तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा स्याउ रुटस्टक उत्पादन

A Manual Book for

Apple Rootstock Production Through Micropropagation

नेपाल सरकार
कृषि तथा पशुपन्छी विकास मन्त्रालय
कृषि विभाग
राष्ट्रिय फलफूल विकास केन्द्र
शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र
मार्फा, मुस्ताङ
२०८२

तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा स्याउ रूटस्टक उत्पादन

A Manual Book for

Apple Rootstock Production Through Micropropagation

नेपाल सरकार
कृषि तथा पशुपन्छी विकास मन्त्रालय
कृषि विभाग
राष्ट्रिय फलफूल विकास केन्द्र
शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र
मार्फा, मुस्ताङ
२०८२

प्रकाशक

नेपाल सरकार
कृषि तथा पशुपन्छी विकास मन्त्रालय
कृषि विभाग
राष्ट्रिय फलफूल विकास केन्द्र
शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र
मार्फा, मुस्ताङ
२०८२

दुई शब्द

नेपालको हिमाली तथा उच्चपहाडी क्षेत्रहरूमा शीतोष्ण फलफूल खेतीको सम्भावना अत्यन्तै व्यापक रहेको सन्दर्भमा स्याउ खेतीले विशेष स्थान ओगटेको छ। पछिल्ला वर्षहरूमा विशेष गरी मुस्ताङ जिल्लामा उच्च घनत्व उत्पादन (High Density Plantation-HDP) प्रविधिको विस्तारसँगै स्याउ खेतीमा गुणस्तर, उत्पादन र व्यावसायिकताको नयाँ आयाम थपिएको छ। यद्यपि, यस प्रविधिको प्रभावकारी कार्यान्वयनका लागि आवश्यक पर्ने गुणस्तरीय र प्रमाणित रुटस्टक तथा सायन बिरुवाको अभाव अझै पनि प्रमुख चुनौतीका रूपमा रहेको छ।

यस्तो अवस्थामा तन्तु प्रजनन् प्रविधि स्याउका रोगमुक्त, एकरूप र उच्च गुणस्तरीय बिरुवाहरू द्रुत गतिमा उत्पादन गर्ने एक विश्वासनीय तथा वैज्ञानिक उपायका रूपमा स्थापित भएको छ। यस प्रविधिको माध्यमबाट उत्पादित पुड्के रुटस्टकहरूले HDP प्रणालीलाई थप सुदृढ बनाउन महत्त्वपूर्ण योगदान पुर्‍याउने विश्वास लिइएको छ।

यस म्यानुअलले प्रयोगशालामा तन्तु नमुना स्थापना, बहुगुण, जरा विकासदेखि नर्सरी व्यवस्थापन सम्मका सम्पूर्ण प्राविधिक पक्षहरूलाई सरल, व्यवस्थित र व्यवहारिक रूपमा समेटेको छ। यसले नेपालका विभिन्न सरकारी तथा निजी तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालाहरूबीच प्रविधिगत एकरूपता कायम गर्न तथा गुणस्तरीय बिरुवा उत्पादनमा मार्गदर्शन प्रदान गर्न महत्त्वपूर्ण भूमिका खेल्ने अपेक्षा गरिएको छ। यस म्यानुअलको तयारीमा विभिन्न अनुसन्धानमूलक प्रकाशनहरू, विज्ञहरूको अनुभव तथा व्यवहारिक ज्ञानलाई समेटिएको छ, जसले यसलाई अझ उपयोगी र सान्दर्भिक बनाएको छ।

अन्त्यमा, यस महत्त्वपूर्ण कार्यको सफलताका लागि योगदान पुर्‍याउनु हुने जैविक प्रविधि प्राविधिक अधिकृत श्री अशोक लिम्बु र जैविक प्रविधि प्राविधिक सहायक श्री सन्धिया खत्री लगायत सम्पूर्ण कर्मचारीप्रति हार्दिक आभार व्यक्त गर्दछु। तन्तु प्रजनन् क्षेत्रमा कार्यरत प्राविधिकहरू, अनुसन्धानकर्ताहरू, विद्यार्थीहरू, उद्यमीहरू तथा कृषकहरूका लागि यो पुस्तक एक महत्त्वपूर्ण सन्दर्भ सामग्री बन्नेमा हामी विश्वास्त छौं।

प्रकाश पन्थ
शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र
मार्फा, मुस्ताङ
बैशाख, २०८२

हाम्रो भनाई

नेपालको हिमाली क्षेत्रमा खेती गरिने प्रमुख शीतोष्ण पात झर्ने फलफूलमध्ये स्याउ एक प्रमुख एवम् लोकप्रिय फलफूल हो। बढी उत्पादकत्व, गुणस्तरीय फल, छिटो उत्पादन तथा राम्रो आर्थिक प्रतिफल दिने कारणहरूले गर्दा विगत केहि वर्ष यता नेपालमा स्याउ खेती, विशेष गरी मुस्ताङ र मनाङ जिल्लाहरूमा स्याउको उच्च घनत्व उत्पादन (HDP) प्रविधि प्रणालीतर्फ उल्लेखनीय परिवर्तन भइरहेको छ। तर व्यावसायिक रूपमा उक्त HDP विस्तार गर्न चाहिने गुणस्तरीय बिरुवाहरू पर्याप्त मात्रामा उपलब्ध नहुनु तथा अन्य प्राविधिक चुनौतीहरूले गर्दा नेपालको स्याउ उत्पादनलाई अवरोध गरिरहेको छ, यद्यपि सम्भावना भने ठूलो रहेको छ। तसर्थ यस चुनौतीलाई समाधान गर्न यहाँको हावा पानीमा सुहाउँदो गुणस्तरिय स्याउका पुड्के रुटस्टक बिरुवाहरू पर्याप्त मात्रामा उत्पादन गर्नुपर्ने देखिन्छ। उक्त स्याउका गुणस्तरिय पुड्के रुटस्टक एवम् सायन बिरुवाहरू द्रुत गतिमा एकै नासका बिरुवाहरू धेरै सङ्ख्यामा उत्पादन गर्न र बिरुवाबाट भाइरस रोग उन्मुलन गर्न तन्तु प्रजनन् प्रविधिलाई उत्तम मानिन्छ।

यो पुस्तक विशेष गरी तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा प्रभावकारी रूपमा स्याउ रुटस्टक बिरुवा उत्पादन गर्न आवश्यक पर्ने प्रयोगशालामा तन्तु नमुना स्थापनादेखि नर्सरी व्यवस्थापनसम्मका सम्पूर्ण प्राविधिक पक्षलाई मध्यनजर राख्दै यो पुस्तक तयार पारिएको छ। नेपालमा रहेका विभिन्न सरकारी एवम् निजी तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालहरूमा स्याउ रुटस्टक बिरुवा उत्पादन गर्न एकरूपता कायम राख्न पनि यस पुस्तकले ठूलो सहयोग पुर्याउने छ।

यस पुस्तक विभिन्न अध्ययन अनुसन्धान संस्थाहरूबाट प्रकाशित लेखहरू, किताबहरू, तन्तु प्रजनन् प्रविधिमा संलग्न विज्ञहरू तथा आफ्नो अनुभवलाई समेत समेटेर तयार गरिएको छ। यो पुस्तक तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा संलग्न प्राविधिकहरू, अनुसन्धानकर्ताहरू, विद्यार्थीहरू, व्यावसायिकहरू, कृषकहरू तथा यस सम्बन्धित सम्पूर्ण सरोकारवालाहरूलाई उपयोगी हुने विश्वास लिएका छौं। यस पुस्तकमा भएका त्रुटी एवम् कमि कमजोरीहरूलाई सकारात्मक रूपमा औंल्याई दिनु भएको खण्डमा यहाँहरूप्रति आभारी हुनेछौं।

यस पुस्तक लेखन कार्यमा अमूल्य सुझाव र सहयोग गर्नु हुने वरिष्ठ बागवानी अधिकृत, श्री प्रकाश पन्थज्यू तथा शीतोष्ण बागवानी केन्द्रका सम्पूर्ण कर्मचारीहरूका साथसाथै प्रत्यक्ष अप्रत्यक्ष रूपमा सहयोग गर्नुहुने सम्पूर्णप्रति हार्दिक आभार प्रकट गर्न चाहान्छौं।

शन्धिया खत्री
प्राविधिक सहायक
(जैविक प्रविधि)

अशोक लिम्बु
प्राविधिक अधिकृत
(जैविक प्रविधि)

विषय सूची (Table of Content)

क्र.सं.	शीर्षक	पृष्ठ
खण्ड १	**परिचय (Introduction)**	१
	१.१. मिडिया तथा आवश्यक रसायन (Media and Required Chemicals)	१
खण्ड २	**बिरुवा उत्पादन गर्ने प्रक्रिया (Process of Production)**	४
	२.१. मिडिया तयारी (Media Preparation)	४
	२.२. नमुना सङ्कलन (Explant Collection)	७
	२.३. एक्सप्लान्ट कल्चर गर्ने तरिका (Process of Culture)	९
	२.४. सब-कल्चर (Sub-Culture)	१०
	२.५. रुटिङ (Rooting)	११
	२.६. प्राइमरी हार्डेनिङ (Primary Hardening)	११
	२.७. सेकेन्डरी हार्डेनिङ (Secondary Hardening)	११
	२.८. फिल्डमा रोप्ने (Field Transfer)	१४
खण्ड ३	**स्याउ रुटस्टक उत्पादन गर्दा देखिने मुख्य समस्याहरू र तिनीहरूको निवारण Major Problems in Apple Production and their Management**	१६
	३.१. सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण (Microbial Contaminants)	१६
	३.२. बिरुवाको टुप्पो मर्ने (Shoot Tip Necrosis)	१७
	३.३. मिडिया र एक्सप्लान्टको ब्राउनिङ (Browning of Media and Explant)	१८
	३.४. हाइपरहाइड्रिसिटी/भिट्रिफिकेशन (Hyperhydricity/ Vitrification)	१८
	३.५. सोमाक्लोनल भिन्नता (Somaclonal Variation)	१९
	३.६. अनुकूलन गर्दा बिरुवा आघात भई मर्ने (Transplant Shock)	२०
	३.७. सेतो भुवादार लाही कीरा (Apple Woolly Aphid)	२१
	३.८. सेतो धुले ढुसी रोग (Powdery Mildew)	२२

क्र.सं.	शीर्षक	पृष्ठ
	३.९. रातो सुलसुले (Red Spider Mite)	२३
	३.१०. फेद र जरा कुहिने रोग (Collar and Root Rot)	२४
	३.११. पात बेर्ने कीरा (Leaf Roller)	२५
	३.१२. खुम्रे कीरा (White grub)	२६
खण्ड ४	**तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा स्याउ रुटस्टक उत्पादनको लागि मासिक कार्यतालिका Monthly Work Schedule for Apple Rootstock Production Through Tissue Culture**	२७
	४.१. बैशाख (April/May)	२७
	४.२. जेठ (May/June)	२७
	४.३. असार (June/July)	२८
	४.४. साउन (July/August)	२८
	४.५. भदौ (August/September)	२९
	४.६. असोज (September/October)	२९
	४.७. कार्तिक (October/November)	२९
	४.८. मङ्सिर (November/December)	३०
	४.९. पुस (December/January)	३०
	४.१०. माघ (January/February)	३१
	४.११. फागुन (February/March)	३१
	४.१२. चैत (March/April)	३१
	अनुसूची	३२
	सन्दर्भ सामग्रीहरू (References)	३२

खण्ड १ परिचय

नेपालको हिमाली क्षेत्रमा खेती गरिने प्रमुख शीतोष्ण पात झर्ने फलफूलमध्ये स्याउ (*Malus domestica Borkh.*) एक हो। आर्थिक वर्ष २०८०/८१ को तथ्याङ्क अनुसार नेपालमा स्याउले फलफूल उत्पादनको करिब ३.६% योगदान पुर्‍याउनुका साथै फलफूल खेती क्षेत्रको ६.९% हिस्सा ओगटेको छ (MoALD, 2025)। सामान्यतया, व्यावसायिक खेती गर्नको लागि स्याउका बिरुवाहरू उत्पादन गर्न सायन रुटस्टकमा ग्राफ्ट गरिएको हुन्छ। रुटस्टकहरूले विभिन्न वातावरणीय अवस्थासँग अनुकूलन, वृद्धि तथा विकासलाई नियमन गर्ने र प्रतिकूल अवस्थाको सामना गर्ने क्षमता प्रदान गर्दछ। त्यसैले आधुनिक व्यावसायिक स्याउ खेती जस्तैः उच्च घनत्व स्याउ खेती प्रणालीका लागि पुड्के जातका रुटस्टकहरू जस्तैः M9, M27, G16 आदि आवश्यक पर्दछ।

हाल नेपालमा व्यावसायिक उच्च घनत्व स्याउ खेती प्रणालीको लागि चाहिने आवश्यक बिरुवाहरू पर्याप्त मात्रामा उपलब्ध नहुनु तथा अन्य चुनौतीहरूले गर्दा नेपालको स्याउ उत्पादनलाई अवरोध गरिरहेको छ, यद्यपि सम्भावना ठूलो रहेको छ। परम्परागत बिरुवा प्रसारण विधिहरू, जस्तै बीउ, हाँगा काट्ने, एयर लेयरिङ आदिमार्फत प्रसारण ढिलो हुने, सीमित गुणन दर हुने, मौसमी प्रतिवन्धमा पर्ने, आनुवंशिक रूपमा एकनासका रुटस्टक उत्पादन गराउन कठिन हुने आदि समस्याहरूले गर्दा आवश्यक माग भए अनुरूप गुणस्तरीय बिरुवा उत्पादन गर्न कठिन हुन्छ। यस्तो अवस्थामा बिरुवा प्रसारणको लागि परम्परागत विधिहरूको विकल्पमा तन्तु प्रजनन् प्रविधि (माइक्रोप्रोपागेसन) एक उत्तम प्रविधि हो।

तन्तु प्रजनन् प्रविधिको आधारभूत अवधारणा भनेको द्रुत गतिका साथ धेरै सङ्ख्यामा आनुवंशिक रूपमा माउबोटमा भएका गुणहरू एवम् गुणस्तर कायम गरी बिरुवाहरू उत्पादन गर्नु हो। यो उद्देश्यको लागि कुनै पनि वानस्पतिक भागहरूको कोष वा सानो तन्तु नमुना (Explant) को प्रयोग गरिन्छ र यसलाई नियन्त्रित कृत्रिम अवस्थामा सुक्ष्म जीवहरू सङ्क्रमण नहुने गरी वृद्धि र विकास गराइन्छ। यो प्रविधि पूर्ण सक्तता (Totipotency) र प्लास्टिसिटी (Plasticity) सिद्धान्तमा आधारित रहेको हुन्छ।

१.१. मिडिया तथा आवश्यक रसायन

तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा स्याउ रुटस्टक बिरुवा उत्पादनको लागि विभिन्न मिडिया प्रयोग गर्न सकिन्छ। यहाँ विशेष गरी M9 र MM111 स्याउ रुटस्टकका लागि MS (Murashige and Skoog) मिडिया र WPM (Woody Plant Medium) मिडियाको प्रयोगबारे उल्लेख गरिएको छ। यी मिडिया बनाउनलाई आवश्यक रसायानहरू तालिका १ मा निम्न अनुसार दिइएको छ।

तालिका १: MS मिडिया र WPM मिडिया बनाउन आवश्यक रसायानहरू

क्र.सं.	रसायनिक	मात्रा (मिलिग्राम प्रतिलिटरमा)	
		MS	WPM
(क)	**मुख्य पोषक तत्वहरू**		
१	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	१६५०	४००
२	Potassium nitrate (KNO_3)	१९००	-
३	Potassium dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	१७०	१७०
४	Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO4.7H_2O) or, Magnesium sulphate ($MgSO_4$)	३७०	३७०
		१८०.54	-
६	Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)	-	-
७	Calcium chloride ($CaCl_2$) or, Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	३३२.०२	-
		४४०	९६
८	Potassium sulphate (K_2SO_4)	-	९९०
९	Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_24H_2O$)	-	५५६
१०	Sodium phosphate monobasic monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$)	-	-
(ख)	**सुक्ष्म पोषक तत्वहरू**		
१	Boric acid (H_3BO_3)	६.२	४.८
२	Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$)	१६.९	३३.५
	वा Manganese sulphate tetrahydrate ($MnSO_44H_2O$)	२२.३	-
३	Zinc sulphate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	८.६	८.६
४	Potassium iodide (KI)	०.८३	-
५	Cobalt chloride hexahydrate ($CoCl_26H_2O$)	०.०२५	-
६	Copper sulphate pentahydrate ($CuSO_45H_2O$)	०.०२५	०.२५
७	Sodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)		०.२५

क्र.सं.	रसायनिक	मात्रा (मिलिग्राम प्रतिलिटरमा)	
		MS	WPM
(ग)	आईरन		
१	Disodium ethylenediaminetetraacetic acid Na_2EDTA	३७.३	३७.३
२	Iron sulphate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	२७.८	२७.८
(घ)	भिटामिनहरू		
१	Thiamine.HCl	०.१	१.६
२	Pyridoxine.HCl	०.५	-
३	Nicotinic acid	०.५	०.५
४	Glycine (Amino acid)	२.०	-
(ङ)	अन्य		
१	Inositol	१००.०	१००
२	GA3	०.२५	-
३	Sucrose	३%	२%
४	Agar	०.८%	-
५	Folic acid	-	-
६	Biotin	-	
७	pH	५.८	५.६

तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा हर्मोनहरूको रूपमा साईटोकाईनिन, अक्जीन र जिबेरेलिन (GA_3) को प्रयोग महत्त्वपूर्ण हुन्छ। यी हर्मोनहरूको मात्रा बिरुवाहरूको प्रकृति अनुसार माथि दिइएका MS र WPS मिडियामा प्रयोग गर्नु पर्दछ।

खण्ड २ बिरुवा उत्पादन गर्ने प्रक्रिया

तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा स्याउ रुटस्टक बिरुवा उत्पादन गर्न विभिन्न चरणमा कार्य गर्नु पर्दछ। यी विभिन्न चरणका प्रक्रियाहरू क्रमिक एवम् विधिगत रूपमा उल्लेख गरिएको छ।

२.१. मिडिया तयारी

MS मिडिया र WPM मिडिया बनाउनलाई आवश्यक रसायानहरू तालिका १ मा दिए अनुसार प्रतिलिटर एवम् आवश्यकता अनुसारको स्टकहरू तयार गर्नु पर्दछ। यी दुवै मिडिया तयार गर्नको लागि एकै प्रकारका विधि रहेता पनि रसायनहरू र यीनका मात्राहरू भने केही फरक हुन्छन्। इन-भिट्रो बिरुवा स्थापनादेखि जरा विकास गरिने चरणसम्म दुवै प्रकारका मिडियामा हर्मोनहरू जस्तैः साईटोकाईनिन, अक्जीनले र GA3 को मात्रा आवश्यकता अनुसार प्रयोग गर्न सकिन्छ। एक्सप्लान्टलाई कल्चर गर्न विशेष गरी तीन प्रकारको अर्ध-ठोस मिडियाहरू क्रमिक रूपमा तयार गरिन्छ। इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना गर्न सर्वप्रथम स्थापना मिडिया तयार गरिन्छ, त्यसपछि इन-भिट्रो बिरुवाको सङ्ख्या वृद्धि गर्न मल्टिप्लिकेसन मिडिया र जरा विकास गराउन रुटिङ मिडिया तयार गरिन्छ।

(क) एक्सप्लान्टलाई आँख्ला कल्चरद्वारा इनभिट्रो बिरुवा स्थापनाको लागि यहाँ १ लिटर MS तथा WPM स्थापना मिडिया बनाउने सामान्य तरिका निम्न बुँदाहरूमा उल्लेख गरिएको छ।

- एक लिटरको beaker मा आधा वा दुई तिहाई double distilled पानी राख्ने।
- त्यसपछि, तालिका १ मा दिए अनुसार रसायनहरूको १०X मुख्य पोषक तत्वहरू, १००X $CaCl_2$ वा $CaCl_2 2H_2O$, १०००X सुक्ष्म पोषक तत्वहरू, १००X फलामको स्रोत र १०००X भिटामिनहरूको स्टक सोलुसन बनाउने र क्रमिक अनुसार १००, १०, १, १० र १ मि.लि. measuring cylinder र पिपेटको सहायताले मापन गरी आधा वा दुई तिहाई डिस्टिल पानी राखेको beaker मा थप्दै जाने र राम्ररी घोल्ने।
- तालिका १ मा उल्लेखित मिडियाको प्रकार अनुसार सुक्रोज वजन गरी beaker मा भएको सोलुसनमा थप्ने र चुम्बकीय स्टेरियरको सहायताबाट राम्ररी घोल्ने।
- ०.१ ग्रा./लि. मायो-इनोसिटोल वा मेसो-इनोसिटोल जोखी माथि बनाएको सोलुसनमा हालेर घोल्ने।
- आवश्यकता अनुसार MS मिडिया वा WPM मिडियामा उचित साईटोकाईनिन र अक्जीनको मात्रा प्रयोग गर्नु पर्दछ। स्याउको इन-भिट्रो स्थापनाको लागि उक्त मिडियामा १-२ मि.ग्रा./लि. BAP, ०.२५ मि.ग्रा./लि. GA_3, १०० मि.ग्रा./लि. इनोसिटोल प्रयोग गर्नाले राम्रो परिणाम देखाएको पाइयो (स्रोत: शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ)।

- उक्त सोलुसनको मिश्रणमा डिस्टिल पानी थपेर लगभग ९९५ मि.लि. 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।
- ६ देखि ८ ग्राम अगार मिडियामा हाली राम्रोसँग चलाउँदै घुलाउनु पर्दछ।
- त्यसपछि, ३० देखि ५० मि.लि. मिडियालाई कल्चर जार अथवा १० देखि २० मि.लि. मिडियालाई कल्चर ट्यूवमा खन्याई बिर्को लगाउने।
- त्यसपछि, १२१ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा र १५ psi दवावमा मिडियालाई १५ मिनेट अटोक्लेभ गरी कीटाणु नष्ट गर्ने।
- मिडिया अटोक्लेभ गरी सकेपछि मिडियालाई हप्ता दिनसम्म भण्डारण गरी बिरुवा कल्चर गर्नु राम्रो हुन्छ। यसो गर्दा मिडियामा सङ्क्रमण भएको वा नभएको भन्ने पहिचान गर्न सकिन्छ।

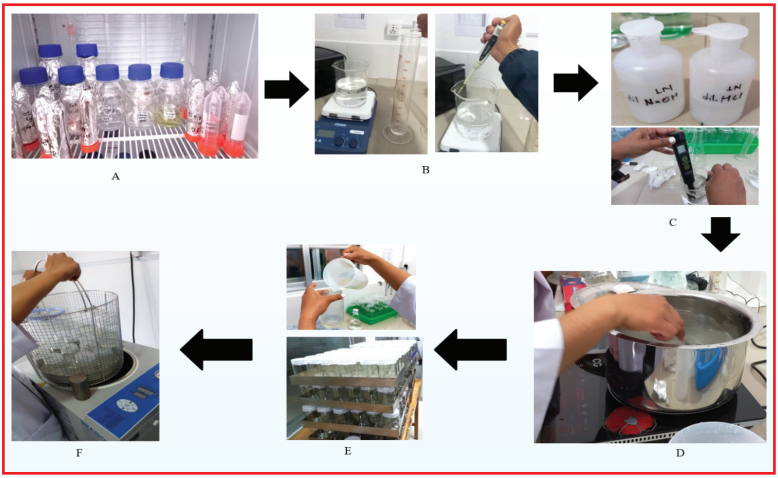
(ख) १ लिटर MS तथा WPM मल्टिप्लिकेसन मिडिया बनाउने तरिका

इनभिट्रो स्थापना भएका स्याउ बिरुवाको सङ्ख्या वृद्धि गर्नका लागि अलगै मिडिया तयार पारिन्छ जसलाई मल्टिप्लिकेसन मिडिया भनिन्छ। यो मिडिया स्थापना चरणमा प्रयोग गरिएको मिडियाको पोषक तत्वहरू र यिनका मात्रा उस्तैनै हुन्छन् तर हर्मोनहरूको अनुपात भने फरक हुन्छन्। यस मिडियामा साईटोकाईनिन र थोरै मात्रामा अक्जीन पनि मिसाएर प्रयोग गरिन्छ। स्याउको मल्टिप्लिकेसन मिडियाको लागि मिडियामा १-२ मि.ग्रा./लि. BAP, ०.१ मि.ग्रा./लि. IBA, १.० मि.ग्रा./लि. GA_3, १०० मि.ग्रा./लि. इनोसिटोल प्रयोग गर्नाले राम्रो परिणाम देखाएको पाइयो (स्रोत: शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ)।

(ग) १ लिटर MS तथा WPM रुटिङ मिडिया बनाउने तरिका

- एक लिटरको beaker मा आधा वा दुई तिहाई double distilled पानी राख्ने।
- त्यसपछि, तालिका १ मा दिए अनुसार रसायनहरूको १०X मुख्य पोषक तत्वहरू, १००X $CaCl_2$ वा $CaCl_2 2H_2O$, १०००X सुक्ष्म पोषक तत्वहरू, १००X फलामको स्रोत र १०००X भिटामिनहरूको स्टक सोलुसन बनाउने र क्रमिक अनुसार ५०, ५, ०.५, ५ र ०.५ मि.लि. measuring cylinder र पिपेटको सहायताले नापन गरी आधा वा दुई तिहाई डिस्टिल पानी राखेको beaker मा थप्दै जाने र राम्ररी घोल्ने।
- तालिका १ मा उल्लेखित मिडियाको प्रकार अनुसार सुक्रोज १/२ भाग वजन गरी beaker मा भएको सोलुसनमा थप्ने र चुम्बकीय स्टेरियरको सहायताबाट राम्ररी घोल्ने।
- ०.०५ ग्रा./लि. मायो-इनोसिटोल वा मेसो-इनोसिटोल जोखि माथि बनाएको सोलुसनमा हालेर घोल्ने।

- आवश्यकता अनुसार MS मिडिया वा WPM मिडियामा उचित अक्जीनको मात्रा प्रयोग गर्नु पर्दछ। स्याउको इन-भिट्रो रुटिङ गराउनको लागि उक्त मिडियामा ०.१ मि.ग्रा./लि. IBA वा NAA प्रयोग गर्नाले राम्रो परिणाम देखाएको पाइयो (स्रोत: शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ)।
- उक्त सोलुसनको मिश्रणमा डिस्टिल पानी थपेर लगभग ९९५ मि.लि. 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।
- ८ ग्राम अगार मिडियामा हाली राम्रोसँग चलाउँदै घुलाउनु पर्दछ।
- त्यसपछि, ३० देखि ५० मि.लि. मिडियालाई कल्चर जार, इर्लेनमेयर फ्लास्क आदिमा खन्याई बिर्को लगाउने।
- त्यसपछि, १२१ डिग्री सेल्सियस तापक्रममा र १५ psi दवावमा मिडियालाई १५ मिनेट अटोक्लेभ गरी कीटाणु नष्ट गर्ने।
- मिडिया अटोक्लेभ गरिसकेपछि मिडियालाई हप्ता दिनसम्म भण्डारण गरी बिरुवा कल्चर गर्नु राम्रो हुन्छ। यसो गर्दा मिडियामा सङ्क्रमण भएको वा नभएको भन्ने पहिचान गर्न सकिन्छ।



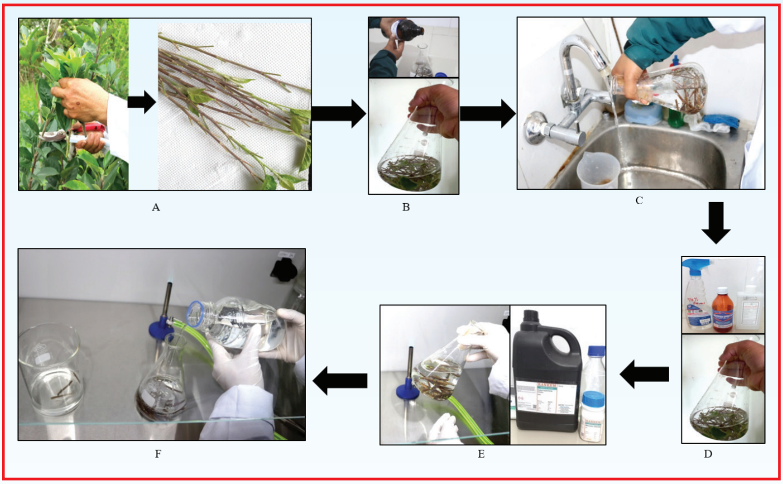
चित्र १: तयार गरिएको MS स्टक सोलुसनबाट १ लिटर मिडिया बनाउने तरिका (A) स्टक सोलुसन, (B) आवश्यक मात्रामा स्टक सोलुसन लिने, (C) पीएच सन्तुलन मिलाउने र डिस्टिल पानी थपी आवश्यक मात्राको मिडिया बनाउने, (D) जेलिङ्ग एजेन्ट मिडियामा घुलाउने, (E) मिडियालाई कल्चर भाडाहरूमा खन्याउने र (F) मिडियालाई अटोक्लेभ गर्ने।

तालिका २: तयार गरिएको स्टक सोलुसनबाट १ लिटर मिडिया बनाउन आवश्यक स्टक सोलुसनको मात्रा

क्र.स.	स्टकको नाम	स्टक सोलुसन को कन्सन्ट्रेसन	१ लिटर मिडिया बनाउन आवश्यक स्टक सोलुसनको मात्रा
(क)	मुख्य पोषक तत्वहरू A (स्टक 'क')	१०X	१०० मि.लि.
(ख)	मुख्य पोषक तत्वहरू B (स्टक 'क')	१००X	१० मि.लि.
(ग)	सुक्ष्म पोषक तत्वहरू (स्टक 'ख')	१०००X	१ मि.लि.
(घ)	आईरन (स्टक 'ग')	१००X	१० मि.लि.
(ङ)	भिटामिनहरू (स्टक 'घ')	१०००X	१ मि.लि.
(च)	अन्य		
१	मायो-इनोसिटोल		०.१ ग्रा.
२	जिबेरेलिक एसिड (GA3)	१०० मि.ग्रा./लि	२.५ मि.लि.
३	साईटोकाईनिन र अक्जीन	१००० मि.ग्रा./लि	आवश्यकता अनुसार (प्रत्येक बिरुवाको फरक फरक हुन सक्छ)
४	चिनी	-	३० ग्रा.
५	अगार	-	८ ग्रा.
६	पी.एच.	-	५.८

२.२. नमुना सङ्कलन

स्याउका सायनहरू तथा रुटस्टका विभिन्न जातहरू जस्तैः M9, M7, MM106, MM111, G16 आदिको इनभिट्रो बिरुवाहरू स्थापना गर्न आँख्ला, मुना एवम् मेरिस्टेम कल्चर गरिन्छ। यी कल्चरहरू गर्न एक्सप्लान्टको रूपमा नयाँ पालुवा फेरेका कलिला मुनासहितका हाँगाहरू सङ्कलन गर्नुपर्छ। एक्सप्लान्ट सङ्कलन गर्दा कल्चर गर्न खोजिएको बिरुवा स्वस्थ्य, किशोर अवस्थामा रहेको, सङ्कलन गरिने मौसम, जातीय शुद्धता, आकार इत्यादि कुराहरूमा ध्यान दिनु पर्दछ। स्याउको एक्सप्लान्ट सङ्कलन गर्न खोजिएको माउ बोट रहेको स्थानमा ढुसीजन्य एवम् कीराहरू देखिएको अवस्थामा कम्तिमा एक हप्ताअघि ढुसीनासक तथा कीटनासक विषादी उचित मात्रामा प्रयोग गर्नु पर्दछ। एक्सप्लान्ट सङ्कलन गर्दा औजारहरू जस्तैः सिकेचर, कैंची, चक्कु, फर्सिप्स, कुटो आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस्ता औजारहरूलाई निःसङ्क्रामकहरूले राम्ररी सफा गरी प्रयोग गर्नु पर्दछ। सङ्कलन गरिएका तन्तु नमुनाहरूलाई कल्चर गर्न अघि रसायन विधिद्वारा कीटाणु निर्मलीकरण गर्नु पर्दछ। एक्सप्लान्टको सतह कीटाणु निर्मलीकरण गर्नलाई तल बुँदाहरूमा लेखिए अनुसार क्रमिक रूपमा कार्य गर्नु पर्दछ।



चित्र २: एक्सप्लान्टको कीटाणु निर्मलीकरण गर्ने सामान्य तरिका (A) सङ्कलन गरिएको एक्सप्लान्ट, (B) ५ देखि १०% साबुनको झोल वा डिटरजेन्ट पानीमा मिसाई 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।

- सङ्कलन गरिएका तन्तुको नमुनालाई सानो टुक्रामा काटी धाराको सफा पानीमा पखाल्नु पर्दछ।
- ५ देखि १०% को साबुनको झोल वा डिटरजेन्ट (Tween २० वा Alconox) का १-२ थोपा पानीमा मिसाई १५ देखि ३० मिनेटसम्म सफा गरी धाराको पानीले पखाल्नु पर्दछ।
- त्यसपछि तन्तु नमुनालाई ७५ प्रतिशत इथेनलमा १ देखि २ मिनेटसम्म डुबाई निकाल्नु पर्दछ। यस चरणदेखि बाँकी चरणहरूलाई लामिना वायु प्रवाह हुड (LAF/ Laminar Air Flowhood) भित्र गर्नाले प्रभावकारी हुन्छ।
- त्यसपछि १-२% सोडियम हाइपोक्लोराइडले १० देखि १५ मिनेटसम्म वा अन्य निःसङ्क्रामकहरू तल दिएको तालिका ३ अनुसार उपयुक्त मात्रा र समयसम्म सफा गरिन्छ ।
- अन्त्यमा ३-५ पटक अटोक्लेभ गरिएको डिस्टिल पानीले रसायन पखाल्नु पर्दछ।

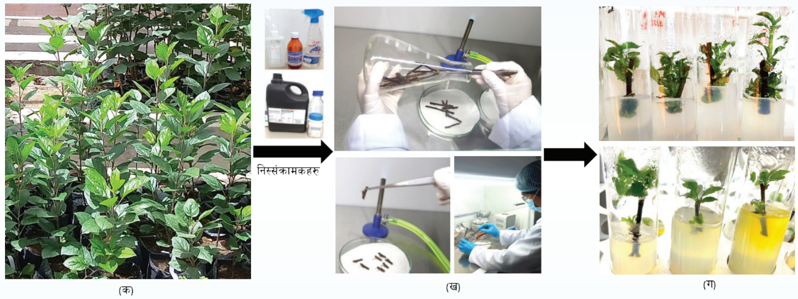
तालिका २ : निःसङ्क्रामकको रूपमा प्रयोग गरिने विभिन्न रसायनहरूको उपयुक्त मात्रा तथा तिनीहरूको एक्सपोजर समय

निःसङ्क्रामक	मात्रा	एक्सपोजर समय
सोडियम हाइपोक्लोराइड	०.५ देखि ५%	५ देखि ३० मिनेट
मरक्यूरिक क्लोराइड	०.१ देखि १.०%	२ देखि १० मिनेट

निःसङ्क्रामक	मात्रा	एक्सपोजर समय
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%	सेकेन्ड देखि २ मिनेट

२.३. एक्सप्लान्ट कल्चर गर्ने तरिका

स्याउको रुटस्टक तथा सायनहरूको इन-भिट्रो स्थापना गर्नलाई बिरुवाको मुना वा एकल वा दुईवटा आँख्ला भएको नमुना प्रयोग गरिन्छ। यहाँ विशेष गरी मुना तथा आँख्लाबाट ईनभिट्रो बिरुवा स्थापना गर्ने तरिका उल्लेख गरिएको छ।



चित्र ३: एक्सप्लान्टलाई मिडियामा स्थापना गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) स्वस्थ बिरुवाबाट एक्सप्लान्ट सङ्कलन गर्ने, (ख) एक्सप्लान्टको कीटाणु निर्मलीकरण गरी कल्चर गरेको र (ग) इन-भिट्रो बिरुवाहरू स्थापना भएका।

स्याउको मुना एवम् आँख्लाबाट इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना गर्ने तरिका

- एक्सप्लान्टको सतहलाई कीटाणु निर्मलीकरण माथि भनिए अनुसार गरिसकेपछि कल्चरको बाँकी कार्यहरू (LAF) मा गर्नु पर्दछ।
- LAF मा फोर्सेप र स्केलपेलको सहायताबाट मुना (१-१.५ से.मी) वा डाँटसहित एक वा दुईवटासम्म आँख्ला भएको नमुना छुट्याउने। आँख्ला छुट्याउदा सतह कीटाणु निर्मलीकरण गर्दा एक्पोज (expose) भएको दुईतिरको डाँटको सानो भागलाई स्केलपेलले काटेर फ्याक्ने। एक्सप्लान्टबाट पानी सोस्न अटोक्लेभ गरिएको फिल्टर पेपर वा ब्लटिङ पेपर प्रयोग गर्ने।
- त्यसपछि, एक्सप्लान्टलाई माथि तयार गरिएको अर्ध-ठोस MS वा WPM स्थापना मिडियामा कल्चर गर्ने।

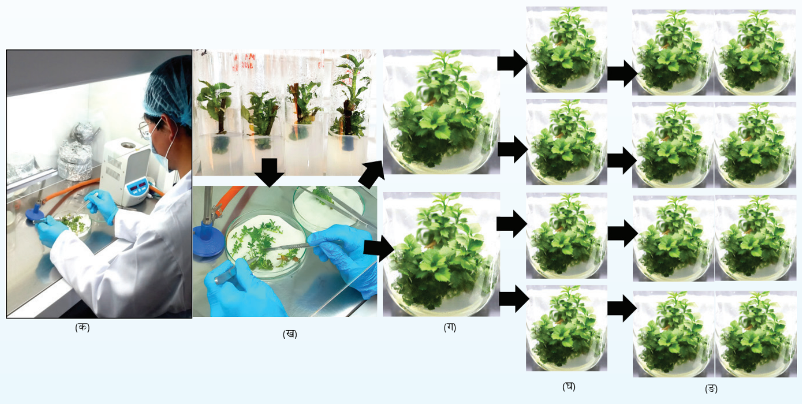
- कल्चर गरिएका एक्सप्लान्टहरूलाई बिरुवा हुर्काउने कोठामा (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमान, (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारोमा लगेर राख्ने।
- एक्सप्लान्टबाट ३-४ हप्तामा इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना भएपछि उक्त बिरुवालाई मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गर्नु पर्दछ।

२.४. सब-कल्चर

इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना भएपछि उक्त बिरुवाहरूको सङ्ख्या वृद्धि गर्न मल्टिप्लिकेसन मिडियामा सब-कल्चर गरिन्छ।

इन-भिट्रो बिरुवाको मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गर्ने तरिका

- ३-४ हप्तामा इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना भएपछि उक्त बिरुवालाई छुट्याई माथि तयार गरिएको अर्ध-ठोस MS वा WPM मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गर्नु पर्दछ। प्रत्येक कल्चर जारमा रहेको लगभग ३० देखि ४० मि.लि. मिडियामा ३ देखि ४ वटा १-३ से.मी. को इन-भिट्रो बिरुवा हल्का ढल्काएर कल्चर गर्ने।
- कल्चर गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई हुर्काउने कोठामा (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमान, (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारोमा लगेर राख्ने।
- यसरी मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गरेको ५-६ हप्तापछि थप नयाँ इन-भिट्रो बिरुवाहरू विकास हुन्छन् र विकास भएका उक्त नयाँ इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई पुनः मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गर्नु पर्दछ। यो कल्चर प्रक्रियालाई सब-कल्चर भनिन्छ। प्रत्येक ५-६ हप्तामा सब-कल्चर गर्नको लागि बिरुवाहरू तयार हुन्छन्।



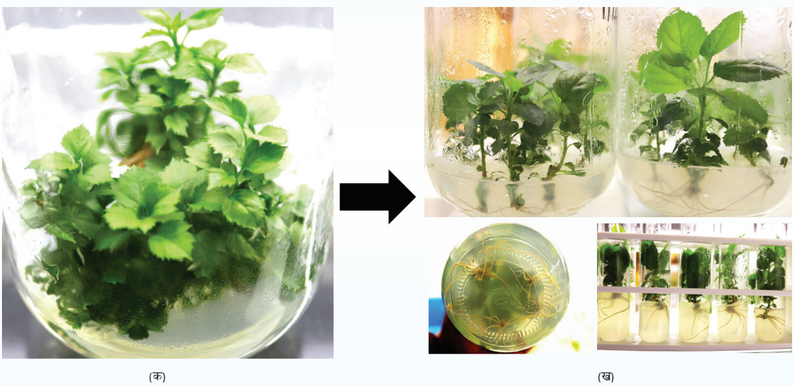
चित्र ४: प्रसारण चरणको समामान्य प्रक्रिया (क) इन-भिट्रो स्थापना भएको स्याउका हाँगाहरूलाई मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गर्दै र (ख) इन-भिट्रो बिरुवा सङ्ख्या वृद्धिको लागि विभिन्न चरणको सब-कल्चर गरिएको।

२.५. रुटिङ

सब-कल्चर गरी आवश्यक सङ्ख्यामा बिरुवाहरू तयार भएपछि जरा विकास गराउन रुटिङ मिडियामा कल्चर गर्नु पर्दछ।

रुटिङ मिडियामा कल्चर गर्ने तरिका

- मल्टिप्लिकेसन मिडियामा कल्चर गरेको ५-६ हप्तापछि नयाँ विकास भएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई एक-एक गरी छुट्याई माथि तयार गरिएको रुटिङ मिडियामा कल्चर गर्नु पर्दछ। प्रत्येक कल्चर जारमा रहेको लगभग ३० मि.लि. मिडियामा ८ देखि १० वटा १-३ से.मी. को इन-भिट्रो बिरुवा सिधा गाडेर कल्चर गर्ने।
- उक्त रुटिङ मिडियामा कल्चर गरिएका बिरुवाहरूलाई हुर्काउने कोठामा (२५±२) डिग्री सेल्सियस तापमान, (२०००-४०००) लक्स प्रकाशको तीव्रतामा दैनिक १६ र ८ घण्टा प्रकाश र अँध्यारोमा लगेर राख्ने।
- माथि भनिएको अवस्थामा ४ देखि ५ हप्तामा जरासहितको पूर्ण बिरुवा विकास हुन्छ।



चित्र ५: रुटिङ प्रक्रिया (क) स्याउ रुटस्टक बिरुवाहरूलाई रुटिङ मिडियामा कल्चर गरी (ख) जरा विकास गराइएको

२.६. प्राइमरी हार्डेनिङ

रुटिङ मिडियामा कल्चर गरिएका बिरुवाहरू लगभग ४ देखि ५ हप्तामा जरा सहितको पूर्ण बिरुवा विकास भएपछि प्राइमरी हार्डेनिङ गर्नु पर्दछ।

प्राइमरी हार्डेनिङ गर्ने तरिका

- अटोक्लेभ गरिएको बालुवा तथा अन्य पटिङ मिश्रण जस्तैः पिट मश, भर्मिक्युलाक्युलाइट, कोकोपिट आदि तयार गर्ने।
- जराको राम्रो विकास भएको इन-भिट्रो बिरुवारुलाई रोप्नुभन्दा कम्तिमा एक

हप्ताअगाडि प्राइमरी हार्डेनिङ सेक्सनमा लैजाने।

- लगभग एक हप्तापछि ५-६ दिनसम्म बोतलको बिर्को खकुलो पारेर राख्ने।
- त्यसपछि प्राइमरी हार्डिनिङ गर्दा पटिङ मिश्रणको रूपमा कोकोपिट, बालुवा, भर्मिक्युलाक्युलाइट र कम्पोष्ट मलको १:२:१:१ अनुपातमा वा एकमात्रै सब्सट्रेट बालुवा वा कोकोपिट पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ। बालुवा, कोकोपिट र कम्पोष्ट मल १:१:१ अनुपातको मिश्रणमा प्राइमरी हार्डिनङ गर्दा राम्रो परिणाम देखाएको पाइयो (स्रोत: शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ)।
- बिरुवा रोप्नु अगाडि बोतलबाट निकाली जरामा भएको मिडिया राम्रोसँग पानीमा सफा गर्ने र २-३ मिनेट १-२% ढुसीनासकले उपचार गर्ने।
- बिरुवालाई polypot वा poly tray मा रोपी उचित आर्द्रता कायम राख्न पारदर्शी पोलिथिनले छोप्ने र तापक्रम र आर्द्रतालाई नियन्त्रण गर्न आवश्यकता अनुसार कुलर, ह्युमिडिफायर, मिस्टिङ प्रणाली प्रयोग गर्ने।
- लगभग १०-१५ दिनसम्म (९०-१००) % आर्द्रता कायम राख्नु पर्दछ। त्यसपछि, आर्द्रता बिस्तारै कम गर्दै लैजानु पर्दछ र २०-२१ दिनपछि पोलिथिनलाई पूर्ण रूपमा हटाईदिनु पर्दछ।
- तापमान २२ देखि ३० डिग्री सेल्सियसबीचमा राख्नु पर्दछ।
- प्रकाश कम गर्न छायाँ नेट (shade net) को प्रयोग गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार तीन हप्तापछि झोल मल दिन सकिन्छ।
- १ देखि २ महिनाभित्र कम्तिमा दुईवटा नयाँ पातहरू विकास भएपछि प्राईमरी हार्डेनिङ पूरा हुन्छ।

चित्र ६: प्राइमरी हार्डेनिङ सेक्सनमा प्राइमरी हार्डेनिङ गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) पूर्ण रूपमा विकास भएका इन-भिट्रो स्याउका बिरुवाहरूलाई सिसा घरमा अनुकूलनको लागि राखिएको, (ख) polypot मा कीटाणु निर्मलीकरण गरिएको उचित पटिङ मिश्रण तयार गरिँदै, (ग) इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई झिकी ढुसीनासकले उपचार गरी रोपिदै, (घ) रोपेको बिरुवाहरूलाई पोलिथिनले छोपेको (ङ) र (च) प्राइमरी हार्डेनिङमा सफल भएका बिरुवाहरू

२.७. सेकेन्डरी हार्डेनिङ

प्राइमरी हार्डेनिङमा सफल भएका बिरुवाहरूलाई थप वृद्धि र विकास गराई प्राकृतिक वातावरणमा अनुकूलन गराउन सेकेन्डरी हार्डेनिङ गरिन्छ।

सेकेन्डरी हार्डेनिङ गर्ने तरिका

- प्राइमरी हार्डेनिङ गरेका लगभग २ महिनापछि एवम् सुसुप्त अवस्थामा रहेको बिरुवाहरूलाई रोप्नको लागि बालुवा, माटो र कम्पोष्ट मल १:२:१ को अनुपातको मिश्रणमा सेकेन्डरी हार्डेनिङ गर्दा राम्रो परिणाम देखाएको पाइयो (स्रोतः शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र, मार्फा, मुस्ताङ)।
- आर्द्रतालाई थप घटाउँदै प्राकृतिक परिवेश सरह सन्तुलन कायम राख्नु पर्दछ। प्रकाशको मात्रा बढाउनलाई shade net हटाउनु पर्दछ।
- सेकेन्डरी हार्डेनिङ गरेको रुटस्टक बिरुवाको मोटाइ करिब पेन्सिल जत्रो (०.८-१.५ से.मी.), उचाईः करिब २०-३० से.मी. पुगेपछि कलमी गर्न उपयुक्त हुन्छ। उक्त रुटस्टक बिरुवाको कलमी गर्दा विशेष गरी सुसुप्त अवस्थामा रहेको बेला सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमै गर्नु पर्दछ।
- यसरी सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा कलमी गरिएको स्याउ बिरुवालाई अर्को वर्ष माघदेखि फागुन महिनामा बाहिर बगैंचामा रोप्ने तथा नर्सरी गर्नु पर्दछ।

अथवा,

- प्राइमरी हार्डेनिङ गरेका लगभग २ महिनापछि उक्त रुटस्टक बिरुवाहरूलाई पोलिट्रेसहित माटो र बालुवा (१:२) अनुपातको मिश्रण भएको बेड माथि राख्नु पर्दछ।
- उक्त रुटस्टक बिरुवालाई सुशुप्त अवस्थासम्म सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमै राख्नु पर्दछ।
- अर्को वर्ष माघदेखि फागुन महिनामा सो रुटस्टक बिरुवालाई फिल्डमा नर्सरी गर्नु पर्दछ।

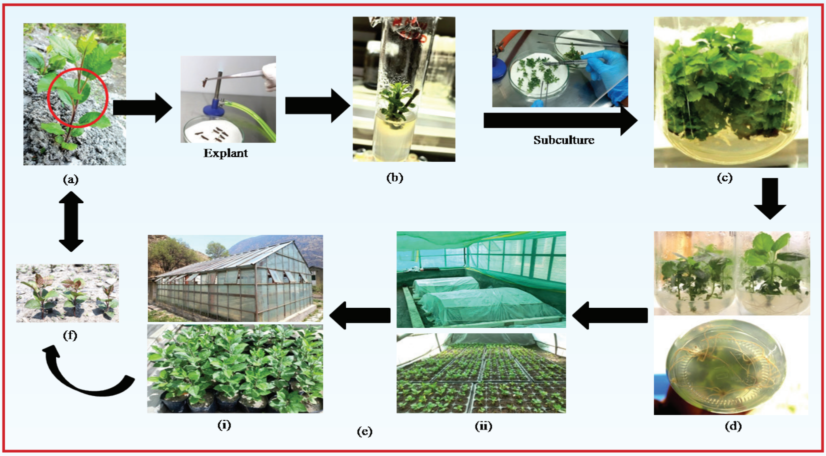
चित्र ७: सेक्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा सेक्डरी हार्डेनिङ गर्ने सामान्य प्रक्रिया (क) प्राइमरी हार्डेनिङमा सफल भएका स्याउका बिरुवाहरू र (ख) तिनीहरूलाई बालुवा, माटो र कम्पोष्ट मलको मिश्रण भएको poly bag मा स्थानान्तरण गरी सफल भएका बिरुवाहरू

२.८. फिल्डमा रोप्ने

स्याउ रुटस्टलाई फिल्डमा नर्सरी गर्ने तरिका

- सेकेन्डरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई फिल्डमा रोप्न राम्रो पानी निकास हुने, पानी नजम्ने ठाउँ र राम्रो घाम लाग्ने तर हल्का छायाँ हुने स्थान छनौट गर्नु पर्दछ।
- जमिन राम्रोसँग जोतेर/खनेर भुसभुसे (friable) बनाई NPK fertilizer ३:२:२ के.जी. प्रति रोपनी र कम्पोष्ट मल ८-१० के.जी. प्रति वर्गमिटर राम्रोसँग मिसाउने। लगभग १ फिट उठेको बेड तयार गर्ने जसको १ देखि १.५ मिटर चौडा भएको र उक्त बेडलाई थप समान दूरीमा दुई पङ्क्तिमा विभाजन गरी रोपाइँका लागि उठाइएको बेड तयार गर्ने।
- स्याउको रुटस्टक बिरुवाको जरा नचुडिने गरी सावधानीपूर्वक पोलिट्रेबाट निकाली जराहरूलाई राम्ररी फैलाई बिरुवादेखि बिरुवा २०-३० से.मी. को दूरीमा रोप्नु पर्दछ। रोप्दा जरा राम्रोसँग माटोले ढाकिएको हुनुपर्छ। पुड्के स्याउ रुटस्टक जस्तैः M9, M27, G16 आदिको लागि बिरुवादेखि बिरुवा २०-२५ से.मी. को दूरीमा रोप्नु उपयुक्त हुन्छ भने मझौला ठूलो स्याउ रुटस्टक जस्तैः MM111, M106 आदिको लागि बिरुवादेखि बिरुवा २५-३० से.मी. को दूरीमा रोप्नु उपयुक्त हुन्छ।
- बिरुवा रोपिसकेपछि तुरुन्त हल्का पानी दिनु पर्दछ। त्यसपछि २ मि.ग्रा. प्रतिलिटर पानीमा Bevistin (Carbendazim) वा अन्य कुनै ढुसीनासक पानीमा मिसाई बोट र जरा वरिपरि प्रयोग गर्नु पर्दछ। नियमित रूपमा रोपेको ३-४ हप्तासम्म नमी कायम राख्नु पर्दछ भने पानी जम्न दिनु हुँदैन।
- लगाएको १ महिना एवम् चैत वा बैशाखतिर NPK fertilizer ३:२:२ के.जी. प्रति रोपनीको दरले तथा अन्य कम्पोष्ट मलसँग मिसाएर आवश्यकता अनुसार २ पटकसम्म १-२ महिनाको फरकमा दिन सकिन्छ।
- NPK fertilizer दिँदा बिरुवाको जरा छोइने गरी सिधै हाल्नु हुँदैन।
- करिब २-३ वर्ष नर्सरीमा राखेपछि बिरुवा field transplant का लागि तयार हुन्छ।

चित्र ८: स्याउ रुटस्टक बिरुवाहरूलाई फिल्ड नर्सरीको लागि स्थानान्तरण गरिएको (क) बिरुवाहरूलाई रोप्न फिल्डमा तयारगरिँदै, (ख) फिल्डमा रोप्न तयार भएका बिरुवाहरू र (ग) फिल्डमा रोपिदै र रोपेको दुई महिनापछि देखिएका उक्त बिरुवाहरू



चित्र ९: स्याउको आँख्ला कल्चरबाट बिरुवा उत्पादन गर्ने सामान्य प्रक्रिया (a) स्वस्थ्य माउबोटबाट एक्सप्लान्ट सङ्कलन गरी प्रत्येक आँख्लालाई कल्चर गर्ने, (b) आँख्ला कल्चरबाट इन-भिट्रो बिरुवा स्थापना भएको, (c) सब-कल्चर गरी बिरुवा सङ्ख्या बढाउने, (d) जरा विकास गराउने, (e) हार्डेनिङ गर्ने (i) प्राइमरी हार्डेनिङ (ii) सेकेन्डरी हार्डेनिङ र (f) फिल्डमा स्थानान्तरण गरिएको।

खण्ड ३ स्याउ रूटस्टक उत्पादन गर्दा देखिने मुख्य समस्याहरू र तिनीहरूको निवारण

३.१. सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण (Microbial Contaminants)

सूक्ष्म जीवहरू (ब्याक्टेरिया, भाइरस, मोल्ड, फङ्गस, माइकोप्लाज्मा) आदि सामान्य रूपमा एक्सप्लान्ट कल्चर वा सब-कल्चर गरिएको मिडियामा देखा पर्दछन्, र यिनीहरूले वृद्धि र विकास हुँदै गरेको बिरुवालाई नष्ट पारिदिन्छन्। कल्चर गर्दा प्रयोग गरिने स्याउ बिरुवाको तन्तु नमुनाभित्रै पनि सुक्ष्म जीवद्वारा सङ्क्रमण भएको हुन सक्छ जसलाई Endophyte भनिन्छ। यी कीटाणुहरू तन्तु प्रजनन् प्रक्रियाको विभिन्न चरणहरूमा बिस्तारै देखा पर्दछन्। ब्याक्टेरियल एन्डोफाइट्स जस्तैः *ब्यासिलस सब्टिलिस, एर्विनिया* र *स्यूडोमोनास* आदिहरूले निष्क्रिय अवस्थामा हुन्छन् र पछि बिस्तारै विभिन्न चरणहरूमा देखा पर्दछन् जसले गर्दा बिरुवाको वृद्धि र विकासमा बाधा पुर्याउँदछन्।

चित्र १०: विभिन्न प्रकारका सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला कोठाहरू सधैं सफा राख्ने तथा काम गर्ने स्थानहरू फराकिलो र आवश्यक सामानहरू 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 गर्नु पर्दछ।
- कल्चर गर्दा कुनै पनि प्रकारको खाने कुराहरू खानु तथा अनावश्यक कुरा गर्नु हुँदैन।
- लामिना वायु प्रवाह हुडमा कल्चर गर्दा कीटाणु निर्मलीकरण विधिहरूको राम्रोसँग पालना गर्नु पर्दछ।
- तन्तु नमुना सतहलाई कीटाणु निर्मलीकरण गर्दा प्रयोग गरिने निःसङ्क्रामकहरूको होल्डिङ अवधि बढाउन सकिन्छ।

- कल्चर गर्दा मिडिया, पानी तथा अन्य विभिन्न वस्तुहरू कीटाणु निर्मलीकरण गरिएको मात्र प्रयोग गर्नु पर्दछ।
- Endophytes लाई नियन्त्रण गर्ने। PPM (Plant Preservative Mixture) वा एन्टिबायोटिक जस्तैः Streptomicin, Penicillin, Ampicillin, Cefazolin, Ticarcillin आदि प्रयोग गर्न सकिन्छ। तर एन्टिबायोटिकको प्रयोग अन्तिम अवस्थामा मात्रै प्रयोग गर्नु पर्दछ।
- नियमित निरीक्षण तथा हेरचाह गर्नु पर्दछ।

३.२. बिरुवाको टुप्पो मर्ने (Shoot Tip Necrosis)

सुट टिप नेक्रोसिस एक प्रकारको शारीरिक अवस्था र विकार हो, जसले इन-भिट्रो बिरुवाहरूको वृद्धि र विकासलाई नकरात्मक असर पुर्याई डाँटको टुप्पो मर्ने हुन्छ। यो समस्या प्रसार र जरा विकास चरणहरूमा देखिने गर्दछ। सुट टिप नेक्रोसिस निम्त्याउने सबैभन्दा सामान्य कारकहरूमध्ये एक पोषक तत्वको कमि वा असन्तुलन हो। यसबाहेक, क्यालसियमको कमी, हर्मोनहरूको असन्तुलन र उच्च सापेक्ष आर्द्रता आदिले सुट टिप नेक्रोसिस निम्त्याउने गर्दछ।

चित्र ११: इन-भिट्रो बिरुवाको टुप्पो मरेको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- मिडियामा सन्तुलित पोषक तत्वहरू र हर्मोनहरूको मात्रा प्रदान गर्नु पर्दछ।
- उचित मात्रामा क्याल्सियम मिडियामा समावेश गर्ने।
- बिरुवा हुर्काउने कोठाको सापेक्ष आर्द्रतालाई नियन्त्रणमा राख्ने।
- कल्चर गरिएको बोतल, जार, कल्चर ट्यूब आदिको बिर्को धेरै कसिलो गरी बन्द नगर्ने तर धेरै हल्का पनि गर्नु हुँदैन।
- फिल्टरयुक्त भएको बिर्को पनि प्रयोग गर्ने सकिन्छ।

३.३. मिडिया र एक्सप्लान्टको ब्राउनिङ (Browning of Media and Explant)

यो समस्या विशेष गरी बारहमासी काठे बिरुवाहरूको तन्तु नमुनालाई मिडियामा स्थापना गर्दा र त्यसपछिको प्रसारण चरणहरूमा देखा पर्दछ। यस्ता तन्तु नमुनाहरूले आफ्नो रक्षा संयन्त्रको लागि विभिन्न रसायन पदार्थ निष्कासन गर्दछन् जसलाई फेनोलिक योगिकहरू भनिन्छ। यही फेनोलिक योगिकहरू मिडियामा एकत्रित हुँदा मिडिया ब्राउन रङ्गको हुन्छ र आफ्नै तन्तु नमुनालाई बिस्तारै मारी दिन्छ। एन्डोफाइट्सहरूको कारणले गर्दा पनि यो समस्या देखा पर्दछ।

चित्र १२: मिडिया र एक्सप्लान्ट ब्राउनिङ भएको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- ब्राउनिङ रोक्न एन्टिअक्सिडेंट पदार्थहरू जस्तैः ५ ग्राम प्रतिलिटर साइट्रिक एसिड वा २.५ ग्राम प्रतिलिटर एस्कोर्बिक एसिड झोलमा एक्सप्लान्टलाई डुबाई कल्चर गर्ने।
- फेनोलिक योगिकहरूलाई सोख्न मिडियामा सक्रिय चारकोल (activated charcoal) ०.१ देखि १ प्रतिशत वा ०.०३ प्रतिशत PVP (Polyvinylpyrrolidone) को प्रयोग गर्नु पर्दछ।
- मिडियामा कल्चर गरिएको तन्तु नमुनाहरूलाई केही दिनसम्म अँध्यारो कोठामा राख्ने।
- मिडियामा ब्राउनिङ देखिए लगातार नयाँ मिडियामा स्थानान्तरण गर्नु पर्दछ।
- एन्डोफाइट्सलाई नियन्त्रण गर्ने।

३.४. हाइपरहाइड्रिसिटी/भिट्रिफिकेशन (Hyperhydricity/ Vitrification)

हाइपरहाइड्रिसिटी भनेको इन-भिट्रो बिरुवाहरूमा हुने शारीरिक गडबडी वा विकृति हो जसले उचित वृद्धि र विकासलाई असर गर्दछ। यस अवस्थामा बिरुवाहरूको डाँट र पातहरू पारदर्शी, ओसिलो, नाजुक र रसिलो देखिन्छन्। हाइपरहाइड्रिसिटीको मुख्य

कारणहरू Oxidative stress लाई ट्रिगर गर्ने कारकहरू मानिन्छन्। उच्च लवरणको मात्रा, उच्च सापेक्ष आर्द्रता, कम प्रकाश, कल्चर जारको वातवरणमा ग्यास सञ्चय, सब-कल्चर सङ्ख्या र सब-कल्चरबीचको समय अन्तराल, जेलिङ एजेन्टको मात्रा, हर्मोनल असन्तुलन आदि कारणहरूले निम्त्याउने गर्दछ।

चित्र १३: इन-भिट्रो बिरुवाहरूमा हाइपरहाइड्रिसिटी देखिएको

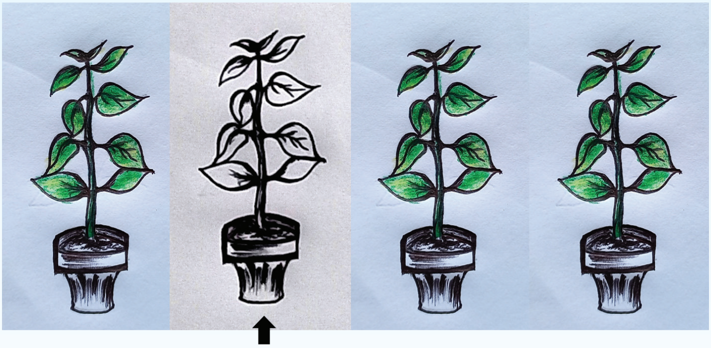
समस्या निवारणका केही उपायहरू

- मिडियामा उचित कार्बोहाइड्रेटको मात्रा प्रयोग गर्नु पर्दछ।
- कल्चर गरिएको भाँडालाई फिल्टरयुक्त भएको बिर्को प्रयोग गर्न सकिन्छ।
- बिरुवाको प्रकृति अनुसार मिडियामा पोषक तत्व, अगार, साईटोकाइनिन र अक्जीनको कन्सन्ट्रेसन परिमार्जन गर्नु पर्दछ।
- बिरुवा हुर्काउने कोठाको सापेक्ष आर्द्रतालाई नियन्त्रणमा राख्ने।
- बिरुवा हुर्काउने कोठामा इथिलीन प्रदुषण हुन नदिने तथा पोजेटिभ एयर प्रेसर कायम राख्नु पर्दछ।
- प्रकाशको मात्रा परिवर्तन गर्ने।
- केही अवस्थामा समस्या कम गर्न क्याल्सियमको कन्सन्ट्रेसन वृद्धि गर्नु पर्न देखाइएको छ।

३.५. सोमाक्लोनल भिन्नता (Somaclonal Variation)

कल्चर गरिएको कोष तथा तन्तु नमुनाहरूमा पाइने आनुवंशिक परिवर्तनलाई सोमाक्लोनल भिन्नता भनिन्छ र त्यस्ता कोष तथा तन्तुहरूबाट उत्पन्न हुने बिरुवाहरूलाई सोमाक्लोन (Somaclones) भनिन्नछ। आनुवंशिक परिवर्तन जस्तैः क्रोमोजोमको संरचना तथा सङ्ख्यामा परिवर्तन र डिएनए (DNA) अनुक्रममा परिवर्तनहरूले गर्दा बिरुवाहरूमा सोमाक्लोनल भिन्नता देखा पर्दछ। तन्तु प्रजनन् प्रक्रियामा आनुवंशिक परिवर्तन विभिन्न stress factors जस्तैः कल्चर मिडियामा हर्मोनहरूको असन्तुलन, कीटाणु निर्मलीकरण गर्दा अत्यधिक रसायनहरूको प्रयोग, कोष तथा तन्तुमा चोट आदि कारणहरूले भई सोमाक्लोनल भिन्नता निम्त्याउँदछ। सोमाक्लोनल भिन्नताले गर्दा एक समान बिरुवाहरू उत्पादन गर्न थप

चुनौती बढाउँदछ। धेरै जसो अवस्थाहरूमा सोमाक्लोनल भिन्नताहरू अनावश्यक हुन्छन्, तर उत्परिवर्तीहरू विकास गर्नका लागि भने उपयोगी हुन सक्छ।



चित्र १४: दोस्रो बिरुवामा सोमाक्लोनल भिन्नता देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- आनुवंशिक स्थायित्वको कारणले, तन्तु प्रजनन् नमुनाको रूपमा पार्श्व शाखा (axiallary shoot) प्रयोग गरी प्रसार गर्ने।
- एउटै इन-भिट्रो बिरुवा माउ स्टकबाट धेरै सङ्ख्यामा सब-कल्चर गर्नु हुँदैन।
- क्यालस माध्यमबाट प्रसारित बिरुवाहरूको सन्तति परीक्षण गर्ने।
- सन्तुलित मात्रामा अक्जीन र साईटोकाईनिन हर्मोनहरूको प्रयोग गर्ने।
- नयाँ तन्तु नमुना सङ्कलन गरी पुन कल्चर स्थापना गर्ने।

३.६. अनुकूलन गर्दा बिरुवा आघात भई मर्ने (Transplant Shock)

इन-भिट्रो वातावरण (उच्च आर्द्रता, पोषणयुक्त माध्यम, रोगाणु-मुक्त अवस्था) मा हुर्काइएका स्याउ बिरुवाहरू माटो वा ग्रीनहाउसमा स्थानान्तरण गर्दा उच्च वाष्पीकरण, तापक्रम, तीव्र प्रकाश आदिले गर्दा बिरुवा आघात भई ओइलाउने र मर्ने हुन्छ। यस अवस्थामा पातमा क्लोरोप्लास्ट र क्युटिकल पर्याप्त विकसित नभएकाले प्रकाश संश्लेषण कमजोर हुन्छ, स्टोमाटा नियमन असक्षम हुँदा पानी छिट्टै नष्ट हुन्छ, जराहरू नाजुक र कमजोर भएकाले पोषण तथा पानी अवशोषण गर्न सक्दैनन्, साथै रोगजन्य सूक्ष्मजीवहरूको आक्रमणले गर्दा मृत्यु दर उच्च हुन्छ। यही कारणले अनुकूलन चरणलाई स्याउको टिस्यु कल्चरमा प्रमुख चुनौतीहरूमध्ये एक मानिन्छ।

चित्र १५: अनुकूलन गर्दा बिरुवाहरू आघात भई मरेका

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- अनुकूलन गर्न प्राइमरी हार्डेनिङ सेक्सनको तापमान २२ देखि ३० डिग्री सेल्सियसबीचमा कायम राख्ने तथा प्रकाश कम गर्न छायाँ नेट (shade net) को व्यवस्था गर्ने।
- जराको राम्रो विकास भएको इन-भिट्रो बिरुवाहरुलाई रोप्नुभन्दा कम्तिमा एक हप्ता अगाडि प्राइमरी हार्डेनिङ सेक्सनमा लैजाने।
- लगभग एक हप्तापछि ५-६ दिनसम्म बोतलको बिर्को खकुलो पारेर राख्ने।
- कीटाणु निर्मलीकरण गरिएको उचित पटिङ मिश्रणमा रोप्ने।
- बिरुवा रोप्नु अगाडि बोतलबाट निकाली जरामा भएको मिडिया राम्रोसँग पानीमा सफा गर्ने र २-३ मिनेट १-२% ढुसीनासकले उपचार गर्ने।
- उचित आर्द्रता कायम राख्न polypot वा poly tray मा रोपिएको बिरुवाहरूलाई पारदर्शी पोलिथिनले छोप्ने र तापक्रम र आर्द्रतालाई नियन्त्रण गर्न आवश्यकता अनुसार कुलर, ह्युमिडिफायर उपकरण, मिस्टिङ प्रणाली प्रयोग गर्ने।
- बिरुवाको प्रकृति अनुसार, लगभग १०-१५ दिनसम्म (९०-१००)% आर्द्रता कायम राख्नु पर्दछ। त्यसपछि आर्द्रता बिस्तारै कम गर्दै लैजानु पर्दछ र २०-२१ दिन पछि पोलिथिनलाई पूर्ण रूपमा हटाइदिनु पर्दछ।

३.७. सेतो भुवादार लाही कीरा (Apple Woolly Aphid)

सेतो भुवादार लाही कीरा (*Eriosoma lanigerum*) विशेष गरी स्याउ बिरुवाहरूलाई प्राइमरी हार्डेनिङ गरेपछिको चरणहरूमा देखा पर्दछ। यो कीराले नर्सरी बिरुवाको कमलो भागहरूको रस चुसेर आक्रमण गर्छ। चिसो मौसममा कीराहरू जमिनमुनि जरामा बस्छन् भने तापक्रम वृद्धि भएपछि कीराहरू डाँठमा एवम् पातहरूको फेदमा देखा पर्दछन्। यी कीराहरूले बढी सङ्क्रमण गरेको बिरुवाको भागमा सेतो रुवा जस्तो तथा गिर्खाहरू देखिने गर्दछ।

चित्र १६: स्याउ बिरुवामा सेतो भुवादार लाही कीरा लागेको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

कीरा लागेका हाँगा एवम् बोटहरूबाट ती कीराहरूलाई सङ्कलन गरी मार्नु पर्दछ।

- स्याउ रुटस्टक बिरुवा नर्सरी गर्दा सेतो भुवादार लाही कीरा प्रतिरोध गर्न सक्ने जातहरू जस्तैः Geneva (G) series का G41, G16, G11 आदिमा जोड दिनु पर्दछ।
- १ देखि १.५ मि.लि. प्रतिलिटर रोगर (Dimethoate 30%) पानीमा मिसाई उक्त समस्या देखिएमा १५-१५ दिनको फरकमा २ पटक छर्कनु पर्दछ।
- ०.५ मि.लि. प्रतिलिटर इमिडाक्लोप्रिड पानीको मिश्रणले उपचार गर्ने।

३.८. सेतो धुले ढुसी रोग (Powdery Mildew)

सेतो धुले ढुसी रोग एक प्रकारको ढुसी (*Podosphera leucotricha)* बाट लाग्दछ। यो रोग पनि स्याउ बिरुवाहरूलाई प्राइमरी हार्डेनिङ गरेपछिको चरणहरूमा देखा पर्दछ। हावा कम चल्ने ठाउँ, बाक्लो रोपाइँ, सुक्खा र हल्का चिस्यान भएको मौसममा यो रोग देखा पर्दछ। विशेष गरी संक्रमित बिरुवाको कलिला मुना तथा पातको सतहहरूमा सेतो पाउडर जस्ता धुलोले ढाकेको देखिन्छ।

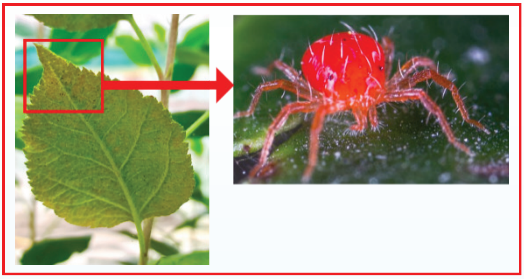
चित्र १७: स्याउको बोटमा सेतो धुले ढुसी रोग

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- अनुकूलन गर्ने सेक्सनहरूमा राम्रो भेन्टिलेसनको व्यवस्था मिलाउने।
- बिरुवाहरूमा सिँचाइ गर्दा पानी नजम्ने गरी दिनु पर्दछ।
- रुटस्टक बिरुवा नर्सरी गर्दा सेतो धुले ढुसी रोग प्रतिरोध गर्न सक्ने जातहरू जस्तैः Geneva (G) series का G11, G16, G41 आदिमा जोड दिनु पर्दछ। Malling (M) series को M9 लाई अत्यधिक आर्द्र र भिजेको ठाउँ नभएको अवस्थामा जोड दिन सकिन्छ।
- २ ग्राम क्याराथिन वा बेभिष्टिन प्रतिलिटर पानीमा मिसाई बिरुवाको पालुवा आउने समयमा १०-१० दिनको फरकमा २ पटक छर्कनु पर्दछ।

३.९. रातो सुलसुले (Red Spider Mite)

यस कीराले हार्डेनिङ गरिएको तथा नर्सरी बिरुवाहरूको पातको पछाडिको भागमा, डाँटमा र कोपिलाहरूमा बसेर रस चुस्ने गर्दछ। यो कीराहरूको प्रकोप बढेपछि पात र हाँगाहरूको कापाहरूमा रातो सिंदुरको थुप्रो जस्तो देखिन्छ। त्यसपछि पातहरू विस्तारै रातो खैरो भएर सुक्न थाल्छन्। सामान्यतया यो कीराको प्रकोप सुक्खा र तातो अवस्थामा धेरै देखिन थाल्छ।



चित्र १८: स्याउको पातमा रातो सुलसुले कीराहरूको प्रकोप देखिएको

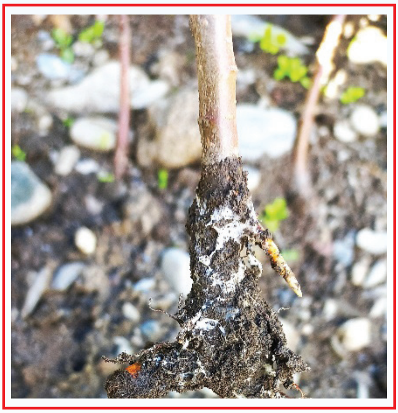
समस्या निवारणका केही उपायहरू

- बिरुवालाई हल्का सिँचाइ एवम् मिस्टिङद्वारा पानीको फोहोराले छर्किने।
- नर्सरी बिरुवा रोप्दा सम्भव भए धेरै धुलो नहुने ठाउँ छनौट गर्नु पर्दछ। यदि धेरै धुलो हुने ठाउँ भएमा समय समयमा पानीको फोहराले बिरुवामा रहेको धुलो सफा गर्नु पर्दछ।
- नाइट्रोजन उपयुक्त मात्रामा प्रयोग गर्ने, धेरै नाइट्रोजनले पात नरम बनाउँदछ जसले गर्दा माइट बढी आकर्षित हुन्छ।
- १ देखि १.५ मि.लि. प्रतिलिटर रोगर (Dimethoate 30%) पानीमा मिसाई पुसदेखि माघ महिनातिर १५-१५ दिनको फरकमा २ पटक नर्सरी बिरुवाहरूमा छर्कनु पर्दछ।

- सुलसुलेनासक विषादी जस्तैः ओमाइट १ देखि १.५ मि.लि. प्रतिलिटर पानीमा मिसाई उक्त समस्या देखिएमा १५-१५ दिनको फरकमा २-३ पटक छर्कनु पर्दछ।
- हप्तामा कम्तीमा १ पटक पातको पछाडिको भाग जाँच गर्नु पर्छ।

३.१०. फेद र जरा कुहिने रोग (Collar and Root Rot)

फेद र जरा कुहिने रोग पनि स्याउ नर्सरीमा लाग्ने मुख्य समस्यामध्ये एक हो। फेद कुहिने रोग *Phytophthora cactorum* तथा *P. syringeae* भन्ने ढुसीबाट लाग्दछ भने जरा कुहिने रोग *Dematophora necatrix* नामक ढुसीबाट लाग्दछ। यो समस्या मुख्य गरी माटोमा बढी चिस्यान हुने, पानी जम्ने तथा बढी पानी पर्ने क्षेत्रमा देखिन्छ। नर्सरी बिरुवाहरूका कलिला जराहरू भएकोले यो रोग नर्सरी बिरुवाहरूमा बढी देखिने गर्दछ।



चित्र १९: फेद र जरा कुहिने रोग

समस्या निवारणका केही उपायहरू

अनुकूलन गर्दा एवम् नर्सरी बगैंचामा स्थानान्तरण गर्दा जराहरूलाई सुरक्षित निकाली ढुसीनासकले राम्ररी उपचार गर्नु पर्छ। प्राइमरी हार्डेनिङ गर्दा जरालाई राम्ररी पानीले पखाली ढुसीनासकले उपचार गर्नु पर्छ।

- बगैंचामा सिँचाइ गर्दा पानी जम्न दिनु हुँदैन र त्यसका लागि निकासको राम्रो व्यवस्था मिलाउनु पर्छ।
- स्याउ नर्सरीमा भएको झारपातहरू हटाई सफा राख्ने।
- नर्सरीमा गोडमेल गर्दा स्याउ बिरुवाको जराहरू चोटपटक लाग्ने गरी खनजोत गर्नु हुँदैन। जरामा चोटपटक लागेमा त्यही घाउबाट रोगका जीवाणुहरू बोटभित्र प्रवेश गर्दछन्।
- स्याउ रुटस्टक बिरुवा नर्सरी गर्दा फेद र जरा कुहिने रोग प्रतिरोध गर्न सक्ने जातहरू जस्तैः Geneva (G) series वा Budagovsky series का G41, G16, Bud.9

आदिमा जोड दिनु पर्दछ। सिँचाइ र निकासको राम्रो व्यवस्था मिलाएमा Malling (M) series को M9 लाई पनि जोड दिन सकिन्छ।

- २ ग्राम डाइथेन एम ४५ वा बेभिष्टिन प्रतिलिटर पानीमा मिसाई बिरुवाहरूमा फागुन-चैत र भदौ-असोजमा फेद तथा जरा भिज्ने गरी हाल्ने।

३.११. पात बेर्ने कीरा (Leaf Roller)

यो कीरा मुख्यतया गर्मी याम सुरु भएपछि पातहरूमा देखिने गर्दछ। यो कीराको लाभ्रेले पात बेरेर भित्र जालो बनाएर बस्छ र पातको सतह कोतारेर खाई बोटलाई नोक्सान पुर्याउँछ। यो लाभ्रे हरियो रङ्गको पारदर्शी किसिमको हुन्छ।

चित्र २०: स्याउ विरुवामा पात बेर्ने कीरा देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- कीरा वा कीरा लागेका पातहरू हटाउने र बगैंचा सरसफाइमा विशेष ध्यान दिनु पर्छ।
- कीराको वयस्क पुतली (Moth) लाई नियन्त्रण गर्न फेरोमोन ट्र्याप साथै बत्तिको पासो प्रयोग गर्न सकिन्छ।
- १ मि.लि. प्रतिलिटर पानीमा निमजन्य कीटनासक विषादी वा स्पिनोस्याड (Spinosad) नामक वातावरण मैत्री कीटनासक मिसाएर प्रयोग गर्न सकिन्छ।
- अत्यधिक मात्रामा यो कीराको प्रकोप देखिएमा १ ग्राम प्रतिलिटर पानीमा एमामेक्टिन बेनजोयट (Emamectin benzoate) वा ३ ग्राम प्रतिलिटर पानीमा क्लोरानट्रानिलिप्लोर (Chlorantraniliprole) मिसाएर छर्न सकिन्छ।

३.१२. खुम्रे कीरा (White grub)

विशेष गरी खुम्रे कीराको लार्भाले स्याउ बिरुवाहरूको जरालाई नष्ट गरी बिरुवा मार्छ। यो समस्या सेकेन्डरी हार्डेनिङ र बगैंचामा नर्सरी गर्दा देखिने गर्छ।

चित्र २१: खुम्रे कीराको लार्भाहरू स्याउ बिरुवाहरूको जाराहरूमा देखिएको

समस्या निवारणका केही उपायहरू

- सेकेन्डरी हार्डेनिङ गर्दा निर्मलीकरण गरेको माटो एवम् पाकेको मल प्रयोग गर्नु राम्रो मानिन्छ।
- वयस्क खपटेलाई नियन्त्रण गर्न फेरोमोन ट्र्याप प्रयोग गर्ने।
- लाभ्रे र वयस्क देखा परेको अवस्थामा जम्मा गरेर नष्ट गर्ने।
- स्याउको नर्सरी गर्दा बारी गहिरोसँग खन्ने र उठेको बेड तयार गरी बिरुवा रोप्ने।
- असर गरेको बोटको नजिकै कीरा खोजी मार्नु पर्छ।
- मेटाराईजियम एनीसोपले (*Metarhizium anisopliae*) २५० ग्राम प्रति रोपनीको दरले प्रयोग गर्ने।
- ०.३ देखि ०.५ मि.लि. इमिडाक्लोप्रिड (Imidacloprid) प्रतिलिटर पानीमा मिसाई माटोमा ड्रेन्च गर्ने।

खण्ड ४

तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा स्याउ रुटस्टक उत्पादनको लागि मासिक कार्य-तालिका

तन्तु प्रजनन् प्रविधिमार्फत गुणस्तरीय एवम् तोकिएको परिमाण सङ्ख्यामा स्याउ रुटस्टक बिरुवाहरू उत्पादन गर्न मासिक रूपमा तपसिल बमोजिम विभिन्न कार्यहरू क्रमस गर्नु पर्छ।

४.१. बैशाख (April/May)

- इन-भिट्रो बिरुवा स्थापनाको लागि नमुना सङ्कलन गरी कल्चर गर्ने।
- थप इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई सब-कल्चर एवम् रुटिङ गर्ने।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- अनुकूलन गर्नको लागि आवश्यक सामग्रीहरू जस्तैः बालुवा, कोकोपिट, भर्मिकम्पोष्ट, माटो, पोलिट्रे, पोलिथिन कभर आदि व्यवस्था गरी राख्नु पर्दछ।
- अनुकूलन गर्नु भन्दा दुई हप्ताअघि हार्डेनिङ सेक्सन तथा बेडहरूलाई राम्ररी सफाई तथा ढुसी देखिएमा ढुसीनासकले उपचार गर्ने।
- रुटिङ गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई दोस्रो हप्ताबाट प्राइमरी हार्डेनिङ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- पहिलो वर्षको नर्सरी बिरुवामा नियमित बगैंचा सरसफाइ एवम् आवश्यकता अनुसार सिँचाइ गर्ने।

४.२. जेठ (May/June)

- इन-भिट्रो बिरुवा स्थापनाको लागि नमुना सङ्कलन गरी कल्चर गर्न सकिने।
- थप इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई सब-कल्चर एवम् रुटिङ गर्ने।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- नर्सरी बिरुवामा नियमित बगैंचा सरसफाइ एवम् आवश्यकता अनुसार सिँचाइ गर्ने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, रातो सुलसुले, जिजेना मथ, पात बेर्ने कीरा आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.३. असार (June/July)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई निरन्तर सब-कल्चर एवम् रुटिङ गर्ने।
- वर्षायाम हुने भएकोले प्रयोगशालामा सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण जोखिम अत्यधिक हुने भएकोले जैविक सुरक्षाका उपायहरू राम्ररी अपनाउनु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा स्थानान्तरण गर्ने।
- रुटिङ गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई पुनः दोस्रो पटक प्राइमरी हार्डेनिङ गर्न सकिने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- बिरुवाको फेदमा गोडमेल गरी झारपात हटाई नियमित सरसफाइ एवम् आवश्यकता अनुसार सिँचाइ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा स्थानान्तरण गरिएका र नर्सरी बगैंचामा रहेका बिरुवाहरूमा सुक्ष्म खाद्यतत्व तथा अन्य जैविक मल वा रासायनिक मल दिने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, भुवादार लाही, रातो सुलसुले, जिजेना मथ, पात बेर्ने कीरा आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.४. साउन (July/August)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई निरन्तर सब-कल्चर एवम् रुटिङ गर्ने।
- वर्षायाम हुने भएकोले प्रयोगशालामा सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण जोखिम अत्यधिक हुने भएकोले जैविक सुरक्षाका उपायहरू राम्ररी अपनाउनु पर्दछ।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- बिरुवाको फेदमा गोडमेल गरी झारपात हटाई नियमित सरसफाइ एवम् आवश्यकता अनुसार सिँचाइ गर्ने।
- असार महिनामा नछरेको भए आवश्यकता अनुसार सुक्ष्म खाद्यतत्व तथा अन्य जैविक मल वा रासायनिक मल दिने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, रातो सुलसुले, जिजेना मथ, पात बेर्ने कीरा, लाही कीरा आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.५. भदौ (August/September)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- वर्षायाम हुने भएकोले प्रयोगशालामा सुक्ष्म जीवहरूको सङ्क्रमण जोखिम अत्यधिक हुने भएकोले जैविक सुरक्षाका उपायहरू राम्ररी अपनाउनु पर्दछ।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा स्थानान्तरण गर्ने।
- रुटिङ गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई पुनः तेस्रो पटक प्राइमरी हार्डेनिङ गर्न सकिने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाको फेदमा रहेको झारपात हटाई नियमित सरसफाइ गर्ने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, भुवादार लाही, रातो सुलसुले, फेद कुहिने, खुम्रे कीरा, पात बेर्ने कीरा आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.६. असोज (September/October)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- बिरुवाको फेदमा गोडमेल गरी झारपात हटाई नियमित सरसफाइ एवम् आवश्यकता अनुसार सिँचाइ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाको फेदमा रहेको झारपात हटाई नियमित सरसफाइ गर्ने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, भुवादार लाही, रातो सुलसुले, फेद कुहिने, खुम्रे कीरा, पात बेर्ने कीरा आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.७. कार्तिक (October/November)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- प्राइमरी हार्डेनिङ गरिएका बिरुवाहरूलाई सेकेन्डरी हार्डेनिङ सेक्सनमा स्थानान्तरण गर्ने।

- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाहरूलाई सिँचाइ तथा मिस्टिङ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाको फेदमा रहेको झारपात हटाई नियमित सरसफाइ गर्ने।
- ढुसीजन्य तथा कीराहरू जस्तैः सेतो धुले ढुसी, भुवादार लाही, रातो सुलसुले, फेद कुहिने, खुम्रे कीरा, आदिको प्रकोप देखिने हुँदा उचित रोग व्यवस्थापन गर्ने।

४.८. मङ्सिर (November/December)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई आगामी वर्षको लागि निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाहरूलाई सिँचाइ गर्ने।
- आवश्यकता अनुसार बिरुवाको फेदमा रहेको झारपात हटाई नियमित सरसफाइ गर्ने।
- मरेका बोटहरू भए जरासहित उखेलेर हटाउने।
- पुस र माघमा नयाँ नर्सरी बगैंचा स्थापनाको लागि जगा छनौट गरी रेखाङ्कन गर्ने।
- झरेका पातहरू बटुलेर जलाइदिने वा कम्पोष्ट मल बनाउने खाडलमा हाल्ने।

४.९. पुस (December/January)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई आगामी वर्षको लागि निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- अनुकूलन गरिएका बिरुवाहरूलाई फिल्ड नर्सरी बगैंचा स्थापनाको लागि रेखाङ्कन गरिएको स्थानमा स्थानान्तरण गर्ने।
- ढुसीनासक वा बोर्डोमिश्रणले उपचार गरी बिरुवा रोप्ने।
- नियमित रूपमा बिरुवाहरूलाई सिँचाइ गर्ने।
- कलमीको लागि आवश्यक सायनको व्यवस्था गर्ने।
- पहिलो वर्षको बिरुवाहरूमा कलमी गर्ने।
- झरेका पातहरू बटुलेर जलाइदिने वा कम्पोष्ट मल बनाउने खाडलमा हाल्ने।
- स्याउको कत्ले कीरा नियन्त्रण गर्न नर्सरी बिरुवामा खनिज तेल जस्तैः एट्सो (ATSO) वा सर्वो तेल १५-२० मि.लि. वा किन्नर गोल्ड (Kinnaur gold oil) १०-१५ मि.लि. प्रति पानीमा मिसाई बोटको सबै भागमा भिज्ने गरी छर्ने।

४.१०. माघ (January/February)

- इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई आगामी वर्षको लागि निरन्तर सब-कल्चर गर्ने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- पुस महिनामा नर्सरी बगैंचामा स्थानान्तरण नगरिएका बिरुवाहरूलाई रोप्ने।
- ढुसीनासक वा बोर्डीमिश्रणले उपचार गरी बिरुवा रोप्ने।
- नियमित रूपमा बिरुवाहरूलाई सिँचाइ गर्ने।
- पहिलो वर्षको बिरुवाहरूमा कलमी गर्ने।
- स्याउको कत्ले कीरा नियन्त्रण गर्न नर्सरी बिरुवामा खनिज तेल जस्तैः एट्सो (ATSO) वा सर्वो तेल १५-२० मि.लि. वा किन्नर गोल्ड (Kinnaur gold oil) १०-१५ मि.लि. प्रति पानीमा मिसाई बोटको सबै भागमा भिज्ने गरी छर्ने।

४.११. फागुन (February/March)

- सब-कल्चर गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई रुटिङ गराउने।
- निरन्तर इन-भिट्रो सब-कल्चर पनि गर्ने।
- प्रयोगशालामा आवश्यक सामग्रीहरूको व्यवस्था गर्ने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- बगैंचामा माटोको चिस्यान हेरी आवश्यकता अनुसार बिरुवामा सिँचाइ गर्ने।

४.१२. चैत (March/April)

- सब-कल्चर गरिएका इन-भिट्रो बिरुवाहरूलाई रुटिङ गराउने।
- निरन्तर इन-भिट्रो सब-कल्चर पनि गर्ने।
- नियमित रूपमा प्रकाश, सापेक्ष आर्द्रता र तापक्रम नियन्त्रण गर्ने।
- बगैंचामा माटोको चिस्यान हेरी आवश्यकता अनुसार बिरुवामा सिँचाइ गर्ने।
- अनुकूलन गर्नको लागि आवश्यक सामग्रीहरू जस्तैः बालुवा, कोकोपिट, भर्मिकम्पोष्ट, माटो, पोलिट्रे, पोलिथिन कभर आदि व्यवस्था गरी राख्नु पर्दछ।

अनुसूची-१

उपयोगी मापन तालिका

नाप

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

तौल

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

आयातन

१ मि.लि. = १००० माईक्रोलिटर	१ ग्यालन = ३.७८५४१ लिटर
१ मि.लि. = १००० क्युविक मिलिमिटर	१ पाथी = ८ माना
१ लिटर = १००० मि.लि.	१ मुरी = २० पाथी

क्षेत्रफल

१ वर्ग मिटर = १०.७६ वर्ग फीट	१ रोपनी = १६ आना
१ वर्ग फीट = ९२९.०३ वर्ग से.मी.	१ रोपनी = ५०८.५ वर्ग मिटर
१ हेक्टर = १००० वर्ग मिटर	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 कठ्ठा = 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

दवाव

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

१ KPa (किलो पासकल) = १००० Pa

कन्सन्ट्रेसन

१ M (मोलर) = १००० mM (मिलि मोलर)

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

१ ppm = १mg/१kg = १mg/लिटर H_2O

Number of moles = weight in grams/molecular weight

सन्दर्भ सामग्रीहरू (References)

Atreya, P. (2022). High-Density Apple Production Technology. Temperate Horticulture Development Centre, Marpha, Mustang (*Nepali*).

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

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*.

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.

Duchefa Biochemie. (n.d.). *McCown Woody Plant Medium (WPM) product sheet* [Product datasheet]. Duchefa Biochemie. Retrieved from Duchefa Biochemie website

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.

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

Lloyd, G., & McCown, B. (1980). *Commerciallyfeasible micropropagation of mountain laurel (Kalmia latifolia) by use of shoottip culture.* Proceedings of the International Plant Propagators' Society, 30, 421.

MoALD. (2025). Statistical Information on Nepalese Agriculture 2080/81 (2023/24). *MoALD*, 269. https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf

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

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.

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

नेपाल सरकार

कृषि तथा पशुपन्छी विकास मन्त्रालय

कृषि विभाग

राष्ट्रिय फलफूल विकास केन्द्र

शीतोष्ण बागवानी विकास केन्द्र

मार्फा, मुस्ताङ

२०८२