्ण, उपोष्ण, समशीतोष्णदेखी शीतोष्ण हावापानी पाईन्छ र यस्तो हावापानीमा हुने विविध खालका कृषिबालीहरु उत्पादन गर्न सकिन्छ। कृषिको उत्पादन र उत्पादकत्व बृद्धिको अथाह सम्भावनाहरु हुँदाहुँदै पनि परम्परागत खेती पद्दति, गुणस्तरीय श्रोत वीउ बिरुवाको अभाव, रोगकीराहरुको प्रकोप आदिका कारण कृषि क्षेत्रबाट आशातीत फाईदा लिन सकिरहेका छैनौं। हाल विश्वमा भईरहेका कृषि प्रविधिहरु उचित प्रयोगसँगसँगै विकशित तथा कतिपय विकाशोन्मुख देशहरुले कृषिमा आधुनिक प्रविधिहरुको अवलम्वन गरी प्रतिकूल हावापानीमा पनि कम जनशक्तिहरुको परिचालन गरी कृषि उत्पादन र उत्पादकत्व वढाएर मनग्य आम्दानी गरिरहेका छन्। हाम्रो देशको लागि बिरुवा तन्तु प्रजनन् प्रविधि एक नयाँ प्रविधि हो। यसका विभिन्न प्रविधिहरुको ज्ञान कृषि प्राविधिक तथा कृषकहरुमा अत्यन्त न्युन छ। यस्तो परिप्रेक्षमा हामीले भौगोलिक हिसावले अलिक विकट मानिने मुस्ताङ्ग जिल्लामा पनि वि. स. २०७८ सालमा **तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला** (**Plant Tissue Culture Lab**) को स्थापना गरी शीतोष्ण फलफूलहरु (जस्तैः स्याउ, ओखर, कागजी वदाम, स्विट चेरी, आदि) तथा तरकारी (आलुका पूर्व मुल वीउ) हरुको स्वस्थ बिरुवा तथा वीउ उत्पादनका विविध कामहरु सुचारु रुपले अगाडि बढाईरहेका छौं। यस नविन प्रविधि सँगसँगै यहाँ सिकेका, अध्ययन अनुसन्धान गरेका तथा भोगेका समस्याहरुलाई समेटेर "**बिरुवा उत्पादनको लागि तन्तु प्रजनन् प्रविधि** (**Plant Tissue Culture Technology**)" नामक प्राविधिक पुस्तक शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र मार्फाबाट प्रकाशन हुन लागेको कुरा जानकारी गराउन चाहन्छु। नेपालमा बिरुवाको तन्तु प्रजनन् त्यसमा पनि बागवानी क्षेत्रसँग सम्वन्धित अध्ययन, अनुसन्धान र विकासका कार्यहरु नगण्य भए तापनि यस पुस्तकका लेखक तथा यस केन्द्रका जैविक प्रविधि प्राविधिक अधिकृत **श्री अशोक लिम्बु**को अथक प्रयासबाट यो पुस्तकलाई अन्तिम रुप दिन सक्षम हुनु भएकोमा विशेषतः उहाँलाई हार्दिक धन्यवाद दिन चाहन्छु।

यो पुस्तक नेपालको तराईदेखी हिमाली क्षेत्रसम्म कृषिमा विशेषगरी बागवानी क्षेत्रमा काम गर्ने सम्पुर्ण कृषकवर्गहरु, अनुसन्धान/शिक्षण/प्रसारमा काम गर्ने कृषिकर्मीहरु लगायत अन्य सरकारी तथा गैह्र सरकारी संस्थाहरुमा आवद्ध महानुभावहरुलाई अत्यन्त उपयोगी हुनेछ भन्ने अपेक्षा लिएको छु। अन्त्यमा यो पुस्तक प्रकाशनका क्रममा प्रत्यक्ष अप्रत्यक्ष रुपमा सहयोग गर्नुहुने सम्पुर्ण दिव्यजनहरुमा हार्दिक आभार प्रकट गर्न चाहन्छु। अस्तु।

पद्मनाथ आत्रेय
केन्द्र प्रमुख

मितिः २०८१ पुस शुभम।

मेरो भनाइ

प्रविधिको विकाससँगै विकशित देशहरुले प्रतिकूल हावापानी तथा कम जनशक्ति संलग्नताको बावजुद पनि आधुनिक प्रविधिको प्रयोग र वैज्ञानिक पद्दतिको अभ्यासद्वारा कृषि क्षेत्रको उत्पादन तथा उत्पादकत्व बढाउन सफल भइ रहेका छन। नेपालमा भने कृषि क्षेत्रको धेरै राम्रो सम्भावना भएता पनि सोचे जस्तो फाइदा लिन सकेका छैनौं। परम्परागत खेती पद्दति, गुणस्तरीय बिरुवा तथा बीउ उपलब्ध नहुनु, उपयुक्त प्रविधिको अभाव हुनु, विभिन्न फलफूल एवम् अन्य नगदेबाली खेतीहरुमा रोग फैलिँदै जानु आदि कारणहरुले गर्दा कृषि क्षेत्रमा विकशित देशहरुको तुलनामा धेरै कम उत्पादन तथा उत्पादकत्व रहेको छ।

सरकारी तथा निजी तवरबाट नेपालको कृषि क्षेत्रलाई सुधार गर्न केही प्रयासहरु भने देखिन्छन्। कृषि क्षेत्रलाई सुधार गर्न विभिन्न सरकारी फार्म केन्द्रहरु तथा निजी स्तरबाट गुणस्तरीय बिरुवाहरु उत्पादन गर्न आधुनिक उदयीमान प्रविधिको रुपमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरुको स्थापना गरी संचालन कार्य भइ रहेका छन्। यस प्रविधिबाट बिरुवाको कुनै पनि वानस्पतिक भागलाई प्रयोग गरी द्रुत गतिमा एकै नासका बिरुवाहरु धेरै संख्यामा उत्पादन गर्न सकिने र बिरुवाबाट भाइरस रोग उन्मूलन गरी निरोगी बिरुवा उत्पादन गर्न यो प्रविधिलाई उत्तम मानिन्छ। यस्ता स्थापना भएका तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरु पूर्ण रुपमा संचालन तथा गुणस्तरीय बिरुवा उत्पादन गर्न यस सम्बन्धि विशेष ज्ञान र सिपको आवश्यकता हुनु पर्दछ। तसर्थ सरकारी तथा निजी स्तरबाट संचालनमा रहेका तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालहरुमा एकरुपता कायम राख्नु र यस प्रविधिलाई प्रभावकारी रुपमा प्रयोग गर्न आवश्यक प्राविधिक पक्षलाई मध्यनजर राख्दै यो पुस्तक तयार पारिएको छ। वर्तमान अवस्थामा नेपालमा यस उदयीमान प्रविधिको बारेमा कृषि सम्बन्धित सरोकार राख्नु हुने सम्पूर्ण माझ पुऱ्याउन पनि आवश्यक रहेको छ।

यस पुस्तक विभिन्न अध्ययन अनुसन्धान संस्थाहरुबाट प्रकाशित लेखहरु, किताबहरु, तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा संलग्न विज्ञहरु तथा आफ्नो अनुभवलाई समेत समेटेर प्रकाशित गरिएको छ। यो पुस्तक विशेष गरी तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा संलग्न प्राविधिक, अनुसन्धानकर्ता, विद्यार्थी, व्यवसायी र कृषकहरु तथा यस सम्बन्धित सम्पूर्ण सरोकारवालाहरुलाई उपयोगी हुने विश्वास लिएको छु। यस पुस्तकमा भएका त्रुटी एवम् कमी कमजोरिहरुलाई सकारात्मक रुपमा औल्याई दिनु भएको खण्डमा यहाँहरु प्रति आभारी हुनेछु।

यस पुस्तक लेखन कार्यमा निरन्तर प्रेरणा, अमुल्य सुझाव र सहयोग गर्नु हुने प्रा. डा. धुर्व प्रसाद गौचन साथै वरिष्ठ बागवानी विज्ञ श्री पद्मनाथ आत्रेय तथा शीतोष्ण बागवानी केन्द्रका सम्पूर्ण कर्मचारीहरुका साथसाथै प्रत्यक्ष अप्रत्यक्ष रुपमा सहयोग गर्नु हुने सम्पूर्ण प्रति हार्दिक आभार प्रकट गर्न चाहन्छु।

अशोक लिम्बु

विषयसूची

क्र.सं.	शीर्षक	पृष्ठ
खण्ड १	बिरुवा उत्पादनका लागि तन्तु प्रजनन् प्रविधिको पृष्ठभूमि र संक्षिप्त इतिहास (Background and Brief History of Plant Tissue Culture Technology)	१
	१.१. पृष्ठभूमि (Background)	१
	१.२. संक्षिप्त इतिहास (Brief History)	२
	१.३. नेपालमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको इतिहास (Plant Tissue Culture Technology in Nepal)	३
	१.४. शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्रमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको अवस्था (Plant Tissue Culture Technology in Temperate Horticulture Developent Center)	३
खण्ड २	तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सिद्धान्त, फाइदा र बेफाइदाहरु (Principle, Advantages and Disadvantages)	५
	२.१. तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सिद्धान्त (Principle of Plant Tissue Culture Technology)	५
	२.२. तन्तु प्रजनन् प्रविधिका फाइदाहरु (Advantages)	५
	२.३. तन्तु प्रजनन् प्रविधिका बेफाइदाहरु (Disadvantages)	६
खण्ड ३	तन्तु प्रजनन् प्रविधिका लागि आवश्यक पूर्वाधारहरु (Required Infrastructures for the Plant Tissue Culture Technology)	७
	३.१. तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला निर्माण गर्दा ध्यान दिनुपर्ने मुख्य कुराहरु (Major Points to be Considered Before Laboratory Setup)	७
	३.२. तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको आधारभूत संरचना, उपकरणहरु, सुविधाहरु तथा कार्यहरु (Basic Layout, Equipments, Facilities and Function)	८
खण्ड ४	तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने विधिहरु (Sterilization Technique Used in Plant Tissue Culture)	१९
	४.१. कीटाणु निर्मलिकरण गरिने भौतिक र रसायनिक विधिहरु (Physical and Chemical Methods Used for Sterilization)	१९
खण्ड ५	वानस्पतिक नमूना/एक्सप्लान्ट (Explant)	२३
	५.१. एक्सप्लान्टका प्रकारहरु (Types of Explant)	२३

क्र.सं.	शीर्षक	पृष्ठ
	५.२. एक्सप्लान्ट संकलन गर्दा ध्यान दिनुपर्ने कुराहरु (Things to Consider When Collecting Explant)	२४
	५.३. एक्सप्लान्टको सतही कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने तरिका (Surface Sterilization of Explant)	२६
खण्ड ६	मिडिया र मिडियाका अवयवहरु (Media and it's Components)	२८
	६.१. अजैविक यौगिकहरु (Inorganic Compounds)	२८
	६.२. जैविक यौगिकहरु (Organic Compounds)	२९
	६.३. जेलिङ एजेन्ट (Gelling Agent)	३०
	६.४. प्रचलित मिडियाहरुको विवरण (Commonly Used Media)	३०
खण्ड ७	मिडिया बनाउने तरिका (Media Preparation Process)	३३
	७.१. स्टक सोलुसन बनाउने तरिका (Preparation of Stock Solution)	३३
	७.२. स्टक सोलुसनबाट मिडिया बनाउने तरिका (Preparation of Media from Stock Solution)	३६
	७.३. मिडिया बानाउदा वा कल्चर गर्दा प्रयोग गरिने कन्टेनर/भाँडा (Containers Used in Media Preparation or Culture)	३८
खण्ड ८	तन्तु प्रजनन्को प्रक्रिया (Process of Plant Tissue Culture)	३९
	८.१. तन्तु प्रजनन्को सामान्य प्रक्रियाहरु (General Process of Plant Tissue Culture)	३९
खण्ड ९	तन्तु प्रजनन्का प्रकारहरु र गुणस्तर मापन (Types of Plant Tissue Culture and Measuring the Quality)	४७
	९.१. बीउ कल्चर (Seed Culture)	४७
	९.२. मेरिस्टेम कल्चर (Meristem Culture)	४८
	९.३. आँख्ला कल्चर (Node Culture)	५२
	९.४. क्यालस कल्चर (Callus Culture)	५४
	९.५. हेप्लोइड कल्चर (Haploid Culture)	५५
	९.६. अन्य तन्तु प्रजनन्का प्रकारहरु (Other Types)	५७
	९.७. तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट उत्पादित बिरुवाहरुको गुणस्तर मापन (Measuring the Quality of Tissue Culture Plants)	५७
खण्ड १०	तन्तु प्रजनन् बिरुवाहरुमा देखिने समस्याहरु र तिनीहरुको निवारण (Problems and their Troubleshooting Occurred in Tissue Cultured Plants)	५९
	१०.१. सुक्ष्म जीवहरुको संक्रमण (Microbial Contaminants)	५९
	१०.२. बिरुवाको टुप्पो मर्ने (Shoot Tip Necrosis)	६०

क्र.सं.	शीर्षक	पृष्ठ
	१०.३. मिडिया र एक्सप्लान्टको ब्राउनिङ (Browning of Media and Explant)	६०
	१०.४. हाइपरहाइड्रेसिटी/भिट्रिफिकेशन (Hyperhydricity/Vitrification)	६१
	१०.५. रिकल्सिट्रान्स (Recalcitrance)	६२
	१०.६. ह्याविच्युएशन (Habituation)	६२
	१०.७. सोमाक्लोनल भिन्नता (Somaclonal Variation/Genetic or Chimeral Variation)	६३
खण्ड ११	कृषिमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग (Application of Plant Tissue Culture Technology in Agriculture)	६४
	११.१. तीव्र क्लोनल प्रसारण (Rapid Clonal Propagation)	६४
	११.२. रोगजनकहरुको उन्मूलन (Elimination of Pathogens)	६४
	११.३. आनुवंशिक रुपान्तरण (Genetic Transformation)	६५
	११.४. जर्मप्लाज्म संरक्षण (Germplasm Conservation)	६५
	११.५. वर्णशङ्कर बिरुवाको उत्पादन (Hybrid Production)	६५
	११.६. बिरुवा प्रजनन् कार्यक्रम (Plant Breeding Program)	६५
	११.७. कृषि अनुसन्धान र विकास (Agricultural Research and Development)	६५
खण्ड १२	नेपालमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिका अवसर र चुनौतिहरु (Opportunities and Challenges of Plant Tissue Culture Technology in Nepal)	६६
	१२.१. अवसरहरु (Opportunities)	६६
	१२.२. चुनौतिहरु (Challenges)	६७
खण्ड १३	तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा पालना गर्नुपर्ने सुरक्षाका नियमहरु (Safety Rules to be Followed in Plant Tissue Culture Laboratory)	६९
	सन्दर्भ सामग्रीहरु (References)	७०
	अनुसूची १	७३
	अनसूची २	७५
	अनुसूची ३	७७
	अनुसूची ४	७९

खण्ड १

बिरुवा उत्पादनका लागि तन्तु प्रजनन् प्रविधिको पृष्ठभूमि र संक्षिप्त इतिहास

१.१. पृष्ठभूमि

वनस्पतिय जैविक प्रविधि 'Plant Biotechnology' अन्तर्गत एउटा अभिन्न अंगको रुपमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिलाई लिएको पाइन्छ । तन्तु प्रजनन् (Plant tissue culture) वा माइक्रो प्रोपागेसन (Micropropagation) भनेको एकिकृत प्रविधि हो, जसमा बीउ तथा अन्य वानस्पतिक भागहरुको कोष वा तन्तु नमूनाहरु जस्तै; पात, टुप्पो, जरा, आँख्ला, काण्ड परागकोष, गर्भासय, मेरिस्टेम आदिलाई नियन्त्रित कृतिम वातावरणमा सुक्ष्म जीवहरूको संक्रमण नहुने गरी द्रुत गतिमा वृद्धि र विकास गराइन्छ। बिरुवा प्रसारको लागि धेरै विधिहरु मध्ये यो प्रविधि वैज्ञानिक रुपले प्रमाणित महत्वपूर्ण आधुनिक प्रविधि हो। वर्तमान अवस्थामा बिरुवा प्रजनन्को क्षेत्रमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा आनुवंशिक रुपमा ठीक माउबोट सरहका बिरुवाहरु उत्पादन गर्नको लागि एक उत्तम र व्यापक रुपमा परिचित हुदै गइरहेको प्रविधि हो। विशेषगरी व्यवसायिक कृषि, वन विज्ञान, औषधि निर्माण र अनुसन्धान क्षेत्रमा बिरुवाको तीव्र प्रसार, स्वस्थ्य र गुणस्तरीय, रोग प्रतिरोधी बिरुवा, उन्नत जातका बालीहरु, सेकन्डरी मेटाबोलाइट्स आदि उत्पादन गर्नका लागि यो प्रविधिको उपयोगिता उल्लेखनीय रुपले बढी रहेको छ।

नेपालमा कृषि क्षेत्रले लगभग २३ प्रतिशत राष्ट्रिय कुल ग्रार्हस्थ्य उत्पादन (GDP) मा योगदान पुऱ्याइ रहेकोले यस क्षेत्रलाई देशको अर्थतन्त्रमा महत्वपूर्ण मानिन्छ। मुलुकमा करिब ३० लाख ९१ हेक्टर खेतियोग्य जग्गा रहेको र राष्ट्रिय आय तथा रोजगारीमा कृषि क्षेत्रमा पनि बागवानी उपक्षेत्र अग्रपङ्तिमा रहेको छ। सन् २०२३ को तथ्याङ्क अनुसार विगत एक दशक यता नेपालमा फलफूल बालीको कुल खेती क्षेत्रफल १,३७,७५८ हेक्टरबाट बढेर १,८२,६४८ हेक्टरसम्म पुगेको छ । फलफूल बालीको कुल खेती, उत्पादनको क्षेत्रफल र उत्पादकत्व वृद्धि भए तापनि औसत उत्पादकत्व विगत दस वर्षमा ९.२५ टन प्रति हेक्टर बाट १०.९४ टन प्रति हेक्टरसम्म मात्र वृद्धि भएको छ जुन विकशित देशहरुको तुलनामा धैरै कम हो। उक्त फलफूल तथा अन्य कृषि बालीहरुको उत्पादकत्व सोचे जस्तो वृद्धि नहुनुको मुख्य कारणहरु मध्ये आवश्यकता अनुसार गुणस्तरीय बिरुवाहरु उपलब्ध नहुनु, परम्परागत खेती पद्दति र उपयुक्त प्रविधिको अभाव तथा प्रभावकारी रुपमा अवलम्बन गर्न नसक्नु रहेका छन्। त्यसैगरी विभिन्न फलफूल तथा अन्य नगदे बाली खेतीहरुमा धेरै रोग फैलिदै जाँदा उक्त बालीहरुको उत्पादकत्वमा ह्रास हुदै गइ रहेका छन्। वर्तमान अवस्थामा छोटो समयमा उच्च उत्पादन दिने नयाँ खालका व्यवसायिक खेती प्रणालीहरु शुरु हुँदै जानु, कृषकहरुमा खेतीप्रति सजक र चासो बढ्दै जानु आदि कारणहरुले गुणस्तरीय फलफूल बिरुवाहरुको माग पनि क्रमिक रुपमा बढी रहेको छ। नेपालमा फलफूलका बिरुवा मुख्यतयाः स्याउ, ओखर, केरा औपचारिक रुपमा इटली, चीन, भारत, टर्की तथा अन्य देशहरुबाट आयात भइरहेको छ। यसैगरी फ्लोरिकल्चर एशोसिएसन नेपाल (FAN) को तथ्याङ्क अनुसार फलफूलसँगै पुष्पजन्य बिरुवाहरुको आयातमा पनि निरन्तर वृद्धि भइरहेको छ। त्यसैले बढ्दो खाद्यान्न, गुणस्तरीय फलफूल र अन्य

नगदे बाली बिरुवाहरुको आवश्यक माग पुरा गर्न परम्परागत खेती तथा बिरुवा प्रसारण पद्दतिलाई परिष्कृत गर्न वैज्ञानिक कृषि प्रविधिलाई अंगाल्नै पर्ने देखिन्छ। तसर्थ वर्तमान अवस्थामा नेपालको कृषि क्षेत्रमा वैज्ञानिक प्रविधिको रुपमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग गरी थप कृषि क्षेत्रलाई मजबुत बनाइ महत्वपूर्ण योग्दान पुऱ्याउन सकिन्छ। यो प्रविधि परम्परागत प्रजनन् विधिहरु भन्दा धेरै फाइदाजनक र प्रभावकारी भएको पाइन्छ।

गुणस्तरीय बिरुवाको उत्पादन होस वा जेनेटिक ईन्जिनियरिङ् र मलिक्युलर बायोलोजिद्वारा विश्वको विकसित देशहरुमा नयाँ प्रजातिका बिरुवाहरुको विकास पनि तन्तु प्रजनन् प्रविधि विकासकै करणले मात्र सम्भव भएको हो। तन्तु प्रजनन् प्रविधि संचालन कार्यको लागि धेरै खर्च र कुशल प्राविधिक आवश्यकता पर्दछ तथापि यसबाट कृषि अनुसन्धान तथा कृषि व्यवसायिकरण मार्फत ठूलै फाइदा लिन सकिन्छ। त्यसैले यस प्रविधिको प्रयोग गरी खाद्यान्न र गुणस्तरीय बिरुवाहरुको बढ्दै गइरहेको मागलाई पुर्ती गर्न थप टेवा पुऱ्याउनुका साथै कृषि क्षेत्रमा अध्ययन र अनुसन्धानका साथसाथै आधुनिकिकरण, यान्त्रिकरण एवम् व्यवसायिकरणमा उल्लेखनिय योगदान पुऱ्याउन सकिन्छ।

१.२. संक्षिप्त इतिहास

विश्वमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रारम्भ भने १८ औं शताब्दीको अन्त्यतिर भएको पाइन्छ तथापि प्रविधि विकासको युग भने १९४० देखि १९६० ई. स. बीच भएको थियो। Mathias Schleiden / Theodor Schwann ले सन् १८३८ मा दिएका 'कोष सिद्दान्त' को अवधारणालाई जर्मन वनस्पति शास्त्री हैबेरलांट (Gottlieb Haberlandt) ले प्रमाणित गरी १९०२ ई .स. मा तन्तु प्रजननको सैद्धान्तिक आधार जर्मन एकेडेमी अफ साइन्समा सम्बोधन गरेका थिए र उनको थप अग्रगामी प्रयोगहरुका आधारमा उनलाई तन्तु प्रजननका जनक मानिन्छन्। सन् १९०४ मा Henning ले पहिलो पटक सफलतापूर्वक भ्रूण कल्चर गरेका थिए भने १९२२ मा कोटे र रोबिन्सले बिरुवाको जरा र डाँटको तन्तुलाई कल्चर गरेका थिए। सन् १९३९ सम्ममा R. Gautheret, P. Nobecourt र P.R. White ले क्यालस कल्चरको विकास गरे। G. Morel र C. Martin ले सन् १९५० मा मेरिस्टेम कल्चरद्वारा डाहलियाबाट भाइरस मुक्त गरेका थिए र पछि सन् १९६३ तिर अर्किड प्रसारको लागि मेरिस्टेम कल्चर गरेका थिए। तोसियो मुरासिगे र फोलके के. स्कुगले सन् १९६२ ई.स मा सबै भन्दा बढी प्रयोग गरिने तन्तु प्रजनन् मिडिया मुरासिगे-स्कुग (MS) को विकास गरे यता विभिन्न प्रजातिका बिरुवाहरुको तन्तु प्रजनन् प्रोटोकलहरु विकास गर्न महत्वपूर्ण योग्दान पुऱ्याएको छ। १९६० को दशक र १९७० को प्रारम्भिक दशकमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको व्यवसायिक उपयोगिताको थालनी भएको पाइन्छ। तन्तु प्रजनन् प्रविधिको विस्तार सन् १९७० दशक यता संयुक्त राज्य अमेरिका, युरोप, अस्ट्रेलिया र एसियामा व्यवसायिक नर्सरी प्रयोगशालाहरुमा प्रयोग र थप विकास हुदै आइरहेको छ। वर्तमान २१ औं शताब्दी तिर आइपुग्दा छिमेकी राष्ट्रहरु चीन र भारतले सक्रिय रुपमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग व्यवसायिक बिरुवा उत्पादन र अनुसन्धान क्षेत्रमा गरिरहेका छन्। हाल हजारौं विभिन्न प्रजातिका बिरुवाहरुको इन भिट्रो प्रोटोकलहरु विकास गरिएका छन् जुन विशेषगरी व्यवसायिक प्रसारणको लागि प्रयोग भइरहेका छन्।

१.३. नेपालमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको इतिहास

नेपालको सन्दर्भमा सन् १९७६ मा सर्पगन्धा (Rauvolfia serpentina) वनस्पतिको प्रजनन् राष्ट्रिय हर्बेरियम तथा वनस्पति प्रयोगशाला (KATH, DPR) बाट तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सुरुवात भएको थियो। त्यसपछि बाँस, बीज र मेरिस्टेमबाट अर्किड आदि वनस्पतिहरुमा इन भिट्रो कल्चरको प्रयास भएको पाइन्छ। सन् १९८९/९० मा आलुको पूर्व मुल बीउ राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम (NPRP) बाट उत्पादन शुरु भएको थियो। हिउँदे फलफूल तथा सुन्तलाजात फलफूलको विकासको लागि जापान सरकारको सहयोगमा वागवानी विकास आयोजान (HDP) अन्तर्गत सन् १९८५ देखि १९९७ को अन्तरालमा तत्कालिन केन्द्रिय बागवानी केन्द्र र हालको समशीतोष्ण बागवानी केन्द्र, कीर्तिपुरमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको स्थापना भएको थियो तथापि उक्त कार्य लामो समयसम्म संचालनमा आउन सकेन। पछि सन् २०१९ बाट पुन संचालन कार्य हुदै आइरहेको छ। सन् २०१० पछि विभिन्न निजी क्षेत्रहरुबाट तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग व्यवसायिक बिरुवा उत्पादन र अनुसन्धानको लागि कामहरु भइरहेका छन्। वर्तमान अवस्थामा नेपालमा सरकारी स्वामित्वमा रहेका विभिन्न फार्म केन्द्रहरुमा पनि तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला विभिन्न प्रयोजनका लागि स्थापना भए सँगै कार्य संचालन भइरहेका छन्। वि.स. २०८१ सम्ममा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला स्थापना गरिएका विभिन्न सरकारी फार्म केन्द्रहरु यस प्रकार छन्;

- समशीतोष्ण बागवानी केन्द्र, कीर्तिपुर, काठमाण्डौ
- आलुबाली विकास केन्द्र, निगाले, सिन्धुपाल्चोक
- शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ्ग
- अलैंची विकास केन्द्र, फिक्कल, ईलाम
- उष्ण प्रदेशिय बागवानी विकास केन्द्र, नवलपुर, सर्लाही
- सुन्तलाजात फलफूल विकास केन्द्र, तानसेन, पाल्पा
- पुष्प विकास केन्द्र, गोदावरी, ललितपुर,

थप अनुसूची १ को तालिका ९ मा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला भएका विभिन्न सरकारी केन्द्रहरुको विवरण दिइएको छ।

१.४. शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्रमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको अवस्था

शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र मार्फा मुस्ताङ्गमा वि.स. २०७८ सालबाट तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला विशेष गरी प्रविधिको प्रचारसँगै शीतोष्ण फलफूलजन्य बिरुवाहरुको संरक्षण, संवर्द्धन एवम् गुणस्तरीय बिरुवाहरु उत्पादनको लागि स्थापना भएको छ। यस केन्द्रमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला स्थापना भएसँगै शीतोष्ण फलफूलहरुको बिरुवा जस्तै; उच्च घनत्व स्याउका रुटस्टक, ओखर, कागजी बदाम आदिको उत्पादन स्वदेशमा नै गरी हालको उच्च आयात अवस्थालाई कम गर्नेछ र गुणस्तरीय बिरुवाहरुको दिगो उत्पादन र आत्मनिर्भरता तर्फ ठूलो टेवा पुग्नेछ। साथै मुस्ताङ्गमा राम्रो उत्पादन हुने र परम्परागत रुपमा खेती गर्दै आईरहेको बालीहरु मध्ये एक आलु पनि हो। तसर्थ आलु खेतीको विकास एवम् विस्तार गर्नका लागि आलुको पूर्व मूल बीउ उत्पादन गर्नु पनि यसको एक

उद्देश्य रहेको छ। यस केन्द्रमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला स्थापना भएको पाँच वर्षभित्र यस प्रविधिबाट उत्पादन गरिएको बिरुवाहरु व्यवसायिक फलफूल खेती गर्ने कृषकमाझ पुऱ्याउने लक्ष्य यस केन्द्रको रहेको छ। स्थापना कालको प्रारम्भ अवस्थामा रहेको यस तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा हाल विभिन्न शीतोष्ण फलफूलहरुको बिरुवा उत्पादनको लागि अनुसन्धान र परीक्षणका कार्यहरु भइरहेका छन्।

१.४.१. हालसम्म भएको र भइरहेका केही गतिविधिहरुः

- तन्तु प्रयोगशालामा उच्च घनत्व स्याउ रुटस्टक (M9, MM111 र G16) र नासपातीको रुटस्टक मयल (Himalayan wild pear) को सफलतापूर्वक इन भिट्रो (in vitro) माउबोट स्थापना भएका छन्।
- उच्च घनत्व स्याउ रुटस्टक (M9, MM111 र G16) को माउबोटबाट प्रसारण कार्य भइरहेको छ।
- M9 स्याउ रुटस्टकको प्राइमरी र सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग कार्यहरु सफलतापूर्वक भएका तथा अन्य स्याउ रुटस्टक जस्तै; MM111 र G16 को परीक्षण भइरहेका छन्।
- M9 स्याउ रुटस्टकको सफलतापूर्वक फिल्ड ट्राइल गरिएको तथा थप परीक्षण भइरहेको छ।
- सफलतापूर्वक मुस्ताङ्गको स्थानिय आलुको मेरिस्टेम कल्चरबाट इन भिट्रो (in vitro) माउबोट स्थापना गरिएको र यसबाट Pre-basic seed (PBS) उत्पादन पनि गरिएको छ।

(क) (ख) (ग) (घ) (ङ)

चित्र १: शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र मार्फामा तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट इन भिट्रो बिरुवाहरु स्थापना गरिएको (क) **M9** *स्याउको रुटस्टक (ख)* **MM111** *स्याउको रुटस्टक (ग)* **G16** *स्याउको रुटस्टक (घ) मयल नासपातीको रुटस्टक (ङ) मुस्ताङ्गको स्थानिय आलु*

थप शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्रमा रहेको तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला तथा विभिन्न कार्यहरु भई रहेका केही झलकहरु अनुसूची ४ मा दिइएको छ।

तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सिद्धान्त, फाइदा र बेफाइदाहरू

२.१. तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सिद्धान्त

तन्तु प्रजनन्को आधारभूत अवधारणा भनेको द्रुत गतिकासाथ धेरै संख्यामा आनुवंशिक रुपमा ठीक माउबोटमा भएका गुणहरुनै भएका रोगकीरा मुक्त गुणस्तरीय बिरुवाहरु उत्पादन गर्नु हो । यो उद्देश्यको लागि कुनै पनि वानस्पतिक भागहरुको कोष वा सानो तन्तु नमूना (Explant) को प्रयोग गरिन्छ र यसलाई नियन्त्रित कृतिम अवास्थामा सुक्ष्म जीवहरूको संक्रमण नहुने गरी वृद्धि र विकास गराइन्छ । यो प्रविधि पूर्ण सक्तता (Totipotency) र पलास्टिसिटी (Plasticity) सिद्धान्तमा आधारित रहेको हुन्छ । पूर्ण सक्तता अर्थात प्रत्येक कोषिकाले हुर्कने परिवेश पाएमा पुनः बिरुवा उत्पन्न गर्न सक्ने क्षमता रहेको हुन्छ । प्रत्येक सोमाटिक कोष (Somatic cell) को आनुवंशिक बनावट (DNA अनुक्रम) ठीक भ्रूणमा भए जसरी समान रहेको हुन्छ, तसर्थ यसमा जीव उत्पन्न गर्ने सम्पूर्ण गुणहरु हुन्छ । त्यस्तै पलास्टिसिटी भन्नाले बिरुवाहरुको क्षमता हो जुन तिनीहरुले उपयुक्त वातावरणमा वृद्धि, मेटाबोलिज्म, र विकासलाई परिवर्तन गर्न सक्छन् ।

यस प्रविधिमा बिरुवाको प्रसार गर्नका लागि चाहिने आवश्यक कृतिम अवस्थाहरु जस्तै; पोषक तत्व, तापक्रम, प्रकाश, सापेक्षित आद्रता र हावाको सन्तुलन कायम गरिएको हुन्छ। एकल कोष, कोषभित्ता हटाइएको कोष (प्रोटोपलाष्ट), पातका टुक्राहरु, काण्ड वा जरा ईत्यादिहरुलाई तन्तु प्रजनन् मिडियामा नयाँ बिरुवा उत्पन्न गर्न प्रयोग गरिन्छ। यस प्रविधिमा वानस्पतिक नमूना तन्तुको वृद्धि र विकासको लागि चाहिने पोषक तत्वहरु ठोस मिडिया (Solid media) वा अर्ध-ठोस मिडिया (Semi–solid media) वा तरल मिडिया (Liquid media) माध्यमबाट प्रदान गरिन्छ। यस मिडियामा बिभिन्न तत्वहरु जस्तै; मुख्य पोषक तत्वहरु (Macronutrients), सुक्ष्म पोषक तत्वहरु (Micronutrients), अजैविक (Inorganic) श्रोतहरु, न्युन मात्रामा जैविक यौगिकहरु, भिटामिनहरु, हर्मोनहरु र जेल्लिंग एजेन्टहरुको (Gelling agents) सन्तुलन कायम गरिएको हुन्छ। एकल कोष नियन्त्रण गर्न व्यवहारिक रुपमा कठिन हुनाले सामान्यतया एउटा सानो तन्तु एवम् अंगको नमूना प्रयोग गरी तन्तु प्रजनन् कल्चरको कार्य शुरु गरिन्छ। तन्तु प्रजनन् प्रविधिलाई बिरुवा कोष वा तन्तु वा अंग प्रजनन् प्रविधि पनि भनिने गरिन्छ। यस प्रविधिबाट उत्पादित बिरवाहरुलाई तन्तु प्रजनन् (Tissue cultured raised plants) बिरुवाहरु भनिन्छ।

२.२. तन्तु प्रजनन् प्रविधिका फाइदाहरु

तन्तु प्रजनन् प्रविधिका फाइदाहरु यस प्रकार छन्;

- अपेक्षाकृत रुपमा कम समय र ठाउँमा माउ बिरुवाको केवल एउटा सानो एक्सप्लान्टको प्रयोग गरी एकै नाशका बिरुवाहरु आवश्यक संख्यामा बिना मौसम अवरोध उत्पादन गर्न सकिने।
- बिरुवाबाट भाइरस तथा अन्य जीवाणु रोग उन्मूलन गरी स्वस्थ तथा निरोगी बिरुवाहरु उत्पादन गर्न

सकिने ।

- गुणस्तरीय, राम्रो फूल, उच्च फल दिने अथवा आँफूलाई चाहिएको गुण भएको बिरुवाको ठीक उस्तै बिरुवाहरु उत्पादन गर्न सकिने ।
- बिरुवा प्रजनन् कार्यक्रम अन्तर्गत समयुग्मजी (Homozygous) बिरुवा विकास गर्न परम्परागत अभ्यासबाट धेरै समय लाग्ने तर यस प्रविधिको प्रयोगबाट छोटो समयमा नै विकास गर्न सकिने ।
- अंकुरण सहज रुपमा नहुने बीजको अंकुरण गर्न सकिने ।
- बिरुवाको विकासलाई चाहिने आवश्यक पोषक तत्वहरु, तापक्रम, प्रकाश र अन्य कारकहरुको नियन्त्रण गर्न अन्य परम्परागत अभ्यासहरु भन्दा अधिक प्रभावकारी हुने ।
- दुर्लभ र लोप हुन लागेका बिरुवाहरुका प्रजातिको संरक्षण एवम् संवर्द्धन गर्न सकिने ।
- जैविक अनुसन्धान क्षेत्र जस्तै; आणविक प्रजनन् (Molecular breeding) मा यो प्रविधिको प्रयोगबाट आनुवंश रुपान्तरण गरी उन्नत जातका रोग तथा अन्य प्राकृतिक प्रकोप प्रतिरोधी बिरुवाहरु उत्पादन गर्न सकिने ।
- कृषि, वन विज्ञान एवम् अनुसन्धान क्षेत्रमा यस प्रविधिको माध्यमबाट बिरुवाहरुको जैविक रसायन अध्ययन गर्न सकिने ।
- यस प्रविधिको माध्यमबाट Secondary metabolites उत्पादन गरी औषधि निर्माण क्षेत्रमा योगदान पनि पुऱ्याउन सकिने ।

२.३. तन्तु प्रजनन् प्रविधिका बेफाइदाहरु

तन्तु प्रजनन् प्रविधिका बेफाइदाहरु यस प्रकार छन्;

- सञ्चालन कार्यको लागि उच्च खर्च र कुशल जनशक्तिको आवश्यकता पर्दछ। यदि सिमित मात्रामा बिरुवा उत्पादन गरे व्यवसायिक रुपमा फाइदा लिन सम्भव हुदैन ।
- प्रयोशालामा जैविक सुरक्षाका नियमहरु पालना गर्नुपर्ने हुन्छ अन्यथा प्रसार गरिएका कल्चरहरुमा सुक्ष्म जीवहरुको संक्रमणले मर्ने हुन्छ जसबाट ठूलो आर्थिक नोक्सानी बेहोर्नु पर्ने हुन सक्छ।
- यस प्रक्रियामा बिरुवाहरु उत्पादनका लागि विशेष प्रजाति अनुसार प्रोटोकलको आवश्यकता पर्दछ। यदि प्रोटोकल नभएमा प्रोटोकल अनुकूलन (Protocol optimization) गर्नुपर्ने हुन्छ र यो प्रक्रिया कहिले काँही लामो समय पनि लाग्ने गर्दछ।
- यस प्रक्रियाबाट प्रसार गरिएका बिरुवाहरुमा समय क्रम अनुसार क्रोमोजोम असामान्यता हुने सम्भावना पनि हुन्छ। यसलाई सोमाक्लोनल भिन्नता (Somaclonal variation) पनि भनिन्छ। यस अवस्थामा अनावश्यक गुण/गुणहरु प्रसार गरिएका बिरुवाहरुमा देखिन्छन् ।
- माउ बोटको स्वस्थ, जातिय शुद्धता र अन्य गुणहरु प्रसार गर्नु अगाडि राम्रोसँग जाँच्नु पर्दछ अन्यथा प्रसार गरिएका बिरुवाहरु न्यून गुणस्तर हुने सम्भावना हुन्छ।

तन्तु प्रजनन् प्रविधिका लागि आवश्यक पूर्वाधारहरु

तन्तु प्रजनन् प्रविधिलाई अपनाउनुको लागि विभिन्न आवश्यकताहरु पर्दछन्। तपशिल बमोजिम आधारभूत आवश्यकताहरु जस्तै;

- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला र उपकरणहरु
- मिडियाका अवयवहरु
- वानस्पतिक नमूना
- अनुकूलन गर्ने क्षेत्र (प्राइमरी हार्डनिङ र सेकेण्डरी हार्डनिङ सेक्सन)
- गुणस्तर नियन्त्रण तथा प्रमाणीकरण
- स्वच्छता कायम अनि अभ्यास

३.१. तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला निर्माण गर्दा ध्यान दिनुपर्ने मुख्य कुराहरु

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला निर्माण गर्नु अघि विशेष ध्यान दिनु पर्दछ अन्यथा प्राविधिक त्रुटि भई बिरुवा उत्पादनमा प्रतिकुल असर पर्न सक्छ। त्यसैले तन्तु प्रजनन् प्रोगशाला निर्माण गर्दा निम्नलिखित मुख्य कुराहरुमा ध्यान पुऱ्याउनु पर्दछ;

- निर्माण गरिने स्थान राम्रो घाम लाग्ने तर धेरै ओसिलो नभएको हुनु पर्दछ। यस्तो छनौट गरिएको स्थान नजिकैको वातावरणमा धुलो तथा कुनै पनि प्रकारको प्रदुषण हुनु हुदैन। साथै प्रयोगशाला नजिकै बिरुवा 'अनुकूलन' गर्ने क्षेत्र हुनुपर्दछ।
- ठाँउको भौगोलिक अवस्था अनुसार प्रयोगशालाको संरचना कंक्रिट, प्रिकास्ट, प्रिफेब आदिबाट निर्माण गर्न सकिन्छ।
- प्रयोगशाला निर्माण गरिएको स्थानमा पानी नजम्ने किसिमले ढल बनउनु पर्दछ।
- ढुसीजन्य प्रकोपबाट बचाउन भित्ता तथा सिलिङ्ग फेब्रिक वा बालुवा तथा गिटीको प्रयोग गर्न सकिन्छ। बालुवा तथा गिटीको प्रयोग गर्दा भित्ता तथा सिलिङ्गको सतहलाई चिल्लो बनाइ ढुसी प्रतिरोधी रंग लगाउनु पर्दछ।
- भुई कंक्रिटबाट बनेको चिल्लो अथवा टाईल तथा मार्बलको हुनुपर्दछ।
- प्रयोगशालाको ढोकाहरु तथा बफर जोन फराकिलो वा कम्तिमा पनि १.५ मीटर चौडा भएको हुनु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा प्रयोग हुने ढोका एवम् झ्यालहरु आद्रता नसोस्ने र खिया नलाग्ने प्रकृतिको जस्तै; आल्मोनियम, सिसा, स्टिल आदिबाट बनेको राख्नु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा प्रयोग हुने औजार, उपकरण, रसायन आदि राख्ने उपयुक्त स्थान बनाउनु पर्दछ।

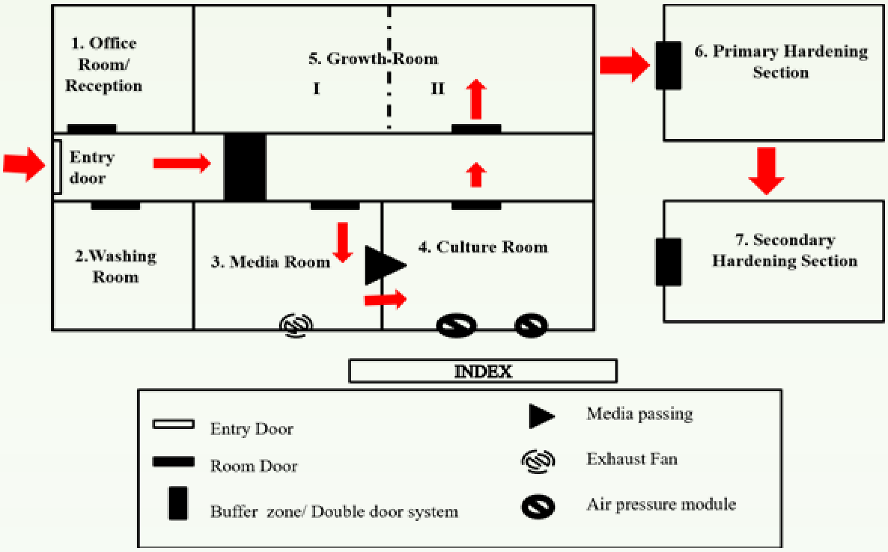
- प्रत्यक्ष रुपमा धुलो तथा अन्य सुक्ष्म प्रदूषकहरुको आवतजावत रोक्न सिसाको झ्यालहरु सिल गरिएको हुनु पर्दछ भने प्रयोगशाला भित्र स्वच्छ हावा कायम गर्न एयर प्रेसर मड्युल सिस्टम जडान गर्नुपर्दछ।
- पानी र बिजुलीको धेरै आवयश्कता पर्दछ त्यसैले पानी र विजुलीको राम्रो प्रबन्ध मिलाउनु पर्दछ। UV-filter system जडित पानीको व्यवस्था हुनु पर्दछ भने विजुली थ्रि फेज लाईन जडित र अर्थिङ्ग गरिएको हुनु पर्दछ।
- प्राय बिरुवाहरु तथा आवश्यक सामग्रीहरुको ढुवानी गर्नुपर्ने हुदा नजिकै सडक सुविधा भएको राम्रो हुन्छ।
- प्रयोगशाला सम्बन्धित मापदण्डहरु अध्ययन गर्ने तथा सम्बन्धित प्राविधिक विज्ञसँग परामर्श लिनु पर्दछ।

चित्र २: सिसा घर निर्माण गरिदैं

३.२. तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको आधारभूत संरचना, उपकरणहरु, सुविधाहरु तथा कार्यहरु

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको क्षेत्रफल र संरचना कस्तो र कत्रो तथा के कस्ता सुविधाहरु हुनुपर्छ भन्ने निर्धारण कति परिष्कृत बनाउने, कति क्षमतामा बिरुवा उत्पादन गर्ने र कति लागतमा बनाउने कुराहरुमा भर पर्दछ। प्राय सबै जसो तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको आधारभूत संरचना अन्तर्गत कम्तिमा पनि तीनवटा कोठा भएको हुनु पर्दछ तर अफिस/रिसेप्सन कोठा सहित अन्य चारवटा अलग-अलग कोठाहरु; भाँडा धुने कोठा, मिडिया बनाउने कोठा, कल्चर गर्ने कोठा र बिरुवालाई हुर्काउने कोठा भएको राम्रो मानिन्छ। यसका साथै प्रयोगशालामा तयार भएका बिरुवाहरुलाई रुपान्तरण गर्नलाई प्राइमरी हार्डनिङ र सेकेण्डरी हार्डनिङ सेक्सन छुट्टै प्रयोगशाला नजिकै हुनुपर्दछ।

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको थप आधाभूत संरचना, उपकरणहरु, सुविधाहरुको तथा गरिने कार्यहरुको बिस्तृत जानकारी यस प्रकार छन्;



चित्र ३: तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको आधारभूत संरचना

३.२.१. अफिस/रिसेप्सन कोठा

अफिस/रिसेप्सन कोठा विशेष गरी तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको सम्बन्धित योजना तथा संचालनको निम्ति यसमा काम गर्ने कर्मचारीहरुले बसेर छलफल गर्ने, प्रयोगशालामा गरिएका कामहरुको रेकर्ड राख्ने, इन्टरनेटको प्रयोग गरी प्रकाशीत कृति, दस्तावेज तथा कागजातहरुको समिक्षा गर्न प्रयोग हुन्छ। थप यस कोठामा आगन्तुक पाउनाहरुसँग अन्तरक्रिया गर्ने तथा निजी सामानहरु राख्नको लागि पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ। टेबल, कुर्सी, कम्प्युटर, प्रिन्टर, दराज, रजिस्टर, फाईल आदि यस कोठामा हुनु पर्दछ। यो कोठाको क्षेत्रफल आवश्यकता अनुसार निर्धारण गर्न सकिन्छ।

३.२.२. भाँडा सफा गर्ने कोठा

प्रयोगशालामा दैनिक प्रयोग गरिने तथा प्रयोग गरिएका फोहोर सिसाका भाँडा तथा अन्य सामानहरुलाई नियमित सफाई गर्नका लागि एउटा अलगै भाँडा सफा गर्ने कोठाको आवश्यकता पर्दछ जसमा तातो एवम् चिसो पानी आउने व्यवस्था गर्नु पर्दछ। सिसाका भाँडा तथा अन्य सामानहरु धुनको लागि कम्तिमा पनि २ वटा वाटर सिन्क (water sink), एउटा अटोक्लेभ, एउटा कपडा धुनी मिसिन (washing machine) तथा अन्य सफाई गर्ने वस्तुहरु जस्तै; डिटरजेन्ट, भोल युक्त साबुन, फिनोल आदि हुनुपर्दछ। अन्य सामानहरु जस्तैः पलास्टिक ट्रे, बकेट, मग आदि आवश्यकता अनुसार राख्न सकिन्छ। सामान भण्डारणको लागि खिया र ढुसी नलाग्ने र्‍याक तथा यस्तै प्रकृतिको वस्तु राख्न सकिन्छ। भाँडा सफा गर्ने कोठाको क्षेत्रफल प्रयोगशालाको क्षमतामा भर पर्दछ तथा आवश्यकता अनुसार बनाउन सकिन्छ। सामान्यतया यस कोठाको क्षेत्रफल ३० देखि ५० वर्ग मीटर हुनु राम्रो मानिन्छ।

३.२.३. मिडिया बनाउने कोठा

यस कोठामा बिरुवालाई हुर्कन र विकासको लागि चाहिने आवश्यक पोषक तत्वहरुको सन्तुलित मिडियाहरु तयार गरिन्छ। साथै यस कोठामा मिडिया बनाउनका लागि प्रयोग हुने विभिन्न पोषक पदार्थ, रसायन, भिटामिन, हर्मोन, जेल्लिंग एजेन्ट आदिको व्यवस्था गरिएको हुन्छ र भण्डारण गर्नको लागि खिया तथा ढुसी नलाग्ने केविनेट, दराज वा ऱ्याकहरुको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस कोठाको क्षेत्रफल फराकिलो भएको राम्रो वा कम्तिमा २० वर्ग मीटर अथवा मापदण्ड तोके अनुसार बनाउनु पर्दछ। मिडिया राख्नको लागि सीसाको वा पलास्टिकको कल्चर जार, कल्चर ट्यूब, पेट्री डीस आदि सामानहरु यसै कोठामा भण्डारण गर्नुपर्दछ। मिडियालाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्नको लागि कम्तिमा एउटा अटोक्लेभ (Autoclave) हुनु पर्दछ। अन्य आवश्यक उपकरणहरु जस्तै; डिजिटल तौल मेसिन, पीएच मीटर, फ्रिज, चुम्बकीय उत्तेजक (Magnetic stirrer), पिपेट, माइक्रोवेब ओभन, ग्यास वा विधुतिय चुला आदि पनि यसै कोठामा हुनु पर्दछ। मिडिया बनाउन वा सिसाका भाँडा पखाल्नका लागि डि- आयोनाइज पानी वा डिस्टिल पानीको आवश्यकता पर्ने हुदा यस कोठामा एउटा डबल डिस्टिलेसन एकाइ (Double Distillation Unit) पनि हुनुपर्दछ। थप यस कोठामा डिस्टिल पानी बनाउनको लागि तथा सिसाका भाँडाहरु पखाल्नको लागि पानीको आवश्यकता पर्नाले डबल ट्र्याप सिस्टमको धारा जडित हुनु पर्दछ। त्यसैगरी पखाली सकेका सिसाका भाँडा तथा अन्य सामानहरुलाई सुख्खा र कीटाणु निर्मलिकरण गर्न कम्तिमा एउटा हट एयर ओभनको पनि व्यवस्था हुनु पर्दछ।

चित्र ४: (a) मिडिया बनाउने कोठा र यस कोठामा प्रयोग गरिने उपकरणहरु; (b) हट एयर ओभन, (c) डबल डिस्टिलेसन एकाइ, (d) डिजिटल तौल मिसिन, (e) पीएच मीटर, (f) विधुतिय चुला, (g) र (k) अटोक्लेभ, (h) चुम्बकीय उत्तेजक, (i) पिपेट, (j) माइक्रोवेब ओभन, (l) बेसिन

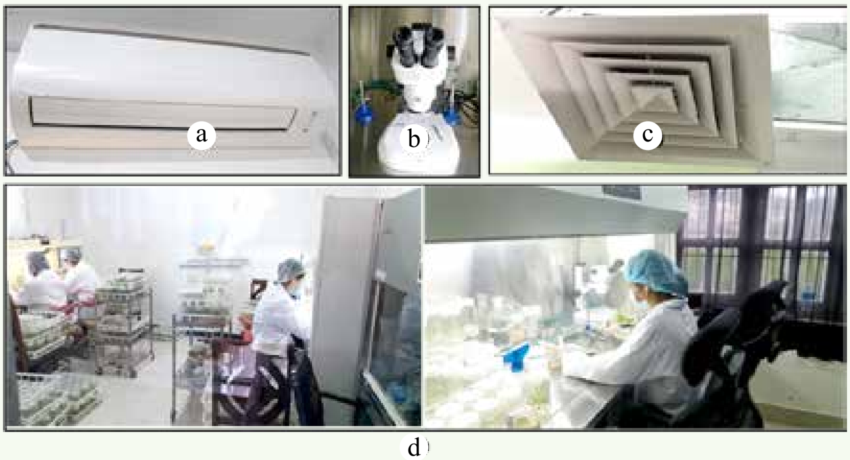
मिडिया बनाउने कोठामा हुनु पर्ने आवश्यक उपकरण र रसायनहरुको विवरण निम्नानुसार छन्;

- Hot air oven
- Digital weighing machine
- Double distillation unit

- pH meter
- Electric oven
- Autoclave
- Magnetic stirrer
- Micopipette र tips
- Vortex mixture
- Microwave oven
- Glasswares (measuring cylinder, conical flask, beaker, volumetric flask, culture jars, reagent bottles, petriplates)
- Air pressure module system
- Chemicals (तालिका ५ मा दिए अनुसार)

३.२.४. कल्चर गर्ने कोठा

कल्चर गर्ने कोठा विशेष गरी कीटाणु निर्मलिकरण गरिएका बिरुवा नमूनालाई इन भिट्रो स्थापना गर्न तथा इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई नयाँ मिडियामा कल्चर (culture) तथा सब-कल्चर (subculture) गर्नको लागि प्रयोग गरिन्छ। यस कोठामा मिडिया भण्डारण पनि गर्न सकिन्छ र सो भण्डारणको लागि आवश्यक संख्यामा खिया र ढुसी नलाग्ने दराज वा र्‍याकहरुको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यो कोठामा अतिनै संवेदनशील कार्य हुने भएकोले विशेष सतर्कता अपनाउनु पर्दछ। यस कोठामा कुनै पनि प्रकारको ढुसी तथा सुक्ष्म जीवाणुहरुको प्रत्यक्ष रुपमा संक्रमण नहुने वातावरण कायम राख्नुपर्छ। साथै यो कोठा धेरै ओसिलो हुनु हुदैन। यस कोठाको क्षेत्रफल कम्तिमा २० वर्ग मीटर वा आवश्यकता वा माप दण्ड तोके अनुसार बनाउनु पर्दछ। लामो समयसम्म कार्य गर्नुपर्ने हुनाले यस कोठामा स्वच्छ हावा कायम गर्न एयर प्रेसर मड्युल सिस्टम जडान गर्नुपर्दछ। तापक्रम तथा आद्रता नियन्त्रण गर्न अन्य उपकरणहरु जस्तैः AC, dehumidifier आदि आवश्यकता अनुसार जडान गर्न सकिन्छ।



चित्र ५: कल्चर गर्ने कोठाको सुविधा तथा उपकरणहरु; (a) AC, (b विच्छेदन माइक्रोस्कोप), (c) एयर प्रेसर मड्युल सिस्टम र (d) Laminar air flow hood

कुनै पनि प्रकारको कल्चर गर्दा सुक्ष्म जीवहरुको संक्रमण रोकथाम गर्नको लागि यस कोठामा मुख्य उपकरणको रुपमा एकतर्फी खुल्ला भएको ल्यामिनर एयर फ्लो हुड (LAF) प्रयोग गरिन्छ। यस हुडमा डवल फिल्टर मार्फत धुलोको कण रहित हावा HEPA (High–Efficiency Particulate Air) फिल्टरहरु मार्फत भई सुक्ष्म जीवहरु तथा तिनीहरुको स्पोर्सहरुलाई रोकी प्रत्यक्ष रुपमा संक्रमण नहुने वातावरण कायम राख्दछ। HEPA फिल्टरहरुको अति नै सानो छिद्रको आकार (०.३μm) भएको हुँदा यसको लगभग ९९.९७ देखि ९९.९९ प्रतिशत दक्षताका साथ कार्य गर्दछ। हावा प्रवाहको आधारमा Vertical वा Horizontal प्रकारको LAF प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस LAF मा अन्य उपकरणहरु जस्तै; विच्छेदन माइक्रोस्कोप, बर्नर, Glass bead sterilizer, स्टेनलेस फोर्सेप, कैंची आदिको प्रयोग गरिन्छ। कल्चर कार्य गर्नु अघि LAF लाई ७०% ईथानोलले सफा गरी UV लाईट कम्तिमा ३० मिनेटसम्म बालेर छोड्नु पर्दछ जसले गर्दा हुड भित्र कल्चर गरिने ठाँउ र प्रयोग गरिने उपकरणहरुमा रहेको जीवाणुहरुलाई मार्ने काम गर्दछ। UV प्रकाश खोलेको अवस्थामा प्रत्यक्ष सम्पर्कमा आउनु हुदैन किन भने UV प्रकाशको सम्पर्कमा आउँदा दीर्घकालीन रुपमा आँखा एवम् शरीरलाई प्रतिकूल असर पुऱ्याउदछ। मिडियामा बल्चर गरिएको नमूनालाई राख्न तथा ओसार-पसार गर्न ट्रे र moving trolley हरु पनि यस कोठामा हुनु पर्दछ।

कल्चर गर्ने कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक उपकरण तथा अन्य सामानहरुको विवरण निम्नानुसार छन्;

- Laminar air flow hood (LAF)
- Dissecting microscope
- Glass bead sterilizer or incinerator
- Dissecting equipments (forceps, scissors, Scalpel)
- Moving trolley
- Burner
- AC
- Air pressure module system

३.२.५. बिरुवा हुर्काउने कोठा

यस बिरुवा हुर्काउने कोठामा कल्चर गरिएका नमूनाहरुलाई वृद्धि र विकासको लागि चाहिने कृतिम अवस्थाहरु जस्तै; प्रकाश जसमा फोटोपीरियड (Photoperiod) र प्रकाश विकिरण (Light irradiance), तापक्रम र सापेक्ष आद्रता नियन्त्रण गर्न सकिने व्यवस्था गरिएको हुन्छ। यस कोठालाई ग्रोथ रुम पनि भनिन्छ। बिरुवाहरुको प्रकृति तथा जात अनुसार अलग-अलग ग्रोथ रुमहरु बनाउन सकिन्छ। ग्रोथ रुमको क्षेत्रफल वार्षिक रुपमा कति मात्रामा बिरुवा उत्पादन गर्ने लक्ष्यमा भर पर्दछ जस्तै; वार्षिक रुपमा ५०,००० सम्मको बिरुवा उत्पादन लक्ष्य रहेको प्रयोगशालामा कम्तिमा २० वर्ग मीटर हुनुपर्दछ। यो कोठा पनि अति नै संवेदनशील हुने भएकोले ढुसी तथा सुक्ष्म जीवाणुहरुको प्रत्यक्ष रुपमा संक्रमण नहुने वातावरण कायम राख्नुपर्छ तथा इन्सुलेशन सिस्टम राख्दा बाहिरको तापक्रमले यस कोठाको तापक्रमलाई असर नपुऱ्याउने हुनुपर्दछ। ढुसीजन्य प्रकोपबाट बचाउन यस कोठाको भित्ता तथा सिलिङ्गको सतहलाई चिल्लो बनाइ ढुसी प्रतिरोधी रंग लगाउनु पर्दछ।

चित्र ६: बिरुवा हुर्काउने कोठाको सुविधा तथा उपकरणहरु; (a) बिरुवहरु राख्ने लाईट सिस्टम जडित कल्चर र्याकहरु (b) AC, (c) लक्स मीटर र (d) dehumidifier

यस कोठामा बिरुवाहरुलाई राख्नका लागि खिया तथा ढुसी नलाग्ने लाईट सिस्टम जडित कल्चर र्याकहरु हुनु पर्दछ। सामान्यतया फोटोपीरियड १६ घण्टा प्रकाश र ८ घण्टा अध्यारो नियन्त्रण गर्न अटोमेटिक टाईमर सिस्टम जडान गर्नु पर्दछ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार लगभग १००० देखि १०,००० Lux सम्म प्रकाश विकिरणको आवश्यकता पर्दछ र यसलाई मापन गर्न लक्स मीटरको प्रयोग गरिन्छ। यस कोठामा लगभग २१ देखि २७°C तापक्रम बिरुवाको प्रकार हेरी नियन्त्रण गर्न एयर कंडीशनर जडान गरिएको हुन्छ। त्यस्तै सापेक्षआद्रता २० देखि ७०% हुनुपर्दछ यदि कायम नभए मिस्टिङ वा dehumidifier को प्रयोग गर्नुपर्दछ। यस कोठाको तापक्रम र सापेक्ष आद्रता मापन गर्ने उपकरण digital temperature & RH meter reader पनि राख्नुपर्दछ। साथै Liquid culture एकाइको लागि रोलिंग ड्रूम एवम् सेर्कर मीसिन पनि राखिएको हुन्छ। हावा शुद्धिकरण गर्नको लागि हावा शुद्धिकरण मीसिन पनि राख्न सकिन्छ।

बिरुवा हुर्काउने कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक उपकरण र रसायनहरुको विवरण निम्नानुसार छन्;

- AC
- Light fitted racks
- Lux meter
- Digital temperature & RH meter reader
- Shaking Incubator
- Dehumidifier
- Air purifier

तालिका १: आधारभूत तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा हुनु पर्ने मुख्य उपकरणहरु, रसायनहरु र अन्य सामानहरु

क्र. स.	उपकरणहरुको नाम	परिमाण (कम्तिमा)	कैफियत
१	Hot magnetic stirrer	१	आवश्यकता अनुसार संख्या बढाउन सकिने
२	Autoclave (minimum 75 liter)	१	
	Autoclave (minimum 25 liter)	२	
३	Digital weighing machine-4 digits	१	
४	pH meter	१	
५	Vortex mixer	१	
६	Laboratory Refrigerator	१	
७	Microwave Oven or Electric stove or LPG burner	१	उपलब्द भए अनुसार प्रयोग गर्ने
८	Double distillation unit	१	
९	Hot air oven	१	
१०	Laminar air flow hood	१	
११	Dissecting stereo-microscope	१	
१२	Glass bead sterilizer	१	
१३	Light fitted racks	१	
१४	Micropipette set (0.1 - 5 ml.)	१ प्रति	
१५	Air conditioner (1.5 - 2 ton)	२	आवश्यकता अनुसार जडान गर्न सकिन्छ
१६	Laboratory orbital shaking incubator	१	विकल्पको रुपमा राख्न सकिने
१७	Air purifier	२	
१८	Digital temperature & RH meter reader	४	
१९	Growth incubator chamber	१	विकल्पको रुपमा राख्न सकिने
२०	Lab moving trolley	२	
२१	Digital temperature & RH reader meter	२	
२२	Water sink	१	आवश्यकता अनुसार
२३	Generator (20KVa)	१	वैकल्पिक उर्जाको लागि
२४	Voltage stabiliser (5KVa)	३	
२५	Glasswares		
	Measuring cylinder (50-2000 ml)	४	
	Conical Flasks (50-2000 ml)	४	
	Beaker (50-2000 ml)	४	
	Volumetric flasks (50-2000 ml)	४	
	Reagent bottles (50-1000 ml)	६	
	Petriplates (150 mm * 15 mm)	५०	

	Petriplates(100 mm * 15 mm)	५०	
	Culture Jars	५०००	आवश्यकता अनुसार
२६	Stainless steel dissecting equipment		
	Forceps	१२	
	Scissors	६	
	Scalpel	१२	
	Blade (100 pcs pack)	१२	
२७	Chemicals		
	Ammonium nitrate*, 500 gm	२	
	Potassium nitrate, 500 gm	२	
	Potassium dihydrogen phosphate, 500 mg	२	
	Magnesium sulphate heptahydrate or Magnesium sulphate, 500 mg	२	
	Calcium Chloride or Calcium chloride dehydrate, 500 mg	२	
	Boric acid, 500 gm	२	
	Manganese sulphate monohydrate or Manganese sulphate tetrahydrate, 500 mg	२	
	Zinc sulphate heptahydrate, 500 mg	२	
	Potassium iodide, 500 mg	२	
	Cobalt chloride hexahydrate, 500 mg	२	
	Copper sulphate pentahydrate, 500 mg	२	
	Sodium molybdate dihydrate, 100 mg	२	
	Disodium ethyenediaminetetraacetic acid, 500mg	२	
	Iron sulphate heptahydrate, 500 mg	२	
	Glycine, 500 mg	२	
	Thaimine HCL, 25 mg	२	
	Pyridoxine HCL, 25 mg	२	
	Nicotinic acid, 25 mg	२	
	Gibberellic acid (GA3), 25 gm	२	
	Myo-inositol, 25 gm	२	
	Benzyl amino purine (BAP), 25 gm	२	
	Napthalene acetic acid (NAA), 25 gm	२	
	Kinetin, 25 gm	२	
	Indole 3- butyric acid (IBA), 25 gm	२	
	Indole 3-acetic acid (IAA), 25 gm	२	

	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 25 gm	२	
	Citric Acid, 500 mg	२	
	HCl, 500 ml	२	
	NaOH, 500 ml	२	
	Mercuric Chloride, 100 mg	२	
	Sodium hypochlorite, 5 liter	२	
	Twin 20, 500 ml	२	
	Sucrose, 500 mg	१०	
	Agar-agar, 500 mg	२	
	Ethanol, 5 liter	२	
	Spirit, 5 liter	२	
२८	Other		आवश्यकता अनुसार
	Falcon tube, 50 ml	२५	
	Cotton roll, 500 gm	६	
	Aluminium foil, 1kg	६	

Ammonium nitrate* नेपालमा यस रसायनको आयातमा प्रतिबन्ध गरिएको छ र यसको विकल्पमा अन्य पूर्व मिश्रित मुख्य पोषक तत्वहरुको प्रयोग गर्न सकिन्छ।

३.२.६. हार्डनिङ्ग सेक्सन

ग्रोथ रुममा काण्ड तथा जराहरुको पूर्ण रुपमा विकास भएका इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई बाहिरी प्राकृतिक वातावरणमा सफलतापूर्वक अनुकूलित गराउने प्रकृयालाई हार्डनिङ्ग भनिन्छ। बिरुवाहरुलाई सफलतापूर्वक अनुकूलित गर्नका लागि हार्डनिङ्ग सेक्सन अति नै महत्वपूर्ण हुन्छ। हार्डनिङ्ग सेक्सनले प्रयोगशाला र प्राकृतिक वातावरणको मध्यवर्ती वातावरण उपलब्ध गराउँदछ। सामान्यतया प्राइमरी र सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गरी दुई चरणमा हार्डनिङ्ग गरिन्छ। प्राइमरी हार्डनिङ्ग गर्नलाई प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन र सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्नलाई सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको आवश्यकता पर्दछ।

३.२.६.१. प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन

प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन अन्तर्गत ग्रोथ रुममा काण्ड तथा जराहरुको पूर्ण रुपमा विकास भएका इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई पहिलो चरणको रुपमा अनुकूलित गराउने अवस्थाहरु प्रदान गरिएको हुन्छ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको रुपमा स्क्रिन हाउस वा ग्लास हाउसको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस सेक्सनमा तापक्रम, प्रकाश र आद्रतालाई नियन्त्रण गर्न सकिने उपकरणहरु जडान गरिएको हुनु पर्दछ। प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको क्षेत्रफल वार्षिक रुपमा कति मात्रामा बिरुवा उत्पादन गर्ने लक्ष्यमा भर पर्दछ जस्तै; वार्षिक रुपमा ५०,००० सम्मको बिरुवा उत्पादन लक्ष्य रहेको प्रयोगशालामा कम्तिमा ४५० वर्ग मीटरको स्क्रिन हाउस वा ग्लास हाउस हुनुपर्दछ।

प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन बनाउदा ध्यान दिनुपर्ने आधारभूत आवश्यकता तथा अन्य कुराहरु

- प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला नजिकै हुनुपर्दछ।
- यस सेक्सनको संरचना निर्माण गरिने स्थान राम्रो घाम लाग्ने र नजिकैको वातावरणमा धुलो तथा कुनै पनि प्रकारको प्रदुषण हुनुहुदैन। साथै यस सेक्सन भित्र वा वरिपरीको स्थानहरुमा पानी नजम्ने किसिमले ढल बनाउनु पर्दछ।
- यस प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको छत UV protective glass/plastic वा Fiber glass ले बनेको हुनु पर्दछ। यसै सेक्सनको छत भन्दा मुनि shade net को प्रयोग गरी आवश्यकता अनुसार प्रकाशको मात्रालाई नियन्त्रण गर्ने एवम् थप विज्ञको सुझाव अनुसार जडान गर्नुपर्दछ।
- आलुमिनियम तथा खिया नलाग्ने वस्तुबाट बनेको भरसक स्लाईडिङ्ग डबल डोर सिस्टम भएको बफर जोन हुनुपर्दछ।
- हार्डनिङ्ग गर्नलाई यस सेक्सनको भुईमा एवम् सतहबाट कम्तिमा आधा मीटर जति माथि उठेको बेड वा फलामको रडले बनेको र्‍याकहरुमा पनि गर्न सकिन्छ वा बिरुवाको प्रकृति अनुसार मापदण्डमा तोकिएको अनुसार हुनुपर्दछ।
- भौगोलिक अवस्था अनुसार तापक्रम र आद्रतालाई नियन्त्रण गर्न सकिने उपकरणहरु जस्तै; कुलर, humidifier, मिस्टिङ्ग सिस्टम आदि जडान गरिएको हुनुपर्दछ।
- सिंचाईको लागि राम्रो व्यवस्था तथा यसमा UV filter water system जडान हुनुपर्दछ।

चित्र ७: प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा हुनुपर्ने पूर्वाधार तथा कामहरु (a) स्क्रिन घर, (b) र (d) स्क्रिन घर भित्र सेड नेट तथा पोलिथिन कवर र (c) बिरुवा रोप्ने बेड

३.२.६.२. सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सन

प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा सफल भएका बिरुवाहरुलाई प्राकृति वातावरणमा स्थानान्तरण गर्नु पूर्व थप बिरुवाहरुलाई अनुकूलित गराउने अवस्थाहरु यस सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा प्रदान गरिएको हुन्छ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको रुपमा स्क्रिन हाउस वा ग्लास हाउस वा नेट हाउसको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस सेक्सनमा पनि तापक्रम, प्रकाश र आद्रतालाई नियन्त्रण गर्न सकिने उपकरणहरु जडान गरिएको हुनुपर्दछ। सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सन प्राईमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको नजिकै हुनुपर्दछ। सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सनको क्षेत्रफल पनि वार्षिक रुपमा कति मात्रामा बिरुवा उत्पादन गर्ने लक्ष्यमा भर पर्दछ जस्तै; वार्षिक रुपमा ५०,००० सम्मको बिरुवा उत्पादन लक्ष्य रहेको प्रयोगशालामा कम्तिमा ५०० वर्ग मीटरको स्क्रिन हाउस वा ग्लास वा नेट हाउस हुनुपर्दछ। सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सन बनाउँदा बाँकी आधारभूत आवश्यकताहरु माथि प्राइमरी हार्डनिङ्गमा भए अनुसार एवम् विज्ञको सुझाव अनुसार जडान गर्नुपर्दछ।

(a) (b)

चित्र ८: सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सन (a) सिसा घर र (b) जाली घर

तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने विधिहरू

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने उपकरणहरु, वानस्पतिक भागहरु, अन्य वस्तुहरु तथा कार्य गर्ने ठाँउमा रहेका कीटाणुहरु एवम् बीजाणुहरु जस्तै; ब्याक्टेरियल, ब्याक्टेरियल बीजाणु, भाइरस, फंगस आदिलाई पूर्ण रुपमा नष्ट गर्ने प्रक्रियालाई कीटाणु निर्मलिकरण भनिन्छ। कीटाणुहरुको जीवन चक्र छोटो हुने भएकोले मिडियाको सम्पर्कमा बिरुवाहरु भन्दा यिनीहरु तिव्र गतिमा वृद्धि भई बिरुवाको तन्तुलाई मारिदिने हुन्छ। कीटाणुहरु विभिन्न माध्यमहरु जस्तैः ग्लासवेयर, पोषण तत्व, उपकरण, तन्तु नमूनाको प्रयोग, कार्य गर्ने ठाँउ, कार्यशैली आदिबाट मिडियाको सम्पर्कमा आउने भएकोले कीटाणु निर्मलिकरण गर्न अति नै महत्वपूर्ण हुन्छ।

४.१. कीटाणु निर्मलिकरण गरिने भौतिक र रसायनिक विधिहरु

४.१.१. भौतिक विधिहरु (Physical Methods)

४.१.१.१. ***सुक्खा ताप (Dry Heat)***: विच्छेदन उपकरणहरु जस्तैः स्टेनलेस फोर्सेप, कैंची, स्प्याचुला, स्केलपेल, ग्लास र अन्य पलास्टिक जन्य वस्तुहरुको सुक्खा ताप विधिबाट कीटाणु निर्मलिकरण गरिन्छ। यस विधिबाट कीटाणु तथा बीजाणुको प्रोटिन विकृति (Protein denaturation), ओक्सिडेटिभ क्षति (Oxidative damage) र इलेक्ट्रोलाइट्सको उच्च स्तरको विषाक्त प्रभावहरुद्वारा कार्य गर्ने मुख्य संयन्त्र हो।

» **ज्वलन्त *(Flaming)*** : यस विधिमा उपकरणहरुलाई बन्सेनको (bunsen) ज्वालामा क्षणिक रुपमा तताईन्छ तर रातो तातिने गरी तताइदैन। उपकरणहरु जस्तैः फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल, कल्चर ट्यूबको मुख, ढक्कनी वस्तु आदिहरुलाई ज्वलन्त गरिन्छ। धातुका उपकरणहरुलाई ७०-९५% इथेनलमा डुबाइ ज्वलन्त गर्नाले कीटाणु निर्मलिकरण गर्न थप प्रभावकारी हुन्छ।

(a) (b)

चित्र ९: फोर्सेप र पेट्री प्लेटलाई ज्वलन्त गरी कीटाणु निर्मलिकरण गरिँदै

» **भस्मीकरण *(Incinerator)*:** सामान्यतया यस विधिमा जीवाणु दूषित वस्तुहरुलाई Incinerator स्टेरिलाइजरमा हाली नष्ट गरिन्छ। तर तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने धातुका विच्छेदन उपकरणहरुलाई incineration मा हाली कीटाणुहरुलाई मात्र भस्मीकरण गरिन्छ। विच्छेदनको लागि आवश्यक उपकरणहरु जस्तै; फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल आदिलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्न incinerator को प्रयोग गरिन्छ।

चित्र नं. १०: Incinerator

» **गिलास बिड स्टेरिलाइजर *(Glass bead sterilizer)*** : गिलास बिड स्टेरिलाइजर पनि उच्च तापक्रम २०० देखि ३०० डिग्री सेल्सियसमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने धातुका विच्छेदन उपकरणहरु (जस्तैः फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल) आदिलाई कीटाणु निर्मलिकरण गरिन्छ।

चित्र नं. ११: गिलास बिड स्टेरिलाइजर

» **हट एयर ओभन *(Hot Air Oven)*:** धातुका उपकरणहरु (जस्तैः फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल), ग्लासवेयरहरु (जस्तैः पेट्री डीस, कल्चर ट्यूब, फ्लास्क, कल्चर जार), मिडिया आदिहरुलाई विधुतीय हट एयर ओभनमा उच्च तापक्रम १५०°C मा १५० मिनेट, १६०°C मा ६० मिनेट र १७०°C मा ३० मिनेटसम्म राखी कीटाणुलाई नष्ट गरिन्छ।

चित्र नं. १२: हट एयर ओभन

४.१.१.२. ***ओसिलो ताप* (Moist Heat)**: ओसिलो तापले प्रोटिनको स्कंदन (Coagulation) र विकृतिकरणद्वारा कार्य गर्दछ। यस विधिमा उच्च दबाब र ओसिलो तापमा अटोक्लेभ गरिन्छ। १५ पि.एस.आइ दबाब र १२१°C देखि १३५°C तापक्रममा १५ देखि ३५ मिनेटसम्म अटोक्लेभ गरिन्छ। अटोक्लेभमा विभिन्न वस्तुहरु र उपकरणहरु जस्तैः मिडिया, ड्रेसिङ, रबर पन्जा, ताप प्रतिरोधी पलास्टिक, तरल पदार्थ इत्यादिहरुको कीटाणु निर्मलिकरण गरिन्छ।

चित्र नं. १३: ओटोक्लेभ

४.१.१.३. ***छान्ने प्रक्रिया* (Filtration)**: छान्ने प्रक्रियाले जीवाणुहरुलाई नष्ट गर्दैन, यसले तिनीहरुलाई अलग गर्दछ। यस विधिबाट उच्च ताप संवेदनशील तरल पदार्थ (जस्तै; भिटामीन, हर्मोन, एमिनो एसिडहरु) र ग्याँसहरुलाई छान्ने गरिन्छ। तरल पदार्थहरुलाई छान्नको लागि झिल्ली फिल्टर (Membrane filter) जसमा ०.१ देखि १० माइक्रो मीटर छिद्रहरु भएको प्रयोग गरिन्छ। त्यस्तै ग्याँसहरुलाई छान्नको लागि HEPA (High-Efficiency Particulate Air) फिल्टरहरुको प्रयोग गरिन्छ। HEPA फिल्टरहरु कम्तिमा ०.३ μm व्यासमा कणहरु हटाउनका लागि कम्तिमा ९९.९७% प्रभावकारी भएको हुनुपर्दछ।

*४.१.१.४. **विकिरण (Radiation):*** दुई प्रकारका विकिरणहरु आयनाइजिंङ र नन्-आयनाइजिंङ (Non-ionizing) प्रयोग गरिन्छ। नन्-आयनाइजिंङ विकिरणहरु कमजोर भेदक शक्ति भएका कम उर्जा किरणहरु हुन जबकि आयनाइजिंङ विकिरणहरु राम्रो भेदक शक्ति भएका उच्च उर्जा किरणहरु हुन्। विकिरणको रुपमा गामा किरणहरु प्रयोग गरिन्छ भने नन्-आयनाइजिंङको रुपमा UV किरणहरु प्रयोग गरी कीटाणु निर्मलिकरण गरिन्छ। गामा किरणहरुद्वारा वायुजनित सुक्ष्मजीवहरु मार्ने र ठूलो सतह क्षेत्रफल भएको स्थानलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्न प्रयोग गरिन्छ। त्यस्तै UV किरणद्वारा लामिना वायु प्रवाह हुडको तथा अन्य उपकरणहरुको कीटाणु निर्मलिकरण गर्न प्रयोग गरिन्छ।

चित्र नं. १४: लामिना वायु प्रवाह हुडमा UV किरण प्रयोग गरिएको

४.२.१. रसायनिक विधिहरु

*४.२.१.१. **ग्याससयुक्त रसायन (Gaseous Chemical):*** तन्तु प्रगोगशालाका कोठाहरुलाई फ्युमिगेसन (fumigation) गरी कोठाको वातावरणमा रहेका कीटाणुहरुलाई नष्ट गर्न ग्याससयुक्त रसायनहरुको प्रयोग गरिन्छ। फ्युमिगेसन एक प्रक्रिया हो जसमा कोठाहरुलाई बन्द गरी घातक ग्याससयुक्त रसायनहरुको प्रयोगबाट कीटाणुहरुलाई नष्ट गरिन्छ। फ्युमिगेसन गर्नको लागि Formalin (37-41% formaldehyde) solution वा hydrogen peroxide को प्रयोग गरिन्छ। Formaldehyde solution लाई Potassium permanganate ($KMnO_4$) सँग पनि मिसाएर प्रयोग गर्न सकिन्छ। प्रयोगशाला कोठामा Formaldehyde solution लाई Potassium permanganate ($KMnO_4$) सँग मिसाएर फ्युमिगेसन गर्ने तरीका;

- फ्युमिगेसन गर्ने कोठा पूर्ण रुपमा बन्द गर्ने।
- फ्युमिगेसन गर्ने व्यक्तिले जोखिमबाट बच्ने सुरक्षाका उपायाहरु अपनाउनु पर्दछ। सुरक्षाका उपायाहरु जस्तै; एप्रोन, पन्जा, अनुहारमा लगाउने मास्क, सुरक्षा चस्मा आदि लगाउनु पर्दछ।
- पेट्रि प्लेट अथवा सो सरहको भाडा कोठामा राख्ने, २० वर्ग क्षेत्रफल भएको कोठामा २ वटा पेट्रि प्लेट अलग-अलग ठाँउमा राख्ने।
- बराबर मात्रामा Potassium permanganate र (३७-४१%) formaldehyde solution पेट्रि प्लेटमा मिसाउने।
- त्यसबाट कालो धुवा आउन सुरु हुन्छ र त्यसपछि तुरुन्त कोठाको झ्याल ढोका बन्ध गरी बाहिर निस्कनु पर्दछ।
- लगभग २४ देखि ३६ घण्टा पछि एप्रोन, पन्जा, अनुहारमा लगाउने मास्क, सुरक्षा चस्मा आदि लगाएर कोठाको झ्याल ढोका खोल्ने र प्लेटहरु बाहिर निकाल्ने।
- कोठामा फ्युमलाई न्युट्रलाईज गर्न, ५०० एम.एल formaldehyde प्रयोग गरिएकोमा ३०० एम.एल १०% ammonium hydroxide solution कटन भएको प्लेटहरुमा राखी कोठालाई ३-४ घन्टासम्म बन्द गर्ने। यसो गर्दा formaldehyde gas र ammonia gas को प्रतिक्रिया भई

hexamine उत्पादन गर्दछ जुन चाहिँ हानीरहित हुन्छ ।

- त्यसपछि कोठाहरुको ढोका खोल्ने र थप ७०% इथानोलले कोठामा रहेको उपकरणहरुलाई सफा गर्ने ।
- यसरी प्रयोगशालाको कोठाहरुमा कार्य गर्नको लागि तयार भयो ।

४.२.१.२. **तरल रसायन (Liquid Chemical)**: तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा काम गर्ने स्थान, उपकरणहरु र वानस्पतिक नमूना आदिलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्नको लागि तरल रसायनहरुको नियमित रुपमा प्रयोग गरिन्छ । काम गर्ने स्थान र उपकरणहरु जस्तैः टेवल, स्ल्याब, LAF, कल्चर र्‍याक तथा कोठामा रहेका अन्य उपकरणहरुलाई ७०% इथानोल (C_2H_5OH) वा ७०% स्प्रिटले कीटाणु निर्मलिकरण गरिन्छ । वानस्पतिक नमूनालाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्न ७०% इथानोल, ०.५ देखि ५% सोडियम हाइपोक्लोराइड (NaOCl), ०.१ देखि १.०% मरक्यूरिक क्लोराइड ($HgCl_2$) आदिको प्रयोग गरिन्छ ।

चित्र १५ : कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने विभिन्न तरल रसायनहरु

वानस्पतिक नमूना (एक्सप्लान्ट)

एक्सप्लान्ट भनेको बिरुवाको कुनै पनि वानस्पतिक भागको कोष एवम् सानो तन्तुको टुक्रा हो जुन कल्चर सुरु गर्नको लागि प्रारम्भिक सामग्रीको रुपमा प्रयोग गरिन्छ। वानस्पतिक नमूनाको उदाहारणहरु जस्तै- पात, जरा, मेरीस्टेम, नोड, परागकोष, गर्भासय आदिलाई सन्तुलित कृतिम अवस्थामा कल्चर गरिन्छ। त्यहाँबाट एक्सप्लान्टलाई regeneration (पुनर्जीवन) वा non–regeneration को लागि प्रयोग पनि गर्न सकिन्छ। Regeneration मा क्यालस मार्फत अर्गानोजेनेसिस (Organogenesis) र सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति (Somatic embryogenesis) माध्यमबाट पूर्ण बिरुवा बनाउँदछ भने non–regeneration मा क्यालसले बिरुवाहरु उत्पादन गर्दैन र cell suspension र मेटाबोलाइट उत्पादनको लागि प्रयोग गरिन्छ। सफल तन्तु प्रजननको लागि प्रयोग गरिएको वानस्पतिक नमूनाको प्रकार, संकलन गरिएको सिजन, स्थान, बिरुवाको जीनोटाइप आदिले महत्वपूर्ण भूमिका खेलेको हुन्छ।

५.१. एक्सप्लान्टका प्रकारहरु

मेरिस्टेमेटिक कोषिकाहरु भएको वा नभएको आधारमा एक्सप्लान्ट दुई प्रकारको हुन्छ।

५.१.१. पहिलेदेखि नै मेरिस्टेमेटिक कोषिकाहरु भएको एक्सप्लान्ट (Pre-Formed Meristem): यस्ता खालका एक्सप्लान्टबाट प्राय direct regeneration मार्फत shoots को विकास भई पूर्ण बिरुवा बन्दछ। उदाहरणको लागि मेरिस्टेम, शुट टीप, आँख्ला।

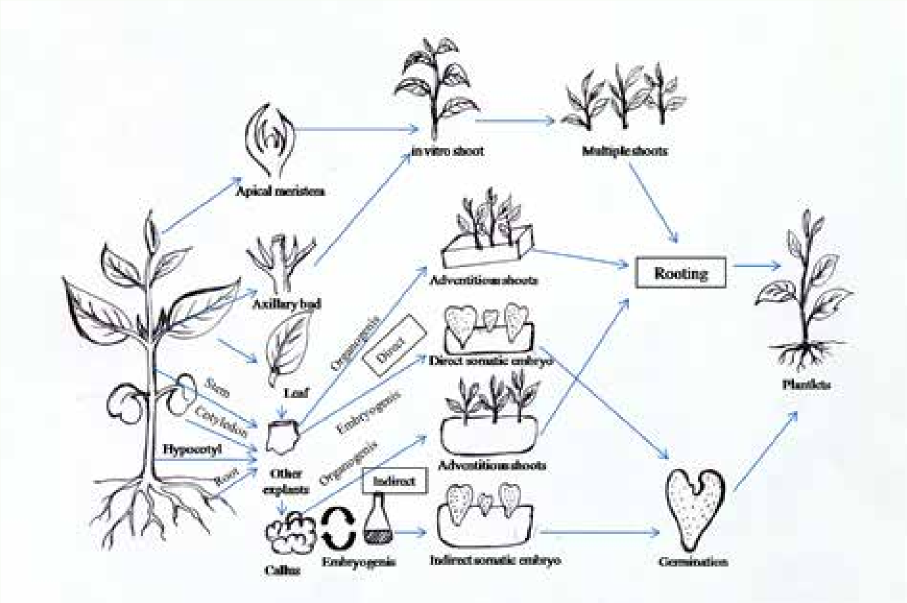
५.१.२. मेरिस्टेमेटिक कोषिकाहरु नभएको एक्सप्लान्ट (Lack of Pre-Formed Meristem): यस्ता खालका एक्सप्लान्टले Organogenesis वा Somatic embryogenesis प्रक्रियाबाट पूर्ण बिरुवाको विकास गर्दछ।

i. अर्गानोजेनेसिस (Organogenesis): अर्गानोजेनेसिसमा कल्चर गरिएको एक्सप्लान्ट, तन्तु, कोष वा क्यालसबाट केवल एकध्रुवीय (mono-polar) अंग जस्तैः वोट वा जरा वा टियुवर आदि विकास भइ पूर्ण बिरुवा बन्दछ। दुई प्रकारको अर्गानोजेनेसिस हुन्छ;

- Direct Organogenesis: क्यालस विकास नभइ बिरुवा बन्दछ।
- Indirect Organogenesis: क्यालस विकास भइ बिरुवा बन्दछ।

ii. सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति (Somatic Embryogenesis): सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति प्रक्रियामा एक्सप्लान्टबाट भ्रूण विकास भइ पूर्ण बिरुवा बन्दछ। दुई प्रकारको Somatic embryogenesis अर्गानोजेनेसिस हुन्छ;

- Direct Somatic embryogenesis: क्यालस विकास नभइ भ्रूण विकास हुन्छ र पछि बिरुवा बन्दछ।
- Indirect Somatic embryogenesis: क्यालस मार्फत भ्रूण विकास भइ बिरुवा बन्दछ।



चित्र १६: एक्सप्लान्टको प्रकार अनुसार direct regeneration, अर्गानोजेनेसिस र सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति माध्यमबाट पूर्ण बिरुवाको विकास भएको

५.२. एक्सप्लान्ट संकलन गर्दा ध्यान दिनुपर्ने कुराहरु

५.२.१. एक्सप्लान्टको आयू:

किशोर अवस्थामा रहेको बिरुवाबाट एक्सप्लान्ट छनौट गर्नु राम्रो हुन्छ किनभने किशोर अवस्थामा कोषहरु बढी सक्रिय हुने भएकोले मिडिया प्रति चाडो प्रतिक्रिया दिने हुन्छ जसले गर्दा स्थापना गर्न सजिलो हुन्छ। कतिपय अवस्थाहरुमा पुरानो एक्सप्लान्ट प्रयोग गर्दा क्यालसको विकास हुदैन जुन चाहिँ regeneration को लागि आवश्यकता पर्दछ। थप किशोर अवस्थामा रहेको बिरुवाबाट लिएको एक्सप्लान्टलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्न पनि सजिलो हुन्छ।

चित्र १७: एक्सप्लान्ट संकलन गरिदैँ

५.२.२. एक्सप्लान्टको संकलन गर्ने मौसमः

कीटाणु संक्रमण र सफल कल्चरको लागि एक्सप्लान्ट संकलन गरिने मौसमको पनि महत्वपूर्ण भुमिका हुन्छ। एक्सप्लान्टको संकलन बिरुवाहरु सक्रिय रुपमा वृद्धि भएको मौसममा गर्नुपर्दछ। प्रायः वसन्त र गर्मियामको शुरुवात तिर संकलन गरिएका एक्सप्लान्टहरु अन्य मौसममा संकलन गरिएको भन्दा बढी सफल हुने र कीटाणु तथा ढुसीजन्य संक्रमणहरु पनि कम हुने हुन्छ। एक्सप्लान्टको संकलन गर्दा सुशुप्तता ब्रेक (Dormancy break) भएको छनौट गर्नु राम्रो हुन्छ।

५.२.३. बिरुवाको स्वास्थ्यः

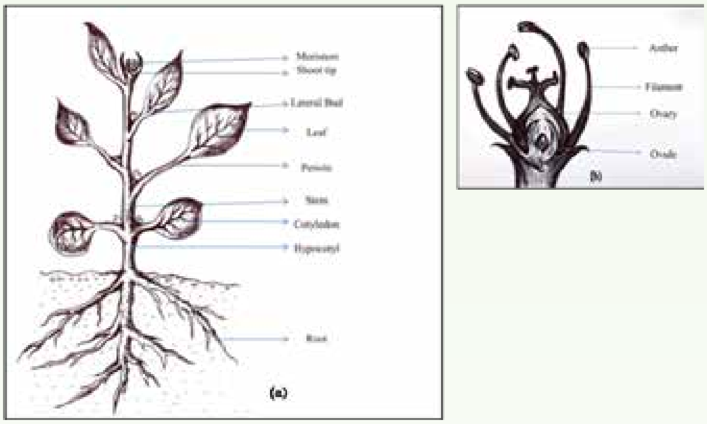
कल्चर गर्नु भन्दा अगाडि एक्सप्लान्ट संकलन गरिने स्रोत बिरुवा (source plant) मा उक्त बालीसँगै सम्बन्धित रोगको प्रकोप तथा पोषणको कमी नरहेको निक्र्योल गर्नु पर्दछ। यदि संक्रमण भएको स्रोत बिरुवाबाट एक्सप्लान्ट संकलन गर्नु परे सम्बन्धित विषादीले उपचार गरेर मात्र प्रयोग गर्नु पर्दछ। सम्भव भएसम्म स्रोत बिरुवालाई किरा नछिर्ने जाली घर एवम् सिसा घरमा हुर्काउनु पर्दछ।

५.२.४. एक्सप्लान्टको आकारः

सफल कल्चरको लागि एक्सप्लान्टको आकारले पनि निर्भर गर्दछ। सानो आकारको एक्सप्लान्टले कल्चर स्थापना गर्दा मिडिया प्रति प्रतिक्रिया नदिने पनि हुन सक्छ भने धेरै ठूलो आकारको एक्सप्लान्टबाट कीटाणु संक्रमण सम्भावना बढी हुने भएकोले कल्चर स्थापना गर्न कठिन हुन्छ। कल्चर स्थापना गर्न लगभग ०.५ देखि १ से. मी. एक्सप्लान्टहरु जस्तै; नोड, सुट, काण्ड, डाँठ, राइजोम, जराको आकार राम्रो मानिन्छ। मेरिस्टेम कल्चर गर्नलाई भने ०.१ देखि ०.३ मी. मी. को आकार उत्तम मानिन्छ।

५.२.५. उद्देश्यः

संस्थाको आवश्यकता र कस्तो उद्देश्यको लागि तन्तु प्रजनन् गर्न खोजिएको आधारमा एक्सप्लान्टको छनौट गर्नु पर्दछ। यदि तीव्र गतिमा प्रसारण गर्ने हो भने नोड वा शुटबाट कल्चर गर्नु पर्दछ। क्यालस कल्चर गर्नलाई एक्सप्लान्टको रुपमा सानो cotyledon, hypocotyl, काण्ड, पत्ता वा भ्रूण तन्तु लिनु राम्रो मानिन्छ। भाइरस मुक्त गरी स्वस्थ बिरुवाहरु प्रसार गर्नको लागि मेरीस्टेम कल्चर गर्नै पर्दछ जसमा मुनाको टुप्पो भागको सानो मेर ीस्टमलाई एक्सप्लान्टको रुपमा लिईन्छ। हेप्लोइड कल्चर (Haploid Culture) मा परागकोष (Anther) वा परागण (pollen) लाई कल्चर गरिन्छ।



*चित्र १८: (**a**) र (**b**) एक्सप्लान्टको रुपमा प्रयोग गरिने बिरुवाको विभिन्न भागहरु*

५.२.६. जीनोटाईपः

बिरुवाहरुको प्रजाति अनुसार फरक-फरक जीनोटाईप हुन्छ जसले गर्दा कल्चर स्थापना गर्दा मिडिया प्रति पनि फरक-फरक प्रतिक्रिया दिने हुन्छ। केही एक्सप्लान्टहरुले कल्चर स्थापना गर्दा मिडिया प्रति राम्रो प्रतिक्रिया दिन्छ भने केहीले प्रतिक्रिया नदिन सक्छ। त्यसैले विभिन्न बालीहरुको कल्चर गर्दा मिडिया प्रति राम्रो प्रतिक्रिया दिन्छ वा दिदैन भन्ने कुराहरु यसै तन्तु प्रजनन् प्रविधि मार्फत निर्क्योल गर्नु पर्दछ। साथै माउ बोटको जात पहिचान भएको र उक्त जात सूचिकृत पनि भएको हुनुपर्दछ।

५.२.७. एक्सप्लान्ट संकलन गर्दा प्रयोग गरिने औजारः

एक्सप्लान्ट संकलन गर्दा औजारहरु जस्तै; सिकेचर, कैंची, चक्कु, फोर्सेप, कुटो आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस्ता औजारहरुलाई निस्संक्रामकहरुले राम्ररी सफा गरी प्रयोग गर्नुपर्दछ।

५.३. एक्सप्लान्टको सतही कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने तरिका

यस विधिमा संकलन गरिएको तन्तु नमूनाको सतहमा रहेको माटोहरु हटाउने तथा कीटाणुहरुलाई नाश गरिन्छ। संकलन गरिएको तन्तु नमूनाको सतहमा रहेको माटोहरु हटाउन तथा कीटाणुहरुलाई नाश गर्न पानी तथा विभिन्न निस्संक्रामक तरल रसायनहरु (Disinfectants) जस्तै; इथानोल (C_2H_5OH), सोडियम हाइपोक्लोराइड ($NaOCl$), मरक्यूरिक क्लोराइड ($HgCl_2$) क्यालसियम हाइपोक्लोराइड, हाईड्रोजन पेरोक्साईड आदिको प्रयोग गरिन्छ।

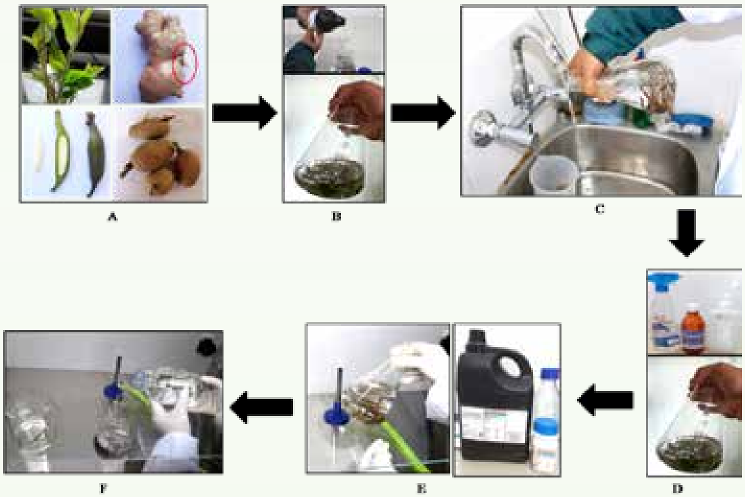
तन्तु नमूनाको सतहमा रहेको माटोहरु हटाउने तथा कीटाणुहरुलाई नाश गर्ने सामान्य तरिकाः

- संकलन गरिएको तन्तु नमूनालाई सानो टुक्रामा काटी धाराको सफा पानीमा पखाल्नु पर्दछ।
- ५ देखि १०% को साबुनको झोल वा डिटरजेन्ट (Tween २० वा Alconox) को १-२ थोपा पानीमा मिसाइ १५ देखि ३० मिनेटसम्म (एक्सप्लान्ट अनुसार फरक हुन सक्छ) सफा गरी धाराको पानीले पखाल्नु पर्दछ।

- त्यसपछि तन्तु नमूनालाई ७५ प्रतिशत इथेनलमा ३० सेकेन्डदेखि २ मिनेटसम्म डुबाइ निकाल्नु पर्दछ। यस देखिको र बाँकी चरणहरुलाई लामिना वायु प्रवाह हुड (LAF) भित्र गर्नाले प्रभावकारी हुन्छ।
- त्यसपछि १-२ % सोडियम हाइपोक्लोराइडले ५ देखि ३० मिनेटसम्म (एक्सप्लान्ट अनुसार फरक हुन सक्छ) वा अन्य निस्संक्रामकहरु तल दिएको तालिका २ अनुसार उपयुक्त मात्रा र समयसम्म सफा गरिन्छ।
- अन्त्यमा ३-५ पटक अटोक्लेभ गरिएको डिस्टिल पानीले रसायन पखाल्नु पर्दछ।

तालिका २: निस्संक्रामकको रुपमा प्रयोग गरिने विभिन्न रसायनहरुको उपयुक्त मात्रा तथा तिनीहरुको एक्सपोजर समय

निस्संक्रामक	मात्रा	एक्सपोजर समय
सोडियम हाइपोक्लोराइड	०.५ देखि ५%	५ देखि ३० मिनेट
मरक्यूरिक क्लोराइड	०.१ देखि १.०%	२ देखि १० मिनेट
क्यालसियम हाइपोक्लोराइड	९.० देखि १०%	३ देखि ३० मिनेट
बेन्जिलकोनियम क्लोराइड	०.०१ देखि ०.१%	५ देखि २० मिनेट
सिल्वर नाइट्रेट	१%	५ देखि ३० मिनेट
हाईड्रोजन पेरोक्साईड	३ देखि १२%	५ देखि १५ मिनेट
ब्रोमिन पानी	१ देखि २%	२ देखि १० मिनेट
इथेनल	७५ देखि ९५%	३० सेकेन्ड देखि २ मिनेट



चित्र १९: एक्सप्लान्टको कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने सामान्य तरिका (A) आवश्यकता अनुसार संकलन गरिएको एक्सप्लान्टहरु, (B) ५ देखि १०% साबुनको झोल वा डिटरजेन्ट पानीमा मिसाइ एक्सप्लान्टलाई राम्ररी धुने, (C) पानीले एक्सप्लान्टलाई राम्ररी पखाल्ने, (D) ७५% इथेनलमा डुबाउने, (E) १-२ % सोडियम हाइपोक्लोराइडले सफा गर्ने र (F) ३-५ पटक अटोक्लेभ गरिएको डिस्टिल पानीले रसायन पखाल्ने

मिडिया र मिडियाको अवयवहरू

बोटबिरुवाको वृद्धि र विकासका लागि विभिन्न पोषक तत्वहरुको आवश्यकता पर्दछ। बिरुवाले त्यस्ता पोषक तत्वहरु प्राकृतिक रुपमा विभिन्न स्रोतहरु जस्तै; माटो, हावा र पानीबाट प्राप्त गर्ने गर्दछ। कार्बोन (C), हाईड्रोजन (H) र अक्सिजन (O) बाहेक नाइट्रोजन (N), फस्फोरस (P), पोटासियम (K), सल्फर (S), म्याग्नेसियम (Mg), र क्याल्सियम (Ca) तत्वहरु बढी मात्रामा बिरुवालाई आवश्यक पर्दछ भने फलाम (Fe), निकल (Ni), क्लोरीन (Cl), कपर (Cu), म्यागनिज (Mn), जींक (Zn), बोरोन (B) र मोलिब्डेनम (Mo) तत्वहरु कम मात्रामा बिरुवालाई आवश्यक पर्दछ। बलियो र स्वस्थ्य बिरुवाको वृद्धि र विकासको लागि विशेष गरी यी १७ तत्वहरु आवश्यक पर्दछन्। बिरुवाको प्रकृति अनुसार कोबाल्ट (Co), आयोडिन (I) सोडियम (Na) र एल्यूमीनियम (Al) जस्ता अन्य तत्वहरु पनि आवश्यक पर्दछन्। बिरुवाको वृद्धि र विकासको लागि आवश्यक पर्ने पोषण तत्वहरु प्रायः प्राकृतिक माटोमा नै उपलब्ध हुन्छ र यसैलाई अनुशरण गरी तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा वानस्पतिक नमूना तन्तुको वृद्धि र विकासको निम्ति सन्तुलित मात्रामा मुख्य पोषक तत्वहरु (Macronutrients), सुक्ष्म पोषक तत्वहरु (Micro Nutrients), खनिज पदार्थहरु, भिटामिनहरु, हर्मोनहरु, जैविक यौगिकहरु, जेल्लिंग एजेन्ट आदि मिश्रिण गरी तयार गरिएको खानालाई मिडिया भनिन्छ। यहि मिडियामा वानस्पतिक नमूनालाई नियन्त्रित कृतिम अवस्थामा अन्य जीवाणुहरुको संक्रमण नहुने गरी वृद्धि र विकास गराईन्छ। बिरुवालाई आवश्यक विभिन्न पोषण तत्वहरुको भूमिका तथा तिनीहरुको यौगिक स्रोतहरुको बारेमा अनुसूची १ को तालिका १० मा दिईएको छ। यसका साथै मिडियामा आवश्यक पी.एच. र ग्यास विनियमको (gaseous exchange) सन्तुलन पनि कायम गरिएको हुन्छ।

पोषण तत्वहरु बिरुवाको प्रकृति अनुसार सन्तुलित मात्रामा मिश्रण भएको हुनुपर्दछ नभएमा थप बिरुवाको प्रकृति अनुसार परीक्षण गरी सन्तुलन कायम राख्नु पर्दछ। मिडियाका तत्वहरुको शुद्ध यौगिक रसायन अथवा व्यवसायिक पूर्वमिश्रित कल्चर मिडियाबाट पनि मिडिया तयार गर्न सकिन्छ। मिडियाका तत्वहरुलाई तीन समूहमा तपशिल बमोजिम विभाजन गरिएको छ;

६.१. अजैविक यौगिकहरु (Inorganic Compounds): अजैविक यौगिकहरु रुपमा मुख्य पोषक तत्वहरु र सुक्ष्म पोषक तत्वहरु प्रदान गरिन्छ।

६.१.१. मुख्य पोषक तत्वहरु (Macronutrients): नाइट्रोजन (N), फस्फोरस (P), पोटासियम (K), सल्फर (S), म्याग्नेसियम (Mg) र क्याल्सियम (Ca) मुख्य पोषक तत्वहरु हुन्। यी तत्वहरुलाई ०.५mM (मीली मोलर) प्रति लीटर भन्दा बढी मात्रामा प्रदान गरिन्छ। यी तत्वहरु बिरुवाको वृद्धि र विकासको लागि अति आवश्यक हुने भएकोले गर्दा यिनीहरुलाई मुख्य पोषक तत्वहरु भनिएको हो।

६.१.२. सुक्ष्म पोषक तत्वहरु (Micronutrients): सुक्ष्म पोषक तत्वहरु त्यस्ता तत्वहरु हुन जुन बिरुवाको वृद्धि र विकासका निम्ति नभई हुदैनन् तर सानो परिमाणमा मात्र आवश्यक पर्दछ। कपर (Cu), फलाम (Fe),

म्यागनिज (Mn), जींक (Zn), निकल (Ni), क्लोरीन (Cl), बोरोन (B), मोलिब्डेनम (Mo) सुक्ष्म पोषक तत्वहरु हुन् । बिरुवालाई थोरै मात्रामा आवश्यक हुने यी तत्वहरु ०.०५mM (millimolar) प्रति लीटर भन्दा कम मात्रामा प्रदान गरिन्छ । घुलनशीलताको समस्या हटाउन फलामलाई Fe–EDTA को रुपमा प्रयोग गरिन्छ ।

६.२. जैविक यौगिकहरु (Organic compounds): मिडिया तयार गर्ने अवस्थामा विभिन्न प्रकारका जैविक यौगिकहरुको रुपमा कार्बोहाइड्रेट, भिटामिनहरु, हर्मोनहरु इत्यादि प्रयोग गरिन्छ ।

६.२.१. कार्बोहाइड्रेट (Carbohydrate): कार्बन र उर्जाको मुख्य स्रोत कार्बोहाइड्रेट हो । कार्बोहाइड्रेटको रुपमा २ देखि ४% सुक्रोजको प्रयोग गरिन्छ । कहिले काँही ग्लुकोज, फ्रुक्टोज, माल्टोज, स्टार्च आदिको पनि प्रयोग गरिन्छ ।

६.२.२. भिटामिनहरु (Vitamins) तथा Amino acid: मेटाबोलिक प्रक्रियाहरुको लागि न्यून मात्रामा भिटामिनहरुको आवश्यकता पर्दछ । थायमिन, निकोटिनिक एसिड, पाइरिडोक्सिन, इनोसिटवल, बायोटिन, प्यान्टोथिनिक एसिड आदि महत्वपूर्ण भिटामिनहरु हुन् । Amino acid को रुपमा Glycine को प्रयोग गरिन्छ जसले बिरुवाको कोषिकाहरुमा प्रोटिनको biosynthesis मा भूमिका खेल्दछ ।

६.२.३. हर्मोनहरु (Hormones): प्राकृतिक रुपमा बिरुवाले हर्मोनहरुको संश्लेषण गर्दछ जुन चाहिँ जैविक यौगिकहरुको समूह हुन् जसले कोषिका विभाजन, विस्तार (enlargement), फूल फुल्ने, बीउको विकास, सुप्तावस्था र विच्छेदन जस्ता सबै वृद्धि र विकासका गतिविधिहरु नियन्त्रण गर्दछ । त्यसैले हर्मोनहरुलाई बिरुवा वृद्धि नियामक (Growth regulators) वा फाइटोहर्मोन (Phytohormone) पनि भनिन्छ । तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा हर्मोनहरुको रुपमा साईटोकाईनिन (Cytokinin), अक्जीन (Auxin) र GA3 को प्रयोग महत्वपूर्ण हुन्छ । साईटोकाईनिनले कोष विभाजनको प्रारम्भ तथा विभाजनलाई प्रोत्साहन/बढुवा गर्ने, डाँटको, हाँगा र पातको विकासमा ठूलो भूमिका खेलेको हुन्छ । अक्जीनले भने कोषिका विभाजन, कोषिका विस्तार, शिखर प्रभुत्व (apical dominance), सोमाटिक भ्रूण उत्पत्ति र जराको विकास वृद्धिलाई प्रेरित गर्दछ । GA3 ले डाँटको मोटाई, लम्बाई र बीउ सुसुप्ति विश्राम (dormancy break) गर्न सहयोग गर्दछ । बिरुवा तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा तालिका ३ मा दिईएको अनुसार विभिन्न साईटोकाईनिन, अक्जीन र जिबेरेलिन आवश्यकता र कल्चरको प्रकृति अनुसार विभिन्न मात्रामा प्रयोग गर्न सकिन्छ । तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने विभिन्न प्रकारका हर्मोनहरुको थप विस्तृतका साथ अनुसूची २ तालिका १२ मा उल्लेख गरिएको छ ।

तालिका ३: तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा प्रयोग गरिने विभिन्न प्रकारको हर्मोनहरु

हर्मोन	नाम
Cytokinin	6- Benzylaminopurine (BAP)
	2-isopentenyl adenine (2 iP)
	Kinetin
	Thidiazuron (TDZ)

	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N9 phenylurea • Zeatin • Zeatin riboside
Auxin	Indole-3-acetic acid (IAA)
	Indole-3-butyric acid (IBA)
	Naphthalene acetic acid (NAA)
	2,4 Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
Gibberellin	Gibberellic acid (GA3)

६.२.४. अन्य तत्वहरु (**Miscellaneous**): तन्तु ब्राउनिङ रोक्न, वृद्धि र विकासको लागि थप जैविक पदार्थहरु मिडियामा थप्न सकिन्छ। ब्राउनिङ रोक्न एन्टिओक्सिडेंटहरु (Antioxidants) जस्तै; साइट्रिक एसिड (१५० मी.ग्रा./ली.) वा एस्कोर्बिक एसिड (१० mg/l) प्रयोग गर्न सकिन्छ। तन्तु ब्राउनिङ सिर्जना गर्ने पदार्थहरुलाई सोस्न र प्रतिवादको लागि अन्य अधिषोशी (Adsorbents) जस्तै; सक्रिय चारकोल (activated charcoal) ०.१ देखि १ प्रतिशत मिडियामा प्रयोग गरिन्छ। कहिलेकाँही मिडियामा थप जैविक नाइट्रोजन र एमिनो एसिड श्रोतको लागि नरिवलको पानी १० देखि २०%, माल्ट (malt) ५०० मी.ग्रा./ली., yeast extract ५० देखि ५,००० मी. ग्रा./ली., गोलभेडाको रस ३०%, सुन्तलाको रस ३०% इत्यादिहरुको पनि प्रयोग गरिन्छ।

६.३. जेलिङ एजेन्ट (Gelling agent): ठोस वा अर्ध ठोस मिडिया बनाउनको लागि अजैविक लवण र जैविक यौगिकहरुसँग जेलिङ एजेन्टको प्रयोग गरिन्छ। बिरुवा तन्तु प्रजनन् मिडियामा जेलिङ एजेन्टको रुपमा सबै भन्दा बढी प्रयोग हुने अगार (Agar) हो। यसको विकल्पमा तरल मिडियम एवम् अन्य जेलिङ एजेन्टहरु पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ जस्तै; जेलराइट (Gelrite/Gellangum/Phytogel), जिलेटिन, Defacto Bacto Agar, Alginate आदि। बिरुवा तन्तु प्रजनन् मिडिया बनाउदा प्रयोग गरिने केही जेलिङ एजेन्ट तथा प्रयोग गरिने मात्रा तालिका ४ मा दिईएको छ।

तालिका ४: मिडिया बनाउँदा प्रयोग गरिने विभिन्न जेलिङ एजेन्टहरुको विभिन्न मात्राहरु

जेलिङ एजेन्ट	प्रयोग गरिने मात्रा (ग्राम प्रति लीटरमा)
अगार	५ देखि ८
जेलराइट	१.५ देखि २.५
एल्जिनेट	१७.५ देखि ४०
डिफाको ब्याक्टो आगर	६ देखि १०

६.४. प्रचलित मिडियाहरुको विवरण

विस्तृत विवरण सहित लेखहरुमा विभिन्न प्रकारका बिरुवा तन्तु प्रजनन् मिडियाहरु बिरुवाको प्रकृति अनुसार अनुकूलन (optimize) गरेको पाईन्छन्। Murashige–Skoog (MS) मिडिया, गाम्बर्ग बी ५ (Gamborg

B5) मिडिया, Woody plant Media (WPM), वाईट्स (White's) मिडिया, चु एन ६ (Chu N6) आदि तन्तु प्रजनन् मिडियाहरु प्रचलनमा रहेका छन् जसको रसायनहरुको नाम र मात्रालाई तल तालिका ५ मा दिइएको छ । यी मध्ये मुरासिगे-स्कुग मिडिया आज पनि सबैभन्दा बढी र व्यापक रुपमा विभिन्न फलफूल, तरकारी, मशालाबाली तथा अन्य प्रकृतिका बिरुवाहरुको उत्पादनको लागि प्रयोग गरिने बिरुवा तन्तु प्रजनन् मिडिया हो । यस MS मिडियामा नाइट्रेट, एमोनिया र पोटासियमको उच्च मात्रामा समावेश गरिएको हुन्छ । यो मिडिया तोसियो मुरासिगे र फोलके के. स्कुगले १९६२ ई.सं. मा विकास गरेका थिए ।

तालिका ५: प्रचलनमा रहेका केही मिडियाहरुको रसायनिक नामहरु र प्रयोग गरिने मात्रा

क्र.स.	रसायनिक	मात्रा (मीलीग्राम प्रति लीटरमा)					
		White's	**MS**	**Gamborg B5**	**Chu(N6)**	**Nitsch's**	**WPM**
(क) मुख्य पोषक तत्वहरु							
१	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	-	१६५०	-	-	७२०	४००
२	Potassium nitrate (KNO_3)	८०	१९००	२५००	२८३०	९५०	-
३	Potassium dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	-	१७०	-	४००	६८	१७०
४	Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) or, Magnesium sulphate ($MgSO_4$)	७५०	३७०	२५०	१८५	१८५	३७०
		-	१८०.५४	-	-	-	-
६	Ammonium sulphate ($(NH_4)_{2.SO4}$)	-	-	१३४	४६३	-	-
७	Calcium chloride ($CaCl_2$) or, Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	-	३३२.०२	-	-	-	-
		-	४४०	१५०	१६६	-	९६
८	Potassium sulphate (K_2SO_4)	-	-	-	-	-	९९०
९	Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca\ (NO_3)24H_2O$)	-	-	-	-	-	५५६
१०	Sodium phosphate monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$)	१९	-	१५०		-	-
(ख) सुक्ष्म पोषक तत्वहरु							
१	Boric acid (H_3BO_3)	१.५	६.२	३.०	१.६	-	४.८
२	Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$) वा Manganese sulphate tetrahydrate ($MnSO_44H_2O$)	-	१६.९	-	३.३	-	३३.५
		५	२२.३	१३.२	४.४	२५	-
३	Zinc sulphate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	३	८.६	२.०	१.५	१०	८.६
४	Potassium iodide (KI)	०.७५	०.८३	०.७५	०.८	-	-

५	Cobalt chloride hexahydrate ($CoCl_2 6H_2O$)	-	०.०२५	०.०२५	-	०.०२५	-
६	Copper sulphate pentahydrate ($CuSO_4 5H_2O$)	०.०१	०.०२५	०.०२५	०.०२५	०.०२५	०.२५
७	Sodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	-		०.२५	-	०.२५	०.२५
(ग) आईरन							
१	Disodium ethylenediaminetetraacetic acid Na_2EDTA	-	३७.३	३७.३	३७.३	३७.३	३७.३
२	Iron sulphate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	२०	२७.८	२७.८	२७.८	२७.८	२७.८
(घ) भिटामिनहरु							
१	Thiamine.HCl	०.०१	०.१	१०.०	१.०	०.५	१.६
२	Pyridoxine.HCl	०.०१	०.५	१.०	०.५	०.५	-
३	Nicotinic acid	०.०५	०.५	१.०	०.५	५	०.५
४	Glycine (Amino acid)	३	२.०	-	४०	२	-
(ङ) अन्य							
१	Inositol	-	१००.०	१००.०	-	१००	१००
२	GA3	-	०.२५	-	-	-	-
३	Sucrose	२%	३%	२%	५%	२%	२%
४	Agar	-	०.८%	-	-	-	-
५	Folic acid	-	-	-	-	०.५	-
६	Biotin	-	-	-	--	०.०५	
७	pH	५.८	५.८	५.५	५.८	५.८	५.६

खण्ड ७

मिडिया बनाउने तरिका

७.१. स्टक सोलुसन बनाउने तरिका

छिटो मिडिया तयार पार्नको लागि प्रायः माथि तालिका ५ मा उल्लेखित बमोजिम सबै जसो प्रचलनमा रहेका मिडियाहरुको रसायनहरुलाई डिस्टिल पानीमा मिसाएर प्रत्येक समूहको रसायनहरुलाई उचित मात्रामा छुट्टाछुट्टै स्टक सोलुसन (Stock solution) बनाइन्छ। प्रयोगशालामा खपत हुने मिडियाको आधारमा स्टकको कति मात्रामा बनाउने भन्ने निर्धारण गर्न सकिन्छ। यस्ता स्टकका सोलुसनहरुलाई बोतलमा खन्याएर बोतलमा सोलुसनको नाम, कन्सन्ट्रेसन र मिति लेखी आवश्यकता अनुसार प्रयोग गर्ने र थप प्रयोगको लागि फ्रिजमा भण्डारण गर्नुपर्दछ। माथि तालिका ५ मा उल्लेखित बमोजिम सबै जसो प्रचलनमा रहेका मिडियाहरुको यौगिकहरुलाई डिस्टिल पानीमा मिसाएर प्रत्येक समूहको तत्वहरुलाई सामान्यतया निम्नलिखित मात्रामा छुट्टा-छुट्टै स्टकको सोलुसन बनाउनु पर्दछ र सबै स्टकलाई ४ देखि ८ डिग्री तापक्रममा भण्डारण गर्नुपर्छ।

७.१.१. मुरासिगे–स्कुग स्टक सोलुसन बनाउने तरिका

- **मुख्य पोषक तत्वहरु:** यस स्टकको सोलुसन आवश्यकता अनुसार एवम् १०X देखि १००X कन्सन्ट्रेसन (Concentration/Strength) सम्मको १ लीटर डिस्टिल पानीमा बनाउनु सकिन्छ। तालिका ६ मा दिईएको अनुसार मुख्य पोषक तत्वहरुको वजन गर्ने र ५०० मी.ली डिस्टिल पानीमा एक पछि अर्को गर्दै सफा beaker मा घुलाउने। त्यसपछि त्यस सोलुसनलाई १ लीटरको volumetric flask मा हाली डिस्टिल पानी थपी १ लीटर पुरा बनाउनु पर्दछ। यस मुख्य पोषक तत्वहरुको मिश्रण सोलुसनलाई स्टक 'क' पनि भनिन्छ। स्टक 'क' भित्र पर्ने क्यालसियमको यौगिकरु जस्तै; $CaCl_2$ वा $CaCl_2 2H_2O$ को छुट्टै स्टक सोलुसन बनाउनु पर्दछ।
- **सुक्ष्म पोषक तत्वहरु:** आवश्यकता अनुसार एवम् १००X देखि १०००X कन्सन्ट्रेसनको १०० मी.ली. डिस्टिल पानीमा सुक्ष्म पोषक तत्वहरुको स्टक सोलुसन बनाउन सकिन्छ। तालिका ६ मा दिईएको अनुसार सुक्ष्म पोषक तत्वहरुको वजन गर्ने र ५० मी.ली. डिस्टिल पानीमा एक पछि अर्को गर्दै सफा beaker मा घुलाउने। त्यसपछि त्यस सोलुसनलाई १०० मी.ली. को volumetric flask मा हाली डिस्टिल पानी थपी १०० मी.ली. पुरा बनाउनु पर्दछ। यस सुक्ष्मपोषक तत्वहरुको मिश्रण सोलुसनलाई स्टक 'ख' पनि भनिन्छ।
- **आईरन:** आईरन तथा सोडियम EDTA को मिश्रण सोलुसनलाई स्टक 'ग' पनि भनिन्छ। यस स्टकको सोलुसन पनि तालिका ६ मा दिईएको अनुसार १००X वा आवश्यकता अनुसारको कन्सन्ट्रेसमा २०० मी.ली. डिस्टिल पानीमा बनाउन सकिन्छ। २०० मी.ली. स्टक सोलुसन बनाउनलाई आवश्यक यौगिकहरुको वजन लिने र १०० मी.ली. डिस्टिल पानीमा एक पछि अर्को गर्दै सफा beaker मा घुलाउने। त्यसपछि त्यस सोलुसनलाई २०० मी.ली. को volumetric flask मा हाली डिस्टिल पानी

थपी २०० मी.ली. पुरा बनाउनु पर्दछ ।

- **भिटामिनहरु:** भिटामिनहरुको मिश्रण सोलुसनलाई स्टक 'घ' पनि भनिन्छ । स्टक 'घ' लाई आवश्यकता अनुसार वा १००X देखि १०००X कन्सन्ट्रेसन भएको १०० मी.ली. डिस्टिल पानीमा बनाउन सकिन्छ । १०० मी.ली. स्टक सोलुसन बनाउनलाई तालिका ६ मा दिईएको अनुसार भिटामिनहरुको वजन गर्ने र ५० मी. लि. डिस्टिल पानीमा एक पछि अर्को गर्दै सफा beaker मा घुलाउने । त्यसपछि त्यस सोलुसनलाई १०० मी.ली. को volumetric flask मा हाली डिस्टिल पानी थपी १०० मी.ली. पुरा बनाउने ।
- **हर्मोनहरु:** साईटोकाईनिन, अक्जीन र जिबेरेलिक एसिडको छुट्टाछुट्टै (१००-१०००) मी. ग्राम/लीटरको स्टक सोलुसन बनाइन्छ वा आवश्यकता अनुसार बनाउन सकिन्छ । हर्मोनहरुलाई घुलाउन विशेष घुलकको आवश्यकता पर्दछ जस्तै; 1N HCl or 1N NaOH or KOH. साईटोकाईनिन जस्तै; BAP वा Kinetin को १००० मी. ग्राम/लीटरको स्टक सोलुसन बनाउने तरिका यस प्रकार छ;
    - » ०.१ ग्राम साईटोकाईनिन जस्तै; BAP वा Kinetin लाई बटर पेपरमा राखेर डिजिटल तौल मेसिनमा वजन लिने ।
    - » त्यसलाई सुख्खा अटोक्लेभ गरिएको falcon tube वा ५० मी.ली. को बिकर वा कोनिकल फ्लास्कमा हाल्ने ।
    - » त्यसपछि, २ देखि ५ थोपा 1N HCl or 1N NaOH or KOH हाली पूर्ण रुपमा घुलाउने ।
    - » त्यसपछि, पूर्ण रुपमा घुलेको सोलुसनलाई १०० मी.ली. को volumetric flask मा हाली डिस्टिल पानी हालेर १०० मी.ली. पुरा बनाउने ।
    - » त्यसरी नै अक्जीन र जिबेरेलिक एसिडको छुट्टाछुट्टै स्टक बनाउन सकिन्छ ।

तालिका ६: विभिन्न MS Stock घोल कन्सन्ट्रेसन बनाउनको लागि आवश्यक रसायानहरुको मात्रा

क्र.सं.	रसायनको नाम	कन्सन्ट्रेसन		विभिन्न घोलको परिमाणमा चाहिने रसायनको मात्रा (ग्राममा)			
		मीलीग्राम प्रति (लीटरमा)	स्टक सोलुसन				
(क)	मुख्य पोषक तत्वहरु A (स्टक 'क')	१X	१०X	१ ली.	२ ली.	३ ली.	५ ली.
१	NH_4NO_3	१६५०		१६.५	३३.०	४९.५	८२.५
२	KNO_3	१९००		१९.०	३८.०	५७.०	९५.०
३	KH_2PO_4	१७०		१.७	३.४	५.१	८.५
४	$MgSO_4.7H_2O$ or, $MgSO_4$	३७०		३.७	७.४	११.१	१८.५
		१८०.५४		१.८०५४	३.६	५.४	९.०
(ख)	मुख्य पोषक तत्व B (स्टक 'क')	१X	१००X	१०० मी.ली.	२०० मी.ली.	३०० मी.ली.	५०० मी.ली.

५	$CaCl_2$ or, $CaCl_2.2H_2O$	३३२.०२		३.३	६६४	९९६	१६६
		४४०		४.४	८८	१३२	२२०
(ग)	**सुक्ष्म पोषक तत्वहरु (स्टक 'ख')**	**१X**	**१०००X**	**५० मी.ली.**	**१०० मी.ली.**	**३०० मी.ली.**	**५०० मी.ली.**
१	H_3BO_3	६.२		०.३१	०.६२	१.८६	३.१
२	$MnSO_4.H_2O$ or, $MnSO_44H_2O$	१६.९		०.८४५	१.६९	५.०७	८.४५
		२२.३		१.११५	२.२३	६.६९	११.१५
३	$ZnSO_4.7H_2O$	८.६		०.४३	०.८६	२.५८	४.३
४	KI	०.८३		०.०४१५	०.०८३	०.२४९	०.४१५
५	$CoCl_26H_2O$	०.०२५		०.००१२५	०.००२५	०.००७५	०.०१२५
६	$CuSO_45H_2O$	०.०२५		०.००१२५	०.००२५	०.००७५	०.०१२५
७	$Na_2MoO_4.2H_2O$	०.२५		०.०१२५	०.०२५	०.०७५	०.१२५
(घ)	**आईरन (स्टक 'ग')**	**१X**	**१००X**	**१०० मी.ली.**	**२०० मी.ली.**	**३०० मी.ली.**	**५०० मी.ली.**
१	Na2EDTA	३७.३		०.३७३	०७४६	१११९	१८६५
२	FeSO4.7H2O	२७.८		०.२७८	०५५६	०८३४	१३९
(ङ)	**भिटामिनहरु (स्टक 'घ')**	**१X**	**१०००X**	**५० मी.ली.**	**१०० मी.ली.**	**२०० मी.ली.**	**५०० मी.ली.**
१	Thiamine.HCl	०.१		०.००५	००१	००२	००५
२	Pyridoxine.HCl	०.५		०.०२५	००५	०१	०२५
३	Nicotinic acid	०.५		०.०२५	००५	०१	०२५
४	Glycine (Amino acid)	२.०		०.१	०२	०४	१०
(च)	**अन्य**	**१००० मी.ली.**					
२	जिबेरेलिक एसिड (GA3)	०.२५	१०० मी.ग्रा./ली	२.५ मी.ली.			

चित्र २०: मुरासिगे–स्कुग स्टक सोलुसन बनाउने तरिका (a) मिडिया बनाउन आवश्यक रसायानहरु, (b) आवश्यक मात्रामा रसायान तौलिने (c) Measuring cylinder, (म) रसायानहरुलाई पानीमा राम्ररी घोल्ने, (e) डिस्टिल पानी थपी आवश्यक सोलुसनको मात्रा बनाउने र (f) तयार गरिएको स्टक सोलुसनलाई सुरक्षित फ्रिजमा (४–८) डिग्री तापक्रममा भण्डारण गर्ने

७.२. स्टक सोलुसनबाट मिडिया बनाउने तरिका

७.२.१. मुरासिगे–स्कुग स्टक सोलुसनबाट मिडिया बनाउने तरिका

स्टक सोलुसन बनाइ सकेपछि बिरुवा कल्चर गर्नको लागि मिडिया बनाउनु पर्दछ । मिडियाको पनि आवश्यकता अनुसारको भिन्न भिन्न कन्सन्ट्रेसनको बनाउन सकिन्छ तर प्रायः जसो फलफूल तथा तरकारी बालीहरु जस्तैः सुन्तला, स्याउ, केरा, आलु आदि MS मिडियाको पूर्ण कन्सन्ट्रेसनमा कल्चर गर्दा उपयुक्त भएको पाईन्छ । बिरुवाको प्रकृति अनुसार मिडिया तथा हर्मोनहरुको कन्सन्ट्रेसन कति मात्रामा हाल्ने भन्ने कुरो सम्बन्धित बिरुवाको प्रोटोकल हेरेर गर्नुपर्दछ वा अनुसन्धानबाट उपयुक्त प्रोटोकल विकास गर्नुपर्ने हुन्छ । १ लीटर MS मिडिया बनाउनको लागि बिस्तृतमा निम्न बुंदाहरुमा उल्लेख गरिएको छ;

- एक लीटरको beaker मा आधा वा दुई तिहाई डिस्टिल पानी राख्ने ।
- त्यसपछि, तालिका ७ मा दिए अनुसार १०X मुख्य पोषक तत्वहरु, १००X $CaCl_2$ वा $CaCl_2 2H_2O$, १०००X सुक्ष्म पोषक तत्वहरु, १००X फलामको स्रोत र १०००X भिटामिनहरुको स्टक घोलबाट क्रमिक अनुसार १००, १०, १, १० र १ मी.ली. measuring cylinder र पिपेटको सहायताले मापन गरी आधा वा दुई तिहाई डिस्टिल पानी राखेको beaker मा थप्दै जाने र राम्ररी घोल्ने ।

कन्सन्ट्रेसन र परिमाण निकाल्ने शुत्र

$M_1V_1 = M_2V_2$

यहाँ,

M_1= स्टक सोलुसनको कन्सन्ट्रेसन

V_1= स्टक सोलुसनबाट लिइने मात्रा (X)

M_2= MS मिडियाको कन्सन्ट्रेसन

V_2= MS मिडिया बनाइने परिमाण

- ३० ग्राम सुक्रोज वजन गरी beaker मा भएको सोलुसनमा थप्ने र चुम्बकीय स्टेरियरको सहायताबाट राम्ररी घोल्ने।
- ०.१ मी.ग्रा./ली. मायो-इनोसिटवल वा मेसो-इनोसिटवल जोखी माथि बनाएको सोलुसनमा हालेर सोलुसन्ने। यो पदार्थले पनि बिरुवाको वृद्धि र विकासमा सहयोग पुऱ्याउँदछ।
- साईटोकाईनिन, अक्जीन र जिबेरेलिक एसिड हर्मोनहरु आवश्यकता अनुसार थप्ने।
- उक्त सोलुसनको मिश्रणमा डिस्टिल पानी थपेर लगभग ९९५ मी.ली. जति बनाउने र त्यसको pH नाप्ने। मिडियाको pH ५.६ देखि ५.८ सम्म हुनु पर्दछ। यदि सो pH भन्दा कम भएमा 1N NaOH र सो भन्दा बढी भएमा 1N HCl थोपा थोपा गर्दै थप्दै तोकिएको पी.एच. कायम गर्नु पर्दछ।
- पी.एच. कायम भएपछि डिस्टिल पानि थपी मिडियाको अन्तिम मात्रा १००० मी.ली. बनाउने।
- ६ देखि ८ ग्राम अगार मिडियामा हाली राम्रोसँग चलाउदै घुलाउनु पर्दछ।
- त्यसपछि ३० देखि ५० मी.ली. मिडियालाई क्यान जार, इर्लेनमेयर फ्लास्क आदिमा खन्याइ बिर्को लगाउने।
- त्यसपछि १२१ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा र १५ psi दबाबमा मिडियमलाई १५ मिनेट अटोक्लेव गरी कीटाणु नष्ट गर्ने।
- मिडिया अटोक्लेव गरी सकेपछि मिडियालाइ हप्ता दिनसम्म भण्डारण गरी बिरुवा कल्चर गर्नु राम्रो हुन्छ। यसो गर्दा मिडियामा संक्रमण भएको वा नभएको भन्ने पहिचान गर्न सकिन्छ।

तालिका ७: तयार गरिएको स्टक सोलुसनबाट १ लीटर मिडिया बनाउन आवश्यक स्टक सोलुसनको मात्रा

क्र.स.	स्टकको नाम	स्टक सोलुसनको कन्सन्ट्रेसन	१ लीटर मिडिया बनाउन आवश्यक स्टक सोलुसनको मात्रा
(क)	मुख्य पोषक तत्वहरु A (स्टक 'क')	१०X	१०० मी.ली.
(ख)	मुख्य पोषक तत्वहरु B (स्टक 'क')	१००X	१० मी.ली.
(ग)	सुक्ष्म पोषक तत्वहरु (स्टक 'ख')	१०००X	१ मी.ली.
(घ)	आईरन (स्टक 'ग')	१००X	१० मी.ली.
(ङ)	भिटामिनहरु (स्टक 'घ')	१०००X	१ मी.ली.
(च)	अन्य		
१	मायो-इनोसिटवल		०.१ ग्रा.
२	जिबेरेलिक एसिड (GA3)	१०० मी.ग्रा./लि	२.५ मी.ली.
३	साईटोकाईनिन र अक्जीन	१००० मी.ग्रा./ली	आवश्यकता अनुसार (प्रत्येक बिरुवाको फरक फरक हुन सक्छ)
४	चिनी	-	३० ग्रा.

५	अगार	-	८ ग्रा.
६	पी.एच.	-	५.८

*चित्र २१: तयार गरिएको **MS** स्टक सोलुसनबाट १ लीटर मिडिया बनाउने तरिका (**A**) स्टक सोलुसन, (**B**) आवश्यक मात्रामा स्टक सोलुसन लिने, (**C**) पीएच सन्तुलन मिलाउने र डिस्टिल पानी थपी आवश्यक मात्राको मिडिया बनाउने, (**D**) जेलिङ्ग एजेन्ट मिडियामा घुलाउने, (**E**) मिडियालाई कल्चर भाडाहरुमा खन्याउने र (**F**) मिडियालाई अटोक्लेभ गर्ने*

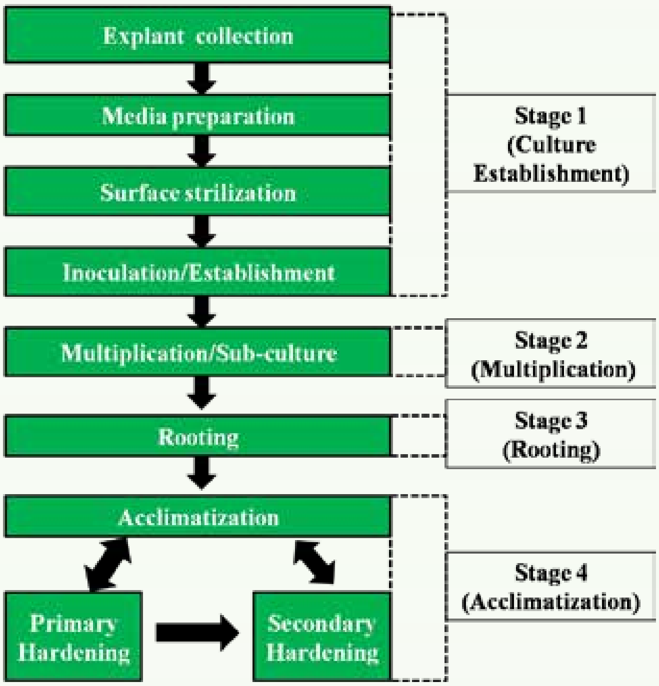
७.३. मिडिया बनाउदा वा कल्चर गर्दा प्रयोग गरिने कन्टेनर/भाँडा

बिरुवा रोप्न वा कल्चर गर्नलाई पारदर्शी, स्टेरिलाइज गर्न सकिने, ग्यास विनियमको राम्रो संचार हुने (CO_2, O_2 र इथाइलिन ग्यास) को र संक्रामक सूक्ष्म जीवहरु अवरोध गर्न सक्ने सीसा वा पलास्टिक कन्टेनरको प्रयोग गर्न सकिन्छ। पाइरेक्स ग्लासबाट बनेका ग्लासवेयर नभएमा कम सस्तो पर्ने सोडा ग्लास (Soda glass) र बोरोसिलिकेटको (Borosilicate) प्रयोग गर्न सकिन्छ। अन्य सस्तो र बलियो प्रकारका व्यवसायिक उत्पादित पलास्टिकका कन्टेनरहरु पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ। आवश्यकता अनुसार विभिन्न प्रकारका कन्टेनरहरु जस्तै; पेट्रीडिश, कल्चर ट्यूव, कल्चर जार, इर्लेनमेयर फ्लास्क, बोतल इत्यादि प्रयोग गर्न सकिन्छ।

तन्तु प्रजननको प्रक्रिया

८.१. तन्तु प्रजननको सामान्य प्रक्रियाहरु

तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा एक्सप्लान्टबाट पूर्ण बिरुवा विकास गराउनलाई विभिन्न चरणमा काम गर्नु पर्दछ। बिरुवाको प्रकृति तथा कल्चर गर्न खोजिएको अनुसार तन्तु प्रजनन् प्रक्रियाको चरणहरुमा केही फरक हुन सक्दछ तर सामान्यतया यसलाई चार चरणमा विभाजित गर्न सकिन्छ जुन चित्र २२ फ्लो चार्टमा दिईएको छ। प्रत्येक चरणको बिस्तृत जानकारी यस प्रकार छन्;



चित्र २२: तन्तु प्रजनन् प्रक्रियाको सामान्य फ्लोचार्ट

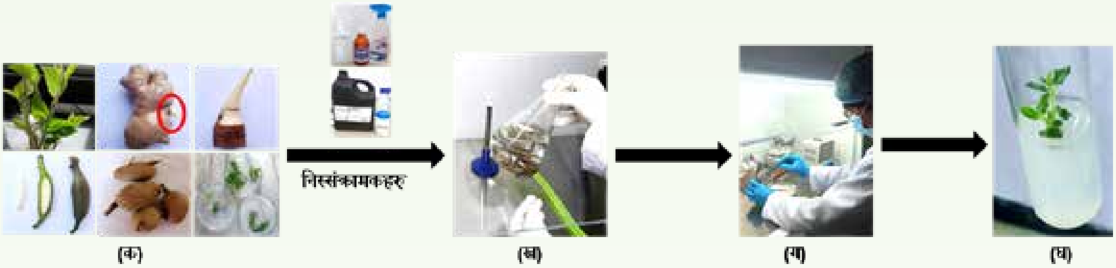
८.१.१. प्रारम्भिक चरण/कल्चर स्थापना (Culture Establishment):

यस चरणमा बाहिरी वातावरणमा हुर्केको एक्सप्लान्टलाई प्रयोगशालाको वातावरणमा सफलतापूर्वक स्थापना गर्नु हो। यस चरणमा मुख्य गरी कल्चर स्थापनाको लागि मिडिया तयारी, एक्सप्लान्ट संकलन, एक्सप्लान्टको सतहबाट कीटाणु निर्मलिकरण र कल्चर स्थापना गर्नु हा। कल्चर गर्नका लागि आवश्यक बिरुवाको एक्सप्लान्ट संकलन गरी विभिन्न निस्संक्रामकहरुले कीटाणु सतह निर्मलिकरण गर्ने जसको विधि बिस्तृत रुपमा माथि ५.३. मा उल्लेख गरिएको छ। त्यसपछि, कुन कल्चर गर्ने हो सोही अनुसार स्थापनाको लागि आवश्यक

तत्वहरुको उचित मात्रा मिलाए सिसा तथा पलास्टिकको भाँडामा मिडिया तयार गरिन्छ। मिडिया तयार पार्ने विधि बिस्तृत रुपमा माथि खण्ड ७ मा उल्लेख गरिएको छ। त्यसपछि, कल्चर गर्ने कोठामा कीटाणु निर्मलिकरण गरिएको एक्सप्लान्टलाई मिडियामा कल्चर गरी स्थापन गर्नुपर्दछ। एक्सप्लान्टलाई मिडियामा कल्चर गरी थप वृद्धि र विकासको लागि बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२०००-५००० लक्स) प्रकाशको तीव्रतामा १६ घण्टाको फोटोपिरियड अर्थात (१६ घण्टा अध्यारो र ८ घण्टा उज्यालो प्राकाश चक्रमा) प्रत्येक दिन २५±२ डिग्री सेल्सियस तापमान कायम राख्नु पर्दछ। एक्सप्लान्ट स्थापनाको लागि विभिन्न तन्तु मिडियाका अवयवहरु सन्तुलन कायम गरी तरल वा अर्ध-ठोस को रुपमा प्रयोग गर्न सकिन्छ। अन्य उपलब्द व्यवसायिक readymade मिडियाहरु पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ। एक्सप्लान्ट स्थापनाको लागि मिडियामा फाइटोहर्मोनको फरक- फरक मात्रा प्रयोग गर्न सकिन्छ।

कल्चर स्थापना गर्दा ध्यान दिनुपर्ने अन्य कुराहरु

- प्रयोगशालामा काम गर्ने व्यक्तिले काम शुरु गर्नु अघि साबुन पानीले हात धोएर, मेडिकल पन्जा, मास्क डिस्पोजेबल हेयर कभर क्याप र एप्रोन लगाएर काम गर्नु पर्दछ।
- कल्चर गर्ने स्थान LAF मा ७० प्रतिशत ईथानलले सफा गरी आवश्यक वस्तुहरु जस्तै; मिडिया तयार गरिएको जार/बोतल/ट्युव, फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल, अटोक्लेभ गरिएको पानी, sterilize गरिएको पेट्री डिश तथा अन्य एल्युमिनियमका प्लेट, फिल्टर पेपर आदि राखि सकेपछि १५-३० मिनेटसम्म UV लाईट बालेर छोड्नु पर्दछ।
- LAF मा काम गर्दा UV लाईट बन्द गरेर मात्र काम गर्नु पर्दछ साथै बिरुवा तथा एक्सप्लान्टलाई UV लाईटमा राख्नु हुदैन।
- कल्चर गरिने उपकरणहरु जस्तै; फोर्सेप, कैंची, स्केलपेल आदिलाई निर्मलिकरण गरेर मात्र प्रयोग गर्नु पर्दछ।
- कीटणु निर्मलिकरण गरिएको एक्सप्लान्टमा भएको पानीलाई autoclaved फिल्टर कागजले राम्रोसंग सोसेर मात्र कल्चर गर्नु पर्दछ।
- एक्सप्लान्ट कल्चर गरिसकेपछि कल्चर गरिएको भाँडोको बिर्को हावा नछिर्ने गरी बन्द गर्नु पर्दछ तर धेरै टाईट चाही बन्द गर्नु हुदैन। साथै कल्चरको नाम तथा कोड, र कल्चर गरिएको मिति बोतलको बिर्को तथा सतहमा लेख्नु पर्दछ।
- काम सकिएपछि LAF लाई राम्रोसँग सफा गरी यसको ढोका बन्द गर्ने तथा सप्लाई गरेको विद्युतलाई पनि बन्द गर्नु पर्दछ।
- मिडियामा पोषण तत्वहरु, हर्मोनहरु तथा कीटाणु निर्मलिकरणको सन्तुलन मिलेको अवस्थामा बाली तथा एक्सप्लान्टको प्रकृति अनुसार मुनाहरु विकास हुन लगभग १ देखि २ महिनासम्म लाग्न सक्छ।
- मिडियामा कल्चर स्थापनाको थप सुनिश्चित गर्न नियमित अनुगमन तथा हेरचाह गर्नु पर्दछ।



चित्र २३: एक्सप्लान्टलाई मिडियामा कल्चर स्थापना गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) पाउलोनिया बिरुवाबाट एक्सप्लान्ट संकलन गरिएको, (ख) एक्सप्लान्टको कीटाणु निर्मलिकरण गरेको, (ग) कल्चर गरेको र (घ) इन भिट्रो बिरुवा स्थापना भएको

८.१.२. बिरुवाको गुणन चरण (Multiplication Phase):

यस चरणको मुख्य उद्देश्य भनेको मिडियामा एक्सप्लान्ट कल्चर गरेर सफल भएको बिरुवालाई सब-कल्चर गरी माउबोट तथा आवश्यक संख्यामा बिरुवाहरु तयार गर्नु हो । सामान्यतया यस चरणमा प्रयोग गरिने मिडियाको पोषक तत्वहरु पनि स्थापना चरणमा प्रयोग गरिएको जस्तै हुन्छ तर हर्मोनहरुको अनुपात भने फरक हुन सक्छ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार प्रसारणको लागि मिडियामा साईटोकाईनिन मात्र प्रयोग गरिन्छ वा थोरै मात्रामा अक्जीन पनि मिसाएर प्रयोग गरिन्छ। साईटोकाईनिन कोष विभाजन तथा डाँटको, हाँगा, काण्ड र पातको विकासमा ठूलो भूमिका खेल्नाले तुलनात्मक रुपमा यस चरणमा साईटोकाईनिनको मात्रा अक्जीनको भन्दा बढी प्रयोग गरिन्छ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार उत्तम प्रसारणको लागि स्थापित प्रसारण मिडियामा कल्चर गर्ने तथा साईटोकाईनिन र अक्जीनको मात्रा विभिन्न कन्सन्ट्रेसनमा परीक्षण गरी प्रोटोकल विकास गर्नु पर्दछ। मिडियामा पोषण तत्वहरु र हर्मोनहरुको सन्तुलन मिलेको अवस्थामा बाली तथा एक्सप्लान्टको प्रकृति अनुसार २ देखि ८ हप्ताको अन्तरालमा नयाँ मिडियामा प्रसारण अर्थात सब-कल्चर गर्नु पर्दछ। लामो समयसम्म पुनः नयाँ मिडियामा प्रसारण नगर्दा पातहरु पहेलो र टुप्पो मर्ने लक्षणहरु देखा पर्दछ।

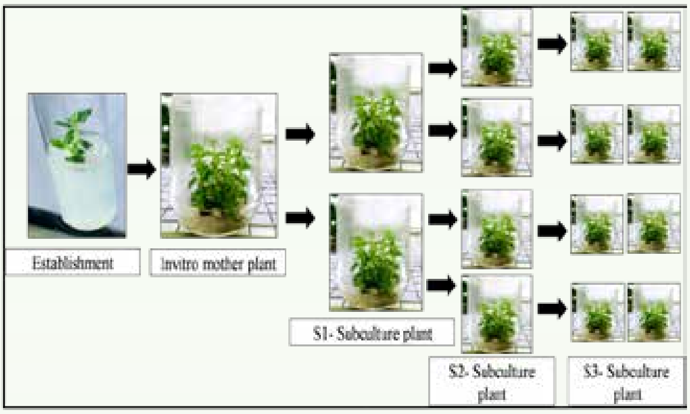
गुणन चरणमा कल्चर गर्दा ध्यान दिनुपर्ने अन्य कुराहरु

- प्रयोगशालामा काम गर्ने व्यक्तिले काम शुरु गर्नु अघि साबुन पानीले हात धोएर, मेडिकल पन्जा, मास्क, हेयर कभर र एप्रोन लगाएर काम गर्नुपर्दछ।
- सब-कल्चर गर्नु अगाडि र LAF मा सब-कल्चर गर्दा ध्यान दिनुपर्ने सम्पूर्ण कुराहरु माथि कल्चर स्थापना गर्दा भने जसरी गर्नुपर्दछ।
- मुनाहरुको आकार लगभग १-३ से.मी. वा २-३ आँख्ला विकास भएपछि मुनाहरु तथा बिरुवाको प्रकृति अनुसार नोड/हाँगा/मेरिस्टेम/पातलाई छुट्टाएर प्रोटोकल अनुसार नयाँ मिडियामा कल्चर तथा सब-कल्चर गर्नुपर्दछ।
- सब-कल्चर संस्थाको आवश्यकता तथा बिरुवाको प्रकृति अनुसार ५ देखि १० चक्रसम्म गर्नु राम्रो मानिन्छ। एउटै बिरुवालाई धेरै पटक सब-कल्चर गर्दा Somaclonal Variation अर्थात clones

बिरुवाहरुमा आनुवंशिक उत्परिवर्तन (Genetic mutations) भई भिन्न देखा पर्न सक्दछन् ।

- बिरुवा प्रसारण एवम् सब-कल्चर गर्नको लागि तरल वा अर्ध-ठोस मिडिया प्रयोग गर्न सकिन्छ ।
- प्रसारण चरणमा पनि सब-कल्चर गरिसकेपछि थप वृद्धि र विकासको लागि बिरुवा हुर्काउने कोठामा १६ घण्टाको फोटोपिरियड, (२०००-५०००) लक्स प्रकाशको तीव्रता र (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमानमा राख्नुपर्दछ ।
- सफल सब-कल्चरको थप सुनिश्चित गर्न नियमित अनुगमन तथा हेरचाह गर्नुपर्दछ ।

(क)



(ख)

चित्र न. २४ : गुणन चरणको सामान्य प्रक्रिया (क) इन भिट्रो स्थापना भएको पाउलोनिया बिरुवाबाट प्रसारण गरिँदै र (ख) इन भिट्रो स्थापना भएको पाउलोनिया बिरुवाबाट विभिन्न चरणको सब-कल्चर गरिएको

८.१.३. जरा विकास गरिने चरण (Rooting Phase):

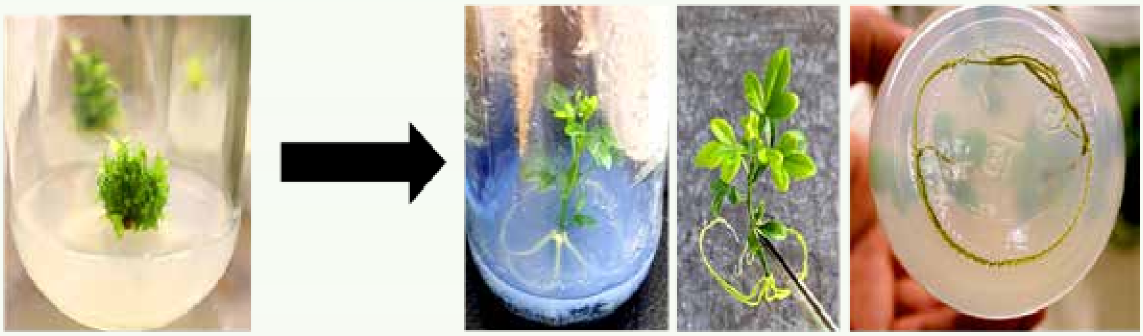
यस चरणमा जराको विकास वृद्धिलाई प्रेरित गर्ने नयाँ रुटिंङ मिडिया तैयार गरी माथि प्रसारण चरणमा प्रसार गरिएका नयाँ बिरुवाहरुको जरा विकास गराइन्छ । यस प्रक्रियालाई रुटिंग (Rooting) पनि भनिन्छ । हार्डनिङ्ग प्रक्रियालाई प्रभावकारी बनाउनको लागि इन भिट्रो बिरुवामा जरा विकास गराईन्छ । अक्जीनले जराको विकास वृद्धिलाई प्रेरित गर्नाले यसको प्रयोग यस चरणमा प्रयोग गरिन्छ । साईटोकाईनिनको भने कम मात्रामा प्रयोग गरिन्छ वा आवश्यकतानुसार प्रयोग नगर्न पनि सकिन्छ । कतिपय अवस्थामा मिडियामा तन्तु बिरुवाको जरा विकासका लागि केही दिनसम्म कल्चर गरिएका बिरुवाहरुलाई अध्यारो कोठामा पनि राख्ने गरिन्छ ।

जरा विकास गरिने चरणमा कल्चर गर्दा ध्यान दिनुपर्ने अन्य कुराहरु

- प्रयोगशालामा काम गर्ने व्यक्तिले काम शुरु गर्नु अघि साबुन पानीले हात धोएर, मेडिकल पन्जा, मास्क, हेयर कभर र एप्रोन लगाएर काम गर्नुपर्दछ ।
- सब-कल्चर गरिएको बिरुवाबाट ३-५ से.मी. लम्बाइ भएका मुनाहरुलाई छुट्टाएर प्रोटोकल अनुसार रुटिंग मिडियामा कल्चर गर्नुपर्दछ ।
- कल्चर गरिसकेपछि जराको विकास र वृद्धिको लागि बिरुवा हुर्काउने कोठामा १६ घण्टाको प्रकाश

अवधि, २०००-५००० लक्स प्रकाशको तीव्रता र (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमानमा राख्नुपर्दछ।

- रुटिंग मिडियामा कल्चर गरेको ४-८ हप्तामा जरा विकास हुन्छ।
- जराको राम्रो विकास गर्न मिडियामा मुख्य र सुक्ष्म पोषक तत्व र सुक्रोजको मात्रा घटाएर प्रयोग गर्न सकिन्छ।
- बिरुवाको प्रकृति अनुसार रुटिंग मिडियामा कल्चर गरिसकेपछि एक हप्ता अध्यारोमा राख्नाले राम्रो जराको विकास हुने अनुसन्धानले देखाएका छन्।
- सफल रुटिंगको थप सुनिश्चित गर्न नियमित अनुगमन तथा हेरचाह गर्नुपर्दछ।



(क) (ख)

चित्र २५: जरा विकास चरणमा (क) तीन पाते सुन्तला बिरुवाहरुलाई रुटिङ मिडियामा कल्चर गरी (ख) जरा विकास गरिएको

८.१.४. हार्डनिङ्ग वा अनुकूलन चरण (Hardening or Acclimatization Phase):

यस हार्डनिङ्ग चरणमा पूर्ण रुपमा जराहरु विकास भएका इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई बाहिरको प्राकृतिक वातावरणमा सफलतापूर्वक अनुकूलित गराउने प्रक्रिया हो। इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई नियन्त्रित वातावरण तथा उच्च आद्रतामा वृद्धि र विकास गराइएको हुन्छ, जसले गर्दा तिनीहरुको डाँठहरु र पातहरुमा प्यालिसेड कोषिकाहरु बीच ठूलो खाली ठाँउ हुने, एपिक्युटिक्युलर मोम (epicuticular wax) नहुने वा असामान्य हुने र थोरै स्टोमाटाहरु (stomata) भएको पातहरु विकास भएका हुन्छन्। त्यस्तै कम प्रकाश, कम CO_2 ग्यास र उच्च कार्बन स्रोत भएको तन्तु मिडियामा वृद्धि र विकास गराइएको हुँदा इन भिट्रो बिरुवाहरुमा कम प्रकाश संश्लेषण दर र पात सानो वा विकास नहुने हुन्छन्। जब नियन्त्रित वातावरणमा हुर्काइएको इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई सोभै बाहिरी वातावरणमा रोप्दा उच्च वाष्पीकरण, तापक्रम, तीव्र प्रकाश आदिले गर्दा बिरुवा ओइलाउने र मर्ने हुन्छ। बाहिरी वातावरणमा ढुसिजन्य संक्रमणको पनि जोखिम हुन्छ। त्यसैले इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई प्राकृतिक वातावरणमा रोप्नु पूर्व हार्डनिङ्ग गर्नु एकदम महत्वपूर्ण हुन्छ। बाली तथा बिरुवाहरुको प्रकृति अनुसार विभिन्न चरणमा हार्डनिङ्ग गर्नुपर्दछ। सामान्यतया इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई प्राइमरी हार्डनिङ्ग र सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गरी दुई चरणमा हार्डनिङ्ग गरिन्छ।

८.१.४.१. प्राइमरी हार्डनिङ्ग (Primary Hardening)

ग्रोथ रुममा जराहरुको पूर्ण रुपमा विकास भएका इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई प्राईमरी हार्डनिङ्ग सेक्सन जस्तै;

सिसा घर वा स्क्रिन घरमा लगि उचित पटिङ मिश्रणमा स्थानान्तरण गरिन्छ। प्राइमरी हार्डिनिङ्ग गर्न ग्रोथ रुममा भए जस्तै वातावरण भएको एउटा अलगै कोठामा पनि गर्न सकिन्छ। प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा तापक्रम, प्रकाश र आद्रतालाई नियन्त्रण गर्न सकिने उपकरणहरु जडान गरिएको हुनु पर्दछ। उच्च आद्रता ९० देखि १०० प्रतिशत लगभग १०-१५ दिनसम्म कायम राख्नुपर्दछ। त्यसपछि बिस्तारै घटाउँदै लैजानु पर्दछ। प्राइमरी हार्डनिङ्ग गर्दा पटिङ मिश्रणको उचित तरिकाले कीटाणु निर्मलिकरण गरी प्रयोग गर्नुपर्दछ। पटिङ मिश्रणको रुपमा बालुवा, कोकोपिट, पीट मस, भर्मिक्युलाइट, perlite आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ। इन भिट्रो बिरुवाहरु अति नै संवेदनशील हुने भएकोले प्राइमरी हार्डिनिङ्ग गर्दा विशेष ध्यान दिनुपर्दछ।

प्राइमरी हार्डनिङ्ग गर्दा ध्यान दिनुपर्ने कुराहरु

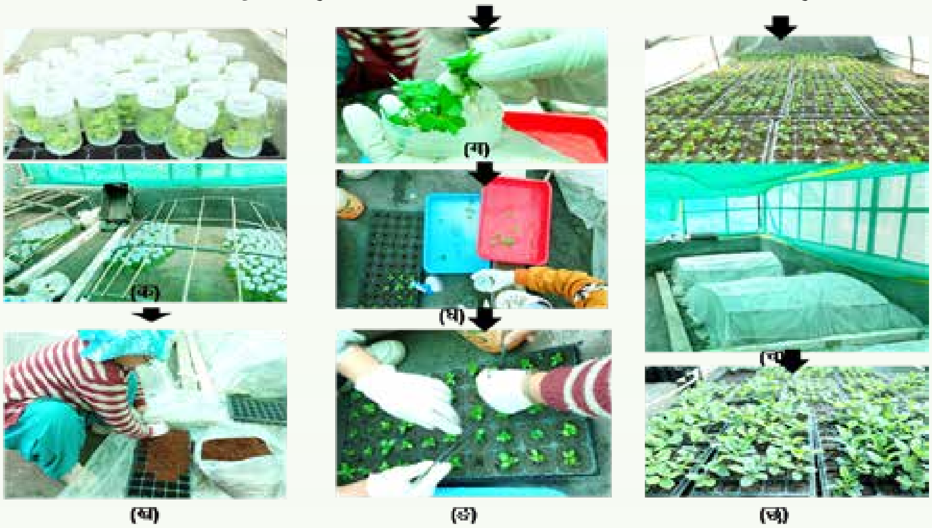
- काम गर्ने व्यक्तिहरुले बिरुवा रोप्नु अघि साबुन पानीले हात राम्ररी सफा गर्ने तथा हातमा मेडिकल पन्जा तथा एप्रोन लगाएर मात्र काम गर्नुपर्दछ।
- यस प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा कुनै पनि खाने कुरा खानु हुदैन।
- उचित पटिङ मिश्रणको चयन गर्नुपर्छ।
- प्रकाश, आद्रता र तापमानलाई नियन्त्रण गर्न सकिने व्यवस्था गर्नुपर्छ।
- पटिङ मिश्रणको राम्रोसँग निर्मलिकरण गर्नुपर्छ।
- कीटाणु रहित वा UV फिल्टर गरिएको पानी प्रयोग गर्नुपर्छ।
- उचित मात्रामा ढुसीनासक प्रयोग गरेर रोग व्यस्थापन गर्नुपर्छ।
- नियमित अनुगमन र हेरचाह गर्नुपर्छ।

प्राइमरी हार्डनिङ्ग गर्ने सामान्य तरिका

- अटोक्लेभ गरिएको बालुवा तथा अन्य पटिङ मिश्रणसँग जस्तैः पिट मश, भर्मिक्युलाइट, कोको पिट आदि तयार गर्ने।
- जराको राम्रो विकास भएको इन भिट्रो बिरुवारुलाई रोप्नु भन्दा कम्तिमा एक हप्ता अगाडि प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा लैजाने।
- लगभग एक हप्ता पछि ५-६ दिनसम्म बोतलको बिर्को खकुलो पारेर राख्ने।
- त्यसपछि, बिरुवाको प्रकृति अनुसार वा प्रोटोकल अनुसार polypot वा poly tray मा कीटाणु निर्मलिकरण गरिएको उचित पटिङ मिश्रणमा रोप्ने। प्राइमरी हार्डिनिङ्ग गर्दा पटिङ मिश्रणको रुपमा कोको पिट, बालुवा, भर्मिक्युलाइट र कम्पोस्ट मलको १:२:१:१ अनुपातमा वा एकमात्रै सब्सट्रेट बालुवा वा कोको पिटमा वा बिरुवाको प्रकृति अनुसार प्रयोग गर्न सकिन्छ। बिरुवा रोप्नु अगाडि बोतलबाट निकाली जरामा भएको मिडिया राम्रोसँग पानीमा सफा गर्ने र २-३ मिनेट १-२% ढुसीनाशकले उपचार गर्ने।
- उचित आद्रता कायम राख्न polypot वा poly tray मा रोपिएको बिरुवाहरुलाई पारदर्शी पोलिथिनले छोप्ने र तापक्रम र आद्रतालाई नियन्त्रण गर्न आवश्यकता अनुसार कुलर, ह्युमिडिफायर उपकरण,

मिस्टिङ्ग प्रणाली प्रयोग गर्ने ।

- बिरुवाको प्रकृति अनुसार, लगभग १०-१५ दिनसम्म (९०-१००)% आद्रता कायम राख्नुपर्दछ। त्यसपछि, आद्रता बिस्तारै कम गर्दै लैजानु पर्दछ र २०-२१ दिन पछि पोलिथिनलाई पूर्ण रुपमा हटाईदिनु पर्दछ ।
- तापमान २२ देखि ३० डिग्री सेल्सियस बीचमा राख्नुपर्दछ ।
- प्रकाश कम गर्न छायाँ नेट (shade net) को प्रयोग गर्ने ।
- आवश्यकता अनुसार तीन हप्ता पछि झोल मल दिन सकिन्छ ।
- थप Mycorrhizal fungi उपचार मार्फत बिरुवाहरुको राम्रो जरा विकास गरी प्राईमरी हार्डनिङ्गमा सहयोग पुर्‍याउदछ। विभिन्न प्रयोग तथा अध्ययन अनुसार Mycorrhizal fungi उपचार गरिएको बिरुवाहरुमा स्टोमेटल प्रवाहकत्वको (Stomatal conductance) राम्रो नियन्त्रण हुने, पोषक तत्व सम्प्रेषण क्षमता बढाउने र बिरुवाको वृद्धि राम्रो गर्ने देखिएको छ। यस बाहेक अन्य लाभदायक सूक्ष्म जीवहरु जस्तैः ट्राइकोडरमा (*Trichoderma*) वा बेसिलसको (*Bacillus* spp.) उपचार गरी बिरुवाको राम्रो वृद्धि र विकास गर्न सकिन्छ ।
- बाली तथा बिरुवाको प्रकृति अनुसार १ देखि २ महिना भित्र प्राईमरी हार्डनिङ्ग पुरा गर्न सकिन्छ ।



चित्र २६ः प्राइमरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा प्रइमरी हार्डनिङ्ग गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) पूर्ण रुपमा विकास भएका इन भिट्रो स्याउका बिरुवाहरुलाई सिसा घरमा अनुकूलनको लागि राखिएको, (ख) polypot मा कीटाणु निर्मलिकरण गरिएको उचित पटिङ मिश्रण तयार गरिन्दै, (ग) र (घ) इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई झिकी ढुसीनाशकले उपचार गरिँदै, (ङ) इन भिट्रो बिरुवाहरु रोपिँदै, (च) रोपेको बिरुवाहरुलाई पोलिथिनले छोपेको र (छ) प्राइमरी हार्डनिङ्मा सफल भएका बिरुवाहरु

८.१.४.२. सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग (Secondary Hardening)

प्राइमरी हार्डनिङ्गमा सफल भएका बिरुवाहरुलाई थप वृद्धि र विकास गराई प्राकृतिक वातावरणमा अनुकूलन गराउन सेकेन्डरी हार्डिनङ्ग गरिन्छ । बिरुवाको प्रकृति अनुसार सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्न स्क्रिन हाउस वा सिसा

घर वा नेट हाउसको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस चरणमा प्राईमरी हार्डनिङ्ग भन्दा अलि प्रतिकुल वातावरणमा बिरुवाहरुलाई वृद्धि र विकास गराईन्छ। सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्न पटिङ मिश्रणको रुपमा बाली तथा बिरुवाको प्रकृति अनुसार बालुवा, माटो, पीट मस, भर्मिक्युलाइट, perlite, कम्पोस्ट मल आदिको उचित अनुपात एवम् बालुवा, माटो र कम्पोस्ट मलको १:२:१ मा पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ। आद्रतालाई थप घटाउदै प्राकृतिक परिवेश सरह सन्तुलन कायम राख्नु पर्दछ। प्रकाशको मात्रा बढाउनलाई shade net हटाउनु पर्दछ। सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्न पनि बाली तथा बिरुवाको प्रकृति अनुसार १ देखि २ महिना लाग्न सक्छ।

सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्दा ध्यान दिनुपर्ने कुराहरु

- उचित पटिङ मिश्रणको (Potting mixture) वा सब्सट्रेको छनौट गर्ने।
- प्रकाशको मात्रा बढाउने तर आद्रता क्रमशः घटाउँदै जाने।
- कीटाणु रहित वा UV फिल्टर गरिएको पानीको प्रयोग गर्ने।
- ढुसीनाशकको उचित मात्रा प्रयोग गरेर रोग व्यवस्थापन गर्ने।
- नियमित अनुगमन तथा हेरचाह गर्नुपर्ने।
- आवश्यकता अनुसार मल प्रयोग गर्ने।

चित्र २७: सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग सेक्सनमा सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) प्राइमरी हार्डनिङ्गमा सफल भएका स्याउका बिरुवाहरु र (ख) तिनीहरुलाई बालुवा, माटो र कम्पोस्ट मलको मिश्रण भएको ***poly bag*** *मा स्थानान्तरण गरी सफल भएका बिरुवाहरु*

तन्तु प्रजनन्का प्रकारहरू र गुणस्तर मापन

बिरुवा तन्तु नमूनाको प्रयोग र छनौटका आधारमा केही महत्वपूर्ण तन्तु प्रजनन्का प्रकारहरु बारे तल बिस्तृत रुपमा वर्णन गरिएको छ।

९.१. बीउ कल्चर

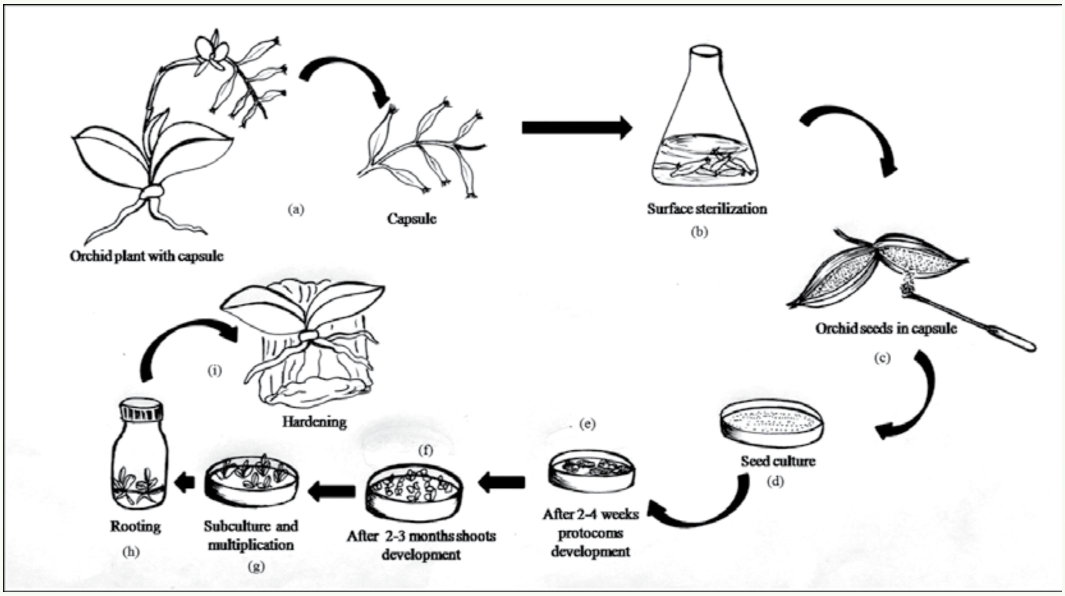
प्राकृतिक अवस्थामा बीउमा भएको भ्रूणले अनुकूल वातावरण पाएमा अंकुरण भइ बिरुवामा विकास हुन्छ। तर कतिपय बालीहरुको उमार शक्ति अत्यन्तै कम हुने तथा शुसुप्ता अवस्थामा जाने जसले गर्दा बीउको अंकुरण नहुने समस्या हुन्छ। त्यस्तै प्राकृतिक अवस्थामा कुनै कुनै बालीहरुको परागसेचन नहुने वा परागसेचन अत्यन्तै न्यून हुने र फल नै नलाग्ने पनि हुन्छ। यस्तो अवस्थामा बीउको कल्चर अत्यन्तै महत्वपूर्ण हुन्छ। यस कल्चरमा बीउलाई तन्तु नमूना श्रोतको रुपमा प्रयोग गरिन्छ। तन्तु प्रजनन् प्रविधि मार्फत बीउ कल्चर मुख्य गरी सुनगाभाहरु (Orchids) तथा अन्य फूलका बिरुवा/फलफूल/जडिबुटी/बन पैदावार/फलफूल आदिमा प्रयोग गर्न सकिन्छ। सुनगाभाको बीउलाई अंकुरण हुनको लागि विशेष प्रकारको ढुसीसँग सहजीवी (Symbiotic) सम्बन्ध हुनुपर्छ अन्यथा अंकुरण हुन सम्भव हुदैन, तर कृत्रिम अवस्थामा सुनगाभा बीउलाई तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा अंकुरण गराउन बीउ कल्चर माध्यमबाट सम्भव हुन्छ। प्राकृतिक अवस्थामा सुनगाभा र ढुसीको सहजीवी सम्बन्ध अंकुरण अवस्था देखि नै रहेको हुन्छ। सामान्यतया जीवाणु रहित एक्सप्लान्टको विकास र सहज बीउको अंकुरण गर्न बीउ कल्चर गरिन्छ।

९.१.१. सुनगाभा बीउको कल्चर गर्ने तरिका

सुनगाभाको सफलतापूर्वक बीउ कल्चर गर्नको लागि बीउको परिपक्कता (seed maturity), कल्चर मिडिया, बिरुवा वृद्धि नियामकहरु, कार्बोहाइड्रेटहरु र जैविक पोषक तत्वहरुमा भर पर्दछ। विभिन्न प्रजाति अनुसार सुनगाभा बीउ कल्चरको फरक फरक प्रोटोकल एवम् वातवरणीय अवस्था हुन सक्छ। सामान्यतया सुनगाभाको बीउ कल्चर गर्ने तरिका निम्न रुपमा वर्णन गरिएको छ।

- प्रोटोकल अनुसार सुनगाभालाई उत्तम हुने मिडिया (MS वा Vacin & Went वा Knudson C मिडिया वा अन्य) तयार गर्ने। मिडियामा अन्य जैविक पोषक तत्वहरु जस्तै; नरिवलको काँचो पानी वा banana homogenate थप गर्नाले बिरुवाको राम्रो विकास भएको विभिन्न प्रयोगहरुले देखाएका छन्।
- सुनगाभाको कोसा पाकेर फुट्नु भन्दा अगाडि आवश्यक मात्रामा संकलन गर्ने।
- त्यसपछि कोसालाई माथि ५.३. मा भनिए अनुसार सतहको कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने। एक्सप्लान्टबाट पानी सोस्नु अटोक्लेभ गरिएको फिल्टर पेपर वा बलटिङ पेपर प्रयोग गर्ने।
- तीन पटक कोसालाई बर्नरमा flame गरी सतहको कीटाणु निर्मलिकरणको कार्य पुरा गर्ने।

- कोसालाई स्टेरीलाईज गरेको पेट्री प्लेटमा राखी तेर्सो (longitudinally) गरेर बराबर दुई भाग हुने गरी काट्ने । यसरी काटेको कोसामा धेरै सानो बीउहरु हुन्छन् र तिनीहरुलाई फोर्सेप अथवा स्केलपेलको सहायताले माथि तयार गरिएको मिडियामा फैलाउने/रोप्ने ।
- त्यसपछि बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२४±२) डिग्री सेल्सियस तापमानमा (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारो कायम राख्ने ।
- कल्चर गरेको लगभग २ देखि ४ हप्तामा प्रोटोकमको विकास हुन्छ। २ देखि ३ महिनामा पात र डाँठ सहितको बिरुवाहरु विकास भएपछि यिनीहरुलाई रुटिङ्ग (जरा आउने) मिडियामा स्थानान्तरण गर्ने ।
- जराहरुको राम्रो विकास भएपछि सिसा घर वा जाली घरमा उचित सब्सट्रेट (कोइलाका टुक्राहरु, पाइन बार्क, कोकोपिट, परलाईट आदिको मिश्रणमा) माथि ८.१.४.१. मा भनिएको विधि अनुसार प्राइमरी हार्डनिङ्ग गर्ने ।
- प्राइमरी हार्डनिङ्ग सफल भएपछि माथि ८.१.४.२. भनिएको विधि अनुसार सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्ने ।
- त्यसपछि सुनगाभाको बिरुवाहरु बाहिरी प्राकृतिक वातावरणमा निकाल्न तयार गर्ने ।



चित्र २८: सुनगाभाको बीउ कल्चर गर्ने सामान्य प्रक्रिया (a) कोसा संकलन गर्ने, (b) सतहको कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने, (c) र (d) कोसाबाट सानो बीउहरुलाई स्केलपेलको सहायताले मिडियामा रोप्ने, (e) २ देखि ४ हप्तामा प्रोटोकम विकास भएको, (f) र (g) २ देखि ३ महिनामा पात र डाँठ सहितको बिरुवाहरु विकास भएको, (h) जरा विकास गरिएको र (j) हार्डनिङ्ग गरिएको

९.२. मेरिस्टेम कल्चर

मेरिस्टेम एक प्रकारको तन्तु हो जसमा कोष विभाजन गर्न योग्य अविभेदित (Undifferentiated) कोषिकाहरु हुन्छन् जसलाई मेरिस्टेमक कोषहरु भनिन्छन् । मेरिस्टेम मुनाको टुप्पो र जराको टुप्पोमा हुन्छ। त्यसैले मेरिस्टेम कल्चर एक प्रकारको तन्तु प्रजनन् प्रविधि हो जसमा असेप्टिक वातावरणमा आवश्यक बिरुवाको मुना तथा

जराको टुप्पोबाट मेरिस्टेमलाई विच्छेदन माइक्रोस्कोपको सहायताले छुट्याई उचित तरल वा अर्ध-ठोस मिडियामा कल्चर गरी वृद्धि र विकास गराईन्छ। यो प्रविधि बिरुवाहरुबाट भाइरस तथा अन्य जीवाणुहरु हटाउन विभिन्न विधिहरु मध्ये मेरिस्टेम कल्चर अत्यधिक महत्वपूर्ण र प्रभावकारी हुन्छ। बिरुवाको प्रकृति अनुसार मेरिस्टेमको श्रोतहरु फरक फरक हुन सक्छ जस्तै; तरकारी बाली आलुमा ट्यूवरबाट निस्केको टुसालाई राम्रो एक्सप्लान्टको रुपमा प्रयोग गरिन्छ भने सुन्तलाजात फलफूलमा एपिकल वा एक्जिलरी मेरिस्टेम, केरामा सकर मेरिस्टेम र अदुवा तथा अलैंचीमा राइजोमबाट पलाएको टुसा मेरिस्टेम स्रोतको रुपमा प्रयोग गरिन्छ। यस प्रविधिमा जति सानो मेरिस्टेमको आकार कल्चर गर्न सकियो त्यति नै भाइरस तथा अन्य जीवाणुहरु रहित बिरुवा विकास हुने सम्भावना बढी हुन्छ तर कल्चर असफल हुने पनि त्यत्तिकै बढी सम्भावना हुन्छ, त्यसै गरी जति ठुलो मेरिस्टेमको आकार कल्चर गर्न सकियो त्यति नै बढी कल्चर सफल हुने सम्भावना हुन्छ तर भाइरस र ब्याक्टेरियल जीवाणु रहित बिरुवा विकास हुने सम्भावना भने कम हुन्छ। त्यसैले मेरिस्टेम कल्चरमा विशेषगरी मुनाको टुप्पो भागको सानो मेरिस्टेम लगभग ०.१ mm को व्यास र ०.२५ देखि ०.३ mm लम्बाइ माइक्रोस्कोप, फोर्सेप र स्केलपेलको सहायताबाट झिकी तन्तु नमूना स्रोतको रुपमा लिने गरिन्छ।

निम्न कारणहरुले मेरिस्टेम कल्चरलाई भाइरस हटाउनको लागि उत्तम मानिन्छ

- मेरिस्टेम कोषको विभाजन दर भाइरस गुणन दर भन्दा छिट्टो हुन्छ।
- उच्च मेटाबोलिक गतिविधिले गर्दा भाइरसको प्रतिकृति (replication) हुँदैन।
- भाइरसहरु बिरुवाको भास्कुलर तन्तुबाट छिटो फैलिने गर्दछ तर मेरिस्टेममा भास्कुलर तन्तु हुँदैन।
- मेरिस्टेममा अक्जीनको उच्च मात्राले गर्दा भाइरसको वृद्धिलाई अवरोध गर्दछ।

९.२.१. मेरिस्टेम कल्चरबाट आलुको पूर्व मुल बीउ (Pre-Basis Seed) उत्पादन गर्ने प्रक्रिया

कृषि क्षेत्रमा मेरिस्टेम कल्चर प्रविधिद्वारा भाइरस मुक्त आलुको पूर्व मुल बीउ उत्पादन गरिन्छ। आलुको बोट एवम् टुसाको सानो तन्तु नमूनालाई मेरिस्टेम विधिबाट कल्चर गरी थप द्रुत दरले प्रसार गरी लाहिकीरा प्रतिरोधि जाली घर वा सिसा घरभित्र कीटाणु रहित बालुवा र माटोको मिश्रणमा उत्पादन गरिएका आलुका दानालाई पूर्व मुल बीउ भनिन्छ। आलुको बीउ वृद्धि कार्यक्रममा पूर्व मुल बीउको विशेष महत्व हुन्छ। पूर्व मुल बीउलाई ३ देखि ४ पुस्तासम्म वृद्धि गरी उक्त बीउ खायन आलुखेती उत्पादनका लागि प्रयोग गरिन्छ। पूर्व मुल बीउ उत्पादनको मुख्य उद्देश्य आलु बालीमा उत्पादन क्षमतामा ह्रास भएको, पुरानो बिग्रिएको एवम् अस्वस्थ बीउ प्रतिस्थापन गरी उत्पादकत्व बढाउनु हो।

नेपालमा सरकारी तवरबाट राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम (NPRP) र राष्ट्रिय आलु, तरकारी तथा मसाला बाली विकास केन्द्र मातहतमा रहेको आलुबाली विकास केन्द्र निगाले, सिन्धुपाल्चोकबाट पूर्व मुल बीउ उत्पादन भइरहेको छ। पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्ने प्रक्रिया विस्तृत रुपमा तल वर्णन गरिएको छ;

९.२.१.१. प्रारम्भिक चरण/स्थापना चरण

- पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्नका लागि सर्वप्रथम तन्तु नमूनाको लागि स्वास्थ्य आलुको ट्यूवरबाट

निस्केको टुसा आवश्यक पर्दछ।

- संकलन गरिएको आलुको टुसा नमूनालाई माथि ५.३. मा भनिएअनुसार सतह कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने।
- त्यसपछि LAF मा टुसा नमूनाको टुप्पो भागको सानो मेरिस्टेमलाई लगभग ०.१ mm को व्यास र ०.२५ देखि ०.३ mm लम्बाइ विच्छेदन माइक्रोस्कोप, फोर्सेप र स्केलपेलको सहायताबाट छुट्याई उचित तरल वा अर्ध-ठोस MS मिडियामा स्थापना गर्ने। तरल मिडियामा मेरिस्टेम कल्चर स्थापना गर्नको लागि कल्चर ट्यूबको प्रयोग गर्न सकिन्छ जसमा मेरिस्टेमलाई अड्याउन र पोषक तत्व प्रदान गर्न फिल्टर पेपर ब्रिज प्रविधि प्रयोग गरिन्छ भने अर्ध-ठोस मिडियामा मेरिस्टेम कल्चर स्थापना गर्नको लागि पेट्री डीस प्रयोग गरिन्छ।
- आलु बालीको लागि MS मिडियामा ०.२५ मी.ग्रा./ली. GA3, १०० मी.ग्रा./ली. इनोसिटोल र ०.२ मी.ग्रा./ली. Calcium D pantothenate प्रयोग गर्दा राम्रो परिणाम प्राप्त भएको पाईन्छ।
- त्यसपछि बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२४±२) डिग्री सेल्सियस तापमानमा (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारो कायम गर्नुपर्छ।
- लगभग ३-४ महिनामा मेरिस्टेमबाट ४-५ वटा आँख्ला भएको सुक्ष्म बिरुवा विकास हुन्छ। यस सुक्ष्म बिरुवाबाट टुप्पो सहित एकल आँख्ला अर्ध-ठोस MS मिडियामा कल्चर गरी बिरुवा हुर्काउने कोठामा माथिको अवस्थामा वृद्धि गराउनुपर्छ।

९.२.१.२. भाइरस रोग परीक्षण:

- मेरिस्टेमबाट विकास भएको सुक्ष्म बिरुवाको टुप्पो सहित एकल आँख्ला (single node) अर्ध-ठोस MS मिडियामा कल्चर गरेको ४-५ हप्तामा पूर्ण बिरुवाको विकास हुन्छ।
- त्यसपछि आलुमा लाग्ने मुख्य ६ वटा भाइरसहरु (PLRV, PVS, PVX, PVY, PVA र PVM) को सेरोलोजिकल (ELISA) वा मालिकुलर (PCR) विधिबाट परीक्षण गर्नुपर्छ। यदि एकल आँख्ला कल्चरबाट पूर्ण विकास भएको बिरुवाको भाइरस परीक्षण गर्दा नेगेटिभ भयो भने उक्त इन भिट्रो माउ बोटलाई प्रमाणीकरण गरी त्यसबाट आवश्यक संख्यामा बिरुवाहरु बनाईन्छ। तर पोजिटिभ आए पश्चात उक्त एकल आँख्ला कल्चरबाट पूर्ण विकास भएको बिरुवालाई नष्ट गर्नुपर्दछ अथवा अन्य थर्मो, किमो जस्ता अन्य विधिहरु प्रयोग गरी पुनः भाइरस हटाउन मेरिस्टेम कल्चर दोहोराउनु पर्दछ। यसरी कल्चर गरिएको बिरुवाहरुलाई पुनः भाइरसको परीक्षण गरी उत्पादन गर्नुपर्छ।
- पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्ने प्रक्रियामा दुई पटक भाइरस परीक्षण गर्नुपर्छ। पहिलो पटक इन भिट्रो माउ बिरुवा स्थापना हुँदा र दोस्रो पटक भने जाली घरमा वा सिसा घर भित्र लगाइएको बिरुवाहरुमा भाइरस मुक्त भएको पुष्टि गर्न परीक्षण गर्नुपर्दछ।

९.२.१.३. गुणन चरण:

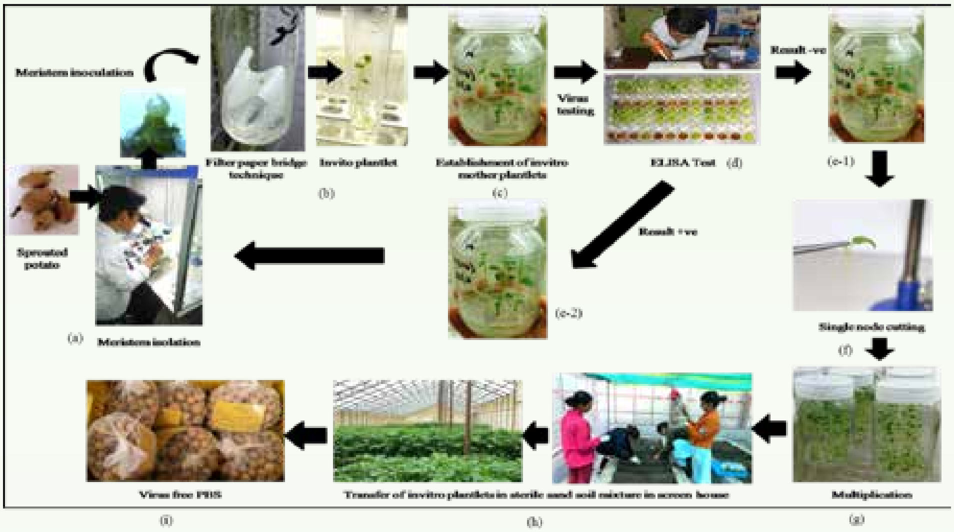
- यस चरणमा भाइरस परीक्षण गरी प्रमाणित गरिएका इन भिट्रो माउ बिरुवाहरुबाट थप द्रुत गतिमा संस्थाको

आवश्यक संख्यामा बिरुवाहरु प्रसार गरिन्छ। प्रमाणित गरिएको एउटा इन भिट्रो माउ बिरुवाबाट लगभग (५-१०) पुस्तासम्म सब-कल्चर गर्दा राम्रो मानिन्छ तथा मापदण्ड तोकिएअनुसार गर्नुपर्दछ।

- भाइरस मुक्त इन भिट्रो माउ बिरुवालाई MS मिडियामा एकल आँख्ला कल्चर गर्ने। MS मिडियामा ०.२५ मी.ग्रा./ली. GA3, १०० मी. ग्रा./ली. इनोसिटोल र ०.२ मी.ग्रा./ली. Calcium D pantothenate प्रयोग गर्नाले आलु बालीमा राम्रो परिणाम देखाएको पाईन्छ।
- प्रायः आलु बालीमा साईटोकाईनिन र अक्जीनको प्रयोग बिनानै शुटिङ्ग र रुटिङ्गको एकैसाथ विकास हुँदा रुटिङ्ग मिडियामा कल्चर गर्नुपर्दैन।
- त्यसपछि बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२४±२) डिग्री सेल्सियस तापमानमा (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारोमा राख्ने।
- कल्चर गरेको लगभग ३ देखि ५ हप्तासम्म बिरुवाहरु रोप्नको लागि तयार हुन्छन्।

९.२.१.४. अनुकूलन र पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्ने:

- एकल आँख्ला कल्चर गरेको ३ देखि ५ हप्ता भएका बिरुवाहरुलाई जाली घर वा सिसा घर भित्र लगेर कम्तीमा हप्ता दिनसम्म राख्ने र रोप्नु भन्दा ५-७ दिन अगाडि कल्चर गरेको बोतलको बिर्को हल्का खोलेर राख्नुपर्दछ।
- बिरुवा रोप्नु अगाडि बोतलबाट निकाली जरामा भएको मिडिया राम्रोसँग पानीमा सफा गर्ने र २-३ मिनेट ढुसीनाशक जस्तै; १ देखि २ प्रतिशत वेभिस्टेनले उपचार गर्ने।
- त्यसपछि बिरुवाहरुलाई बालुवा र माटोको २:१ मिश्रण भएको बेडमा सानो सानो ड्याङ्ग बनाइ एक बिरुवादेखि अर्को बिरुवाको दुरी २०X२० से.मी. र एक बिरुवादेखि अर्को बिरुवाको दुरी एउटा लहरमा १०X१० से.मी. कायम गरी रोप्नु पर्दछ। सापेक्ष आद्रता कायम राख्न मिस्ट, फगिङ वा पोलि टेन्ट भित्र स्थानान्तरण गर्न सकिन्छ।
- रोपण कार्य गर्नु १५-२० दिन अघिनै बालुवा र माटोको मिश्रणलाई ५ देखि १० प्रतिशत फर्मलडिहाइड वा अन्य निस्संक्रामक तरल रसायनहरुले उपचार गर्नुपर्दछ।
- सिंचाईको लागि UV प्रशोधित पानीको प्रयोग गर्नु पर्दछ। रसायनिक मलको रुपमा नाइट्रोजन, फोस्फोरस र पोटासको २००:२००:१२० केजी प्रति हेक्टर वा मापदण्ड तोकिए वा आवश्यकता अनुसार प्रयोग गर्नु पर्दछ। आलुका बिरुवाहरुलाई क्याल्सियम, म्यागनेसियम, सल्फर र बोरोन जस्ता सूक्ष्मपोषक तत्वहरुको पनि थप आवश्यकता पर्दछ।
- हाल्मपुलिङ्ग (Haulm pulling) गर्नु भन्दा दुई-तीन दिन अघि सिंचाई बन्द गर्नुपर्दछ।
- आलुको जात अनुसार बेडमा लगाएको ३-४ महिना पछि पूर्व मूल बीउ तयार हुन्छ।



*चित्र २९: पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्ने प्रक्रिया (**a**) आलुको ट्युवरबाट मेरिस्टेम झिकेको, (**b**) मेरिस्टेमलाई पेपर फिल्टर ब्रिजमा अड्याउने र मेरिस्टेमबाट बिरुवा विकास भएको, (**c**) आँख्ला कल्चर गरी माउबोट विकास गरेको, (**d**) भाइरस टेस्ट गरेको, (**e**–१) भाइरस परीक्षण गर्दा नेगेटिभ बिरुवाबाट (**f**) आँख्ला कल्चर गरी (**g**) बिरुवा प्रसारण गर्ने, (**e**–२) भाइरस परीक्षण गर्दा पोजेटिभ बिरुवाहरुलाई पुनः शुरुबाट दोहोर्‍याने, (**h**) बिरुवाहरुलाई झाली घरमा रोप्ने र (**i**) आलुको पूर्व मुल बीउ दाना*

९.३. आँख्ला कल्चर

आँख्ला कल्चर एक प्रकारको तन्तु प्रजनन् प्रविधि हो जसमा बिरुवाको एकल वा दुईवटासम्म आँख्ला काटेर मिडियामा कल्चर गरिन्छ। प्रत्येक आँख्लामा सक्रिय वा सुप्तता अवस्थामा रहेको एक्सिलरी शूट बड हुन्छ जुन चाहिँ मिडियामा कल्चर गरी बिरुवामा विकास हुन्छ। इन भिट्रो बिरुवा स्थापना एवम् सब-कल्चर गर्न विभिन्न फलफूल, आलु बाली तथा रुखजन्य बिरुवाहरु जस्तै; स्याउ, सुन्तला जातका फलफूलमा, टीक, पाउलोनिया, बांस आदिहरुमा आँख्ला कल्चरको प्रयोग गरिन्छ।

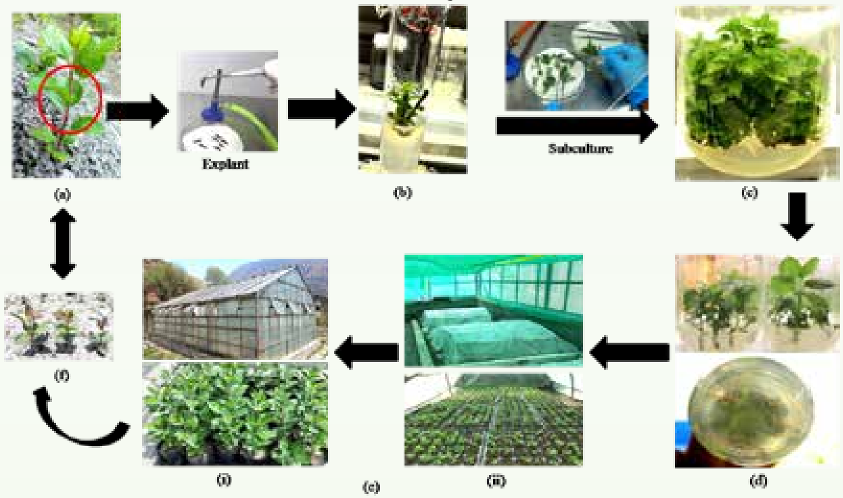
९.३.१. स्याउको आँख्लाबाट इन भिट्रो बिरुवा स्थापना गरी बिरुवा उत्पादन गर्ने तरिका

आँख्ला कल्चरबाट स्याउको रुटस्टक तथा सायनहरुको इन भिट्रो बिरुवा स्थापना गरी बिरुवाहरु उत्पादन गर्नको लागि प्रयोग गरिन्छ। स्याउको विभिन्न रुटस्टकहरु जस्तै; M9, M7, MM106, MM111, G16 आदिको इन भिट्रो बिरुवाहरु स्थापना गर्न आँख्ला कल्चर गरिन्छ। स्याउको आँख्ला कल्चरबाट इन भिट्रो बिरुवा स्थापना गरी उत्पादन गर्ने प्रकृया विस्तृत रुपमा तल वर्णन गरिएको छ;

- नयाँ पालुवा फेरेको कलिलो मुना सहितको हाँगाहरु संकलन गर्न। एक्सप्लान्ट संकलन गर्दा माथि ५.२. मा भनिए अनुसार विविध कुराहरुमा ध्यान दिनुपर्दछ।
- सिकेचरले हाँगाको पातहरुलाई हटाएर २-३ वटा आँख्ला सहितको टुक्रा छुट्याउने।
- एक्सप्लान्टको सतहलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्न माथि ५.३. मा भनिए अनुसार गर्ने।
- त्यसपछि LAF मा फोर्सेप र स्केलपेलको सहायताबाट डाँट सहित एक वा दुई वटासम्म आँख्ला

छुट्याएर उचित अर्ध-ठोस MS मिडिया वा WPM मिडियामा कल्चर गर्ने। आँख्ला छुट्याउँदा सतह कीटाणु निर्मलिकरण गर्दा एक्पोज (expose) भएको दुई तिरको डाँटको सानो भागलाई स्केलपेलले काटेर फ्याक्ने। एक्सप्लान्टबाट पानी सोस्न अटोक्लेभ गरिएको फिल्टर पेपर वा बलटिङ पेपर प्रयोग गर्ने। आवश्यकता अनुसार MS मिडिया वा WPM मिडियामा उचित साईटोकाईनिन र अक्जीनको मात्रा प्रयोग गर्नु पर्दछ। स्याउको इन भिट्रो स्थापनाको लागि MS मिडियामा १-२ मी.ग्रा./ली. BAP, ०.२५ मी.ग्रा./ली. GA3, १०० मी.ग्रा./ली. इनोसिटोल प्रयोग गर्नाले राम्रो परिणाम देखाएको पाइन्छ।

- बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमान, (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारोमा लगी राख्ने।
- ३-४ हप्तामा उक्त कल्चर अर्को आँख्लाबाट मुनाहरु पलाउँछन् र तिनीहरुलाई नयाँ मिडियामा (५ देखि १०) पुस्तासम्म सब-कल्चर गर्नुपर्दछ। ५-६ हप्तामा प्रत्येक सब-कल्चर गर्नको लागि बिरुवाहरु तयार हुन्छन्।
- संस्थाको आवश्यक संख्यामा बिरुवाहरु तयार भएपछि जरा विकास गराउन रुटिङ्ग मिडियामा कल्चर गर्नुपर्दछ। बिरुवा हुर्काउने कोठामा माथि भनिएको अवस्थामा ४ दखि ५ हप्तामा जरा सहितको पूर्ण बिरुवा विकास हुन्छ।
- त्यसपछि प्राइमरी र सेकेन्डरी हार्डिनङ्ग माथि ८.१.४.१. र ८.१.४.२. मा भनिए अनुसार गर्नुपर्दछ। प्राइमरी हार्डिनङ्गमा सफल भएका बिरुवाहरुलाई सेकेन्डरी हार्डिनङ्ग गर्ने। बालुवा, कोकोपिट र कम्पोस्ट मल १:१:१ अनुपातको मिश्रणमा प्राइमरी हार्डिनङ्ग गर्दा राम्रो परिणाम देखाएको छ भने सेकेन्डरी हार्डिनङ्ग गर्दा बालुवा, माटो र कम्पोस्ट मल १:२:१ अनुपातको मिश्रणमा राम्रो परिणाम देखाएको छ। (श्रोतः शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ्ग)



चित्र ३०: स्याउको आँख्ला कल्चरबाट बिरुवा उत्पादन गर्ने सामान्य प्रक्रिया (a) स्वास्थ्य माउबोटबाट एक्सप्लान्ट संकलन गरी प्रत्येक आँख्लालाई कल्चर गर्ने, (b) आँख्ला कल्चरबाट इन भिट्रो बिरुवा स्थापना भएको, (c) सब-कल्चर गरी बिरुवा संख्या बढाउने, (d) जरा विकास गराउने, (e) हार्डनिङ्ग गर्ने (i) प्राइमरी हार्डनिङ्ग (ii) सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग र (f) फिल्डमा स्थानान्तरण गरिएको

९.४. क्यालस कल्चर:

घाउ, कीराहरुको आक्रमण र कलमी गर्दा प्रतिक्रिया अनुरुप बिरुवाहरुमा प्राकृतिक रुपमा क्यालस बन्दछ जुन असंगठित (unorganized), अविभाजित (undifferentiated) र dedifferentiated कोषिकाहरुको राश (Mass) हो । यस प्रविधिमा एक्सप्लान्टलाई उच्च अक्जीन कन्सन्ट्रेसन वा अक्जीन र साईटोकाईनिन दुवैको समान कन्सन्ट्रेसन संयोजन समावेश भएको मिडियामा कल्चर गरी उक्त एक्सप्लान्टलाई क्यालसमा परिणत गराईन्छ । क्यालसलाई regeneration (पुनर्जीवन) वा non–regeneration को लागि प्रयोग गरिन्छ । Regeneration मा क्यालस मार्फत अर्गानोजेनेसिस र सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति माध्यमबाट पूर्ण बिरुवाहरुको विकास गराइन्छ भने non–regeneration मा क्यालसले बिरुवाहरु उत्पादन गर्दैन जसलाई सेल सस्पेन्सन र मेटाबोलाइट उत्पादनको लागि प्रयोग गरिन्छ । क्यालस कल्चर गर्न एक्सप्लान्टको रुपमा विभिन्न स्रोतहरु जस्तै; काण्ड, जरा, पात, कोटिलेडन, हाइपोकोटाइल, भ्रूण आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ । क्यालस कल्चर विशेषगरी बिरुवाहरुको आनुवंशिक रुपान्तरण गर्न र अन्य जैविक रसायनहरुको अध्ययन गर्न यो कल्चरलाई महत्वपूर्ण मानिन्छ ।

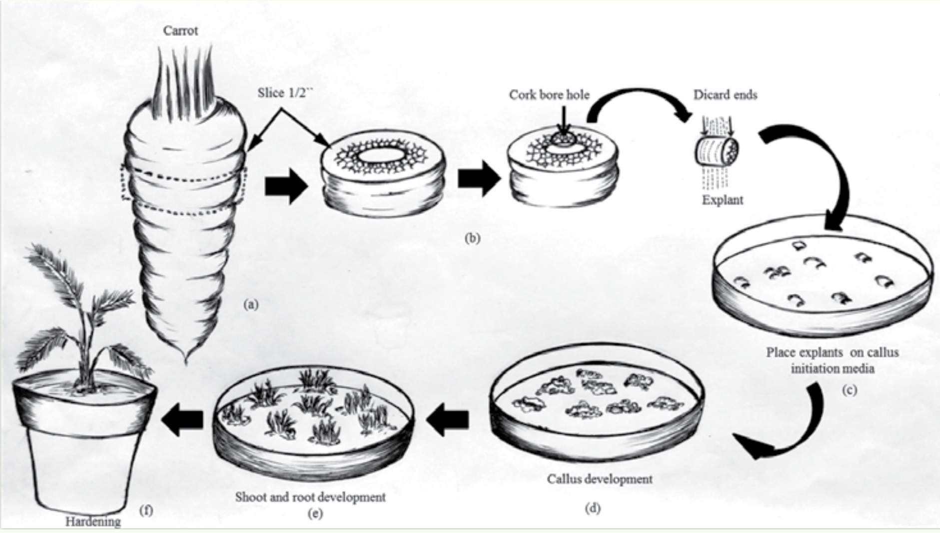
९.४.१. गाजरको क्यालस कल्चरबाट इन भिट्रो बिरुवा उत्पादन गर्ने तरिका

९.४.१.१. *गाजरबाट क्यालस उत्पादन गर्ने तरिका*

- गाजरको एक्सप्लान्टबाट क्यालस कल्चर गर्न विशेष किसिमको मिडिया (क्यालस इनिसिएसन मिडिया) अनुसूची १ को तालिका ११ मा भनिएअनुसार तयार गर्ने । क्यालस कल्चर गर्दा मिडियालाई पेट्री प्लेटमा कल्चरको लागि तयार गर्ने ।
- एक्सप्लान्टको रुपमा गाजरको फेद भाग संकलन गरी सफा पानीले पखल्ने र पेपर तौलियामा राखेर लगभग १/२ इन्च बाक्लो क्रसवाइज स्लाइसहरुमा काट्ने तल चित्र ३१ मा दिएअनुसार । त्यसपछि माथि ५.३. मा भनिएअनुसार गाजरको सतहलाई राम्ररी कीटाणु निर्मलिकरण गर्ने ।
- LAF मा एक्सप्लान्टबाट कीटाणु निर्मलिकरण गरको पानी सोस्न स्टेरिलाइज पेट्री प्लेटमा फिल्टर पेपर वा बलटिङ पेपर राखी उक्त एक्सप्लान्ट राख्ने ।
- स्टेरिलाइज गरेको कर्क बोरर प्रयोग गरी बिचको फ्लोम भागलाई सिलिन्डर आकारमा खोपेर निकाल्ने । सतह कीटाणु निर्मलिकरण गर्दा एक्पोज (expose) भएको दुई तिरको सानो भागलाई फोर्सेप र स्केलपेलको सहायताले काटेर फ्याक्ने । लगभग १/८ इन्च बाक्लो उक्त बिचको फ्लोम भागलाई माथि पेट्री प्लेटमा कल्चरको लागि तयार गरिएको क्यालस इनिसिएसन मिडियामा स्थानान्तरण गर्ने ।
- प्याराफिल्मले पेट्री प्लेटहरुको किनारालाई राम्ररी सिल गर्ने र अध्यारो कोठा वा इन्क्यूकेटर वा अध्यारो क्याविनेटमा वा कालो पलास्टिकले ढाकी २५±२ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा राख्नुपर्दछ ।
- लगभग दुई हप्तामा सेता क्यालसहरु देखिन थाल्दछ र ५ हप्तामा प्रयोग गरिएको एक्सप्लान्टको व्यास भन्दा ४ देखि ५ गुणा बढी सम्म क्यालसहरु देखिन थाल्दछ ।

९.४.१.२. ***क्यालसबाट इन भिट्रो बिरुवा उत्पादन गर्ने तरिका***

- क्यालसहरुबाट बिरुवा उत्पादन गर्नलाई एम्ब्रियोजिनेसिस मिडिया अनुसूची १ को तालिका ११ मा भनिए अनुसार तयार गर्ने । मिडियालाई पेट्री प्लेटमा कल्चरको लागि तयार गर्ने ।
- LAF मा स्टेरिलाइज फोर्सेपले माथि तयार गरिएको एम्ब्रियोजिनेसिस मिडियामा स्थानान्तरण गरी प्याराफिल्मले पेट्री प्लेटहरुको किनारालाई राम्ररी सिल गर्ने ।
- त्यसपछि सिल गरिएको पेट्री प्लेटहरुलाई बिरुवा वृद्धि गर्ने कोठामा २५±२ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा २००० देखि ४००० लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारो कायम राख्ने ।
- २-३ हप्तामा क्यालसहरु भ्रूणको रुपमा देखिन थाल्दछन् । अपरिपक्व भ्रूणहरु आकारमा गोलाकार देखिन्छन् भने अलि परिपक्व भ्रूणहरु आकारमा हार्ट वा टार्पेडो खालका देखिन्छन् ।
- पेट्री प्लेटहरुमा लगभग १/२ इन्च बिरुवाहरु भएपछि अन्य कल्चर भाँडाहरुमा स्थानान्तरण गर्ने ।



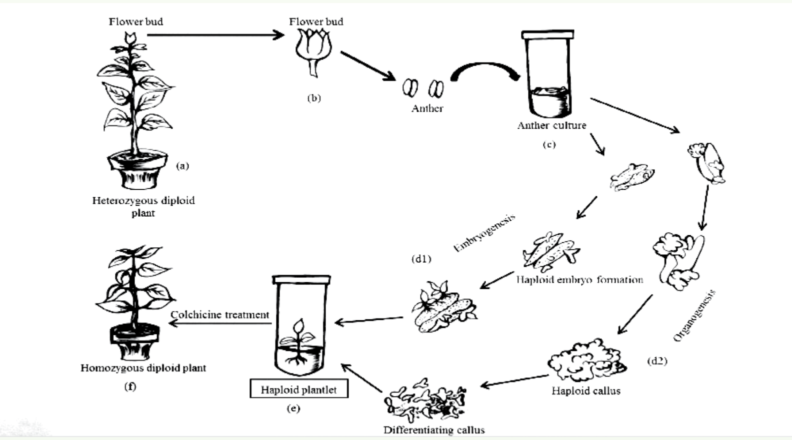
चित्र ३१: गाजरको जराबाट क्यालस कल्चर गरी बिरुवा उत्पादन गर्ने तरिका (a) गाजरको जरा, (b) १/२ इन्च बाक्लो क्रसवाइज स्लाइसहरु काटी एक्सप्लान्ट (c) कल्चर गर्ने, (d) क्यालस विकास भएको, (e) क्यालसबाट बिरुवा विकास भएको र (f) हार्डनिङ्ग गर्ने

९.५. हेप्लोइड कल्चर:

हेप्लोइड भन्नाले कुनै पनि जीव वा कोशाणुको क्रोमोजोम सेटको ठीक आधा सेट हुनु हो । प्राकृतिक अवस्थामा बिरुवाहरुमा अगुणित (n) घटित हुने सम्भावना धेरै न्यून हुन्छ जुन लगभग ०.००१ देखि ०.०१% मात्र हुन्छ। हेप्लोइड कल्चर कृतिम अवस्थामा भाले अङ्ग पुंकेशर वा स्त्रीकेशरका भागरहरु जस्तै; परागकोष, परागकण, अण्डाशय वा बीजाण्ड आदिलाई एक्सप्लान्टको रुपमा प्रयोग गरिन्छ। हेप्लोइड कल्चरको मुख्य उद्देश्य समयुग्मजी (Homozygous) बिरुवा उत्पादन र उत्परिवर्तन विश्लेषण अध्ययन गर्नु हो ।

९.५.१. परागकोष कल्चरबाट हेप्लोइड बिरुवा उत्पादन गर्ने तरिका

- नफक्रिएको कोपिलाहरु लगभग १७-२२ मी.मी. को संकलन गर्ने । परागकोष कल्चर गर्दा परागकोष बाइन्युक्लिएट वा युनिन्युक्लिएटमा छ छैन एसिटोकार्मिन परीक्षणबाट जाँच्न सकिन्छ । युनिन्युक्लिएटमा भएको परागकोषलाई एक्सप्लान्टको लागि उत्तम मानिन्छ ।
- कोपिलाहरुलाई माथि ५.३. मा भनिए अनुसार सतह निर्मलिकरण गर्ने ।
- LAF मा सतह निर्मलिकरण गरको पानी सोस्न स्टेरिलाइज पेट्री प्लेटमा फिल्टर पेपर राखी उक्त कोपिलाहरुलाई राखी त्यसबाट स्टेरिलाइज फोर्सेपले पुंकेशर छुट्याउने ।
- त्यसपछि, फिलामेन्ट हटाइ परगकोषलाई अर्ध-ठोस वा तरल मिडियामा कल्चर गर्ने । अर्ध-ठोस मिडियामा १०-२० वटा परगकोष प्रति ६ से. मी. व्यास भएको पेट्री प्लेटमा कल्चर गर्ने । तरल मिडियामा भने ५० वटा परगकोष प्रति १० मी.ली. मा कल्चर गर्ने । परागकोष कल्चर गर्न MS मिडियामा २, ४-D र NAA बढी प्रयोग गरिने अक्जीन हो ।
- प्याराफिल्मले पेट्री प्लेटहरुको किनारालाई राम्ररी सिल गरी अध्यारो कोठा वा इन्क्यूवेटरमा २४ देखि २८ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा ३-४ हप्तासम्म राख्नु पर्दछ ।
- ३-४ हप्ता देखि सुक्ष्म हेप्लोइड बिरुवाहरु अर्गानोजेनेसिस र सोमाटिक भूणउत्पत्ति माध्यमबाट पूर्ण बिरुवाहरुको विकास भएको देखिन थाल्दछ ।
- पेट्री प्लेटहरुमा लगभग १/२ इन्च बिरुवाहरु भएपछि अन्य कल्चर भाँडाहरुमा स्थानान्तरण गरी बिरुवा वृद्धि गर्ने कोठामा २४-२८ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा २००० देखि ४००० लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारो कायम राख्ने ।
- इन भिट्रो बिरुवाहरु लगभग ४-५ से.मी. उचाइ भएपछि माथि ८.१.४.१. र ८.१.४.२. मा भनिएको विधि अनुसार प्राइमरी र सेकेन्डरी हार्डनिङ्ग गर्ने ।



चित्र ३२. : परागकोष कल्चर गरी हेप्लोइड बिरुवा उत्पादन गर्ने सामान्य प्रक्रिया (a) heterozygous diploid बिरुवाबाट (b) फूलको कोपिला संकलन गरी मिडियामा (c) परागकोष कल्चर गर्ने, (e) हेप्लोइड बिरुवा (d1) सोमाटिक भ्रूणउत्पत्ति र (d2) अर्गानोजेनेसिस माध्यमबाट विकास गरिएको र (f) Homozygous diploid बिरुवा विकास गरिएको

९.६. अन्य तन्तु प्रजनन्का प्रकारहरु

- **सुट टिप कल्चर**: यो कल्चर कलिलो टुसा वा मुनालाई तन्तु नमूना स्रोतको रुपमा लिएर गरिन्छ। बिशेषगरी छिटो इन भिट्रो माउ बिरुवा उत्पादन गर्न मुना कल्चर गरिन्छ। मुना कल्चर गर्नको लागि तन्तु नमूनाको आकार मेरिस्टेम भन्दा केही ठुलो लिने गरिन्छ।
- **भ्रूण कल्चर**: पुरै वा केही भ्रूणको अंश जुन परिपक्व (Mature) वा अपरिपक्व (Immature) भ्रूणलाई एक्सप्लान्ट स्रोतको रुपमा यस भ्रूण कल्चरमा प्रयोग गरिन्छ। पाकेको बीउबाट परिपक्व भ्रूणलाई एक्सप्लान्टको रुपमा कल्चर गरिन्छ भने नपाकेको अथवा हाइब्रिड बीउबाट अपरिपक्व भ्रूणलाई कल्चर गरिन्छ। विशेष गरी यो कल्चर त्यस्ता बिरुवाहरुको गरिन्छ जसको बीउहरुमा एन्डोस्पर्म विकसित हुँदैन।
- **प्रोटोप्लास्ट कल्चर**: प्रोटोपलास्ट कल्चर माध्यमबाट सोमाटिक हाइब्रिड बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ। प्रोटोपलास्ट भन्नाले रसायनिक उपचार गरी कोषभित्ता (cell wall) हटाइएको कोषलाई भनिन्छ। यस्ता दुई वटा फरक वनस्पतिक प्रजातिहरुको सोमाटिक प्रोटोपलास्टलाई फ्यूजन गरी हाइब्रिड बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ र यस प्रकृयालाई सोमाटिक हाइब्रिडाइजेशन भनिन्छ।

९.७. तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट उत्पादित बिरुवाहरुको गुणस्तर मापन

भाइरस, कीटाणु तथा ढुसीजन्य संक्रमण, सोमाक्लोनल भिन्नता, हापरहाइड्रीसिटी, मिडियामा पोषक तत्वहरु, पीएच, हर्मोनहरुको असन्तुलन आदि कारणहरुले तन्तु प्रजनन् माध्यमबाट उत्पादन गरिएको बिरुवाहरु न्यून गुणस्तर हुने सम्भावना हुन्छ। त्यसैले गुणस्तर सुनिश्चित गर्न तन्तु प्रजनन् माध्यमबाट उत्पादन गरिएका बिरुवाहरुको गुणस्तर मापन गर्न अति महत्वपूर्ण हुन्छ। गुणस्तर मापन गर्न मुख्य रुपमा चारवटा कुरामा विशेष ध्यान दिनुपर्दछ।

९.७.१. आकृतिमूलक विशेषताहरु: बिरुवाहरुको पात, डाँठ, काण्ड आदि तथा तिनीहरुको आकार र रंग माउ बोट जस्तो छ कि छैन राम्रोसँग जाँच्नु पर्दछ। त्यस्तैगरी बिरुवाहरुको सममिति (symmetry), प्रति एक्सप्लान्ट शूट (shoot) संख्या, जराको विकास, आँख्लाहरु बीचको लम्बाइ आदि एकरुपता छ कि छैन राम्रोसँग निरीक्षण गर्नुपर्दछ।

९.७.२. वृद्धि दर: समय अनुसार बिरुवाहरु पात, डाँट, काण्ड आदि एक समान वृद्धि र विकास भइरहेका छन् कि छैनन् राम्रोसँग हेर्नुपर्दछ।

९.७.३. आनुवंशिक शुद्दताको परीक्षण: तन्तु प्रजननबाट हुर्केका बिरुवाहरुको आनुवंशिक शुद्धता परीक्षण गर्न धेरै विधिहरु विकास भएका छन् जस्तै; फिजियोलोजिकल पर्यवेक्षण, साइटोलोजिकल अध्ययन (Cytological studies), आइसोजाइम विश्लेषण, आणविक अध्ययनहरु (Molecular studies) आदि। बिरुवाहरुको आनुवंशिक शुद्धता परीक्षण गर्न अन्य विधिहरु भन्दा आणविक मार्करहरुको प्रयोग अत्यधिक गरिन्छ। आणविक मार्करहरु जस्तै; RAPDs, ISSR, SNP, ScoT, AFLPs, SSRs or STMS, STS, DNA Amplification Fingerprinting (DAF) and Microsatellite Primed-PCR (MP-PCR) वा अन्य प्रयोग गरी

बिरुवाहरुको आनुवंशिक शुद्धता परीक्षण गर्न सकिन्छ।

९.७.४. भाइरस तथा अन्य रोगको परीक्षणः तन्तु प्रजनन् माध्यमबाट विकास गरिएका बिरुवाहरुको भाइरस परीक्षण सेरोलोजिकल विधि (ELISA) वा मलिक्युलर (PCR) विधिहरुबाट गर्न सकिन्छ। कुनै पनि प्रकारको बिरुवाहरु विशेष गरेर आलु, अलैंची, सुन्तला जात फलफूल, केरा आदिमा उच्च जोखिमका भाइरस तथा अन्य रोगको परीक्षण गरेर मात्र माउ बोटबाट प्रसार गरिनुपर्दछ। यदि बिरुवाहरुमा भाइरस तथा रोगको संक्रमण देखिएमा मेरेस्टेम कल्चर तथा अन्य विधिहरु जस्तै; केमोथेरपी, थर्मोथेरापी, इलेक्ट्रोथेरापी आदिको प्रयोगबाट यिनीहरुलाई निर्मूल गरी पुनः प्रसार गर्नु पर्दछ।

ELISA*: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) एउटा सेरोलोजिकल डायग्नोस्टिक प्रविधि हो जसले एन्टिबडीहरु र इन्जाइमहरु प्रयोग गरेर भाइरस र ब्याक्टेरिया रोग पत्ता लगाउँदछ। ELISA को प्रयोगबाट छोटो समयमा नै ठूलो संख्यामा नमूनाहरुको परीक्षण र गुणात्मक डेटा प्रदान गर्दछ।

PCR*: Polymerase Chain Reaction (PCR) बिरुवाको रोगजनक पत्ता लगाउनको लागि व्यापक रुपमा प्रयोग हुने एउटा मलिक्युलर प्रविधि हो जुन आनुवंशिक सामग्री (DNA) को इन्जाइम्याटिक प्रतिकृति (replication) मा आधारित हुन्छ। यस प्रविधिमा निश्चित DNA अनुक्रमको धेरै प्रतिलिपिहरु द्रुत गतिमा सृजना गरी भाइरस, ब्याक्टेरिया, माइकोप्लाज्मा तथा अन्य रोगजनकहरुको पहिचान गर्न एक भरपर्दो, विशिष्ट र महत्वपूर्ण विधि प्रदान गर्दछ।

तन्तु प्रजनन् बिरुवाहरुमा देखिने समस्याहरु र तिनीहरुको निवारण

तन्तु प्रजनन् प्रविधि प्रकृयामा बिरुवा उत्पादन गर्ने क्रममा प्रत्येक चरणहरुमा विभिन्न प्रकारका समस्याहरु देखा पर्दछन् । तन्तु प्रजनन् प्रकृयामा देखिने केही समस्याहरु र तिनीहरुको निवारणका उपायहरु यस प्रकार छन्:

चित्र ३३: विभिन्न प्रकारका सुक्ष्म जीवहरुको संक्रमण भएको

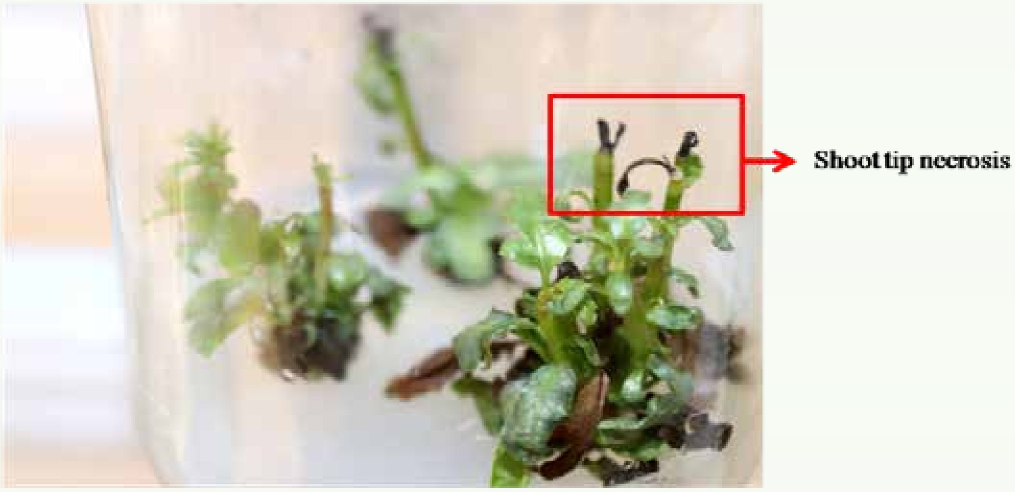
१०.१. सूक्ष्म जीवहरुको संक्रमण: सूक्ष्म जीवहरु लगभग सबै ठाँउमा उपस्थित हुन्छन् जसले गर्दा प्रयोगशालामा अनुकूल वातावरण उपलब्ध भएमा यिनीहरु तीव्र गतिमा फस्टाउन्छन् । सूक्ष्म जीवहरु (ब्याक्टेरिया, भाइरस, मोल्ड, फंगस, माइकोप्लाज्मा) आदि सामान्य रुपमा एक्सप्लान्ट कल्चर वा सब-कल्चर गरिएको मिडियामा देखा पर्दछन्, र यिनीहरुले वृद्धि र विकास हुँदै गरेको बिरुवालाई नष्ट पारिदिन्छन् । ब्याक्टेरिया, मोल्ड र फंगसहरुको द्रुत वृद्धि दरको कारणले यिनीहरु सबैभन्दा सामान्य रुपमा संक्रमण गर्ने सूक्ष्म जीवहरुमा पर्दछन् । यी प्रदूषकहरुलाई सजिलै छुट्याउन सकिन्छन भने भाइरस र माइकोप्लाज्मालाई सजिलै छुट्याउन सकिदैन । कल्चर गर्दा प्रयोग गरिने कतिपय बिरुवाको तन्तु नमूना भित्रै पनि सूक्ष्म जीवद्वारा संक्रमण भएको हुन सक्छ जसलाई Endophyte भनिन्छ । यी कीटाणुहरु तन्तु प्रजनन्को विभिन्न चरणहरुमा बिस्तारै देखा पर्दछन् । ब्याक्टेरियल एन्डोफाइट्स जस्तै; *ब्यासिलस सब्टिलिस, एर्विनिया र स्यूडोमोनास* आदिहरुले निष्कृय अवस्थामा हुन्छन् र पछि बिस्तारै विभिन्न चरणहरुमा देखा पर्दछन् जसले गर्दा बिरुवाको वृद्धि र विकासमा बाधा पुर्‍याउदछन् ।

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला कोठाहरु सधै सफा राख्ने तथा काम गर्ने स्थानहरु फराकिलो र आवश्यक सामानहरु व्यवस्थित तरिकाले राख्नु पर्दछ ।
- काम गर्ने व्यक्तिले कल्चर गर्नु अगाडि साबुन पानीले हातलाई राम्ररी सफा गर्ने तथा हातमा मेडिकल पन्जा, अनुहारमा मास्क, टाउकोमा कपाल छोप्ने hair cover र एप्रोन लगाएर काम गर्नुपर्दछ ।
- कल्चर गर्दा कुनै पनि प्रकारको खाने कुराहरु खानु तथा अनावश्यक कुरा गर्नु हुदैन ।
- लामिना वायु प्रवाह हुडमा कल्चर गर्दा कीटाणु निर्मलिकरुण विधिहरुको राम्रोसँग पालना गर्नुपर्दछ ।
- तन्तु नमुना सतहलाई कीटाणु निर्मलिकरण गर्दा प्रयोग गरिने निस्संक्रामकहरुको होल्डिङ अवधि बढाउन सकिन्छ ।
- कल्चर गर्दा मिडिया, पानी तथा अन्य विभिन्न वस्तुहरु कीटाणु निर्मलिकरण गरिएको मात्र प्रयोग गर्नुपर्दछ ।

- Endophytes लाई नियन्त्रण गर्ने । PPM (Plant Presevative Mixture) वा एन्टिबायोटिक जस्तैः Streptomicin, Penicillin, Ampicillin, Cafazolin, Ticarcillin आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ । तर एन्टिबायोटिकको प्रयोग अन्तिम अवस्थामा मात्रै प्रयोग गर्नुपर्दछ ।
- नियमित निरीक्षण तथा हेरचाह गर्नुपर्दछ ।

१०.२. बिरुवाको टुप्पो मर्ने: शूट टिप नेक्रोसिस एक प्रकारको शारीरिक अवस्था र विकार हो, जसले इन भिट्रो बिरुवाहरुको वृद्धि र विकासलाई नकरात्मक असर पुऱ्याइ डाँटको टुप्पो मर्ने हुन्छ । यो समस्या प्रसार र जरा विकास चरणहरुमा देखिने गर्दछ । शूट टिप नेक्रोसिस निम्त्याउने सबैभन्दा सामान्य कारकहरु मध्ये एक पोषकतत्वको कमी वा असंतुलन हो । यस बाहेक, क्यालसियमको कमी, हर्मोनहरुको असंतुलन र उच्च सापेक्ष आद्रता आदिले शूट टिप नेक्रोसिस निम्त्याउने गर्दछ ।



चित्र ३४. : इन भिट्रो बिरुवाको टुप्पो मरेको

समस्या निवारणका केही उपायहरुः

- मिडियामा सन्तुलित पोषक तत्वहरु र हर्मोनहरुको मात्रा प्रदान गर्नुपर्दछ ।
- उचित मात्रामा क्यालसियम मिडियामा समावेश गर्ने ।
- बिरुवा हुर्काउने कोठाको सापेक्ष आद्रतालाई नियन्त्रणमा राख्ने ।
- कल्चर गरिएको बोतल, जार, कल्चर ट्यूब आदिको बिर्को धेरै कसिलो गरी बन्द नगर्ने तर धेरै हल्का पनि गर्नु हुदैन ।
- फिल्टरयुक्त भएको बिर्को पनि प्रयोग गर्ने सकिन्छ ।

१०.३. मिडिया र एक्सप्लान्टको ब्राउनिङः यो समस्या विशेष गरी बारहमासी काठे बिरुवाहरुको तन्तु नमूनालाई मिडियामा स्थापना गर्दा र त्यसपछिको प्रसारण चरणहरुमा देखा पर्दछ । यस्ता तन्तु नमूनाहरुले आफ्नो रक्षा संयन्त्रको लागि विभिन्न रसायन पदार्थ निष्काशन गर्दछन् जसलाई फेनोलिक योगिकहरु भनिन्छ ।

यही फेनोलिक योगिकहरु मिडियामा एकत्रित हुदा मिडिया ब्राउन रङ्गको हुन्छ र आफ्नै तन्तु नमूनालाई बिस्तारै मारी दिन्छ। एन्डोफाइट्सहरुको कारणले गर्दा पनि यो समस्या देखा पर्दछ।

चित्र ३५: मिडिया र एक्सप्लान्ट ब्राउनिङ भएको

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

- ब्राउनिङ रोक्न एन्टिओक्सिडेंट पदार्थहरु जस्तै; ५ ग्राम प्रति लीटर साइट्रिक एसिड वा २.५ ग्राम प्रति लीटर एस्कोर्बिक एसिड झोलमा एक्सप्लान्टलाई डुबाई कल्चर गर्ने।
- फेनोलिक योगिकहरुलाई सोख्न मिडियामा सक्रिय चारकोल (activated charcoal) ०.१ देखि १ प्रतिशत वा ०.०३ प्रतिशत PVP (Polyvinylpyrrolidone) को प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- मिडियामा कल्चर गरिएको तन्तु नमूनाहरुलाई केही दिनसम्म अध्यारो कोठामा राख्ने।
- मिडियामा ब्राउनिङ देखिए लगातार नयाँ मिडियामा स्थानान्तरण गर्नु पर्दछ।
- एन्डोफाइट्सलाई नियन्त्रण गर्ने।
- नियमित निरीक्षण तथा हेरचाह गर्ने।

१०.४. हाइपरहाइड्रेसिटी/भिट्रिफिकेशन: हाइपरहाइड्रेसिटी भनेको इन भिट्रो बिरुवाहरुमा हुने शारीरिक गडबडी वा विकृति हो जसले उचित वृद्धि र विकासलाई असर गर्दछ। यस अवस्थामा बिरुवाहरुको डाँट र पातहरु पारदर्शी, ओसिलो, नाजुक र रसिलो देखिन्छन्। हाइपरहाइड्रेसिटीको मुख्य कारणहरु Oxidative stress लाई ट्रिगर गर्ने कारकहरु मानिन्छन्। उच्च लवरणको मात्रा, उच्च सापेक्ष आद्रता, कम प्रकाश, कल्चर जारको वातवरणमा ग्यास संचय, सब-कल्चर संख्या र सब-कल्चर बीचको समय अन्तराल, जेलिंग एजेन्टको मात्रा, हर्मोनल असन्तुलन आदि कारणहरुले निम्त्याउने गर्दछ।

चित्र ३६: इन भिट्रो बिरुवाहरुमा हाइपरहाइड्रेसिटी देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

- मिडियामा उचित कार्बोहाइड्रेटको मात्रा प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- कल्चर गरिएको भाँडालाई फिल्टरयुक्त भएको बिर्को प्रयोग गर्न सकिन्छ।
- बिरुवाको प्रकृति अनुसार मिडियामा पोषकतत्व, अगार, साईटोकाइनिन र अक्जीनको कन्सन्ट्रेसन परिमार्जन गर्नुपर्दछ।
- बिरुवा हुर्काउने कोठाको सापेक्ष आद्रतालाई नियन्त्रणमा राख्ने।
- बिरुवा हुर्काउने कोठामा इथिलीन प्रदुषण हुन नदिने तथा पोजेटिभ एयर प्रेशर कायम राख्नुपर्दछ।
- प्रकाशको मात्रा परिवर्तन गर्ने।
- केही अवस्थामा समस्या कम गर्न क्याल्सियमको कन्सन्ट्रेसन वृद्धि गर्नुपर्ने देखाइएको छ।

१०.५. रिकल्सिट्रान्स: इन भिट्रो वातावरणमा बिरुवाको कोष तथा तन्तुहरुले कुनै पनि प्रकारको वृद्धि तथा विकासको प्रतिकृया नदिने अवस्थालाई रिकल्सिट्रान्स भनिन्छ। कोषिकाहरुको म्याक्रो-मोलेक्युलहरुसँग फ्री रेडिकलहरुको प्रतिक्रिया, मिडिया, हर्मोनल असन्तुलन, एक्सप्लान्टको प्रकार, संकलन गरिएको बिरुवाको तन्तु नमूनाको आयु, वातावरणीय कारकहरु आदि कारणहरुले रिकल्सिट्रान्स निम्त्याउँदछ। यो समस्या तन्तु प्रजनन् प्रक्रियाको जुनै पनि चरणमा देखा पर्न सक्छ।

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

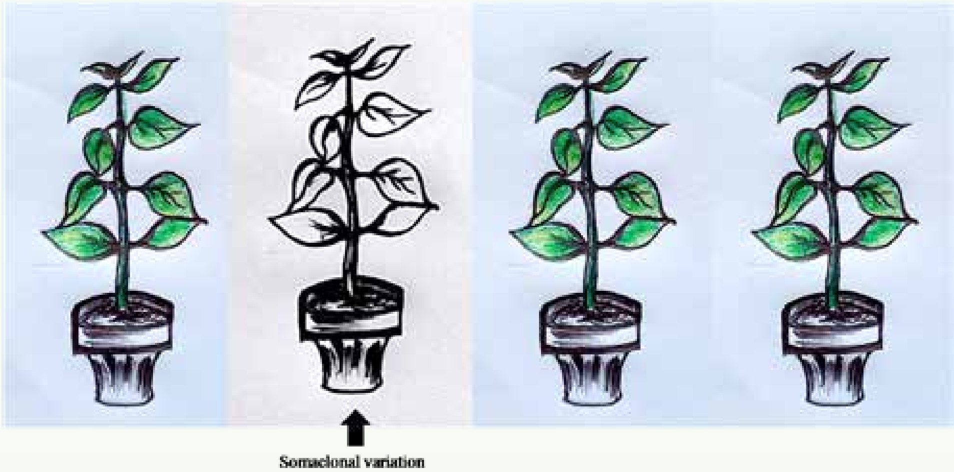
- बिरुवाको किशोर एवम् उच्च मेरिस्टेमेटिक भागहरु तन्तु नमुनाको रुपमा प्रयोग गर्ने।
- उचित मिडिया तथा साईटोकाइनिन र अक्जीनको सन्तुलित कन्सन्ट्रेसन प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- विकल्पको लागि सोमाटिक भ्रूणजनन जस्ता प्रविधिहरु प्रयोग गर्ने।
- बिरुवाको आवश्यकता अनुसार प्रकाशको तीव्रता र फोटोपिरियड अवधि समायोजन गर्ने।
- तापक्रम र आद्रतालाई उचित मात्रामा नियन्त्रण गर्ने।

१०.६. ह्याविच्युएशन (Habituation): इन भिट्रो अवस्थामा बिरुवालाई कोषिका विभाजन र निरन्तर विकास कायम राख्न मिडियामा बिरुवा वृद्धि नियामक जस्तै; अक्जीन र साईटोकाईनिनको आवश्यकता पर्दछ तर पछि अक्जीन वा साईटोकाईनिनको अभावममा पनि निरन्तर कोषिका विभाजन र विकास हुन जारी रहन्छ भने यस्तो घटनालाई ह्याविच्युएशन भनिन्छ। यस अवस्थामा बिरुवाका कोषिकाहरु र तन्तुहरुले कोषिका विभाजन र निरन्तर विकास कायम राख्न बाहिरी हर्मोनको आवश्यकता गुमाउँदछन्।

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

- नयाँ तन्तु नमूना संकलन गरी मिडियामा स्थापना गर्ने।
- सन्तुलित मात्रामा अक्जीन र साईटोकाइनिन् हर्मोनहरुको प्रयोग गर्ने।

१०.७. सोमाक्लोनल भिन्नता: कल्चर गरिएको कोष तथा तन्तु नमूनाहरुमा पाइने आनुवंशिक परिवर्तनलाई सोमाक्लोनल भिन्नता भनिन्छ र त्यस्ता कोष तथा तन्तुहरुबाट उत्पन्न हुने बिरुवाहरुलाई सोमाक्लोन (Somaclones) भनिन्छ। आनुवंशिक परिवर्तन जस्तै; क्रोमोजोमको संरचना तथा संख्यामा परिवर्तन र डीएनए (DNA) अनुक्रममा परिवर्तनहरुले गर्दा बिरुवाहरुमा सोमाक्लोनल भिन्नता देखा पर्दछ। तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा आनुवंशिक परिवर्तन विभिन्न stress factors जस्तै; कल्चर मिडियामा हर्मोनहरुको असंतुलन, कीटाणु निर्मलिकरण गर्दा अत्यधिक रसायनहरुको प्रयोग, कोष तथा तन्तुमा चोट आदि कारणहरुले भई सोमाक्लोनल भिन्नता निम्त्याउँदछ। सोमाक्लोनल भिन्नताले गर्दा एक समान बिरुवाहरु उत्पादन गर्न थप चुनौती बढाउँदछ। धेरै जसो अवस्थाहरुमा सोमाक्लोनल भिन्नताहरु अनावश्यक हुन्छन्, तर उत्परिवर्तीहरु विकास गर्नका लागि भने उपयोगी हुन सक्छ।



चित्र २७: दोस्रो बिरुवामा सोमाक्लोनल भिन्नता देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरु:

- आनुवंशिक स्थायित्वको कारणले, तन्तु प्रजनन् नमूनाको रुपमा पार्श्व शाखा (axiallary shoot) प्रयोग गरी प्रसार गर्ने।
- एउटै इन भिट्रो बिरुवा माउ स्टकबाट धेरै संख्यामा सब-कल्चर गर्नुहुदैन।
- क्यालस माध्यमबाट प्रसारित बिरुवाहरुको सन्तती परीक्षण गर्ने।
- सन्तुलित मात्रामा अक्जीन र साईटोकाईनिन हर्मोनहरुको प्रयोग गर्ने।
- नयाँ तन्तु नमूना संकलन गरी पुन कल्चर स्थापना गर्ने।

कृषिमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग

बढ्दो विश्वको खाद्यान्न र गुणस्तरीय बिरुवाहरुको माग दिन-प्रतिदिन बढ्दै गइरहेको अवस्थामा उदीयमान प्रविधिको रुपमा बिरुवा तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा आवश्यक गुणस्तरीय बिरुवाहरु उपलब्ध गरी कृषि र उद्योग दुवैमा ठूलो प्रभाव पार्न सक्दछ। हालको समयमा यो प्रविधि कृषि विज्ञानको विकासमा महत्वपूर्ण योगदान पुऱ्याइ आधुनिक कृषि क्षेत्रमा अपरिहार्य औजारको रुपमा प्रयोग बढ्दै गइरहेको छ। कृषि क्षेत्र विशेषगरी फलफूल, पुष्प व्यवसाय र तरकारी बाली उत्पादनको क्षेत्रमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग उलेख्य रुपमा बढ्दै गइरहेको छ। यो प्रविधि कृषि क्षेत्रमा विविध प्रयोजनका लागि निम्न रुपमा प्रयोग गरिन्छ;

११.१. तीव्र क्लोनल प्रसारण: आनुवंशिक रुपमा एकै प्रकारका बिरुवाहरु तीव्र गतिमा प्रसारण गर्न व्यवसायिक स्तरमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग अत्यधिक लोकप्रिय एवम् उत्तम मानिन्छ। यस प्रविधिको प्रयोगबाट कम समय, स्थान र केवल एउटा सानु बिरुवाको नमूनाबाट नै धेरै संख्यामा बिरुवाहरु बिना मौसम अवरोध उत्पादन गर्न सकिन्छ। विभिन्न कृषि बालीहरुमा फलफूल, तरकारी, मसाला, पुष्पजन्य, रुखजन्य आदि बिरुवाहरुको प्रसारणको लागि यस प्रविधिको प्रयोग व्यवसायिक स्तरमा प्रयोग भइरहेको छ।

तालिका ८: तन्तु प्रजनन् प्रविधिको माध्यमबाट व्यवसायिक स्तरमा उत्पादन गरिएका केही बाली तथा बिरुवाहरु

बालीको प्रकार	बालीको नाम
फलफूल	केरा, स्ट्रबेरी, भुईकटर, कागती, सुन्तला, स्याउ, मेवा
तरकारी बाली	आलु, सखरखण्ड, लसुन, गाजर, कुरिलो, ब्रोकाउली, बन्दागोभी
मसाला बाली	मरिच, अलैंची, अदुवा, बेसार, ल्वाङ, भेनिला
पुष्पजन्य	अर्किड, जरबेरा, लिली, एजेलिया, सिङ्गोनियम, डाइफैनबकिया, कारनेसन, एन्थुरियम, गोदावरी, ग्लेडियोलस, बेगोनिया
रुखजन्य	रबर, टीक, पाउलोनिया, बाँस, मसला
औषधीय बिरुवाहरु	घ्यु कुमारी, रोजमेरी, स्टेभिया, पचौली, नीम
अन्य नगदे बाली	ऊखु, जैथुन, जोजोबा, भांग

११.२. रोगजनकहरुको उन्मूलन: भाइरल, ब्याक्टेरियल र ढुसीजन्य जीवहरु ग्रसित बिरुवाबाट यिनीहरुलाई मुक्तगरी स्वस्थ बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ। यी रोग संक्रामक जीवाणुहरुलाई उन्मूलन गर्न विभिन्न विधिहरु मध्ये मेरिस्टेम कल्चर अधिक प्रभावकारी हुन्छ। मेरिस्टेम कल्चर प्रायः सबै प्रकारका बिरुवाहरुमा प्रयोग गर्न सकिन्छ। मेरिस्टेम कल्चरको प्रयोग फलफूलको बिरुवा उत्पादन गर्दा विभिन्न प्रकारका भाइरसहरु जस्तै; स्ट्रबेरीमा हल्का पहेलो किनारा भाइरस (SMYEV), नस बैंडिंग भाइरस (SVBV), क्रिङ्कल भाइरस (SCV), वा ढुसीजन्य जीवहरु जस्तैः *Fragaria sp.: V, dahliae, Sphaeroteca macularis, S, humili, Botrytis cinerea* आदि उन्मूलन गरिसकेपछि तथा भाइरस परीक्षण गरी व्यवसायिक खेती गरिन्छ। यसरी

रोग उन्मूलन गरिएका बिरुवाहरु प्रयोग गर्नाले उत्पादन र उत्पादकत्व वृद्धि भइ बढी आर्थिक लाभ लिन सकिन्छ।

११.३. आनुवंशिक रुपान्तरण: तन्तु प्रजनन् प्रविधिले आधुनिक कृषि क्षेत्रमा आनुवंशिक रुपान्तरण प्रक्रियामा महत्वपूर्ण योग्दान पुऱ्याइ रहेको छ। आनुवंशिक रुपान्तरण भन्नाले आनुवंशिक ईन्जिनियरिङ्गो प्रक्रिया हो जहाँ एउटा नयाँ जीन (ट्रन्सजीन) एकल बिरुवा कोषमा सम्मिलित गराइन्छ र त्यसबाट उत्पादन भएका बिरुवाहरुलाई ट्रान्सजेनिक बिरुवाहरु (Transgenic plants) भनिन्छ। भेक्टर-मध्यस्थ (अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण) वा भेक्टर रहित (प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण) विधिबाट आनुवंशिक रुपान्तरण गरिन्छ। नयाँ जीन बिरुवा कोषमा सम्मिलित गर्न अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरणको लागि एग्रोब्याक्टेरियम-मध्यस्थको व्यापक रुपमा प्रयोग गरिन्छ भने प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरणको लागि कण बमबारी, इलेक्ट्रोपोरेशन र माइक्रोफाइबरहरु प्रयोग गरिन्छ। भेक्टर रहित आनुवंशिक रुपान्तरणमा बिरुवा तन्तु प्रजनन् माध्यमबाट प्रसारण गरिएको कोषमा नयाँ जीन सम्मिलित गरी चाहिएको उत्कृष्ट गुण भएको जस्तै; उच्च उत्पादन दिने, राम्रो गुणस्तरका, रोग, किराहरु, सुक्खा तथा अन्य प्राकृतिक प्रकोप प्रतिरोधी बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ। BT बालीहरु जस्तैः BT cotton, BT maize, BT brinjal आदि बालीहरुमा *ब्यासिलस थुरिन्जिएन्सिस ब्याक्टेरियाको जीन* 'Cry' यी बालीहरुको DNA मा सम्मिलित गरिन्छ जसले किराहरु प्रतिरोधि टोक्सिन बनाउदछ।

११.४. जर्मप्लाज्म संरक्षण: जर्मप्लाज्म भन्नाले जीवित बीउ वा बिरुवाको भाग जस्तै; पातको टुक्रा, काण्डको टुक्रा, परागकण वा कोष आदि जुन पुनः नयाँ बिरुवामा विकास हुन सक्छ र यस्ता बिरुवाको भागलाई भविष्यमा प्रयोग गर्नको लागि संरक्षण गर्नुलाई जर्मप्लाज्म संरक्षण भनिन्छ। लोपुन्मुख, बीउ उत्पादन नगर्ने वा लामो समयसम्म भण्डारण गर्न नसकिने (recalcitrant) बीउ र व्यवसायिक रुपमा मूल्यवान वनस्पति प्रजातिहरुलाई तन्तु प्रजनन् प्रविधिको माध्यमबाट सफलतापूर्वक संरक्षण गर्न सकिन्छ। यस प्रविधिद्वारा प्रसारण गतिलाई सुस्तगरी बिरुवाको आयुलाई थप वृद्धि गर्न सकिन्छ। लामो समयसम्म जर्मप्लाज्म संरक्षण गर्न 'क्रायोप्रिजर्भेसन' विधिबाट संरक्षण गरिन्छ।

११.५. वर्णशङ्कर बिरुवाको उत्पादन (Hybrid Production): प्रोटोपलास्ट कल्चर (Protoplast culture) माध्यमबाट वर्णशङ्कर बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ। प्रोटोपलास्ट भन्नाले रसायनिक उपचार गरी कोषभित्ता हटाइएको कोषलाई भनिन्छ। यस्ता दुइवटा फरक वनस्पतिक प्रजातिहरुको सोमाटिक प्रोटोपलास्टलाई फ्यूजन गरी वर्णशङ्कर बिरुवाहरु उत्पादन गरिन्छ र यस प्रक्रियालाई सोमाटिक हाइब्रिडाइजेशन भनिन्छ।

११.६. बिरुवा प्रजनन् कार्यक्रम: समयुग्मजी (Homozygous) बिरुवाहरुमा विशेष किसिमको गुणहरु हुने जस्तै; उच्च उत्पादन दिने, एकनासले फल पाक्ने, उचाइ, बनावट आदि भएकाहरुलाई प्रजनन् कार्यक्रममा विशेष महत्वका साथ प्रयोग गरिन्छ। समयुग्मजी प्रकारका बिरुवाहरु उत्पादन गर्न ह्याप्लोइड संवर्द्धन प्रयोग गरिन्छ।

११.७. कृषि अनुसन्धान र विकास: अनुसन्धान केन्द्र र विश्वविद्यालय तिर विभिन्न कृषिजन्य बालीहरुको अनुसन्धान र विकासका कार्यहरु तन्तु प्रजनन् प्रविधिको माध्यमबाट भइरहेका छन्। यस प्रविधिबाट विभिन्न वनस्पतिक प्रजातिहरुको इन भिट्रो प्रोटोकल विकास गरी थप कृषि व्यवसायमा ठूलो योग्दान पुऱ्याउदछ।

नेपालमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिका अवसर र चुनौतिहरु

१२.१. अवसरहरु

तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोगबाट नेपालको कृषि, वन विज्ञान, औषधि निर्माण तथा अन्य अनुसन्धान क्षेत्रमा प्रशस्त अवसरहरु रहेका छन् ।

- भौगोलिक विविधताको कारणले गर्दा विभिन्न प्रकारको हावापानी, उर्वर क्षेत्र तथा विभिन्न प्रकारका कृषि बालीहरु उब्जाउनको लागि उपयक्त अवस्थाहरु उपलब्ध हुनु जसले गर्दा यस प्रविधि प्रयोगको दायरा फराकिलो बनाउँदछ ।
- फलफूल बालीको कुल खेती, उत्पादनको क्षेत्रफल र उत्पादकत्व वृद्धि भए तापनि औसत उत्पादकत्व सन्तोषजनक नहुनु । विभिन्न फलफूल तथा अन्य नगदे बाली खेतीहरुमा धेरै रोग फैलिंदै जाँदा उक्त बालीहरुको उत्पादकत्वमा ह्रास हुदै गइ रहेका छन् । जस्तै; सुन्तला खेतीमा सिट्रस ट्रिस्टेजा भाइरस र ग्रिनिङ्ग रोग फैलिदै जानु त्यस्तै गरी अलैंचीमा छिर्के र फुर्के रोगको समस्याले गर्दा उत्पादनमा नराम्रो असर परी रहेको छ। यस्ता रोग लागेका बिरुवाबाट रोग उन्मूलन गर्न तन्तु प्रजनन् प्रविधिको प्रयोग उत्तम मानिन्छ।
- आवश्यकता अनुसार गुणस्तरीय बिरुवाहरु उपलब्ध नहुनु । वर्तमान अवस्थामा छोटो समयमा उच्च उत्पादन दिने नयाँ खालका व्यवसायिक खेती प्रणालीहरु सुरु हुँदै जानु, कृषकहरुमा खेती प्रति सजक र चासो बढ्दै जानु आदि कारणहरुले गुणस्तरीय फलफूल बिरुवाहरुको माग पनि क्रमिक रुपमा बढ्दै जानु। यस्तो अवस्थामा यस प्रविधिको प्रयोग गरी द्रुत गतिमा आवश्यकता अनुसार एकै नासका गुणस्तरीय बिरुवाहरु उत्पादन गर्न सकिने ।
- विभिन्न सरकारी फार्म तथा अनुसन्धान केन्द्ररुमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरु स्थापना हुनु जसले गर्दा फलफूल, तरकारी, मसाला तथा अन्य नगदे बालीहरुको गुणस्तरीय बिरुवा उत्पादन गर्न तथा अनुसन्धानको दायरा फराकिलो बनाउँदछ ।
- बिरुवा प्रजनन् कार्यक्रम अन्तर्गत उच्च फल दिने तथा अन्य राम्रो गुण भएका फलफूल एवम् बालीहरुको विकास गर्न पनि यस प्रविधिलाई महत्वपूर्ण मानिन्छ ।
- उच्च मूल्यवान नगदे बालीहरु तथा औषधिय गुण भएका बिरुवाहरु जस्तै; अलैंची, कफी, अदुवा, केसर, बेसार, चिराइतो, पदमचाल, जमाने मान्द्रो, सर्पगन्धा आदिको इन भिट्रो प्रोटोकल विकास गरी आर्थिक स्थिति सुधार गर्न र थप कृषि अनुसन्धान र विकासमा पनि मद्दत गर्ने ।
- जलवायु परिवर्तनले गर्दा खेतीमा अनावश्यक समस्याहरु देखा परिरहेका छन् जस्तै; खेती बालीहरुमा अत्यधिक झारपात आउनु, किराहरु तथा रोगहरुको प्रकोप बढ्दै जानु आदि कारणहरुले बाली उपजमा नकारात्मक असर पुर्याइ रहेको अवस्थामा यस प्रविधिको प्रयोगद्वारा यस्ता खालका प्रकोपहरु प्रतिरोधि

तथा वातावरण अनुकूलका बिरुवाहरु विकास गर्न सकिने ।

- अनुसन्धान केन्द्र र विश्वविद्यालय तिर पनि विभिन्न कृषिजन्य बालीहरुको अनुसन्धान र विकासका कार्यहरु तन्तु प्रजनन् प्रविधिको माध्यमबाट भइरहेका छन् । यस प्रविधिबाट विभिन्न वनस्पतिक प्रजातिहरुको इन भिट्रो प्रोटोकल विकास गरी थप कृषि व्यवसायमा ठूलो योगदान पुऱ्याउँदछ ।
- दुई ठूला छिमेकी राष्ट्रहरु चीन र भारत हुनुले नेपालको कृषिजन्य उत्पादित वस्तुहरुको बजारिकरणमा प्रशस्त सम्भावना रहेको छ जसले गर्दा यस प्रविधिको प्रयोग गरी प्रविधिको विकास सँगसँगै ठूलो आर्थिक लाभ लिन सकिन्छ ।
- विभिन्न सरकारी फार्म केन्द्रहरु, अनुसन्धान केन्द्ररु तथा निजी स्तरबाट तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरु स्थापना भएसँगै स्वादेशमा नै रोजगारीको अवसर सृजना हुने ।
- सौन्दर्य तथा सजावट कार्यको लागि पुष्पजन्य बिरुवाहरुको पनि अत्यधिक मात्रामा माग बढ्दै जानुले पनि यस प्रविधिको प्रयोग अत्यन्तै आवश्यक देखिन्छ । जस्तै; अर्किड, जरबेरा, कारनेसन, एन्थुरियम, बेगोनिया आदि पुष्पजन्य बिरुवाहरु स्वादेशमा नै उत्पादन गरी निर्यात गर्ने तथा विदेशिएको रकमलाई न्यूनीकरण गर्न मद्दत पुऱ्याउने छ ।
- यस प्रविधिको माध्यमबाट बिरुवाहरुमा भएको सेकेन्डरी मेटाबोलाइट उत्पादन गरी औषधि निर्माण क्षेत्रमा पनि योगदान पुऱ्याउन सकिने ।
- उच्च मूल्यवान तथा लोपुन्मुख प्रजातीका बिरुवाहरु जस्तै; हिमालयन ब्लू पप्पी, सर्पागन्धा, जटामसी आदिलाई संरक्षण तथा संवर्द्धन गर्न सकिने ।
- कृषि, वन विज्ञान एवम् अनुसन्धान क्षेत्रमा यस प्रविधिको माध्यमबाट बिरुवाहरुको जैविक रसायन अध्ययन गर्न सकिने ।

१२.२. चुनौतिहरु

तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट गुणस्तरीय बिरुवाहरु उत्पादन गरी व्यवसायिक कृषि तथा अन्य विभिन्न क्षेत्रमाहरुमा धेरै फाइदा लिन सके तापनि यस प्रविधिको वर्तमान अवस्थामा नेपालमा थुप्रै चुनौतिहरु पनि रहेका छन् ।

- प्रयोगशाला निर्माण, उपकरणहरु, रसायन खरिद आदि गर्न ठूलो लगानीको आवश्यकता पर्दछ । साथै संचानलको निम्ति प्राविधिक एवम् अन्य खर्चहरु परम्पारिक विधिहरुभन्दा खर्चिलो पर्न जान्छ ।
- नेपालमा विभिन्न सरकारी तथा निजी क्षेत्रहरुमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको संरचना निर्माण भई राख्दा विभिन्न त्रुटी भएको पाइन्छ जसले गर्दा सहज रुपमा काम गर्न र बिरुवाहरु उत्पादन गर्न थप चुनौति थपि दिन्छ । साथै तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको संरचना निर्माण गर्दा भौगोलिक अवस्था अनुसार निर्माण गर्नु पर्दछ । त्यसैले उचित मापदण्ड तोके अनुसार र सम्बन्धित विज्ञ व्यक्तिको सल्लाहमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको संरचना बन्नु पर्दछ ।
- यदि सानो मात्रामा बिरुवाहरु उत्पादनको लागि प्रयोगशालाको निर्माण गरी संचालन गर्दा अपेक्षाकृत लाभ लिन सकिन्न तसर्थ अपेक्षाकृत लाभ लिन ठूलो मात्रामा बिरुवाहरु उत्पादन गर्नुपर्दछ ।

- एमोनियम नाइट्रेट जुन चाहिँ बिरुवाहरुलाई अति आवश्यक मुख्य पोषक तत्व हो। बिरुवाहरुलाई यस्ता अति आवश्यक तथा अन्य रसायनहरु बजारमा नियमित रुपमा उपलब्ध नहुने कारणहरुले गर्दा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको व्यवस्था गर्न ठूलो चुनौति देखिन्छ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा बिरुवाहरु हुर्काउनको लागि उच्च शुद्धताका रसायानहरुको आवश्यकता पर्दछ, सानो त्रुटिले गर्दा अपेक्षित नतिजा नआउँन सक्छ।
- संचालनको लागि यस प्रविधि सम्बन्धित दक्ष प्राविधिक जनशक्िको आवश्यकता पर्दछ। वर्तमान अवस्थामा युवाहरु रोजगारीको लागि वैदेशिक गन्तव्य तिरको रोजाइले गर्दा दक्ष जनशक्ति पलायन भइ रहेको छ।
- बिरुवाहरुको प्रकृति अनुसार फरक फरक प्रटोकलहरु हुन्छन्। यी प्रोटकलहरु सहज रुपमा उपलब्ध नहुँदा प्रोटकल विकास गर्न समय लाग्ने हुन्छ।
- सरकारी कार्यालय अन्तर्गत रहेका तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरुमा प्राविधिकहरुको स्थायी दरबन्दी नहुनाले दीर्घकालीन संचालनको लागि थप चुनौति देखिन्छ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने जटिल उपकरणहरु जस्तै; हट एयर ओभन, LAF आदि जस्ता उपकरणहरु मर्मत गर्नु परेमा सो सम्बन्धित प्राविधिक पाउन कठिन हुन्छ।
- तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट अति आवश्यक फलफूल तथा बिरुवाहरुको उत्पादनमा एक रुपता ल्याउन निश्चित SOP नभएकोले इन भिट्रो माउबोटको स्रोत नखुलेको प्रयोग गर्दा गुणस्तरमा असर पर्न सक्दछ।
- नेपालमा आलुको पूर्व मुल बीउ उत्पादन गर्नको लागि कानुनी व्यवस्था भएता पनि अन्य बालीहरुको हकमा हालसम्म कुनै पनि कानुनी व्यवस्था नरहेकोले थप चुनौति देखिन्छ।
- पछिल्लो समयमा आयात बढदै जानु साथै अस्वस्थ प्रतिस्पर्धाले गर्दा तन्तु प्रजनन् बिरुवाहरुको नाममा न्यून गुणस्तर भएका बिरुवाहरु बजारमा उपलब्ध हुनु जसले गर्दा रोग, कीट वा अन्य अप्रत्याशित जोखिमहरुको आयात रोक्नको लागि प्रभावकारी नियमन गर्नुपर्ने देखिन्छ।
- इन भिट्रो कल्चर गर्दा हरेक चरणमा सुक्ष्म जीवहरुको संक्रमणको जोखिम तथा अन्य समस्याहरु माथि खण्ड १० मा भनिए अनुसार हुने हुन्छ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा काम गर्दा अनुशासन, नियमित अनुगमन, हेरचाह तथा धैर्यताको आवश्यकता पर्दछ।

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा पालना गर्नुपर्ने सुरक्षाका नियमहरु

- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको संरचना निर्माण गर्दा मापदण्ड तोके अनुसार तथा भूकम्प प्रतिरोधात्मक भएको हुनुपर्दछ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा अनिवार्य रुपमा अर्थीङ्ग प्रुफ तारहरु जडान गर्नु पर्दछ। त्यस्तै गरी प्रयोगशालाको आवश्यकता र क्षमता अनुसार वैकल्पिक उर्जाको व्यवस्था गर्नु पर्दछ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा काम गर्दा संक्रमण रोक्न सुरक्षात्मक पोशाकहरु जस्तै; ल्याव कोट, पन्जा, मास्क आदि प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा काम गर्ने स्थान र प्रयोग गरिने उपकरणहरुलाई कीटाणु निर्मलिकरण गरी प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला भित्र कुनै पनि प्रकारको खाने वस्तु, धुम्रपान, पिउने पदार्थहरु तथा आनावश्यक हो-हल्ला गर्नु हुदैन। अनुशासित तथा होसियार साथ काम गर्नुपर्दछ।
- विषाक्त रसायनहरुलाई विषाक्त ह्यान्डल गर्न मानक (standard) प्रक्रियाहरु पालना गर्नु पर्दछ। विषाक्त रसायनहरु जस्तैः फर्मलिन, मर्क्युरिक क्लोराइड, हाइड्रोक्लोरिक एसिड आदि रसायनहरुलाई सावधानीका साथ ह्यान्डलिङ गर्नुपर्छ साथै हातमा नाइट्राइल पन्जा र मुखमा मास्क लगाए मात्र काम गर्नु पर्दछ। यस्ता रसायनहरुलाई प्रोयोग गरी सकेपछि छुट्टै लेबल गरिएका उपयुक्त कन्टेनरहरुमा फ्याक्ने व्यवस्था मिलाउनु पर्दछ।
- संक्रमित भएको तन्तु मिडिया र अन्य तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग हुने वस्तुहरुलाई अटोक्लेभ गरी सुरक्षित स्थानमा फ्याक्ने व्यवस्थापन गर्नुपर्दछ।
- नयाँ तन्तु मिडिया बनाउँदा र संक्रमित भएको तन्तु मिडिया अटोक्लेभ गर्न एउटै अटोक्लेभको प्रयोग गर्नुहुदैन।
- फूटेको गिलास र प्रयोग गरिएको स्केलपेल ब्लेडहरु व्यक्तिगत चिन्हित कन्टेनरहरुमा फाल्नुपर्दछ।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने रसायनहरु र सोलुसनहरुलाई राम्ररी लेवल गरेर उपयुक्त तापक्रममा राख्नुपर्दछ।
- गम्भीर दुर्घटना भएको अवस्थामा र विषाक्त रसायनहरु पोखिएमा तुरुन्तै संम्बन्धित व्यक्तिलाई जानकारी गराउनु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा भएका कार्यहरुलाई नियमित रुपमा रेकर्ड गर्नुपर्दछ तथा प्रयोग गरिने उपकरणहरुको म्यानुअललाई सुरक्षित राख्नुपर्दछ।
- प्रयोगाशाला बाहिर लगाएको वस्तुहरु विशेषगरी जुत्ता, चप्पल, सेन्डल आदि लगाइ सौँभै प्रयोगशाला भित्र प्रवेश गर्नुहुदैन।
- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्राथमिक उपचार किटहरु र अग्नि नियन्त्रक उपकरणहरु सजिलै पहुच हुने ठाँउमा अनिवार्य रुपमा व्यवस्था गरिनु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने उपकरणहरुको नियमित रुपमा निरीक्षण गर्नुगर्दछ।

सन्दर्भ सामग्रीहरु

Bag, N., & Palni, L. M. S. (2019). *An Efficient Method for Acclimatization: in vitro Hardening of Tissue Culture- Raised Tea Plants (Camellia sinensis (l.) O. Kuntze) An efficient method for acclimatization: in vitro hardening of tissue culture-raised tea plants (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze)*. *July*. https://doi.org/10.18520/cs/v117/i2/288-293

Bhatia, S. (2015). Application of Plant Biotechnology. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00005-4

Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00006-6

Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Tissue Culture Science. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00004-2

Bhatia, S., & Sharma, K. (2015a). in Micropropagation. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00013-3

Bhatia, S., & Sharma, K. (2015b). Plant Tissue Culture-Based Industries. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00014-5

Bhatt, A., Kansal, S., Rajinder, Chauhan, S., & Sood, H. (2012). *International Journal of Plant Developmental Biology Low-cost Tissue Culture Procedures for Micropropagation of Apple Root Stocks*.

Binesh M. Sakha, Gyan P. Rai, Shambhu P. Dhital and Ram B. Nepal National Potato Research Programme-Nepal Agricultural Research Council, Khumaltar, Lalitpur, Nepal*. (2007). *8*.

Cellular, I. V., Olmos, E., National, S., Burgos, L., & National, S. (2016). *Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars*. *April*. https://doi.org/10.1079/IVP2000136

Chakrabarty, D., Park, S. Y., Ali, M. B., Shin, K. S., & Paek, K. Y. (2005). *Hyperhydricity in apple: ultrastuctural and physiological aspects*. 377–388.

Code, P., Description, P., & Control, Q. (1962). *Murashige and Skoog Macroelements*. 21–22.

Dobra, J., Magyar-ta, K., Teixeira, J. A., & Bulley, S. M. (2010). *The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple*. 251–267. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6

El-banna, A. N., El-mahrouk, M. E., Dewir, Y. H., Farid, M. A., Mahmoud, D., Elyazid, A., & Schumacher, H. M. (2021). *Endophytic Bacteria in Banana In Vitro Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival*. 1–13.

Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Mamgain, J., Syeed, R., & Zafar, N. (2020). Plant tissue culture: agriculture and industrial applications. In *Transgenic Technology Based Value Addition in Plant Biotechnology*. INC. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818632-9.00002-2

Hartmann, T. H., Kester, D. E., Davies,F.T., & Geneve, R.L. (2019). *Plant Propagation Principles and Practices.* India: Pearson India Education Services Pvt. Ltd.

Hussain, A., & Ullah, I. (2012). *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. *March 2016*. https://doi.org/10.5772/50568

Jackson, M. B., Abbott, A. J., Belcher, A. R., Hall, K. C., Butler, R., & Cameron, J. (2016). *Ventilation in Plant Tissue Cultures and Effects of Poor Aeration on Ethylene and Carbon Dioxide Accumulation, Oxygen Depletion and Explant Ventilation in Plant Tissue Cultures and Effects of Poor Aeration on Ethylene and Carbon Dioxide Accumulation, Oxygen Depletion and Explant Development*. *March 1991*. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088127

Joshi, B.K. (2017). Plant Breeding in Nepal: Past, Present and Future. Journal of Agriculture and forestry University

Karki, S., & Rizal, G . (2021). *Production and Regulation of Planting Materials of Horticultural Crops in Nepal*. *September*.

Mcnabola, S., & Kitto, S. L. (2016). *How-Io-Do-It Tissue Culture of Carrot Roots*. *51*(3), 165–167.

Methods, P., & Sterilization, O. F. (n.d.). *Sterilization and Disinfection*.

MoALD. (2023). Statistical Information on Nepalese Agriculture 2078/79 (2021/22). *MoALD*, 269. https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf

Moghadam, N. M., & Hamidi, H. (2017). *Investigating the Effects of Medium, Sterilization and Hormonal Treatment on Micropropagation of Some Apple (Mallus Domestica Borkh.) Rootstocks Abstract Background and Objectives Keywords: Apple, Rootstock, In vitro, Establishment and proliferatio*. *40*(1), 2017.

Nath, B., Jaime, H., Teixeira, A., & Akshay, S. (2006). *Effective Acclimatization of in Vitro Cultured Plants: Methods, Physiology and Genetics*. *October 2015* .

Oliya, Ba. (2023). Plant Tissue Culture Technology. National Center for Potato, Vegetable and Spice Crop Development. Kirtipur, Kathmandu.

Pradhan, S., Regmi, T., Ranjit, M., & Pant, B. (2016). Production of virus-free orchid Cymbidium aloifolium (L.) Sw. by various tissue culture techniques. *HLY*, *July*. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176

Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., & Doni, F. (2023). *Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in Musa sps. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives*. 1–16.

Pospíšilová, J., Tichá, I., Ek, P. K. Č., & Haisel, D. (1999). *Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions*. *42*(96), 481–497.

Processes, B. (n.d.). *1 . Tissue Culture Laboratory*.

Reddy, J. (2019). *Nutrient Media Used For Micropropagation Of Orchids: A World Journal of Pharmaceutical Research Nutrient Media Used For Micropropagation OF*. *February*. https://doi.org/10.20959/wjpr20169-7036

Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., & Saeed, T. (2017). *Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture Chapter 1 Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture* (Issue April 2022). https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5

Sharma, P. (n.d.). *On Plant Biotechnology Pusa Campus, New Delhi Training Manual on Genetic Fidelity Testing of Tissue Culture-Raised Plants Funded by BCIL-DBT*.

Shrivastava, N., & Sharma, S.K. (2019). Plant Tissue Culture, Animal Tissue Culture, Immunology (A loboraoty manual). Laxmi Publications Pvt. Ltd.

Singh, C. R. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, *11*(4), 165–172. https://doi.org/10.3923/ajbs.2018.165 .172

Singh, J., & Kumar, A. (2020). *Plant Tissue Culture and Its Application in Agriculture as Biotechnological Tool*. *11*, 274–284.

Singh, B.D. (2022). Plant Biotechnology. Scientific International Pvt. Ltd

Smith, R.H. (2013). Plant Tissue Culture Techniques & Experiments. Elsevier India Private Limited.

Subedi, G . D. (2023). *High Density Planting of apple in Nepal*. *April*.

Tefera, A. A. (2019). *Review on Application of Plant Tissue Culture in Plant Breeding* . *9*(3), 20–25 . https://doi.org/10.7176/JNSR

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, *37*(2), 169–180. https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3

Vitro, I., & Regeneration, P. (2020). *Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration*. 10–13.

Vivek, M., & Modgil, M. (2018). Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II .' *VirusDisease*. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0437-5

Ziv, M. (1991). *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants*. 45–46.

अनुसूची १

A.

तालिका ९: नेपालमा सरकारी मातहतमा रहेका तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरु

क्र.सं.	(PTC labs) नाम	ठेगाना	मुख्य कार्य	स्थापना
१	वनस्पती विभाग (DPR)	थापाथली, काठमाडौं	अनुसन्धान	वि.स. २०३२
२	राष्ट्रिय आलु अनुसन्धान कार्यक्रम- NARC	खुमलटार, ललितपुर	आलुको in vitro बिरुवा उत्पादन सम्बन्धित अनुसन्धान र PBS उत्पादन	वि.स. २०४६/४७
३	राष्ट्रिय जैविक प्रविधि अनुसन्धान केन्द्र (NBRC)	खुमलटार, ललितपुर	अनुसन्धान तथा उत्पादन	वि.स. २०७५
४	अलैंची विकास केन्द्र	फिक्कल, इलाम	अलैंचीको बिरुवा उत्पादन तथा अनुसन्धान	वि.स. २०७५
५	आलुबाली विकास केन्द्र	निगाले, सिन्धुपाल्चोक	PBS उत्पादन	वि.स. २०७७
६	समशितोष्ण बागवानी केन्द्र	कीर्तिपुर, काठमाडौं	समशीतोष्ण फलफूलहरुको बिरुवा उत्पादन तथा अनुसन्धान	वि.स. २०७६
७	शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र	मार्फा, मुस्ताङ	शीतोष्ण फलफूलहरुको बिरुवा उत्पादन तथा अनुसन्धान	वि.स. २०७८
९	सुन्तलाजात फलफूल विकास केन्द्र	तानसेन, पाल्पा	सुन्तला जात फलफूलहरुको बिरुवा उत्पादन तथा अनुसन्धान	वि.स. २०७८
१०	उष्ण प्रदेशीय बागवानी विकास केन्द्र	नवलपुर, सर्लाही	उष्ण फलफूलहरुको बिरुवा उत्पादन तथा अनुसन्धान	वि.स. २०७८
११	जैविक प्रविधि अनुसन्धान केन्द्र (NARC)	खुमलटार, ललितपुर	विभिन्न बालीहरुको तन्तु प्रजनन् सम्बन्धि अनुसन्धान	

B.

तालिका १०: बिरुवालाई आवश्यक विभिन्न पोषण तत्वहरुको भूमिका तथा तिनीहरुको यौगिक श्रोतहरु

पोषण तत्वहरु	भूमिका	यौगिक श्रोतहरु
नाइट्रोजन	एमिनो एसिड, प्रोटिन र भिटामिनहरुको संरचनात्मक घटकको कार्य गर्दछ।	KNO_3 NH_4NO_3 $Ca(NO_3)_2$
म्याग्नेसियम	क्लोरोफिल संरचनाको घटक हो।	$MgSO_4$
पोटासियम	ओस्मोटिक पोटेन्सियलको (osmotic potential) नियमन गर्दछ।	KNO_3
सल्फर	केही एमिनो एसिडको (methionine, cysteine) घटक र co–factors को कार्य गर्दछ।	$MgSO_4$ K_2SO_4

फस्फोरस	एमिनो एसिडहरुको घटक, ऊर्जा स्थानान्तरण, श्वासप्रश्वास र प्रकाश संश्लेषण मध्यवर्तीको घटक हो।	KH_2PO_4
क्याल्सियम	कोष भित्ताको (cell wall) संरचनात्मक घटक हो।	$CaCl_2$ $Ca(NO_3)_2$
फलाम	साइटोक्रोमको (cytochromes) एक घटकको रुपमा इलेक्ट्रोन स्थानान्तरणको कार्य गर्दछ।	$Na_2FeEDTA$
कपर	इन्जाइम कोफ्यकटर्सको कार्य गर्दछ र इलेक्ट्रोन स्थानान्तरण प्रतिक्रियामा सहभागी हुन्छ।	Cu_2SO_4
मोलिब्डेनम	इन्जाइम कोफ्यकटर्सको कार्य गर्दछ र नाईट्रेट देखि एमोनियममा रुपान्तरण प्रतिक्रियमा सहभागी हुन्छ।	Na_2MoO_4
बोरोन	विभिन्न इन्जाइम प्रक्रियाको गतिविधिमा आवश्यक पर्दछ।	H_3BO_3
क्लोरीन	प्रकाश संश्लेषणको लागि आवश्यक पर्दछ।	$CoCl_2$
म्यागनिज (Mn), जींक (Zn), कोबाल्ट (Co), निकल (Ni)	इन्जाइम प्रक्रियामा कोफ्यकटर्सको कार्य गर्दछन्।	$MnSO_4$ $ZnSO_4$ $CoCl_2$ $NiCl_26H_2O$

C.

तालिका ११: Callus initiation / Embryogenesis media

Components (/Liter)	Callus Initiation Media	Embryogenesis Media
Sucrose (g)	20.0	20.0
MS salts (Murashige and Skoog 1962) (g)	4.3	4.3
Myo-inositol (Mg)	100.3	100.3
Pyrodoxine HCl (Mg)	0.3	0.5
Thiamine HCl (Mg)	0.4	0.4
Nicotinic acid (Mg)	0.5	0.5
2,4 dichlorophenoxyacetic acid (Mg)	1.0	0.0
Bacto agar	10.0	10.0
pH (g)	5.7-5.8	5.7-5.8

अनुसूची २

तालिका १२: तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने विभिन्न प्रकारका हर्मोनहरु

A. Auxins

Hormone Names	Molar Equivalence				Solution Preparation			
	Mol. Wt.	µM for 1 mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Sterilization*	Working Conc.(mg/L)
p-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)	186.6	5.36	EtOH	—	RT	2-8 °C	CA	0.1-10.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	221	4.53	—	—	RT	2-8 °C	CA	0.01-6.0
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	175.2	5.71	EtOH/1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid Sodium salt	197.2	5.07	Water	Water	2-8 °C	-0 °C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetyl-L-aspartic acid	290.3	3.45	0.5N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	F	0.01-5.0
Indole-3-butyric acid (IBA)	203.2	4.90	EtOH/1N NaOH	Water	2-8 °C	-0 °C	CA/F	0.1-10.0
alpha-Naphthaleneacetic acid Free acid (NAA)	186.2	5.37	1N NaOH	Water	RT	2-8 °C	CA	0.1-10.0
Phenylacetic acid (PAA)	136.2	7.34	EtOH	—	RT	2-8 °C	CA/F	0.1-50.0
Picloram	241.5	4.14	DMSO	—	RT	2-8 °C	CA	0.01-10.0
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	255.5	3.91	EtOH	—	RT	2-8 °C	CA	0.01-5.0
2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid (TIBA)	499.8	2.00	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	F	0.05-5.0

B. Cytokinins

Hormone Names	Molar Equivalence				Solution Preparation			
	Mol. Wt.	µM for 1 mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Sterilization*	Working Conc. (mg/L)
6-Benzylaminopurine (BA)	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8 °C	CA/F	0.1-5.0
N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (BPA)	309.4	3.23	EtOH	—	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.1-5.0
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU)	247.7	4.04	DMSO	—	2-8 °C	2-8 °C	F	0.001-1.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	CA/F	1.0-30.0
1,3-Diphenylurea (DPU)	212.3	4.71	DMSO	—	RT	2-8 °C	F	0.1-1.0
Kinetin	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.1-5.0
1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea	220.2	4.54	DMSO	—	RT	2-8 °C	CA/F	0.001-0.05

Zeatin	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin Hydrochloride	255.7	3.91	Water	—	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin riboside	351.4	2.85	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	F	0.01-5.0

C. Miscellaneous Plant Growth Regulators

Hormone Names	Molar Equivalence				Solution Preparation			
	Mol. Wt.	µM for 1 mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz–ation*	Working Conc. (mg/L)
(±)-cis,trans-Abscisic acid (ABA)	264.3	3.78	1N NaOH	Water	-0 °C	-0 °C	CA/F	0.1-10.0
Ancymidol	256.3	3.90	DMSO	—	2-8 °C	-0 °C	CA/F	1.0-10.0
Chlorocholine chloride (CCC)	158.1	6.33	Water	—	RT	2-8 °C	F	up to 500
3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dicamba)	221.0	4.52	EtOH/Water	—	2-8 °C	2-8 °C	F	0.01-10.0
Gibberellic acid (GA3)	346.4	2.89	EtOH	—	RT	2-8 °C	CA/F	0.01-5.0
(±)-Jasmonic acid	210.3	4.76	EtOH	—	2-8 °C	-0 °C	F	0.01-100.0
Phloroglucinol	126.1	7.93	Water	—	RT	2-8 °C	CA/F	up to 162

*Mol. Wt.= Molecular weight, *µM= Micro molar

***CA** = coautoclavable with other media components. **F** = filter sterlize. **CA/F** = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration.

अनुसूची ३

उपयोगी मापन तालिका

नाप

१ से.मी. =१०,००० माईक्रो मी.	१ इन्च = २.५४ से. मी.
१ से.मी. =१० मी.म.	१ फिट = ३०.४८ से. मी.
१ मी. = १०० से.मी.	१ माईल = १७६० गज
१ कि.मी. = १००० मी.	माईल = १.६०९३४४ कि.मी.

तौल

१ ग्राम = १००० मीली ग्राम	१ किलो ग्राम = २.२ पाउण्ड
१ किलो ग्राम = १००० ग्राम	१ मन = ३६.३२ किलो ग्राम
१ क्विन्टल = १०० किलो ग्राम	१ धार्नी = ५ पाउण्ड
१ टन = १००० किलो ग्राम	१ पाउण्ड = १६ औंस

आयातन

१ मी.ली. = १००० माईक्रो लीटर	१ ग्यालन = ३.७८५४१ लीटर
१ मी.ली. = १००० क्युविक मीली मीटर	१ पाथी = ८ माना
१ लीटर = १००० मी.ली.	१ मुरी = २० पाथी

क्षेत्रफल

१ वर्ग मीटर = १०.७६ वर्ग फीट	१ रोपनी = १६ आना
१ वर्ग फीट = ९२९.०३ वर्ग से.मी.	१ रोपनी = ५०८.५ वर्ग मीटर
१ हेक्टर = १००० वर्ग मीटर	१ आना = १६ दाम
१ हेक्टर = ३० कठ्ठा	१ विघा = २० कठ्ठा
१ हेक्टर = २.४७ एकर	१ हेक्टर = १.४२ विघा
१ हेक्टर = ८ रोपनी	१ कठ्डा = २० धुर

तापमान

३२°F = ०°C	८०°F = २७°C
५०°F = १०°C	८६°F = ३०°C
६८°F = २०°C	२१२°F = १००°C

दबाब

१ PSI (Pound per square inch) = ६८९४.७६ Pa (पासकल)

१ KPa (किलो पासकल) = १००० Pa

कन्सन्ट्रेसन

१ M (मोलर) = १००० mM (मीली मोलर)

१ mM (मीली मोलर) = १००० µM (माईक्रो मोलर)

१ ppm = १mg/१kg = १mg/लीटर H_2O

Number of moles = weight in grams/molecular weight

अनुसूची ४

शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ्गमा रहेको तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला तथा विभिन्न कार्यहरु भई रहेका केही झलकहरु

(A) र (B) तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाको भवन

(C) मीडिया बनाउदै र (D) बिरुवा नमूनाबाट कल्चर गरिन्दै

(E) बिरुवा हुर्काउने कोठामा उत्पादन गरिएका बिरुवाहरु

(F) इन भिट्रो बिरुवाहरुलाई प्राइभरी हाईनिङ्, सेकेन्डरी हाईनिङ् र फिल्डमा स्थानान्तरण गरिएको

(G)

(G) मुस्ताङ्ग स्थानीय आलुको पूर्व मुल बीउ उत्पादन गरिएको