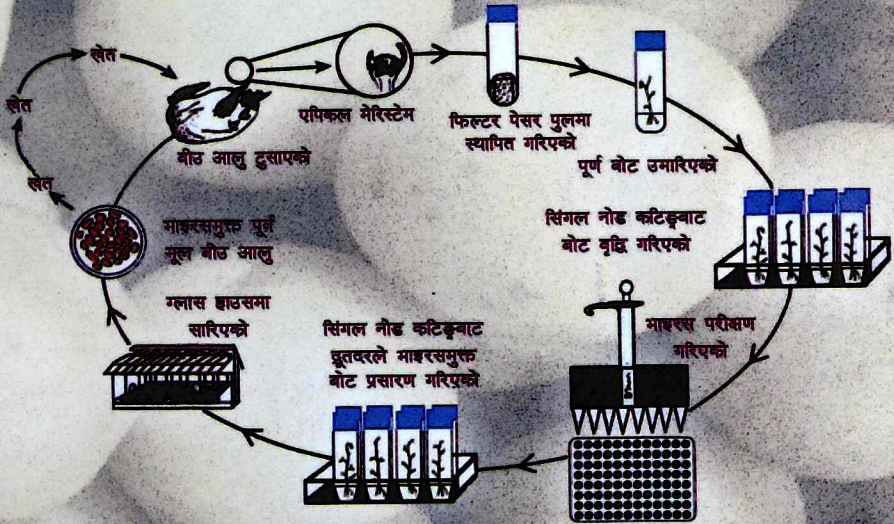


आलुको तन्तु प्रजनन र पूर्व-मूल बीउ उत्पादन

Potato Tissue Culture and Pre-basic Seed Production



डा. शम्भुप्रसाद धिताल



नेपाल सरकार

नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद

राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम

खुमलटार, ललितपुर

२०७२



नाम : डा. शम्भुप्रसाद धिताल
जन्म मिति : २०१६ साल आश्विन १५
जन्म स्थान : खरिबोट, गोरखा

स्थायी : गुन्जनगर गा.वि.स. वार्ड नं. २, चितवन, नेपाल

अस्थायी : बबरमहल, काठमाण्डौ-११, काठमाण्डौ, नेपाल

शिक्षा : बि.एस्सि. एजी. (B.Sc. Agri.); कृषि तथा पशु विज्ञान अध्ययन संस्थान, रामपुर, चितवन, बि.सं. २०३९

एम्. एस्सि. एजी. (M. Sc. Agri.); Kasetsart University, Bangkok, Thailand, बि.सं. २०५२

पिएच.डि. (Ph.D.); Kangwon National University, Chunchon, South Korea, बि.सं. २०६२

पोष्टडक (Postdoc); Kangwon National University, Chunchon, South Korea, बि.सं. २०६६

१. पुस्तक : Dhital, S.P. and H.T. Lim. 2011. Virus Elimination and Seed Production of Potato, LAP Lambert Academic Publication, Germany, pp 108.

२. International Journal: २२ वटा भन्दा बढी अनुसन्धानमुलक लेखहरू प्रकाशन गरेको

३. National Journal: २० वटा भन्दा बढी अनुसन्धानमुलक र अन्य विविध लेखहरू प्रकाशन गरेको

४. अन्य प्रकाशन: २० वटा भन्दा बढी आलुबाली संबन्धी Leaflet, Booklets, Folder, Poster आदि प्रकाशन गरेको

बि.सं. २०४० देखि २०४५ सम्म राष्ट्रिय आलुबाली बिकास कार्यक्रम, कृ.वि.मा स.आ.बि.अधिकृत

बि.सं. २०४५ देखि २०४८ सम्म हेलम्बु बागवानी फार्म, हेलम्बु, कृ.वि.मा स.बा. रोग विज्ञ

बि.सं. २०४८ देखि २०५२ सम्म राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम, नार्कमा वैज्ञानिक (S1)

बि.सं. २०५२ देखि २०६२ सम्म रा. आलुबाली अनु. कार्यक्रम, नार्कमा वरिष्ठ वैज्ञानिक (S3)

बि.सं. २०६२ देखि २०७१ पौषसम्म रा. आलुबाली अनु. कार्यक्रम, नार्कमा वरिष्ठ वैज्ञानिक (S4)

बि.सं. २०७१ माघ देखि हालसम्म रा.आलुबाली अनु. कार्यक्रममा वरिष्ठ वैज्ञानिक एवम् संयोजक

ISBN 993729711-7



9789937297110

आलुको तन्तु प्रजनन् र पूर्व-मूल बीउ उत्पादन

Potato Tissue Culture and Pre-basic Seed Production

डा. शम्भुप्रसाद धिताल
(वरिष्ठ वैज्ञानिक)



नेपाल सरकार
नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद
राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम
खुमलटार, ललितपुर
२०७२

कृति : **आलुको तन्तु प्रजनन र पूर्व-मूल बीउ उत्पादन**
Potato Tissue Culture and Pre-basic Seed Production

प्रकाशक : नेपाल सरकार
नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद
राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम

लेखक/सम्पर्क : डा. शम्भुप्रसाद धिताल
वरिष्ठ वैज्ञानिक एवम् संयोजक
राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम
खुमलटार, ललितपुर ।
फोन नं.: ९८४१ ४०२३५८ (मो.)
इमेल : shapradhi@hotmail.com
spdhit159@yahoo.com

© (सर्वाधिकार लेखकमा सुरक्षित)

प्रथम प्रकाशन : जेष्ठ, २०७२

प्रकाशन प्रति : ५०० थान

आवरण चित्र : मेरिस्टिम टिप कल्चर (meristem tip culture) द्वारा
भाइरस निर्मूलीकरण तथा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन
प्रविधि

ISBN : 978-9937-2-9711-0

मूल्य : रु. २५०/-

मुद्रण : सिद्धार्थ प्रिन्टिङ्ग प्रेस, ललितपुर मो.: ९८४९६२७६८९

मनतव्य

आलु नेपालमा धान, मकै र गहुँ पछिको चौथो प्रमुख खाद्य बाली हो । आलुलाई नेपालमा उच्च पहाडी क्षेत्रमा खाद्य बालीको रूपमा र तराई तथा पहाडी क्षेत्रमा तरकारी बालीको रूपमा लिने गरिएको पाइन्छ । नेपालमा आलु यस्तो महत्वपूर्ण बाली हुदाहुँदै पनि आशातीत रूपमा आलुको उत्पादकत्व बढाउन सिकिएको छैन । यसको प्रमुख कारण आलुबालीमा लाग्ने रोग कीराहरू नै हुन् । रोगहरू मध्ये भाइरस रोग प्रमुख मानिन्छ । तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा रोगरहित बीउ उत्पादन गरी बीउ उत्पादक कृषक समूह/फार्महरूसम्म पुऱ्याउनु नै यसवाट बच्ने सबैभन्दा भरपर्दो उपाय हो । जुन कार्य नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद् अन्तर्गत राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम, खुमलटारमा सन् १९८९/९० देखि निरन्तर रूपमा तन्तु प्रजनन प्रयोगशालाको संचालन भै भाइरस मुक्त बीउ आलु उत्पादन हुँदै आइरहेको छ । हालसम्म आलुको गुणस्तरिय बीउ उत्पादन प्रविधि बारे विस्तृतरूपमा लेखन कार्य नभएको अवस्थामा परिषद्को राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम संयोजक एवमं वरिष्ठ वैज्ञानिक डा. शम्भुप्रसाद धितालले सरल भाषामा यस पुस्तक प्रकाशन गर्न लाग्नु भएकोमा म धेरै खुसी छु । यस पुस्तकमा लेखकले तन्तु प्रजनन प्रयोगशाला सम्बन्धी र रोगरहित पूर्व-मूल बीउ (pre-basic seed) उत्पादन सम्बन्धी सम्पूर्ण कार्यको बारेमा सिलसिलेवार रूपले लेख्नु भएकोमा यस सराहनीय कामको लागि लेखकलाई धन्यवाद दिन चाहन्छु । यो पुस्तक “आलुको तन्तु प्रजनन र पूर्व-मूल बीउ उत्पादन (Potato Tissue Culture and Pre-basic Seed Production)” कृषि प्राविधिक, अनुसन्धानकर्ता तथा विद्यार्थीहरूका साथै कृषकहरूलाई समेत उपयोगी हुनेछ भन्ने मैले विश्वास लिएको छु ।




डा. बाई. आर. पाण्डे
कार्यकारी निर्देशक

नेपाल सरकार
नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद्

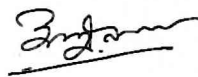
मेरो भनाई

नेपालमा आलु एक प्रमुख तरकारीको साथै उच्च पहाडी क्षेत्रमा मुख्य खाद्यवस्तुको रूपमा लिने गरिएको छ । मुख्य खाद्यबालीहरूमा आलुको स्थान ढाकिएको क्षेत्रफल अनुसार छैठौँ, उत्पादनमा चौथो र उत्पादकत्वमा पहिलोमा पर्दछ । आलु खेती नेपालका सबै जिल्लाहरूमा हुन सक्ने र बाह्रै महिना उपभोग्य वस्तु भएको हुँदा आलुको महत्व दिनानुदिन बढ्दै गएको छ भने अर्कोतर्फ यसमा विद्यमान समस्याहरूले गर्दा उत्पादकत्वमा खासै वृद्धि गर्न सकिएको देखिँदैन जसको कारणहरू मध्ये गुणस्तरीय बीउको अभाव प्रमुख हो । यस समस्याबाट उन्मुक्तिका लागि रोगरहित तथा गुणस्तरीय बीउ उत्पादन कार्यक्रम देश भित्रै स्थापना गरी उत्पादन गर्नु हो । यसका लागि मित्र राष्ट्र स्वीजरल्याण्डको आर्थिक तथा प्राविधिक सहयोगमा यस किसिमको प्रविधिको स्थापना र आवश्यक न्यूनतम जनशक्तिको विकास गरी सन् १९८९/९० देखि तन्तु प्रजनन प्रयोगशाला एवम् सिसा घर/जाली घरको स्थापना भै पूर्व-मूल बीउ अर्थात् "Pre-basic seed (PBS)" उत्पादनको लागि नेपालमा पनि यस किसिमको उच्च प्रविधि भित्रिनु गएकोमा स्वीस सरकार प्रति हार्दिक कृतज्ञता व्यक्त गर्दछु । यस प्रविधिको सुरुवात गर्नु हुने तत्कालिन संयोजक श्री ज्ञानप्रसाद राईको अथक प्रयासमा जुन सराहनीय कार्य भयो र हामीलाई पनि निरन्तरता गर्ने मौका मिल्यो त्यसका लागि उहाँ प्रति हार्दिक कृतज्ञता व्यक्त गर्न चाहन्छु । यस PBS उत्पादन कार्यलाई बढो मेहनतका साथ निरन्तरता दिनुहुने श्रीमति अम्बिका मानन्धर, डा. मुकुन्द रन्जित, श्री विनेशमान शाखः सबैमा हार्दिक कृतज्ञता व्यक्त गर्न चाहन्छु ।

त्यसैगरी यस पुस्तक लेखन प्रारम्भ गर्नका लागि हौसला एवम् निरन्तररूपले सल्लाह, सुझाव एवम् विविध सहयोग गर्नु हुने राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम खुमलटारका पूर्व संयोजक डा.

बुद्धिप्रकाश शर्मा, बाली रोग विज्ञान शाखाका पूर्व प्रमुख डा. हीराकाजी मानन्धरलाई पनि हार्दिक कृतज्ञता व्यक्त गर्न चाहन्छु । पुस्तक प्रकाशन गर्ने क्रममा महत्वपूर्ण सुझाव, सल्लाह तथा सम्पादन गरिदिनुहुने डा. बिष्णुकुमार धिताल प्रति पनि म हृदयदेखि आभार व्यक्त गर्दै उहाँहरूको सराहनीय कार्यको लागि हार्दिक धन्यवाद दिन चाहन्छु ।

“आलुको तन्तु प्रजनन् र पूर्व-मूल बीउ उत्पादन (Potato Tissue Culture and Pre-basic Seed Production)” पुस्तकले गुणस्तरीय आलु बीउ उत्पादन गर्ने सोच राख्नु हुने व्यवसायी, अनुसन्धानमा संलग्न विज्ञ/प्राविधिक, कृषि प्रसारमा लाग्नु भएका प्राविधिक तथा तन्तु प्रजनन् संबन्धी विषयमा अध्ययन अध्यापन गर्नु हुने सम्पूर्णलाई सहयोग पुग्ने अपेक्षा लिएको छु । अन्तमा यो पुस्तकलाई भविष्यमा अभ्र परिमार्जित गरी बढी व्यावहारिक एवं उपयोगी बनाउनका लागि पाठक वर्गबाट रचनात्मक सुझावहरूको अपेक्षा गर्दछु ।



डा. शम्भुप्रसाद धिताल
बबरमहल, काठमाण्डौ ११

Abbreviations

ABA	Abscisic acid
A/C	Air conditioner
BAP	6-benzylaminopurin
CCC	(2-chloroethyl) trimethylammonium chloride
CIP	International Potato Centre
DAS-ELISA	Double antibody sandwich -enzyme-linked immunosorbent assay
DNA	Deoxyribonucleic acid
EC	Electric conductivity
GA	Gibberellic acid
HEPA	High efficiency particulate air
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
LN	Liquid nitrogen
MS	Murashige and Skoog (1962)
NAA	α naphthaleneacetic acid
PBS	Per-basic seed
PDA	Potato dextrose agar
PEG	polyethylene glycol
PLRV	Potato leaf roll virus
psi	pounds per square inch
PVP	Polyvinylpyrrolidon-k 25
PVS-2	Plant vitrification solution-2
PVY	Potato virus Y
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDC	Swiss Development Cooperation
SNC	Single nodal cutting
UV	Ultraviolet
v/v	volume/volume

विषय-सूची

खण्ड १ : परिचय (Introduction).....	१
खण्ड २ : प्रयोगशाला व्यवस्थापन तथा आवश्यक सुविधाहरू.....	३
२.१ मिडिया बनाउने कोठा (Media preparation room or kitchen).....	३
२.१.१ अटोक्लेभ (Autoclave).....	८
२.१.२ डिस्टिलेसन युनिट (Distillation unit).....	८
२.१.३ विद्युतीय तराजु (Digital balance).....	९
२.१.४ चुम्बकीय घोलक (Magnetic stirrer).....	९
२.१.५ पिएच मीटर (pH meter).....	९
२.१.६ माइक्रो ओभन (Micro oven).....	१०
२.१.७ यूभि (Ultra violet; UV) लाइट.....	१०
२.२ कल्चर कोठा (Culture room)	१०
२.२.१ लेमिनारफ्लो (Laminar air flow cabinet/ clean bench).....	१२
२.२.२ हट एअर ओभन (Hot air oven).....	१३
२.३ मेरिस्टिम टिप निकाल्ने कोठा (Meristem excision room)	१४
२.३.१ डएस -एलाइजा कीट (DAS-ELISA kit).....	१४
२.३.२ एलाइजा रिडर (ELISA plate reader).....	१४
२.४ विरुवा हुर्काउने कोठा (Incubation room).....	१५
२.४.१ प्रकाश (Light).....	१६
२.४.२ तापक्रम र आर्द्रता (Temperature and humidity)	१६
२.५ भांडा सफा गर्ने कोठा (Washing room).....	१७
खण्ड ३ : मिडियाको बनेट तथा निर्मूलिकरण (Composition and sterilization of media).....	१९
३.१ एम एस मिडिया (MS media).....	२१
३.२ कल्चरको अवस्था (Cultural condition).....	२१
३.३ सुक्रोज (Sucrose).....	२१

३.४ सूक्ष्म खाद्यतत्व (Mineral nutrient).....	२२
३.५ ग्रोथ रेगुलेटर वा हर्मोन (Plant growth regulators).....	२३
३.५.१ अक्जीन (Auxin)	२३
३.५.२ साइटोकीनिन् (Cytokinin).....	२३
३.५.३ जिब्रिलिन (Gibberellin).....	२४
३.५.४ भिटाविन (Vitamins).....	२४
३.५.५ अन्य (Others).....	२४
३.६ निर्मलिकरण गर्ने तरिका (Sterilization method).....	२७

खण्ड ४ : भाइरस उन्मूलन गर्ने प्रविधि (Virus elimination method)..... २७

४.१ ताप उपचार प्रविधि (Thermotherapy).....	२७
४.१.१ स्वस्थ र राम्रो जातको विरुवाको छनौट.....	२८
४.१.२ विरुवाललाई प्रयोगशालामा स्थानान्तरण गर्ने	२८
४.२ रासायनिक उपचार प्रविधि (Chemotherapy).....	३०
४.३ विद्युतीय उपचार प्रविधि (Electrotherapy).....	३१
४.४ न्यून ताप उपचार प्रविधि (Cryotherapy).....	३२
४.५ मेरिस्टिम टिप प्रविधि (Meristem tip culture).....	३७
४.५.१ मेरिस्टिम टिप निकाल्ने (Excision of meristem tips).....	३७
४.५.२ मेरिस्टिम कल्चर गर्ने (Meristem culture).....	३८

खण्ड ५ : भाइरस रोग परीक्षण (Virus Indexing), सूक्ष्म प्रसारण (Micropropagation) र जर्मप्लाज्म संरक्षण (Germplasm Conservation)..... ४३

५.१ भाइरस रोग परीक्षण.....	४३
५.१.१ DAS-ELISA प्रविधि.....	४३
५.१.२ RT-PCR प्रविधि.....	४९
५.२ सूक्ष्म प्रसारण (Micropropagation).....	५२
५.२.१ एकल आँख्ले प्रविधि (Single nodal cuttings).....	५२
५.२.२ डाँठको वृद्धि (Shoot proliferation).....	५३

५.३ प्रयोगशालामा आलुको जर्मप्लाज्म संरक्षण (<i>In vitro</i> germplasm conservation).....	५४
---	----

खण्ड ६ : तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा आलुको जातीय सुधार (Tissue culture method for potato crop improvement)	५७
६.१ प्रोटोप्लास्ट कल्चर (Protoplast culture).....	५७
६.२ एन्थर कल्चर (Aulther culture).....	६०
६.३ भ्रूण कल्चर (Embryo culture).....	६२
६.४ सिंथेटिक बीउ उत्पादन (Synthetic seed production).....	६३

खण्ड ७ : प्रयोगशालामा सूक्ष्म बीउ उत्पादन (Microtuber production).....	६५
७.१ आलुको सूक्ष्म बीउ (microtuber) भनेको को हो ?.....	६५
७.२ सूक्ष्म बीउ (microtuber) उत्पादन प्रविधि.....	६६
७.३ सूक्ष्म बीउ (microtuber) को महत्व.....	६६
७.४ सूक्ष्म बीउ (microtuber) उत्पादन.....	६८
७.५ सिसाघर/जाली घरमा रोपाईं.....	६८

खण्ड ८ : हाइड्रोपोनिक प्रविधि (Hydroponic method) द्वारा पूर्व मूल बीउ उत्पादन.....	७१
८.१ परिचय.....	७१
८.२ हाइड्रोपोनिक प्रविधिमा विद्यमान सकारात्मक पक्षहरू	७३
८.३ हाइड्रोपोनिक प्रविधिमा विशेष ध्यान दिनु पर्ने कुराहरू	७४
८.५ विरुवाको तयारी तथा रोप्ने तरिका.....	७५
८.६ रोग तथा कीराहरूको नियन्त्रण.....	७६
८.७ आलु निकाल्ने	७७
८.८ बीउ आलुको उपचार तथा भण्डारण.....	७८

खण्ड ९: परंपरागत प्रविधि (Conventional method) द्वारा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन.....	७९
९.१ सिसाघर/जालीघरको निर्माण र संचालन.....	७९

९.२ विरुवा रोप्ने बेन्चको निर्माण.....	८१
९.३ माटोको मिश्रण.....	८१
९.४ माटोको उपचार.....	८१
९.५ जमिनको तयारी तथा मलखाद	८२
९.६ विरुवा रोप्ने	८४
९.७ पूर्व-मूल बीउ आलुको भण्डारण तथा बितरण.....	८६

खण्ड १० : पूर्व-मूल बीउ (PBS) आलु उत्पादनका लागि अपनाउनु पर्ने मासिक कार्यतालिका	८९
--	----

खण्ड ११ : नेपालमा हालसम्म उन्मोचन (Released) भै तन्तु प्रजनन प्रविधिबाट पूर्व-मूल बीउ उत्पादित आलुका जातहरूको संक्षिप्त विवरण.....	१०१
---	-----

११.१ कुफ्रि ज्योती	१०१
११.२ कुफ्रि सिन्दुरी.....	१०२
११.३ डेजिरे.....	१०३
११.४ जनकदेव.....	१०४
११.५ खुमल सेतो-१.....	१०५
११.६ खुमल रातो-२.....	१०७
११.७ खुमल लक्ष्मी.....	१०८
११.८ आई.पि.वाई-८.....	१०९
११.९ खुमल उज्वल.....	११०
११.१० खुमल उपहार.....	१११
११.११ कार्डिनल.....	११२

सन्दर्भ सूची.....	११३
--------------------------	------------

खण्ड - १

परिचय

आलु नेपालको महत्वपूर्ण तरकारी बाली हो भने विशेष गरेर उच्च पहाडी भेगमा यसलाई प्रमुख खाद्यान्नको रूपमा पनि उपभोग गरिन्छ । मुख्य खाद्यान्न बालीहरू मध्ये आलुको स्थान ढाकिएको क्षेत्रफल अनुसार छैठौँ (१८९,००० हेक्टर), उत्पादनमा चौथो (२६,१०,००० टन) र उत्पादकत्वमा पहिलो (१३.८१ टन/हे.) रहेको छ (कृ.व्य.प. तथा त.म. २०११/१२) । तराईको सम्म मैदानदेखि उच्च पहाडी भेगसम्म यसको खेती हुने र बाह्रै महिना विविध परिकारको रूपमा उपभोग गर्न सकिने हुँदा यसको महत्व दिनानुदिन बढ्दै गएको छ । आलु एकमात्र यस्तो बाली हो जुन विविध हावापनी, तापक्रम, माटोमा सफलताका साथ खेती गर्न सकिन्छ । अझैपनि नेपालमा आलुको उत्पादकत्व अन्य छिमेकी राष्ट्रहरूको तुलनामा निकै न्यून छ । परम्परादेखि नै आलुको प्रसारण दानाबाट हुँदै आएको छ । यसरी बर्षौँसम्म दानाद्वारा बीउ वृद्धि गरिरहँदा माटो तथा दानामा विद्यमान दुसीबाट, शाकाणुबाट, विषाणुबाट र निमाटोडबाट हुने रोगहरू फैलदै जाने खतरा हुन्छ । अतः यिनै समस्याहरूलाई समाधान गर्ने उद्देश्यले तन्तु प्रजनन् प्रविधिको विकास भयो जसले गर्दा छोटो समयमा रोगरहित विरुवाहरू धेरै उत्पादन गर्न सकिने भयो । भाइरस रोग बाहेक अन्य रोगहरू निर्मूल गर्ने धेरै तरिकाहरू छन् र सजिलो पनि छ तर भाइरस रोग निर्मूल गर्न सिमित प्रविधि उपलब्ध हुनाको साथै ती प्रविधि कठिन, बढी समय लाग्ने र खर्चिलो पनि छन् । नेपालमा आलुमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिको सुरुवात वि.सं २०४६ (सन् १९८९/९०) सालमा स्वीस सरकारको सहयोगमा भयो र हालसम्म रोग रहित बीउ आलु उत्पादन गर्ने कार्य हुँदै आइरहेको छ जुन बीउ आलुलाई पूर्व-मूल बीउ अर्थात् प्रि-वेसिक

सिड (pre-basic seed) वा PBS पनि भनिन्छ । यस किसिमको बीउको महत्त्वलाई बुझेर केहि कृषि उद्यमी तथा व्यापारीहरूले यस प्रकारका प्रयोगशाला र जालीघरको स्थापना गरेका थिए । तर यसको बढ्दो लागत, दक्ष प्राविधिकको अभाव तथा उत्पादित बीउको उच्च मूल्यको कारणले गर्दा लामो समय टिक्न नसकि बन्द भएका तथ्यहरू पनि छन् । सरकारले यसमा पर्ने समस्याहरू बारे बृहत छलफल गरी भविष्यमा सरकारी निकायलाई थप सहयोग वृद्धि गरी बढी उत्पादन गर्न प्रोत्साहन गर्ने साथै निजी उद्यमीहरूलाई पनि विशेष सहूलियत उपलब्ध गराई रोग रहित बीउ उत्पादन गर्नमा सघाउनु पर्ने अनुभवले देखाउँछ । अर्कोतर्फ, सरकारी स्तरमा स्थापना भएको एकमात्र यस प्रयोगशाला तथा सिसाघर/जालीघरलाई सुविधा सम्पन्न गराउँदै उत्पादन वृद्धिमा प्रोत्साहन गर्नुपर्ने देखिन्छ । यस प्रविधिबाट उत्पादित बीउ आलुको प्रयोग हुन थालेपछिका दिनहरूमा आलुमा लाग्ने खतरनाक रोग विशेष गरी आलुको भाइरस रोगहरू, खैरो पिपचक्के (Bacterial wilt), र ऐंजेरु (Wart) जस्ता रोगहरूको फैलावटमा कमी आएको र राष्ट्रिय उत्पादनमा गत बीस वर्षको तुलनामा २१२% ले वृद्धि भएको तथ्याङ्कले देखाएको छ (NPRP, 2009) । तन्तु प्रजनन प्रयोगशालाको स्थापना गरी आलुको पूर्व-मूल बीउ उत्पादन र त्यसको प्रयोगबाट मूल बीउ उत्पादन गर्न तथा हालसम्म उन्मोचन गरिएका आलुका जातहरूको छोटकरीमा जानकारी गर्न सहयोग पुगोस् भन्ने उद्देश्यका साथ यो पुस्तक तयार गरिएको छ ।

खण्ड - २

२. प्रयोगशाला व्यवस्थापन तथा आवश्यक सुविधाहरू

यस खण्डमा तन्तु प्रजनन् प्रयोगशाला (tissue culture laboratory) को निर्माण (construction of laboratory), व्यवस्थापन र त्यसका लागि आवश्यक पर्ने सरसामान, रसायनहरू, आदिको बारेमा उल्लेख गरिएको छ । विरुवाको आवश्यकता अनुसार प्रयोगशालाको साइज भर पर्दछ । तर आवश्यक न्यूनतम् पनि मिडिया बनाउने कोठा, सबकल्चर गर्ने कोठा र विरुवा हुर्काउने कोठाहरू (incubation room) हुनुपर्दछ । यहाँ हरेक कोठाको हुनुपर्ने आवश्यक साइज, सरसामान र पूर्वाधारहरूको बारेमा पनि उल्लेख गरिएको छ ।

२.१ मिडिया बनाउने कोठा (Media preparation room or kitchen)

यो कोठा आवश्यकता अनुसार कम्तीमा १०० देखि १५० वर्ग फिटको हुनु आवश्यक हुनुपर्दछ । आवश्यकता अनुसार वायु संचार (ventilation) र प्रकाशको राम्रो व्यवस्था भएको हुनुपर्दछ र वातानुकूलित गर्ने उपकरण (air conditioner) पनि हुनु आवश्यक पर्दछ । यसै कोठामा मिडिया बनाउने तथा अन्य विभिन्न प्रकारका रसायनिक पदार्थ पनि भण्डारण गर्नुपर्ने भएकाले वायु संचारको राम्रो व्यवस्था हुनु जरूरी छ । यस कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक उपकरण/सामानहरूको विवरण र रासायनिक पदार्थको विवरण तल उल्लेख गरिएको छ । पानीको पनि राम्रो व्यवस्था भएको हुनुपर्छ । यस कोठामा सम्भव भएसम्म फिल्टर डि-आयोनाइज गरिएको पानी र बेसिनको व्यवस्था हुनु जरूरी छ । सिसाका भाडाहरू तथा सामानहरू र रसायनिक पदार्थहरू राख्नका लागि आवश्यक मात्रामा उपयुक्त ज्याक र दराजहरू पनि हुनुपर्दछ ।

बाहिरबाट ल्याइएका आलुका नमूना सफा गर्ने ठाउँको राम्रो प्रबन्ध हुनु जरूरी छ । संभव भएसम्म भाँडाहरू धाराको पानीले सफा गरिसकेपछि पुनः एकपटक निर्मलीकृत (डिस्टिल्ड) पानीले पखाल्नु पर्दछ । भाँडाहरू प्रयोग गरिसकेपछि तुरुन्तै सफा गर्नुपर्दछ, अन्यथा मिडिया जस्ता पदार्थ भाँडामा टाँसिन गै पछि सफा गर्न गाह्रो हुन जाने हुन्छ । सफा गरिसकेपछि भाँडामा रहेको पानी सुक्न दिनुपर्दछ । यो कोठा मिडिया बनाउनुका अलावा ल्याब सामान भण्डारण गर्नका लागि पनि प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ ।

मिडिया बनाउने कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक सामान तथा रसायनहरूको विवरण निम्नासार छन् :

- Laminarflow (work bench)
- Autoclave (1 big, 1 small)
- Different types of glassware
- Hotplate suitable for large vessels
- Sensitive balance for measuring (mini. 0.1 mg)
- Micro-wave oven
- Water distillation apparatus
- Measuring cylinder
- Beakers
- Petri dish
- Plastic containers
- Deep freezer (-20°C)
- Automatic media dispenser
- Micro wave plastic jug
- Magnetic stirrer-cum-hotplate
- Storage tank for distilled water
- Sucrose
- Media mixture
- Gas, water and electricity supplies
- De-ionizer
- Coarse balance for measuring (0.01 g)
- Spatula & spoons
- pH meter
- Jam bottle with cap
- Conical flask
- Test tube with cap
- Steel dekchi
- Refrigerator (4°C)
- Fiter sterilization unit with vacuum pump
- Cabinets or cupboard
- Agar powder
- Muarshige & Skoog media
- Storage space or racks

२.१.१ अटोक्लेभ (Autoclave)

मिडियामा विरुवाको कुनै पनि भाग जस्तै बीउ, पात, आख्ला, जरा, तन्तु आदि राख्नुभन्दा पहिला मिडिया जीवाणु रहित हुनका लागि निर्मलीकरण गरेको हुनु पर्दछ । यसो गर्ने प्रविधिलाई निर्मलीकरण (autoclaving) र सो गर्ने सामानलाई अटोक्लेभ (autoclave) भनिन्छ । अटोक्लेभ विभिन्न साइज, आकार र मोडेलका हुन्छन् त्यसमध्ये horizontal type, vertical type आदि प्रयोगमा छन्



चित्र नं. १: Vertical type अटोक्लेभ

(चित्र नं. १) । आवश्यकता अनुसार यसमा प्रयोग हुने अन्य उपकरण तथा सामानहरू (accessories) थपघट गर्न पनि सकिन्छ । विभिन्न क्षमता भएका autoclaves प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । तुलनात्मक रूपमा horizontal autoclave मा काम गर्न सजिलो हुन्छ तर यो केहि महँगो पर्न जान्छ । प्रायजसो मिडियाहरू अथवा सामानहरू पनि अटोक्लेभ द्वारा नै निर्मलीकरण गरिन्छ । Autoclaving भनेको pressurized steam दिएर त्यसमा हुनसक्ने सबै जीवाणुहरूलाई निर्मूल गर्ने प्रविधि हो । कुनै पनि रोगयुक्त मिडिया अथवा सामान प्रयोगपछि फाल्नु भन्दा पहिले पनि निर्मलीकरण गर्नु उपयुक्त हुन्छ जस्को लागि autoclaving गर्नु अनिवार्य हुन्छ । Autoclave मा $99\text{--}135^{\circ}$ से. तापक्रमसम्म गर्न मिल्दछ । निर्मलीकरण गर्ने समय त्यसमा प्रयोग हुने प्रेसर, भित्री तापक्रम, प्रयोग गर्ने मिडिया आदिको परिमाण (volume) र भित्र प्रयोग हुने भाँडा (type of container) आदिमा भरपर्दछ । Autoclave गर्ने सम्पूर्ण सामान भित्र राखिसकेपछि स्वीच "ON" गर्ने र psi को संकेत सुई ५-१० को बिचमा रहँदा १-२ पटक

भिन्न रहेको पहिलाको चिसो हावा भल्ब खोली फाल्नु अनिवार्य हुन्छ भने psi १५ नाघेपछि पनि भित्रको तापक्रम १२९° से. नपुगेमा १५ भन्दा कम नहुने गरी भल्ब खोल्नु पर्दछ । Autoclave भित्रको तापक्रम निरीक्षण गर्न thermorecorder को पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ ।

(क) निर्मलीकरण (Autoclaving) गर्दा आवश्यक पर्ने समय र तापक्रम

- टेष्ट ट्यूब, बोतल अथवा फ्लास्कमा २०-५० एम. एल. मिडिया भएमा १२९° से. तापक्रममा २० मिनेट ।
- बोतल अथवा फ्लास्कमा ५०-५०० एम.एल. मिडिया भएमा १२९° से. तापक्रममा २५ मिनेट ।
- बोतल अथवा फ्लास्कमा ५००-५००० एम.एल. मिडिया भएमा १२९° से. तापक्रममा ३५ मिनेट ।
- खालि टेष्टट्यूब, बोतल, फ्लास्क र फिल्टर पेपर आदिलाई १२९° से. तापक्रममा ३० मिनेट autoclaving गर्नुपर्दछ ।

(ख) अटोक्लेभ (Autoclave) मा सामान राख्नुभन्दा पहिले ध्यान दिनुपर्ने कुराहरू

- Autoclave मा सँधै निर्मलीकरण गरेको पानी मात्र प्रयोग गर्ने ।
- Autoclave मा रहेको इलेक्ट्रीक क्वाइल (हिटर रड) पानीले पुरै डुवेको हुनुपर्दछ ।
- सेफ्टीभल्ब र प्रेसर गजले काम गरेको छ/छैन निरीक्षण गर्नुपर्दछ ।
- शुरुमा सामान भित्र राखेर बिको बन्द गरेपछि भित्रको हावा फालेर पुनः बन्द गर्नुपर्दछ ।
- Presser 15 PSI पार गरेपछि पुनः एकपटक भित्रको हावा विस्तारै खोली 15 PSI मा भरेपछि बन्द गर्नुपर्दछ ।

(ग) अटोक्लेभ (Autoclave)मा सामान राख्दा ध्यान दिनुपर्ने बुँदाहरू :

- मिडिया स-साना भाँडामा राख्नुपर्दछ ।
- Autoclave गर्न हुने सामान मात्र प्रयोगमा ल्याउने ।
- स-साना बोतल र ट्यूबहरू जालीवाल बास्केटमा राख्ने ।
- बोतलहरू autoclaving गर्दा बिको केहि हल्का खोल्नुपर्दछ ।
- Autoclave व्याग प्रयोग गरेको छ भने व्यागको मुख केहि खुला हुनुपर्दछ ।
- धेरै ठूल-ठूला भाँडाहरू प्रयोग नगर्ने ।
- Autoclaveing गर्दा भाँडमा सामानहरू धेरै खाँदिर नराख्ने आदि ।

(घ) निर्मलीकरण गर्ने कार्य पुरा भएपछि अटोक्लेभ खोल्दा अपनाउनु पर्ने सावधानी

- च्याम्बर प्रेसरको निडल "0" मा पुगेको हुनुपर्दछ (सो कुरा प्रेसर गजबाट थाहा हुनेछ ।
- च्याम्बरको हावा एकैचोटी फाल्ने काम गर्नु हुँदैन ।
- च्याम्बरको तापक्रम 50° से. भन्दा कम भएपछि मात्र autoclave को बिको विस्तारै खोल्नुपर्दछ ।

(ङ) निर्मलीकरण (autoclaved) भैसकेपछि भित्रको सामान फिक्दा ध्यानदिनुपर्ने बुँदाहरू

- प्रयोगशाला कोट (एप्रोन) को प्रयोग गर्नुपर्दछ ।
- ताप प्रतिरोधक (कटन) ग्लोबको प्रयोग गर्ने ।
- Autoclave को ढोका विस्तारै खोल्न शुरू गर्ने र आफ्नो अनुहार सिधै autoclave तिर नहेरी दायाँबायाँ हेर्ने ।

- विशेष गरी मिडिया भिक्दा पोखिएर खुट्टामा पर्ने संभावना हुने भएकाले होसियारी अपनाउनु पर्दछ ।

(च) अटोक्लेभ गर्दा नोक्सान (break down) हुन सक्ने तत्वहरू निम्नानुसार छन् :

Chlorocholine chloride (ccc), Zeatin, GA, Vitamin B, Vitamin B12, Vitamin C, Panthothenic, Antibiotics, Plant extracts, and Enzymes.

२.१.२ डिस्टिलेसन युनिट (Distillation unit)

प्रायः गरेर पानीलाई उमालेर र फिल्टर गरेर निर्मलीकरण गरिन्छ । डिस्टिलेसन विभिन्न प्रकार र साइजका हुन्छन् । यसबाट प्रयोगशालामा प्रयोग गर्न शुद्ध पानी तयार गरिन्छ । निर्मलीकरण गरिएको पानीबाट मिनेरल्स र रसायनिक तत्वहरूका साथै सबै प्रकारका जीवाणु/विषाणुहरू रहित पारिएको हुनेछ । साधारण धाराको पानीमा विभिन्न रसायनिक तत्वहरू र जीवाणुहरू तथा ग्याँस र अन्य विविध कुराहरू मिसिएको हुन सक्ने भएकाले प्रयोगशालामा मिडिया बनाउने काममा प्रयोगमा ल्याउनु हुँदैन । मिडिया बनाउनमा प्रयोग हुने पानी कम्तीमा पनि स्टानण्ड टाईप-२ ग्रेडको हुनुपर्नेछ । साधारणतयाः पानीलाई पहिला de-ionization गरिन्छ र त्यसलाई सिङ्गल वा डबल डिस्टिलेसन गरी तयार गरिन्छ । De-ionization बाट सबै प्रकारका ionic impurities हटाइन्छ भने distillation बाट सबै प्रकारका organic molecule, जीवाणु तथा pyrogens मुक्तहुने छ र उत्पादित पानीको EC 1.0 $\mu\text{mho/cm}$ भन्दा कम हुनुपर्दछ ।

२.१.३ विद्युतीय तराजु (Digital balance)

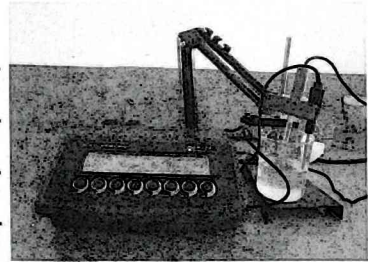
तराजु धेरै प्रकार, मोडल तथा क्षमतामा उपलब्ध हुने गर्दछन् । प्रयोगशालामा प्रयोग हुने तराजु उच्च गुणस्तरको र थोरै भन्दा थोरै परिमाणको पनि तौलिन सक्ने क्षमता भएको हुनुपर्दछ । तराजुहरू धेरैजसो ब्याट्री तथा विद्युतीय शक्तिद्वारा संचालित हुने गर्दछन् । केहि तराजुहरू तौलिने तत्वहरूको आर्द्रता पनि मापन गर्न सक्ने प्रकारका हुने गर्दछन् । प्रयोगशालामा प्रयोग गर्ने तराजुको स्पेसिफिकेसन राम्रोसंग एकिकन गर्नुपर्ने हुन्छ जस्तै weighing range, readability र repetability आदि । सकेसम्म प्रयोगशालामा प्रयोग हुने तराजु ISO प्रमाणित भएको हुनुपर्दछ ।

२.१.४ चुम्बकीय घोलक (Magnetic stirrer)

यो विशेष गरेर ठोस तथा धुलो पदार्थलाई छिटो पानीमा घोलनका लागि प्रयोगमा ल्याइन्छ । यो विभिन्न साइज र बनौटका हुन्छन् भने प्रायः सबैमा बेस (base) मा चुम्बक (magnet) र गति घटबढ (speed controlled) गर्न मिल्ने बनाइएको हुन्छ । ठोस पदार्थ घोलनका लागि पदार्थलाई पानीमा मिसाइन्छ र त्यसमा stirring bar राखिन्छ र control knob को सहायताले आवश्यक परेको खण्डमा यसले घोललाई तताउने वा उमाल्ने काममा पनि प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । यो प्रयोगशालामा अति आवश्यक पर्ने सामानहरू मध्येमा पर्दछ ।

२.१.५ पिएच मीटर (pH meter)

यो विभिन्न मोडलमा उपलब्ध हुने गर्दछ (चित्र नं. २) । यसले पानीमा भएको हाइड्रोजन आयोन (ions) को प्रभावकारी परिमाण पत्ता लगाउन मद्दत गर्दछ । हाइड्रोजनको खास मोलार, pH



चित्र नं. २: पिएच मीटर

मिटर भनेको हाइड्रोजन आयोनको नेगेटिभ लग (log) हो । यसको स्केल १ देखि १४ सम्म हुन्छ र १ भनेको अत्याधिक एसिडीक (acidic), १४ भनेको अत्याधिक क्षारिय (alkaline) र ७ भनेको तटस्थ (neutral) हो । यसलाई समय समयमा क्यालिब्रेसन गरिरहनु पर्दछ ।

२.१.६ माइक्रो ओभन (Micro oven)

प्रयोगशालामा माइक्रोओभनको पनि उत्तिनै जरूरी हुन्छ जति अरू सामानहरूको हुने गर्दछ । विशेष गरेर अगर मिडियाहरू घोलका लागि माइक्रोओभनमा उमालिन्छ । त्यसैगरी विभिन्न सोलुसन अथवा पानीयुक्त तत्वहरू तताउन वा उमाल्नमा यसको प्रयोग गरिन्छ । आवश्यकता अनुसार विभिन्न साइज र प्रकारका माइक्रोओभन प्रयोग गर्न सकिन्छ ।

२.१.७ यूभि (Ultra violet; UV) लाइट

प्रयोगशालाका कोठा तथा क्याबिनेट उपचार गर्न UV निकै उपयोगी छ र त्यसै अनुसार प्रचलनमा ल्याइएको छ । यसको प्रभावकारिता कोठाको सरसफाई, त्यहाँको तापक्रम र UV लाइटको साइजमा भरपर्दछ । कोठाको आर्द्रता ७०% भन्दा माथि भएको खण्डमा UV लाइटको प्रभाव खासै देखिदैन । त्यसैगरी UV लाइट/बल्ब कति समय (age) प्रयोग गरेको हो त्यसमा पनि भरपर्दछ । साधारणतया: UV करिब १००० घण्टासम्म प्रभावकारीरूपले प्रयोग गर्न सकिन्छ । विशेषगरी लेमिनारफ्लो (laminar bench) मा UV लाइटको प्रयोग गरिन्छ ।

२.२. कल्चर कोठा (Culture room)

प्रयोगशालाका कोठाहरू मध्ये यो एक महत्वपूर्ण कोठा मानिन्छ । अन्य कोठाहरूको तुलनामा यो कोठा सधैं सफा हुनु अति आवश्यक पर्दछ ।

सफा पानी तथा नमूना सफा गर्ने ठाउँको राम्रो प्रबन्ध हुनु जरूरी छ । आवश्यकता अनुसार यो कोठाको साइज १०० देखि १५० वर्ग फिटको हुनुपर्ने छ । यसमा लेमिनारफ्लो र त्यसमा ultraviolet (UV) लाइट र एउटा वातानुकूलित मेसिन (A/C) पनि जडान भएको हुनुपर्दछ ।

कल्चर कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक सामान तथा रसायनहरूको विवरण निम्नानुसार छन् :

- Electric sterilizer (heat sterilizer)
- Forceps
- Scalpel handle
- Spirit burner/gas burner
- Dry oven (dryer)
- Temperature controller
- Culture racks
- Timer for regulate day-length
- Trolley
- Scissor
- Scalpel blade
- Needle
- Timer
- Other electrical goods
- Electricity supply
- Fluorescent tubers
- Shaker for rotator
- Spirit lamp

अन्य साधारण सामानहरू (General equipments)

Measuring cylinder, Conical flask, Plastic container, Disposable syringe, Micro pipette, Micro pipette tips, Beaker, Micro-tubers, Conical tube, Micro filter, Plastic jug आदि ।

अन्य साधारण रसायनहरू (General Chemicals)

Alcohol, NaOC_2 , Tween-20, Spirit, NaOH, HCL, GA_3 , Kinetin, BAP, IAA, NAA, IBA, Sorbitol, Manitol, Inositol, ABA, Maleic hydrazide, Chlorocholine chloride (ccc), Hypoclorate आदि ।

२.२.१ लेमिनारफ्लो (Laminar Air Flow Cabinet or Clean Bench)

कल्चर गर्ने क्रममा जीवाणुहरूबाट आक्रमण (contamination) कम गर्नका लागि तन्तु प्रजनन् प्रयोगशालामा लेमिनारफ्लोको प्रयोग आवश्यक पर्दछ । लेमिनारफ्लो विभिन्न प्रकार र साइजका हुन्छन् साधारणतया: Horizontal type, Vertical type, double working space तथा single working space आदि (चित्र नं. ३) । खास गरेर

यसले culture कोठाको हावा हापा (HEPA) फिल्टर हुँदै लेमिनारफ्लो भित्र फाल्दछ जसले गर्दा त्यस भित्र काम गर्दा मिडिया, विरुवाका भागहरू बाहिरी फिल्टर नगरेको हावाको सम्पर्कमा आउन पाउँदैन र अरू जीवाणुहरूले आक्रमण गर्न पाउँदैन । लेमिनार फ्लोमा उज्यालोका लागि ट्युबलाइट र निर्मलीकरण (sterilization) का लागि UV लाइट भित्री उपल्लो भागमा जडान गरेको हुनुपर्दछ । त्यसैगरी



चित्र नं. ३: लेमिनारफ्लो

सामानहरू निर्मलीकरण गर्नका लागि वर्नर सहित ग्याँस सप्लाई गरेको हुनुपर्दछ । यसको सट्टामा स्पिट बत्तिको पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ । त्यसैगरी सोहि कार्यका लागि हिटर जडान गरी तताउने beat sterilizer को पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ । लेमिनारफ्लोमा काम गर्नुभन्दा पहिला कम्तीमा ३० मिनेट मेसिनका साथै UV लाइट पनि 'ON' गर्नुपर्दछ । काम शुरू गर्नु भन्दा पहिला UV लाइट 'Off' गर्नु अनिवार्य हुन्छ । त्यसै गरी काम शुरू गर्नुभन्दा पहिला बेन्चको भित्र कामगर्ने स्थानमा स्पिटद्वारा निर्मलीकरण गर्नु पर्दछ । हरेक दिन काम सम्पन्न गरेपछि पुनः स्पिट लगाएर सबै ठाउँहरू सफा गर्ने, Cabinet

मेसिन बन्द गर्ने र यसको कभर भएमा कभरले छोपि राख्नुपर्दछ । हापा (HEPA) फिल्टरको पाटर्स साइज $0.2 \mu\text{m}$ हुने गर्दछ । लेमिनार फ्लोलाई २-३ वर्ष बिराई मर्मत तथा फिल्टर सफा गर्ने र आवश्यक परेको खण्डमा फिल्टर फेर्नु पनि पर्दछ । यसको अवस्था विशेषगरी हावाको बहन (Air speed) सम्बन्धी जानकारी लिनका लागि air speed मापन यन्त्र (thermo-recorder) को प्रयोग गर्न सकिन्छ जस्मा ०.४ भन्दा माथि हुनुपर्दछ भने बिग्रे (contamination) को अवलोकन गर्न लेमिनारफ्लो 'ON' गरेको कम्तीमा ३० मिनेटपछि पेट्रिडिक्समा autoclaving गरी तयार गरिएको potato dextrose agar (PDA) पेट्रिडिक्सको बिको खोलि करिब १ घण्टासम्म राख्ने र त्यसपछि बिको बन्द गरी observation को लागि उपयुक्त स्थानमा राखि बिग्रे नबिग्रेको अवलोकन गर्नुपर्दछ ।

२.२.२ हट एयर ओभन (Hot air oven)

यो प्रयोगशालामा आवश्यक उपकरणहरू मध्य एक मुख्य उपकरण हो । यसबाट प्रायःजसो ग्लासका सामान (विकर, टेस्ट ट्यूब, बोतल, ग्लास सिरिन्ज), स्टिलका सामान, पाउडर तथा तेलयुक्त पदार्थहरू निर्मलीकरण गर्न प्रयोग गरिन्छ । साधारणतया: यो ५० देखि ३०० डिग्री सेल्सीयस तापक्रम पुग्ने गरी निर्माण गरिएको हुन्छ । Thermostat द्वारा तापक्रम नियन्त्रण गरिएको हुन्छ । यसमा दुई तह हुन्छ, भित्रीतहमा कुचालक (poor conductor) र बाहिरी तह धातु (metallic) ले बनेको हुन्छ । भित्री भागमा तातो हावा सबैतिर एकनाश हुने व्यवस्था मिलाइएको हुनुपर्दछ । यो विभिन्न मोडेल र साइजका हुने गर्दछन् । सामान निर्मलीकरण गर्न कम्तीमा पनि १७० डिग्री सेल्सीयसमा एक घण्टा संचालन गर्नुपर्दछ ।

२.३ मेरिस्टिम टिप निकाल्ने कोठा (Meristem excision room)

यो कोठा धेरै ठूलो नभएपनि हुन्छ अथवा कोठा कम भएको खण्डमा यो काम आइसोलेसन वा कल्चर कोठामा नै पनि गर्न सकिन्छ। अवस्था हेरि कोठा ८०-१०० वर्ग फिट भए पुग्दछ तर यसमा एक लेमिनार फ्लो राख्न पुग्ने हुनु पर्दछ। सफा फिल्टर पानी, वास बेसिन र बत्तिको व्यवस्था पनि भएको हुनु पर्दछ।

यस कोठामा हुनुपर्ने आवश्यक सामान तथा रसायनहरूको विवरण निम्नानुसार छन् :

- Laminar air-flow cabinet
- UV light
- Dissecting microscope
- Petri dish
- Dry sterilizer oven
- Forcep and scissor

२.३.१ डएस-एलाइजा कीट (DAS-ELISA kit)

एलाइजा कीटमा भाइरस परिक्षणको लागि आवश्यक पर्ने सम्पूर्ण रसायन (Antibodies, conjugate) र सामानहरू समावेश गरिएको हुनेछ। साथमा प्रयोग सम्बन्धी निर्देशिका संम्लग्न गरिएको हुनेछ। निर्देशिका अनुसार stock solution आदिको तयार गर्नु पर्ने हुन्छ। कीट केही मात्रामा महंगो भएपनि प्रयोग गर्न सजिलो, छिटो र भरपर्दो हुनेछ।

२.३.२ एलाइजा रिडर (ELISA plate reader)

यो धेरै प्रकारका (Model) का हुने गर्दछन्। प्रायःगरेर यसमा ९६ प्वाल (Well) हुने गर्दछन्। डाटा (data) स्टोर गरेर राख्न मिल्ने, प्रिन्ट गर्ने मिल्ने र स्क्रिनमा हेर्न मिल्ने आदि प्रकारका



चित्र नं. ४: एलाइजा रिडर

हुन्छन् (चित्र नं. ४) । यसमा रहेको फिल्टर ४०५, ४५०, ४९० nm को हुने गर्दछ ।

२.४ विरुवा हुर्काउने कोठा (Incubation room)

प्रयोगशालाको निर्माण गर्दा प्रयोगशाला भित्रको मुख्य भागमा संगै शुरूमा रहेको विशेष कोठा (buffer room) को व्यवस्था गरेको हुनु पर्दछ । आवश्यकता हेरी यसमा ८-१२ जना उभिन पुग्ने ठाउँ हुनु पर्दछ । विशेष कोठामा दुवैतर्फ ढोका हुनु जरूरी हुन्छ । प्रयोगशालाको भित्री भागमा प्रवेश गर्दा प्रयोग हुने एग्रोन, चप्पल आदिको व्यवस्था पनि यसै कोठामा हुनुपर्दछ । यसमा पस्नको लागि बाहिरी ढोका खोलेर भित्र छिरेपछि बाहिरी ढोका बन्द गरेपछि मात्र भित्री ढोका खोली अन्य कोठाहरूमा जाने व्यवस्था मिलाउनु पर्दछ । आवश्यक परेमा हात तथा जुता, कपडा आदिमा सामान्य ७०% अल्कोहल स्प्रे गरेर मात्र भित्र पस्नु पर्दछ ।

प्रयोगशालामा स-साना विरुवाहरू हुर्काउनु पर्ने भएकाले यो कोठामा विशेष गरी तापक्रम, प्रकाश, र सापेक्षिक आर्द्रताको उपयुक्त व्यवस्था गरेको हुनुपर्दछ । यो कोठामा विरुवाहरू लामो समयसम्म रहने भएकाले बिग्रन (contamination) नहुने वातावरण बनाउनु पनि उत्तिकै आवश्यक पर्दछ । कोठाको साइज आवश्यकता हेरी १००-१५० वर्ग फिट हुनुपर्नेछ । यसमा विरुवा सहितको बोतलहरू राख्ने भएकाले च्याक (तख्ता) जडान गरिएको हुनुपर्दछ ।

विरुवा हुर्काउने कोठामा आवश्यक पर्ने उपकरणको नामावली :

- Temperature controller
- Culture racks
- Timer for regulate day-length
- Other electrical goods
- Electricity supply
- White fluorescent tubes
- Air Conditioner

२.४.१ प्रकाश (Light)

विरुवालाई आवश्यक पर्ने प्रकाशको व्यवस्था गरिएको हुनुपर्दछ । विरुवाका बोतलहरू राख्नका लागि बनाइएका हरेक तख्ताहरूको माथिल्लो भागमा ट्यूबलाइट जडान गरेको हुनुपर्दछ । अरू साधारण प्रकाश भन्दा फ्लोरोसेन्ट (fluorescent) प्रकाश एकनाशले फैलने, बढी प्रकाश दिने र तापक्रम कम आदि हुने कारणहरूले गर्दा बढी प्रभावकारी हुनेछ । आलुको जात अनुसार विरुवालाई उपलब्ध हुने उज्यालो २०००-३००० लक्स (Lux) ($20-30 \mu E/m^2/s$) हुनु पर्दछ भने केहि जातहरूलाई ५००० लक्स भन्दा बढी पनि आवश्यक पर्दछ । विरुवा राख्ने तख्ताहरूको उचाई बोतलको माथिल्लो भाग र ट्यूबलाइटको दुरी बढीमा १५ से.मी.को हुनुपर्दछ भने धेरै नजिक हुँदा विरुवालाई बढी तातो भै विरुवा डढ्न सक्दछ । प्रकाशको अधिकतम सदुपयोगका लागि कोठा उज्यालो हुने प्रकारले पेन्ट गर्नुपर्दछ र आवश्यक परेको खण्डमा प्रकाश फर्काउने साधन (reflector) को पनि प्रयोग गर्नुपर्दछ ।

२.४.२ तापक्रम र आर्द्रता (Temperature and humidity)

त्यसैगरी तापक्रम नियन्त्रण उपकरण वातानुकूलित मसिन (air conditioner; A/C) पनि जडान गर्नुपर्दछ । विशेष गरी विद्युत कटौती हुने स्थानमा वा विद्युत महशुल कम गराउन विद्युतको विकल्पको रूपमा सूर्यको प्रकाश प्रयोग गर्न पनि सकिन्छ । यसको लागि अवस्था हेरी सूर्यको प्रकाश बढी भन्दा बढी कोठा भित्र पस्न सक्ने गरी दक्षिण तर्फ ठू-ठूला सिसा राखेका भ्याल भएको कोठा बनाउन सकिन्छ । कोठाको सबै भागमा एकनाशको तापक्रम हुनु जरूरी हुन्छ । कोठामा जडान गरिएको A/C अथवा हिटरले त्यहाँको सापेक्षिक आर्द्रतालाई पनि नियन्त्रण गरेको हुन्छ । कोठाको आर्द्रता ५०-७०% हुनुपर्दछ । यदि ५०% भन्दा कम भएमा मिडियामा भएको पानीको मात्रा कम हुने र

मिनरल साल्टको मात्रा बढ्न गै विरुवालाई असर पर्न सक्दछ । त्यसैगरी ७०% भन्दा बढी हुन गएमा भाँडा भित्रको मिडियामा समेत असर पर्न गै बिग्रने (contamination) संभावना हुन्छ ।

विरुवा राख्ने तख्ता (shelves) कोठाको लम्बाइ, चौडाइ र आवश्यकता अनुसारका हुन्छ भने तिनीहरू प्रायः धातु (metallic) अथवा काठका हुनुपर्दछ । सेतो रंगले पेन्ट गरिएको हुनु पर्दछ । यसको लम्बाइ आफू अनुकुल भएपनि चौडाइ करिब ४५ सेमी र एउटा तख्ता देखि अर्को तख्ताको उचाई करिब ३० से.मी हुनुपर्दछ । जसले गर्दा विरुवा राख्न र भिक्न सजिलो हुनुका साथै विरुवाले धेरै भन्दा धेरै प्रकाश प्राप्त गर्न पाउँछ । कोठा भित्रको तापक्रम, सापेक्षिक आर्द्रता र प्रदुषण नियन्त्रण गर्न बाहिरी वातावरणबाट फरक छुट्टाएको हुनुपर्दछ । कोठाको ढोका तथा भ्यालहरू पूर्णरूपले सिल गरिएको हुनुका साथै अनावश्यक मान्छे आवत जावत कम गर्ने किसिमले बनाउनु पर्दछ । Tissue culture laboratory कुनै पनि स्थानमा बनाउन सकिन्छ तर पनि आलुको खेती हुने स्थान, बिजुली तथा पानी उपलब्ध हुने, निकासको राम्रो व्यवस्था भएको र यातायात तथा संचारको पहुँच भएको स्थानमा राम्रो हुन्छ ।

२.५ भाँडा सफा गर्ने कोठा (Washing room)

प्रयोगशाला भित्र प्रयोग गरिसकेका भाँडाहरू (टेष्टट्यूब, बोतल, बिको आदि) सफा गर्ने बेग्लै कोठाको व्यवस्था हुनुपर्दछ । यो कोठा अन्य कोठाहरू भन्दा अलि बाहिरी भागमा हुनुपर्दछ । यस कोठामा पानीको राम्रो व्यवस्था हुनुका साथै वास वेसिन (wash basin) पनि हुनु जरुरी छ । निकासको राम्रो प्रबन्ध हुनुपर्दछ । यसै कोठामा भित्रबाट आएका बिग्रएका (contaminated) मिडिया सहितका ट्यूब, बोतल आदि autoclave गर्ने व्यवस्था हुनुपर्दछ भने सामानहरू सफा गरिसकेपछि सुकाउन hot air oven को पनि व्यवस्था हुनुपर्दछ ।

खण्ड - 3

३. मिडियाको बनोट तथा निर्मलीकरण (Composition and sterilization of media)

३.१ एम एस मिडिया (MS media)

टिस्सू कल्चर प्रयोशालामा विशेष गरी आलुको विरुवा हुर्काउन Murrashige and Skoog भन्ने वैज्ञानिकहरूले सन् १९६२ मा विकास गरेको मिडिया भएको हुनाले यसलाई एम.एस मिडिया (MS media) भनिन्छ (Murashige and Skoog, 1962)। तयारी एम एस मिडिया (MS media) पनि बजारमा उपलब्ध हुने गर्दछ भने प्रयोशालामा पनि तयार गर्न सकिने छ। उपलब्ध विभिन्न प्रकारका मध्ये आलु विरुवाको लागि MS media with vitamis प्रयोगमा ल्याउनु उपयुक्त हुनेछ। तयारी मिडियामा सुक्रोज मिसाएको र नमिसाएको गरी दुई थरको हुने गर्दछ यदि सुक्रोज नमिसाएको भएमा अगर बाहेक अन्य तत्वहरू सबै मिसाइ सकेपछि त्यसको पिएच ५.६-५.८ बनाउनु पर्दछ। जस्को लागि पिएच बढाउन IN H_2SO_4 को र पिएच घटाउन IN KOH को प्रयोग गर्नुपर्दछ। तयारी एम एस मिडिया (MS media) को संबन्धमा MS पाउडर 4.402 ग्राम/लिटर र Sucrose 3%, (३० ग्राम/लिटर) का दरले डिष्टिल पानीमा घोल्ने र पिएच मिलाउने र ०.८% का दरले (८ ग्राम/लिटर) अगर मिसाइ त्यसलाई राम्रो संग घोलिनका लागि एकपटक हल्का उमाल्नु पर्दछ। त्यसपछि विरुवा रोप्ने भाँडो (test tube, bottles) मा मिडिया हाली Autoclave द्वारा निर्मलीकरण गर्नु पर्दछ। साधारणतया मिडियालाई निर्मलीकरण (sterilization) गर्दा autoclave मा १५ पाउण्ड प्रेशर (psi) र १२१° से. तापक्रममा २० मिनेट पकाउनुपर्दछ वा माथी उल्लेख गरे अनुसार गर्नुपर्दछ। यदि

तयारी मिडिया प्रयोग नगरी प्रयोगशालामा आफैले तयार गर्ने हो भने तालिका १ मा उल्लेख गरे अनुसारले तयार गर्नुपर्दछ । मिडिया पकाएर भिकेपछि त्यसको अवस्था विशेष गरी बिप्रेको (contamination) वा नबिप्रेको हेर्न ३-५ दिन सम्म प्रयोग नगरी कल्चर कोठा (culture room) मा राख्नुपर्दछ । यदि कन्टामिनेशन भएको भए हटाउने र नभएको मात्र छानि प्रयोगमा ल्याउनु पर्दछ ।

तालिका १. MS स्टक सोलुसनको लागि आवश्यक Chemical र त्यसको परिमाण

Chemical	Amount of chemicals in Stock Solution					Remarks
	Standard (MS) (mg/L) (1 X)	(10 X)		(50 X)		
Macro nutrients		(g) dissolve in 200 ml	ml/2 L medium	(g) dissolve in 1000 ml	ml/2 L medium	
KNO ₃	1,900	19	40	95	40	Dissolve in one container
NH ₄ NO ₃	1,650	16.5		82.5		
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	370	3.7		18.5		
KH ₂ PO ₄	170	1.7		8.5		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	4.4	40	22	40	
Micro nutrients	(1 X)	(10 X)		(100 X)		
		(mg) dissolve in 200 ml	ml/2 L medium	(g) dissolve in 1000 ml	ml/2 L medium	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	223	40	2.23	20	Dissolve in one container
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	86		0.860		
H ₃ BO ₃	6.2	62		0.620		
KI	0.83	8.3		0.083		
CuSO ₄ ·H ₂ O	0.025	0.25		0.0025		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	2.5		0.025		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.25		0.0025		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	0.278	40	2.78	20	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Disodium ethylene diamine tetraacetate)	37.3	0.373		3.73		Dissolve in one
Vitamins	(1 X)	(10 X)	ml	(100 X)	ml	
		(mg) dissolve in 200 ml	ml/2 L medium	(g) dissolve in 1000 ml	ml/2 L medium	
Glycine	2	20	40	0.2	20	Dissolve in one container
Nicotinic acid	0.5	5		0.05		
Pyridoxine(in HCl)	0.5	5		0.05		
Thiamine (in HCl)	0.1	1		0.01		
Myo Inositol	100	1000		10		
Ca Pantothenate	2	20		0.2		"
GA ₃	1.25	12.5		125.0		Take 0.25 ml/L from 5000 ppm
Sucrose	3%		60 g		60 g	
Agar	0.8%		16 g		16 g	
pH	5.7					

३.२ कल्चर अवस्था (Cultural condition)

विरुवाको भाग (अंश) लाई मिडियामा स्थानान्तर गरिसकेपछि त्यसलाई इन्कुवेसन कोठा (incubation room) मा लगिन्छ । इन्कुवेसनको लागि $25 \pm 2^\circ$ से. तापक्रम भएको कोठामा १६ घण्टा २०००-४००० लक्स प्रकाश र ८ घण्टा अध्याँरोमा राख्नुपर्दछ । तापक्रम 20° से. भन्दा कम वा 30° से. भन्दा बढी भएमा विरुवाको वृद्धि रोकिन सक्दछ ।

३.३ सुक्रोज (Sucrose)

प्रयोगशाला भित्र (*in vitro* condition) उमारिने विरुवाको वृद्धि र विकासका लागि मिडियामा सुक्रोजको समावेश हुनु अति जरूरी पर्दछ किनकी *in vitro* अवस्थामा प्रकाशको अभावमा प्रकाश संश्लेषण (photosynthesis) हुन पाउँदैन । टेष्टट्यूब भित्र भएको कार्बन डाइअक्साइड (CO_2) ले पनि प्रकाश संश्लेषणमा कम ल्याउन सक्दछ भने अर्कोतर्फ टेष्टट्यूब भित्र हावाको आदान प्रदान पनि कम हुने हुनाले विरुवालाई नकारात्मक असर पर्नजानेछ । यी आदि कारणहरू समाधान वा कम गर्नका लागि पनि सुक्रोजको महत्व धेरै छ । साधारणतया मिडिया बनाउँदा १-५% सुक्रोज राखिन्छ भने यसको परिमाण विरुवाको प्रकार (type of plant) र अवस्था (उमेर) मा भरपर्दछ । जस्तै : भरखरको भ्रूण (embryo) लाई सुक्रोजको मात्रा धेरै चाहिन्छ । साधारणतया: सुक्रोजको मात्रा बढाउँदै जाँदा विरुवाको वृद्धि र विकास पनि बढ्दै जान्छ भने निश्चित परिमाण पछि सुक्रोजको मात्रा बढाउँदै जादा वृद्धि पनि कम हुँदै जान्छ ।

३.४ मिनरल तत्व (Mineral nutrient)

इनभिट्रो कल्चरमा मिनरल, सुक्रोज पछिको महत्वपूर्ण तत्व हो । तन्तु प्रजनन (tissue culture) प्रयोजनमा विभिन्न उद्देश्य र विरुवाको जात

अनुसार धेरै थरिका macro र micro salt का मिश्रणहरू प्रयोगशालामा तयार गर्न सकिनेछ । MS media बनाउँदा प्राय प्रयोगमा आउने तत्वहरूको नाम र परिमाण तल तालिकामा उल्लेख गरिएको छ । धेरै परिमाणमा मिडिया बनाउनु परेको खण्डमा सजिलोका लागि स्टक मिश्रण (stock solution) तयार गर्ने गरिन्छ भने तयारी MS मिडिया पनि बजारमा उपलब्ध छ । यसरी तयार गरिएको स्टक मिश्रणलाई पछिसम्म प्रयोगमा ल्याउन फ्रिज भित्र (४° से.) र अँध्यारो अवस्थामा राख्न उपयुक्त हुन्छ । आलुको विरुवा लगायत अन्य धेरै विरुवाहरू यो MS मिडियामा राम्रो हुने भएकाले यसको व्यापकता पनि बढी नै छ ।

३.५ ग्रोथ रेगुलेटर वा हर्मोन (Plant growth regulators)

हर्मोन एक अर्गानिक तत्व हो जुन विरुवाहरूले प्राकृतिक रूपमै बनाउँदछन् । यसले विरुवाको वृद्धि र विकासमा प्रभाव पार्दछ । यसले विरुवाको विभिन्न अंगहरूलाई सक्रिय पार्ने गर्दछ जुन थोरै परिमाणमा उत्पादन हुने गर्दछ र थोरै परिमाणले नै काम गर्दछ । यसैगरी सेन्थेटिक तत्वहरू पनि विकास भएका छन् र जसले प्राकृतिक तत्वहरू जस्तै काम गर्दछन् । यसरी यी प्राकृतिक र मानव निर्मित हर्मोनहरूलाई सामूहिक रूपमा ग्रोथ रेगुलेटर (growth regulator) भनिन्छ । प्रयोगशालामा विरुवा प्रसारण गर्दा हर्मोनको अति आवश्यक पर्दछ । हर्मोनहरू मध्य auxin र cytokinin प्रमुख हुन जसले विरुवाको प्रजाती र विरुवाको प्रयोग गर्ने अंगहरू अनुसार विरुवा हुर्काउने मिडियामा राख्न जरूरी पर्दछ । यी तत्वहरू तयार गर्दा प्रायः स्टक सोलुसनको रूपमा तयार गर्नु वेस हुनेछ । यसरी तयार गरेको स्टक सोलुसन विशेष गरी IAA र Kinetin लाई खैरो बोतलमा राखि अँध्यारो स्थानमा भण्डारण गर्नुपर्दछ अन्यथा यी तत्वहरू प्रकाशले गर्दा नोक्सानी हुने संभावना रहन्छ । ग्रोथ रेगुलेटरहरूलाई यीनिहरूले गर्ने

कामको र उत्पादनका आधारमा मुख्य गरेर ५ समूहमा विभाजन गरिएको छ ।

३.५.१ अक्जीन (Auxin)

यस समूहमा IAA, IBA, NAA, 2,4-D आदि पर्दछन् । IAA करिब ०.०१-१० मि.ग्रा. प्रति लिटरका दरले प्रयोगमा ल्याइन्छ भने IBA, NAA र 2,4-D सरदर ०.००१-१० मि.ग्रा. प्रतिलिटरका दरले प्रयोग गर्नुपर्दछ । अक्जीनले विशेष गरी विरुवामा तन्तुको वृद्धि र विकासमा मद्दत गर्दछ । त्यसैगरी यसले विरुवाको जराको वृद्धि र विकासमा बढी सहयोग गर्दछ भने डाँठ (काण्ड) को विकासमा केही अवरोध पुऱ्याउदछ ।

३.५.२ साइटोकीनिन् (Cytokinin)

यस समूहमा Kinetin, BA, 2ip, PBA आदि पर्दछन् । यीनिहरूले विशेषगरी विरुवाको तन्तु विभाजनमा सहयोग गर्दछ । यसले विरुवाको काण्डको वृद्धिमा सहयोग गर्दछ भने जराको वृद्धिमा केही अवरोध गर्दछ । यसको प्रायः गरेर १-१० मि.ग्रा. प्रति लिटर को परिमाणमा प्रयोग गरिन्छ । साइटोकीनिनले विरुवामा मूल काण्डको टुप्पोको वृद्धिमा अवरोध गरी शाखा हाँगाहरू आउन सहयोग गर्दछ ।

३.५.३ जिब्रीलिन (Gibberellin)

यो समूहमा पर्ने तत्वहरू हाइयर प्लान्टहरू (higher plants) मा कम प्रयोग गरिन्छ । यस समूहका तत्वहरू मध्ये धेरै प्रयोगमा आउने GA_3 हो जसले बढी तापक्रम सहन सक्दैन । अटोक्लेभपछि करिब ९०% यसको भौतिक तत्व नोक्सान हुन सक्दछ । जिब्रीलिनले आँख्ला बिचको डाँठ (inter node) र मेरिस्टिम (meristem) को वृद्धि र विकासमा

मदत गर्दछ । यसले बीउको सुषुप्तावस्था कम गर्न पनि सहयोग गर्दछ । यसले जराको विकासमा अवरोध ल्याउन सक्दछ ।

३.५.४ भिटामिन (Vitamins)

यस समूहमा inosital, vitamin B1, ca-panthothenate, folic acid, riboflavin, ascorbic acid, nicotinic acid, pyrodoxin, biotin, para-aminobenzoic acid, tocopherol आदि पर्दछन् ।

३.५.५ अन्य (Others)

यस समूहमा abscisic acid, ethylene, oligosaccharins आदि पर्दछन् ।

३.६ निर्मलीकरण गर्ने तरिका (Sterilization method)

विरुवाको कुनै पनि भाग (अंश) जस्तै बीउ, तन्तु, पात, डाँठ, जरा आदि उपयुक्त मिडियामा राख्नु भन्दा पहिला त्यस भाग लाई सबै प्रकारका सूक्ष्म जीवहरूबाट मुक्त गरिनुपर्दछ । आधारभूत रूपमा हेर्ने हो भने निर्मलीकरण गर्ने मुख्य तीन तरिका छन् :

- (१) भौतिक तरिका (Physical distraction of micro organ by dry-hot air, stem, UV light and gama-irradiation आदि) ।
- (२) रसायनिक तरिका (Chemical distraction of micro organism by ethylene oxide, alcohol, hypochlorite, antibiotic आदि) ।
- (३) फिल्ट्रेसन तरिका (Filtration method), न्यूट्रेन्ट मिडियाहरू प्रायः गरेर autoclaving or stem sterilization गरिन्छ, भने कहिले काँही फिल्टर र irradiation पनि गरिन्छ ।

सिसाका सामानहरू (glassware) dry-hot air विधिद्वारा निर्मलीकरण गरिन्छ, जस्का लागि कम्तीमा 95° से. मा ४ घण्टा तताउनु पर्दछ । Glassware autoclave मा पनि निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ । तर यसबाट भिकी राम्रोसंग सुख्खा पार्नु पर्दछ । Autoclave गर्दा न्यूट्रेन्ट मिडिया र खाली बोतलहरू तथा सानो ठूलो भाँडाहरू एकै पटक नगरी बेग्ला बेग्लै गर्नुपर्दछ । ठूलो भाडाँमा राखेको धेरै परिमाणको मिडिया र साना भाँडामा थोरै परिमाणको मिडिया पनि बेग्ला बेग्लै autoclave गर्नुपर्दछ । प्लाष्टिकका भाँडाहरू, ट्यूबहरू र अन्य चिजहरू autoclave गर्दा नोक्सान हुन सक्दछ भने त्यस्को लागि गामा-रे (gamma-ray) द्वारा निर्मलीकरण गर्न पनि सकिन्छ ।

फिल्टर निर्मलीकरण प्रायः गरेर विभिन्न प्रकारका सोलुसन्, तरल मिडिया, हर्मोनहरू आदिको लागि प्रयोग गरिन्छ । यसमा प्रयोग गरिने फिल्टरको साइज सबै प्रकारका भाइरस, व्याक्टेरिया, ढुसीको साइज भन्दा फिल्टरको प्वाल (pore) साइज सानो हुनुपर्दछ । Autoclave र अन्य तरिकाबाट निर्मलीकरण गर्दा त्यसमा भएको तत्वहरूमा हास वा परिवर्तन हुनसक्ने संभावना भएका तत्वहरू फिल्टर प्रविधिद्वारा निर्मलीकरण गरिन्छ । फिल्टरको लागि प्रयोग हुने प्वाल (pore diameter) $0.22 \mu\text{m}$ को हुनुपर्दछ । फिल्टर गर्दा यसमा प्रयोग हुने सिरिन्ज, बोतल आदि सबै अटोक्लेभ गरेको हुनुपर्दछ । यो कार्य लेमिनार वेन्च भित्र सम्पन्न गर्नुपर्दछ ।

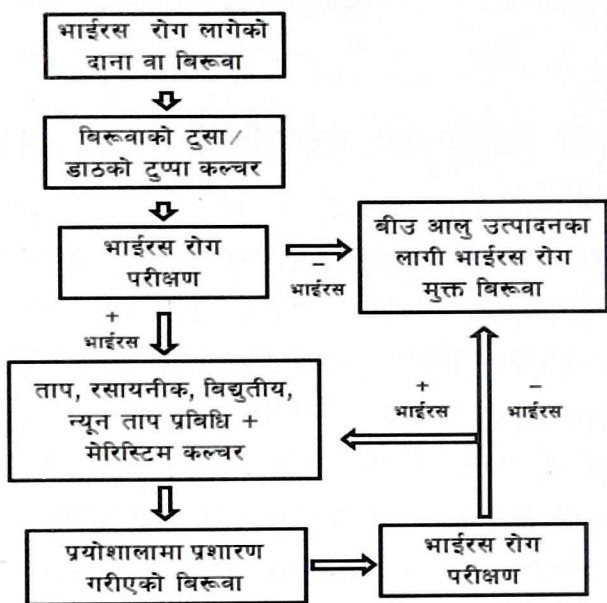
खण्ड - 8

४. भाइरस निर्मूलीकरण गर्ने प्रविधि (Virus elimination method)

बोट विरुवामा लागेका भाइरस रोग निर्मूल गर्ने विभिन्न तरिकाहरू जस्तै मेरिस्टिम टिप कल्चर प्रविधि (meristem tip culture), रसायनिक उपचार प्रविधि (chemotherapy), ताप उपचार प्रविधि (temprotherapy), विद्युतीय उपचार प्रविधि (electrotherapy) (Dhital et al, 2008) र न्यून ताप उपचार प्रविधि (cryotherapy) (Dhital et al, 2009) को एक वा एक भन्दा बढी प्रविधि समावेश गरी प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । यस पुस्तकमा नेपालमा हालसम्म अपनाउँदै आइरहेका प्रविधिहरूको बारेमा छोटकरीमा उल्लेख गरिएको छ ।

४.१. ताप उपचार प्रविधि (Thermotherapy)

यो प्रविधि मेरिस्टिम टिप कल्चर (meristem tip culture) गर्नु भन्दा पहिला प्रयोगशालामा हुर्काइएको विरुवामा गर्नु उपयुक्त हुन्छ । Thermotherapy गर्ने विधि बारे तल छोटकरीमा उल्लेख गरिएको छ । करिब ७ दिनको विरुवालाई BOD इन्क्यूबेटरमा ३७° से. तापक्रम र २४ घण्टा प्रकाश (approx. 20 mol m⁻² S⁻¹ light intensity) अवस्थामा करिब ३ हप्ता राख्ने । यदि आलुको दाना लिने हो भने, दानालाई GA₃ (2 mg/l) ले उपचार गर्ने र ३७° से. तापक्रममा अँध्यारोमा ८-१० से.मी. लामो टुसा हुने अवस्थासम्म राख्ने । ताप-उपचार अपनाइसकेपछि *in vitro* विरुवा वा टुसाहरूबाट मेरिस्टिम (meristem tips) लिनुपर्दछ (चित्र नं. ५) ।



चित्र नं. ५. ताप उपचार विधि (thermotherapy) द्वारा आलुमा भाइरस रोग मुक्त गर्ने तरिका ।

४.१.१ स्वस्थ र राम्रो जातको विरूवाको छनौट

- देखा स्वस्थ र जातीय शुद्धताको विरूवा वा आलु दानाको छनौट गर्ने ।
- DAS-ELISA प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्ने ।
- परीक्षण गर्दा भाइरस देखापरेमा कम भन्दा कम भाइरस लागेको छनौट गरी मेरिस्टिम गर्ने ।
- यदि भाइरस देखा नपरेमा पनि मेरिस्टिम (meristem) गरी प्रयोगशालामा स्थानान्तरण गर्ने ।

४.१.२ विरूवालाई प्रयोगशालामा स्थानान्तरण गर्ने रोगी विरूवाबाट :

विरूवाबाट शुरूवात गर्दा ब्लेड (scalpel blade) को सहायताले विरूवाको टुप्पोबाट तेश्रो र चौथो आँखा लिने । हरेक आँखाको साइज

१-२ से.मी. हुनुपर्दछ र पात हटाउनु पर्दछ । यसरी एकल आँखे टुक्रा (single node cutting; SNC) प्रयोगशालामा स्थानान्तर गरी प्रसारण शुरू गर्नुपर्दछ ।

रोगी आलु दानाबाट

सर्वप्रथम आलु दानालाई ०.२% को वेभिष्टिन (bavistin) ले १५ मिनेट उपचार गरी ओभाउनु पर्दछ । यदि तुरुन्त प्रयोग गर्ने भए दानालाई टुसाउन २४-२६^० से. मा राख्नुपर्दछ । तर तुरुन्त नचाहिने भए ४^० से. तापक्रममा भण्डार गरी राख्न सकिन्छ । आलुको जात अनुसार ८-१० हप्तामा टुसाउन शुरू गर्दछ । टुसाई सकेपछि करिब २-३ से.मी लामो टुसा लिनुपर्दछ । एकल आँख्ला अथवा टुसा लिइसकेपछि त्यसलाई लेमिनार फ्लो (laminar flow) मा २% को सोडियम हाइपोक्लोराइट (sodium hypochlorite; 4% w/v chlorine) ले १०-१५ मिनेटसम्म उपचार गरी निर्मलीकृत पानी (sterile distilled water) ले तीन पटकसम्म पखाल्नु पर्दछ । ओभाइसकेपछि टुक्राको दुवै छेउ काटी फाल्ने र बिचको भागलाई अर्ध ठोस न्यूट्रेन्ट मिडिया भएको टेष्ट ट्यूबमा रोप्नुपर्दछ ।

न्यूट्रेन्ट मिडिया, MS मिडियामा आधारित र त्यसमा D-calcium pantothenate 2 mg/l, gibberellic acid 0.1 mg/l, NAA 0.01 mg/l, सुक्रोज ३० ग्राम/लि र अगर ७ ग्राम/लि का दरले समावेश गरेको हुनुपर्दछ । टेष्ट ट्यूबमा रोपेको विरुवालाई १६ घण्टा प्रकाश अवधि, २००० लक्स भएको fluorescent light र २५±२^० से. तापक्रम भएको अवस्थामा राख्नुपर्दछ । उक्त विरुवा करिब ८-१० से.मी. भएपछि एकल आख्ले प्रविधि (single node cuttings; SNC) द्वारा नयाँ मिडियामा रोपी पहिला जस्तै अवस्थामा राख्नुपर्दछ । प्रशस्त विरुवा नहुन्जेलसम्म यसैगरी हरेक ३-४ हप्तामा नयाँ

मिडियामा प्रसारण गर्दै जानुपर्दछ । भाइरस उन्मूलन गर्ने प्रविधि बारे छोटकरीमा तल प्रस्तुत गरिएको छ ।

त्यसैगरी ताप उपचार प्रविधि (thermotherapy) अर्न्तगत *in vitro* विरुवालाई दैनिक १६ घण्टा प्रकाशमा (५००० लक्स) ३६° से. तापक्रम र ८ घण्टा अँध्यारोमा ३०° से. मा विरुवालाई चार हप्तासम्म राखिन्छ । त्यसपछि प्रयोगशाला भित्र विरुवाबाट मेरिस्टिम (meristem) अथवा एकजीलरी बड (axillary bud) अथवा एपिकल बड (apical bud) निकाली MS मिडियामा रोपिन्छ । यो प्रविधि प्रयोगशाला मै प्रसारण गरिएका विरुवाहरूमा पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ । यस्तो अवस्थामा प्रयोगशाला बाहिर (field) को विरुवाको मोरिस्टिम लिएको छ भने सतह निर्मलीकरण (surface sterilization) गर्नुपर्दछ यदि इनभिट्रोबाट हो भने निर्मलीकरण गर्न जरूरी पर्दैन ।

४.२ रसायनिक उपचार प्रविधि (Chemotherapy)

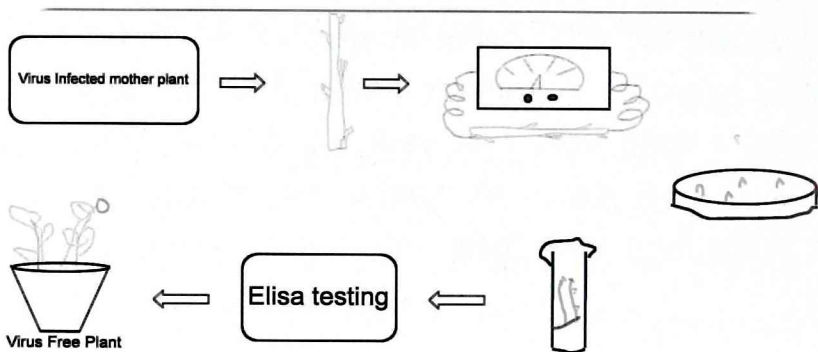
भाइरस उन्मूलन गर्ने क्रममा यस प्रविधिलाई तापक्रम प्रविधिको विकल्पको रूपमा वा सँग सँगैपनि गर्न सकिन्छ । यसमा विभिन्न प्रकारका रसायनहरू (virazol) प्रयोगमा हुने गरेतापनि प्रचलनमा आएको रसायन रिवाभिरीन (ribavirin) हो जुन २०-४० एम.जी.प्रति लिटर MS लिक्वूड मिडियामा मिसाई मिडिया तयार गरिन्छ । रिवाभिरीन मिसाएको मिडियामा विरुवा वृद्धि हुन दिने र विरुवा ठूलो भएपछि त्यसैबाट मेरिस्टिम वा एकजीलरी बड भिकेर अर्को नयाँ MS मिडियामा रोपेर भाइरस निर्मूल गर्ने गरिन्छ (Friffiths et al, 1990) । यसैगरी अर्को तरिकामा भाइरस निर्मूल गर्नुपर्ने विरुवालाई सतह निर्मलीकरण (surface sterilization) गरेर प्रयोगशालामा (*in vitro* condition) प्रसारण गर्ने र विरुवालाई एकल आख्ले प्रविधि (single nodal cutting) बाट MS liquid media मा प्रसारण गर्ने र त्यसैमा

२०-४० मी.ग्राम/लिटरका दरले फिल्टर स्टलाइज रिवाभिरिन मिसाइ ४ घण्टा प्रकाशमा ३४° से. र ४ घण्टा अँध्यारोमा ३०° से. को प्रकाश चक्र (light cycle) दिने र रिवाभिरिन समावेश गरेको MS liquid media हरेक ७ दिनमा बदल्ने र यो प्रकृया ५-६ हप्तासम्म लगातार गर्ने । Meristem tip culture को तुलनामा यस प्रविधिद्वारा छोटो समयमा भाइरस निर्मूल भएको विरुवा उपलब्ध हुने छ (Dhital et al, 2005) ।

४.३. विद्युतीय उपचार प्रविधि (Electrotherapy)

आलुको भाइरस निर्मूलीकरणको लागि ताप उपचार प्रविधि (thermotherapy) र मेरिस्टिम टिप प्रविधि बढी प्रचलनमा रहेका तरिका हुन । यसो हुँदा हुँदै पनि ताप उपचार प्रविधि धेरै समय लाग्ने र कम प्रभावकारी छ । पछिल्लो समयमा आएर भाइरस निर्मूलीकरणको लागि विद्युतीय प्रविधि बढी प्रभावकारी सिद्ध भएको छ । यस प्रविधिले भाइरस निर्मूलीकरणको अलावा विरुवाको वृद्धि र विकासमा पनि सकारात्मक प्रभाव पार्ने वैज्ञानिकहरूको भनाई छ ।

यस प्रविधिमा भाइरस लागेको प्रयोगशाला भित्रको वा खेतबारीमा रोपेको विरुवा वा टुसाएको आलुको दानालाई विशेष प्रकारको उपकरण मार्फत् विद्युतीय प्रणालीमा जडान गरी विरुवामा भएको भाइरसलाई कम गर्न सकिन्छ (Lozyoya-saldana et al, 1996) । जस्मा विरुवा प्रसारण गर्नुभन्दा पहिले मध्यम विद्युतीय प्रवाह (५-१० मिली एम्पीयर MA मा ५-१० मिनेट) गराई विरुवामा विद्यमान भाइरस हटाउन सकिन्छ (Dhital et al, 2008), चित्र नं. ६) ।



चित्र नं. ६. विद्युतीय उपचार प्रविधि (electrotherapy) द्वारा भाइरस निर्मूलीकरण तथा विरुवा प्रसारण गर्ने तरिका ।

मेरिस्टिम टिप (meristem tip) प्रविधिमा भन्दा यसमा ठूलो साइजको टुप्पा लिन सक्ने हुनाले छोटो समयमा भाइरस रहित विरुवाहरू धेरै उत्पादन गर्न सकिन्छ । टुप्पा (bud) लिइसकेपछि त्यसलाई MS मिडिया, ३% सुक्रोज, ०.७% अगर र आवश्यकता अनुसार हर्मोनहरू राखी मिडिया बनाउने र विरुवालाई पेट्रिडिसमा राखि २४ घण्टा अँध्यारो कोठामा र त्यसपछि १६ घण्टा उज्यालो र तापक्रम २५^० सेल्सियस हुने कोठामा राख्नुपर्दछ ।

४.४ न्यून ताप उपचार प्रविधि (Cryotherapy)

विरुवाको कुनै पनि अंशलाई विभिन्न उपचार सम्पन्न गरी तरल नाइट्रोजन (-१९६^० से.) मा संरक्षण गर्ने प्रविधिलाई क्रायोप्रीजरभेशन (cryo-preservation) अथवा न्यून ताप प्रविधि भनिन्छ । यस प्रविधिद्वारा लामो समयसम्म अर्थात् २० वर्ष वा सो भन्दा बढी पनि रोगरहित र पैतृक गुणको नोक्सानी विना संरक्षण गर्न सकिन्छ । क्रायोप्रीजरभेशन गर्ने विभिन्न वैज्ञानिकहरूले बेग्ला बेग्लै तरिकाहरू (protocol) विकास गरेका छन् । शुरूका दिनहरूमा भन्दा हाल सरल

प्रविधि अपनाइ छोटो समयमा संपन्न गर्न सक्ने, थोरै रसायनहरूको प्रयोगबाटै सम्पन्न हुने, विरुवाको रिजेनेरेश धेरै हुने आदि प्रविधिको विकास हुँदै आइरहेको छ ।

शुरूमा जर्मप्लाज्म संरक्षणको उद्देश्यले मात्र यो प्रविधि प्रयोगमा ल्याउने गरिन्थ्यो भने पछिल्ला अध्ययनहरूबाट थाहा लागेअनुसार अरू प्रविधिद्वारा निर्मूल गर्न कठिन भएका भाइरसहरू पनि यो प्रविधिबाट सफलताकासाथ निर्मूल भएको लेखहरूमा छन् । विशेष गरेर लैंगिक विधिद्वारा प्रसारण गरी विरुवालाई जर्मप्लाज्म संरक्षण र प्रयोगशालामा प्रसारण गर्न वा खेतबारीमा संरक्षण गर्दा ठाउँ बढी लिने, बढी खर्च लाग्ने र रोग कीरा आदिबाट नोक्सान हुने हुन्छ भने यस प्रविधिबाट सजिलै संरक्षण गर्न सकिन्छ । यसै प्रविधिबाट अन्तर्राष्ट्रिय आलु विकास केन्द्र, लिमा, पेरूमा त्यहाँ भएका सबै आलुका जर्मप्लाज्मको संवर्धन गर्ने काम भैरहेको छ । विभिन्न बालीहरूमा भाइरस निराकरण गर्ने अन्य विधिहरू भन्दा पनि यो बढी प्रभावकारी भएको विभिन्न वैज्ञानिकहरूको भनाइ छ । जानकारी भए अनुसार हालसम्म आरूवखडाबाट Plum pox virus (Brison et al, 1997), केराबाट cucumber mosaic virus र banana streak virus (Helliot et al, 2002), अंगुरबाट grapevine virus (Wang et al, 2003) र आलुबाट PLRV र PVY (Dhital et al, 2009) सन्तोषनजक रूपले निराकरण गरिसकेको वैज्ञानिकहरूको भनाइ छ ।

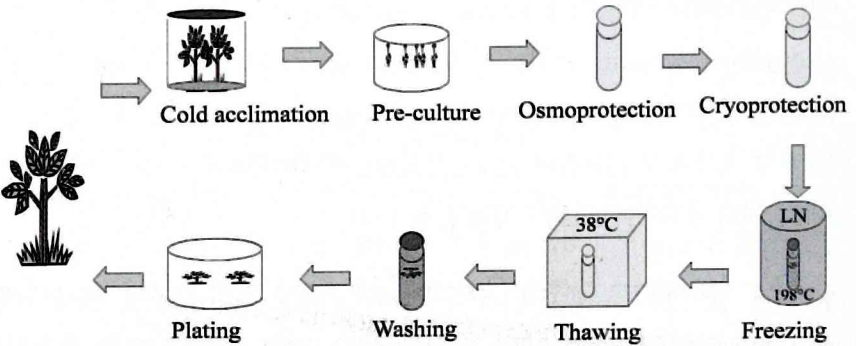
आलुको जर्मप्लाज्म खेतमा संरक्षण गर्दा समय बढी लाग्ने, जनशक्ति बढी लाग्ने, ठाउँ बढी लाग्ने र रोग कीरा तथा वातावरणको प्रभावले नासिन पनि सक्दछ भने यो तरिकाबाट संरक्षण गर्दा विना भन्फट पैतृक गुणको नोक्सान (genetic deterioration) नभै संरक्षण गर्न सकिन्छ । समय बित्दै जादा क्रायोथेरापी गर्ने तरिकाहरू पनि

क्रमिकरूपले सरलिकरण र बढी प्रभावकारी हुने गरी विकास हुदै गैरहेका छन् ।

क्रायोथेरापी गर्ने विभिन्न तरिकाहरू छन् ती मध्ये चलन चल्तीमा आएका मुख्य तरिकाहरू :

- Verification and cryopreservation
- Encapsulation and virification
- Verification encapsulation dehydration & cryopresarv

माथिका तरिकाहरू मध्ये, आलुको जर्मप्लाज्म संरक्षणका लागि मात्र हो भने encapsulation vitrification बढी प्रभावकारी मानिन्छ भने भाइरस निर्मूलीकरणका लागि encapsulation dehydration तरिका बढी प्रभावकारी छ (Dhital et al, 2009) । भाइरस निर्मूलीकरण गर्ने सन्दर्भमा सर्वप्रथम *in virto* विरुवाको केहि ठूलो साइज (०.४ एम एम) को मेरिस्टिम टिप लिने र त्यसलाई cryopreservection protocol अनुसार संपन्न गर्नुपर्दछ (चित्र नं. ७) ।



चित्र नं. ७ : क्रायोथेरापी प्रविधि (cryotherapy) द्वारा भाइरस निर्मूलीकरण गर्ने तरिका ।

भिद्रिफिकेसन तरिका (Vitrification procedure)

१. अधिल्ला खण्डमा उल्लेख गरे जसरी नै भाइरसमुक्त आलुका विरुवाहरू प्रयोगशालामा तयार गरी प्रसारण गर्ने ।
२. करिब २५ दिन उमेरको इनभिद्रो विरुवा (*in vitro* plantlet) बाट ०.५-०.७ एम.एल. साइजका टुसाहरू लिने र त्यस टुसालाई एम.एस. हाफ मिडिया (half strength MS media) र ०.३ M sucrose, ०.२ M mannitol र ८.७ mM GA₃ समावेश गरी तयार गरेको मिडिया भएको पेट्रिडिसमा राखि २४^० से. तापक्रम भएको उज्यालो कोठामा २ दिनसम्म प्रि-कल्चर (pre culture) गर्ने ।
३. पांच एम.एल. साइज टेस्ट ट्यूवमा ३ एम.एल. २०% PVS-2 (३०% w/v glycerol, १५% ethylene glycol, १५% dimethyl sulfoxide, MS medim र ०.४ M sucrose) सोलुसन मा प्रि-कल्चर गरेको २० टुप्पा (shoot tips) राखि २४^० से. तापक्रममा ३० मिनेट राख्ने ।
४. Pasteur pipettes को सहायताले पहिले राखेको सोलुसन हटाउने, ६०% को PVS-2 सोलुसन ३ एम.एल. राखि आइस बाथ (ice bath) मा १५ मिनेट राख्ने ।
५. माथि उल्लेख गरे जस्तै गरी pasteur pipettes को सहायताले सोलुसन निकाल्ने, त्यसैमा ३ एम.एल. आइस कोल्ड PVS-2 थपि ५ मिनेट राख्ने र ५ वटा टिप्सहरू (shoot tips) १ एम.एल. को क्रायोड्यूव मा राख्ने ।
६. उक्त क्रायोड्यूवलाई aluminum canes मा राखि सिल गर्ने ।
७. सिल गरेको aluminum canes लाई liquid nitrogen (LN) भएको क्यानमा राख्ने ।

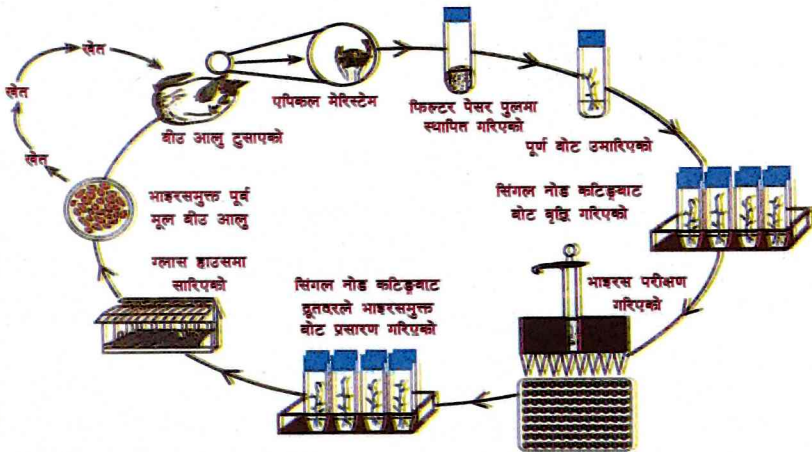
Thawing and post thaw culturing

१. क्रायोड्यूवलाई liquid nitrogen बाट भिकी ३५^० से. भएको वाटर बाथमा १ मिनेटसम्म राखि गरम गराउने, क्रायोड्यूवमा भएको टिप्सलाई लिक्वीड एम.यस्. मिडिया (MS+1.2 M sucrose) ले सफा गर्ने र टिप्सलाई ५ एम.एल. साइज टेष्टट्यूवमा सार्ने ।
२. PVS-2 मिक्चर सोलसुन पास्चर पिपेटको सहायताले निकाल्ने र करिब ४ एम.एल. लिक्वीड मिडियामा राख्ने र ट्यूवलाई कोठाको तापक्रममा ३० मिनेटसम्म राख्ने ।
३. टेस्ट ट्यूवबाट ३ एम.एल. जति सोलसुन निकाल्ने र टिप्स पिपेटको सहायताले कल्चर मिडियामा स्थानान्तर गर्ने ।
४. टिप्सलाई semisolid MS medium (0.2 M sucrose, 5.8 μ M GA₃, 1.0 μ M BA, 6.0 g/l agar) भएको पेट्रिडिस्कमा प्रति प्लेट १० टिप्सका दरले राख्ने ।
५. टिप्सलाई असर नपर्ने तरिकाले पिपेटको सहायताले dilution medium हटाउने ।
६. प्लेटलाई २४^० से. तापक्रम र १६ घण्टा हल्का उज्यालो भएको अवस्थामा राख्ने ।
७. एक हप्तापछि टिप्सलाई 0.09 M sucrose, 2.9 mM GA₃, 6.0 g/l agar भएको MS culture medium मा स्थानान्तर गरी २४^० से तापक्रम र १६ घण्टा उज्यालो कोठामा राख्ने ।
८. तयार भएको विरुवा (regenerated cultures) बाट single node cuttings प्रविधिबाट सब कल्चर गरी चाहिएको मात्रामा विरुवा तयार गर्दै जाने ।

४.५ मेरिस्टिम टिप प्रविधि (Meristem tips method)

४.५.१ मेरिस्टिम टिप निकाल्ने (Excision of meristem tips)

मेरिस्टिम टिप कल्चरका लागि प्रमुख तीन कार्यहरू संपन्न गर्नुपर्ने हुन्छ जस्तै- स्वस्थ र राम्रो जातको विरुवाको छनौट, विरुवा प्रयोगशालामा स्थानान्तर गर्ने र भाइरस निर्मूलीकरण गर्ने । मेरिस्टिम टिप (meristem tip) निकाल्नका लागि आलुको टुसा (sprout) लाई माथि उल्लेख गरे अनुसार सतह निर्मूलीकरण गरिसकेपछि टुसालाई साधारण माइक्रोस्कोप (dissecting microcope) को सहायताले बाहिरको पातहरू हटाउँदै टुसाको बिचको टुप्पो (dome) र दुई पात (perimodium leaves) मात्र रहने गरी निकाल्ने जस्को साइज करिब ०.२-०.४ एम.एम.को हुनुपर्नेछ । यी सबै कामहरू निर्मूलीकरण गरिएका उपकरणहरू (needle, petri plates, tissue paper etc.) को सहायताले होसियारीका साथ सम्पन्न गर्नुपर्दछ (चित्र नं. ८) ।



चित्र नं. ८: मेरिस्टिम टिप कल्चर (meristem tip culture) द्वारा भाइरस निर्मूलीकरण तथा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन प्रविधि ।

४.५.२ मेरिस्टिम कल्चर गर्ने (Meristem culture)

मेरिस्टिम टिप (meristem tip) निकालेपछि तुरून्तै सवकल्चर मिडियामा स्थानान्तर गर्नुपर्दछ । यसको लागि MS मिडिया (Murashige and Skoog, 1962) जस्मा अगर नभएको वा कम अगर (०.६%) प्रयोग गरिन्छ र अन्य विभिन्न तत्वहरू (2 mg/l glycine, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l piridoxine, 0.4 mg/l thiamine, 0.1 mg/l gibberellic acid, 0.4 mg/l kinetin and 2.5% sucrose) प्रयोग गरिन्छ ।

मेरिस्टिम टिपलाई हरेक हप्ता उस्तै प्रकारको नयाँ मिडियामा स्थानान्तर गरिरहनु पर्दछ । यसो गर्दै जाँदा करिब ६-८ हप्ता पछि त्यसबाट पूर्ण विरुवा बन्दछ र त्यसपछि हरेक विरुवाबाट पातको नमूना लिई भाइरस परीक्षण गर्नुपर्दछ । यदि भाइरस निर्मूल भएको फेला परेमा त्यसलाई प्रसारण गर्दै जानुपर्दछ ।

मेरिस्टिम प्रविधि (Meristem excision & culture)

- १) ताप-उपचार गरेको विरुवाबाट ल्वेड (scalpel) र सुई (needle) को सहायताले लेमिनारफ्लोमा Stereoscopic zoom microscope को सहायताले मेरिस्टिम टिप निकाल्नु पर्दछ । मेरिस्टिम टिप निकाल्दा टुप्पो सुक्ने संभावना रहेमा अटोक्लेभ गरेको डिस्टिल पानी (sterile distilled water) प्रयोग गर्न सकिन्छ ।
- २) मेरिस्टिम लिंदा meristematic dome र एक जोडा leaf primordia भएको करिब ०.२-०.४ एम् एम् साइजको हुनुपर्दछ ।
- ३) यदि सिधै आलु दानाबाट टुसा लिने भएमा माथि उल्लेख गरिए जस्तै गरी मेरिस्टिम गर्नुभन्दा पहिला २०% को सोडियम

हाइपोक्लोराइट (NaOCl) ले १० मिनेटसम्म निर्मलीकरण गर्नुपर्दछ ।

- ४) निकालिएको मेरिस्टिम टिपस्लाई अर्ध ठोस MS मिडिया (Semi-solid Ms media; 0.6% agar) वा पुल बनाएको तरल MS मिडिया (Liquid MS media) भएको टेष्टट्यूबमा राख्नुपर्दछ र १६ घण्टा प्रकाश अवधि र $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ से. तापक्रम भएको अवस्थामा राख्नुपर्दछ ।
- ५) मेरिस्टिम कल्चर मिडियामा २ एम.जी./लि. D-calcium pantothenate 2 mg/l, gibberellic acid 0.1 mg/l, NAA 0.01 mg/l, सुक्रोज ३० ग्राम/लि र अगर ७ ग्राम/लि का दरले समावेश गरेको हुनुपर्दछ ।
- ६) मेरिस्टिमबाट पूर्ण विरुवा हुन करिब ४-५ महिना लाग्नेछ ।
- ७) DAS-ELISA प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्नुपर्दछ ।
- ८) भाइरस निर्मूल भएका विरुवाहरूबाट द्रुत प्रसारण (rapid propagation) प्रविधिद्वारा प्रसारण गर्दै जानुपर्दछ ।

यो प्रविधि धेरै पहिलेदेखि चल्दै आइरहेको भए तापनि यो मेरिस्टिमेटिक तन्तु (meristematic cells) किन भाइरस रहित हुन्छ भन्ने कुरा अझै अनुसन्धानकै क्रममा छ । खास कुरा जे भए तापनि हालसम्म उल्लेख गरिएका तथ्यहरूमा आधारित होलान् भन्ने कुरामा नजिक पुगिएको छ र ती अनुमान गरिएका आधारहरू तल प्रस्तुत गरिएको छ ।

१. उच्च मेटाबोलिक कार्य (High metabolic activity)

विरुवामा भाइरस प्रसारण विरुवाको मेटाबोलिजम् अनुसारै हुने गर्दछ । मेरिस्टिमेटिक तन्तुको मेटाबोलिक कार्य उच्च हुने गर्दछ र भाइरसका कणहरूले उक्त उच्च मेटाबोलिक कार्यलाई नियन्त्रण गर्न

पाउँदै न जसले गर्दा उक्त भागमा भाइरसको परिमाण निकै कम हुनजाने गर्दछ ।

२. भास्कूलर तन्तुको कमी (Lack of vascular tissue)

भाइरसहरू विरुवामा भास्कूलर सिस्टमबाट छिटो छिटो फैलिने गर्दछ । विरुवाको मेरिस्टिममा तन्तु (cells) विभाजन र विकास भाइरसको वृद्धि र प्रवाह (movement) भन्दा छिटो हुने भएको कारणले भाइरस त्यस भागमा पुग्न नसक्नु पनि अर्को एक कारण होला भन्ने अनुमान गरिएको छ ।

३. अक्जीनको मात्रा बढी हुनु (High concentration of Auxin)

विरुवाको मेरिस्टिमेटिक तन्तु (meristematic tissue) मा अक्जीन (auxin) को मात्रा अन्य भागमा भन्दा बढी हुने र अक्जीनले भाइरस वृद्धिलाई रोक्न सक्ने अनुमान पनि गरिएको छ ।

विरुवाको भागको सतह निर्मलीकरण (Surface sterilization of plant)

विरुवाको कुनैपनि भागलाई जीवाणुहरू रहित बनाउन सतह निर्मलीकरण गर्नु अति आवश्यक पर्दछ । जीवाणुहरू इनभिट्रो अवस्थामा धेरै छिटो फैलिने भएकाले विरुवालाई नै मार्न पनि सक्दछन् । विरुवाको सतहमा भएका जीवाणुहरूलाई धेरै प्रकारका विधिद्वारा निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ । विरुवाको भागलाई निर्मलीकरण गरिसकेपछि सफा पानीले राम्रोसंग धुन अति जरूरी हुन्छ अन्यथा त्यसले नयाँ विरुवाको वृद्धि समेत रोक्न सक्दछ ।

क) अल्कोहल/इथानोल (Alcohol/ethanol)

अल्कोहल प्रायः व्याक्टेरिया र दुसीका जीवाणुहरूबाट सतह निर्मलीकरण गर्ने चलन चल्तिमा आइरहने प्रविधि हो । जस्ले अरू निर्मलीकरण उपचार गर्नुभन्दा पहिले सतह सफा गर्नमा प्रयोग गरिन्छ । यसले विरुवाको पातमा तथा अन्य भागमा सजिलै प्रवेश गर्न सक्दछ जस्ले गर्दा पछि अर्को पदार्थले निर्मलीकरण गर्दा बढी प्रभावकारी हुनजानेछ । विरुवाको सतह निर्मलीकरण कार्यका लागि ९५-१००% भन्दा ७०% अल्कोहल बढी प्रभावकारी हुन्छ भने प्रयोगशालाको कोठा, सतह र अन्य भाग सफा गर्न ९५-१००% को बढी प्रभावकारी हुन जान्छ ।

ख) सोडियम अथवा क्याल्सीयम हाइपोक्लोराइट (Sodium or calcium hypochlorite)

विरुवाको सतह निर्मलीकरण (strilized) गर्न सोडियम हापोक्लोराइट (NaOCl) अथवा क्याल्सीयम हाइपोक्लोराइट (CaOCl) बढी प्रभावकारी देखिन्छ । CaOCl ले विरुवा लागि कम असर गर्ने भएकाले बढी प्रयोगमा आउने गरेको पाइन्छ । बजारमा पाइने सोलुसनमा प्रायः ४-६% NaOCl को खास तत्व हुन्छ । पानीमा मिसाउँदा क्लोरक्स (clorox) १०% र पानी ९०% गरी बनाइन्छ । विरुवाको अवस्था (नरम अथवा कडा) हेरी ०.५-१% को सोलुसन बनाई विरुवाको कुनैपनि भाग सतह निर्मलीकरण गर्दा त्यस भागलाई सोलुसनमा १०-१५ मिनेटसम्म पुरै डुबाउने र त्यसलाई पुनः निर्मलीकरण गरेको पानीले ३-४ पटक पखाल्नु अति जरूरी हुन जान्छ ।

ग) मर्क्यूरिक क्लोराइड (Mercury chloride)

मर्क्यूरिक क्लोराइड (HgCl_2) पनि निर्मलीकरणको लागि प्रयोग गर्ने गरिन्छ र बढी प्रभावकारी पनि छ तर यो बढी नै असरदार (toxic) भएकाले खासै सिफारिस गरिदैन । निर्मलीकरण गर्ने विरुवाको भागलाई HgCl_2 को ०.०१-०.०५% को दरमा तयार गरेको सोलुसनले ५ मिनेटसम्म उपचार गर्ने र निर्मलीकरण गरेको पानी (sterile distilled water) ले राम्रोसंग ३-४ पटक धुनुपर्दछ ।

घ) व्याक्टेरिसाइड अथवा फन्जीसाइड (Bactericides and fungicides)

विरुवाको भाग धेरै मात्रामा संक्रमित (contaminated) भएको खण्डमा सतह निर्मलीकरण गर्नुभन्दा पहिले व्याक्टेरिसाइड र फन्जिसाइडले एक पटक उपचार गर्नुपर्दछ ।

खण्ड - ५

५ भाइरस रोग परीक्षण (disease indexing), सूक्ष्म प्रसारण (micropropagation) र जर्मप्लाज्म संरक्षण (germplasm conservation)

५.१ भाइरस रोग परीक्षण (Indexing)

मेरिस्टिम टिप (meristem tip) लिएर तयार गरेको विरुवा ठूलो भएपछि त्यसमा भाइरस छ वा छैन भन्नका लागि भाइरस परीक्षण गर्नुपर्दछ । भाइरस परीक्षण गर्ने विभिन्न तरिकाहरू मध्ये हाल बढी प्रयोग गरिने DAS-ELISA र RT-PCR हुन जस्को बारेमा छोटकरीमा तल प्रस्तुत गरिएको छ ।

५.१.१ DAS-ELISA (Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण

सेरोलोजिकल प्रविधि (serological technique) को आधारमा खास एन्टीबडिसंग भाइरसको प्रतिक्रिया प्रविधिद्वारा विरुवाको भाइरस परिमाण पत्ता लगाउने प्रविधि हो । यस प्रविधि अन्तर्गत Double-antibody sandwich-enzyme linked immuno sorbent assay (DAS-ELISA) विशेष संवेदनशील सेरोलोजिकल प्रविधि मानिन्छ (Clark and Adams, 1977).

यदि नमूनामा भाइरसको उपस्थिति छ भने सर्वप्रथम त्यसलाई खास एन्टीबडि (Igg) ले समाएर राख्दछ र त्यसपछि पुनः खास एन्टीबडि (conjugate) संग प्रतिक्रिया गर्दछ । उक्त इन्जायम alkaline phosphate संग प्रतिक्रिया गरी पहुँलो रंग उत्पन्न गर्दछ । पहुँलो रंगको

गाढापन (परिमाण) अनुसार भाइरसको परिमाण एकिन गरिन्छ । यो परीक्षण पुरा हुन करिब दुई दिन लाग्न सक्दछ । यस प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्दा कम्तिमा २ वटा नमूना भाइरसरहित (negative) र २ वटा नमूना खास भाइरससहित (positive) समावेश गर्नुपर्दछ ।

DAS-ELISA प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्ने तरिका

क) प्लेट कोटिङ (Plate coating)

नयाँ ELISA प्लेटहरू (microtitation plate) प्राप्त भएपछि प्रयोग गर्नुपर्दा पहिले प्लेटलाई कोटिङ (coating) गर्नुपर्दछ । यसको लागि Coating buffer बनाउनु पर्दछ ।

- बफर (buffer) बनाउनका लागि Na_2CO_3 : 1.59 gm र NaHCO_3 : 2.93 gm 1000 ml DH_2O मा मिसाई राम्रोसंग घोलेर pH 7.6 कायम गराउनुपर्दछ ।
- प्लेटको हरेक प्वालमा 200 μl (माइक्रोलिटर) का दरले प्रयोग गर्न एउटा प्लेटको लागि 19.20 ml आवश्यक पर्दछ भने त्यसका लागि साधारणतया 25 ml प्रति प्लेटको दरले ६ वटा प्लेटको (६ प्रकारका भाइरस) का लागि Coating buffer विकर वा कोनिकल फ्ल्याक्समा छुट्टाछुट्टै भाइरसको लागि छुट्टाछुट्टै तरिकाले तयार गर्नुपर्दछ ।
- Coating buffer मा Coating antibody (Antibody Igg) (PVA, PVM, PV, PVS, PVX, PVY र PLRV) भाइरस टेष्ट गर्नको लागि राखेर राम्रोसंग मिसाई माइक्रोपिपेटको सहायताले हरेक प्वालमा (well) 200 μl माइक्रोलिटरको दरले छुट्टाछुट्टै भाइरसको प्लेटमा छुट्टाछुट्टै राखिन्छ ।

- यसपछि ३७° से. तापक्रम भएको वाटर बाथ मेसिनमा ४ घण्टा राखिन्छ । त्यसपछि प्लेटलाई washing buffer ले ३ पटक पखाल्नुपर्दछ ।

ख) प्लेट सफा गर्ने (Washing)

- साधारणतया ६ वटा भाइरस टेष्ट गर्नको लागि ५ लिटर washing buffer (PBS tween 20) तयार गर्नुपर्दछ । पाँच लिटर washing buffer बनाउनका लागि तपसिलमा उल्लेख गरिएका रसायनहरू (chemicals) तपसिल अनुसार मिसानु पर्दछ । त्यसको pH 7.4 कायम राख्नुपर्दछ ।

NaCl	-	40 gm
KH ₂ PO ₄	-	1.0 gm
Na ₂ HPO ₄	-	5.75 gm
KCl	-	1.0 gm

- वासिङ बफर तयार गर्दा त्यसमा करिब 2.5 ml प्रति लिटरका दरले अर्थात् पाँच लिटरका लागि 12.5 ml Tween 20 मिसाउनु पर्दछ र ५/५ मिनेटको फरकमा प्लेट पखाल्नु पर्दछ ।
- त्यसपछि कोटिङ गरेको प्लेटलाई पछि प्रयोग गर्ने गरी फिजमा स्टोर गर्न पनि सकिन्छ र तत्काल प्रयोग गर्न पनि सकिन्छ ।

ग) नमूना तयार गर्ने (Sample extraction)

- नमूना लिनु भन्दा पहिले नमूनामा मिसाउने buffer तयार गर्नु पर्दछ त्यसका लागि 500 ml PBS Tween मा 10 gm

Polyvinylpyrrolidone-k 25 (PVP) र 5 gm Egg albumin राखि राम्ररी धुलाएर pH 7.4 बनाउनु पर्दछ ।

- यसरी extraction buffer तयार गरिसकेपछि भाइरस टेष्ट गर्ने नमूना (sample) अनुसार त्यसलाई नम्बरिड गर्नुपर्दछ । प्रत्येक नमूनाका लागि साधारणतया १ भाग नमूना (पात) र २ भाग बफर (1 gm sample + 2 ml extraction buffer) राखी राम्रोसंग पिन्नुपर्दछ ।
- पिनीसकेपछि प्रत्येक नमूनालाई सानो मसिनो टेष्टट्यूबमा छुट्टाछुट्टै राख्नुपर्दछ र थिग्राउनु पर्दछ । थिग्राइसकेपछि 200 μ l (माइक्रोलिटर) का दरले प्लेटमा राख्नुपर्दछ ।
- नमूना राखिसकेपछि सबै प्लेटलाई ओसिलो बक्स (humid box) मा ४ घण्टासम्म राख्ने वा ४^o से. भएको फ्रिजमा एकरात राख्न पनि सकिन्छ त्यसपछि PBS Tween ले ५/५ मिनेटको फरकमा ३ पटक राम्ररी धुनुपर्छ ।
- धुँदा यसमा नमूनाको हरियो भाग (कण) सबै हटाउने किसिमले धुनुपर्दछ ।

घ) कन्जुगेट बफर (Conjugate buffer)

- यसका लागि 300 ml PBS Tween मा 0.6 gm PVP र 6 gm egg albumin मिसाई सोलुसन बनाउनु पर्दछ जस्को pH 7.4 हुनु पर्दछ ।
- कोटिङ एन्टिबिड तयार गरे जस्तै यसमा पनि ६ वटा साना विकर वा कोनिकल फ्याक्समा 25 ml को दरले छुट्टाछुट्टै भाइरसको लागि छुट्टाछुट्टै कन्जुगेट इन्जाइम 1 μ l/ml (माइक्रोलिटर) buffer का दरले अर्थात् 25 ml coating

buffer को लागि 25 μ l (माइक्रोलिटर) राम्ररी मिसाएर 200 μ l का दरले ELISA plate को प्वाल (well) मा राख्नुपर्दछ ।

- त्यसपछि प्लेटलाई वाटर बाथ मेसिनमा ३७^० से.तापक्रममा ३-४ घण्टा राखिन्छ । यसरी भाइरस टेष्टको चौथो स्टेप सकिन्छ । ELISA plate भित्र भएको conjugate buffer लाई पुनः माइक्रो पिपेटको सहायताले फिकेर छुट्टाछुट्टै भाँडामा राखेर पछि प्रयोग गर्न पनि सकिन्छ ।
- यसपछि PBS Tween (washing buffer) ले पहिले जस्तै ५ मिनेटको फरकमा ३ पटक पखाल्नुपर्दछ भने अर्को तर्फ substrate buffer बनाउन शुरु गर्नुपर्दछ (चित्र नं. ५) ।

ड) सबस्ट्रेट बफर (Substrate buffer)

- Substrate buffer तयार गर्न 90 ml निर्मलीकरण गरेको पानीमा (DH₂O) 11.64 ml Dutgabikanube मिसाउने र राम्ररी घोलिसकेपछि pH 9.8 बनाउने र अन्तमा 120 ml बनाउने ।
- उक्त substrate buffer मा 0.75 mg/ml buffer का दर P-Nitrophenyl-Phosphate (PNP) table राख्ने अर्थात 120 ml बफर PNP 90 mg राख्ने र tablet राम्ररी घोलिसकेपछि ELISA plate को प्वालमा 200 μ l का दरले राख्ने र ELISA plate लाई २०-३० मिनेट सम्म incubate गर्ने ।

च) नतिजा अनुमान (Result analysis)

- ELISA Plate हेरेर पनि virus test को नतिजा अनुमान गर्न सकिन्छ जस्मा जति बढी पहिलो रंगको परिमाण हुन्छ त्यतिनै बढी परिमाणमा भाइरस लागेको मान्न सकिन्छ ।

- ELISA plate reader को सहायताले पनि भाइरसको परिमाण पत्तालगाउन सकिने छ ।
- परीक्षण गरिएको नमूनामा भाइरस लागेको पत्तालगाउन तलको Formula प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ ।

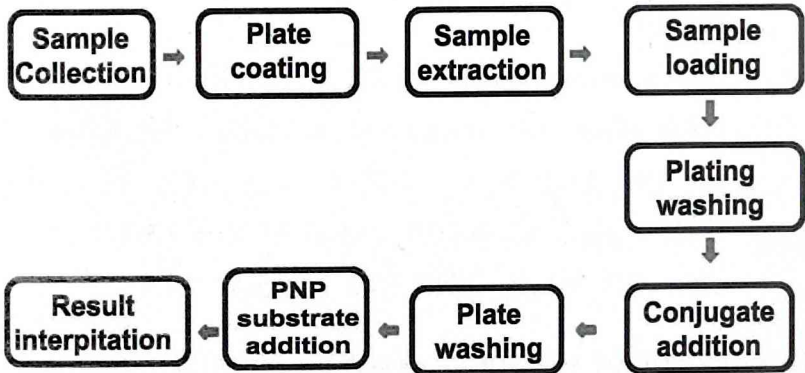
$$\chi \geq xh \times S$$

χ = Threshold value

xh = Average value of healthy controls

S = Standard deviation

पूनश्च : विभिन्न कम्पनी तथा संस्थाहरूबाट virus detection kits पनि उपलब्ध हुने गरेको छ जसको प्रयोग त्यसमा उपलब्ध Instruction Manual को आधारमा गर्न सकिन्छ । DAS-ELISA प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्ने तरिका तल सचित्र उल्लेख गरिएकोछ (चित्र नं. ९) ।



चित्र नं. ९ : DAS-ELISA प्रविधिद्वारा भाइरस परीक्षण गर्ने तरिका ।

५.१.२ RT-PCR (Reverse transcription-polymerize chain reaction) प्रविधि

भाइरस परिमाण (virus detection) गर्नकालागि RT-PCR एउटा निकै भरपर्दो (powerful & sensitive) प्रविधि हो । यो प्रविधि विशेष गरेर थोरै परिमाणमा रहेको भाइरसको मात्रा पत्ता लगाउन सकिन्छ, जसको परिमाण DAS-ELISA, Northern blot, अथवा RNase prediction assay बाट केही कठिन हुनेगर्दछ । यो प्रविधि माथि उल्लेख गरिएका प्रविधिहरू भन्दा हजार गुणा प्रभावकारी छ (Souza-Dais et al, 1999) । यो प्रविधि molecular biology मा RNA को परिमाण पत्ता लगाउन प्रयोगमा ल्याइन्छ ।

(क) सामानहरूको व्यवस्थापन तथा तयारी

- RT-PCR परीक्षण शुरू गर्नु भन्दा पहिला सेन्ट्रिफ्यूज मसिन (centrifuge machine) कम्तिमा पनि ३०-६० मिनेट पहिला संचालन (ON) गर्नु पर्दछ ।
- सेन्ट्रिफ्यूज मसिनको भित्री तापक्रम 40° से. र 1200 rpm मा १० मिनेट समय मिलाउनु पर्दछ ।
- सेन्ट्रिफ्यूज मसिनको तापक्रम 94° से. तापक्रम मिलाउनु पर्दछ ।
- रेफ्रिजरेटबाट प्राइमर, DEPC water mix आदि बाहिर निकाल्नु पर्दछ ।

(ख) RNA तयार गर्ने

- करिब ०.०४ ग्राम आलुको दानाको भाग अथवा पातको दुई टुक्रा लिने र १.५ एम.एल. ट्यूब (Falcon snap cap

polyethylene tube) मा राखि तुरुन्त वरफ भएको बक्स (ice box) मा राख्ने ।

- नमूनामा तरल नाइट्रोजन ग्याँस (liquid nitrogen) राखि पिन्ने । पिन्ने stick RNase सोलुसनले सफा गरेको हुनु पर्दछ ।
- करिब 200 μ l (माइक्रो मिटर) वफर राखि भर्टेक्स गरी राम्रोसंग मिलाउनु पर्दछ ।
- पुनः 200 200 μ l PCR μ l B:C:I (biophenol/ chloroform/ isoamylic alcohol 25:24:1) को अनुपातमा राखि राम्रोसंग मिसाउने र जम्मा 400 μ l बनाउने ।
- ४^० से. तापक्रममा 1200 rpm मा ४ मिनेट सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने ।
- माथि तैरिएको पदार्थ सबैजसो वा 100 μ l नयाँ ट्यूब (200 μ l साइज) मा सार्ने ।
- फेरि अर्को नयाँ ट्यूब लिने र पहिलेकोबाट 10 μ l राख्ने र १:५० को अनुपातमा DEPC water राखि पतल्याउनु पर्दछ । यसकोलागी 10 μ l sample + 490 μ l DEPC water गरी जम्मा 50 μ l हुनेछ र त्यसलाई भर्टेक्स (vertex) मा राखि मिसाउनु पर्दछ ।
- यसैक्रममा २ सेट मभ्यौला खाले ट्यूब तयार गर्ने र एक सेटमा राख्ने ।
- त्यसलाई ९४^० से. मा पानी नभएको water bath मा ५ मिनेट इन्क्यूबेट गर्ने ।
- अन्तमा RNA तयार हुनेछ र त्यसलाई ice box मा राखि ४^० से. मा store गर्ने ।

(ग) RT-PCR गर्ने तरिका

१. PCR-mix तयार गर्ने

- रेफ्रिजेरेटरबाट PCR chemical (master mix, Reverse II आदि) निकाल्ने र PCR mixture मा 8 μ l DEPC water मिसाउने र सेन्ट्रिफ्यूज गरेर पिँधमा हुन दिने ।
- एक नमूनाको लागि mixture 4 μ l, primer I 6 μ l र primer II 6 μ l का दरले मिक्चर तयार गर्नुपर्दछ ।
- कतिवटा भाइरस टेस्ट गर्ने हो त्यतिनै सेट PCR द्यूब तयार गर्नुपर्दछ ।
- मिक्चरबाट हरेक भाइरसको लागि 16 μ l RCR द्यूबमा राख्ने र त्यसमा 4 μ l नमूना (RNA) राखि राम्रोसंग मिसाउने र सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने ।
- द्यूबलाई PCR मेसिनमा राख्ने र ३ घण्टा ८ मिनेटसम्म संचालन गर्ने ।

२. RT-PCR को अवस्था

टेष्ट शुरू गर्नु भन्दा पहिला PCR मेसिन निम्न अनुसारले सेटिङ गर्नुपर्दछ :

- १) 1 hr at 42⁰ C reverse transcripts (RT) and 3 min at 95⁰ C
- २) 1 min at 94⁰ C (denaturation)
- ३) 1 min at 57⁰ C (annealing)
- ४) 1 min at 72⁰ C (extension)
- ५) 10 min at 72⁰ C
- ६) ३ घण्टा २८ मिनेट पछि द्यूब PCR मेसिनबाट निकाल्ने र ४⁰ से. मा store गर्ने ।

(घ) Electrophoresis & UV irradiation

- PCR जेल (gel) तयार गर्ने ।
- TAE (1 X) बफरमा 1% agarose राख्ने र माइक्रोओभनमा पगाल्ने ।
- 50 x TAE buffer solution (stock) बनाउने ।
- Trisbase 242 g/l ।
- Glacial acetic acid 57.1 ml/l ।
- 0.5 EDTA, pH 8 : 50 ml/l मिसाई अन्तमा जम्मा १ लि. को सोलुसन तयार गर्नुपर्दछ ।
- जेल केहि चिसो भएपछि ethidium bromide (ETBR) 100 μ l/100 ml जेलका दरले विस्तारै मिसाई जेल ट्रेमा खन्याउने र १-२ घण्टा जम्नकोलागि कोठमा राख्ने ।
- 1 x TAE बफर भएको electrophoresis box मा जेललाई डुब्ने गरी राख्ने ।
- ले-आउट तयार गरी जेलको दुवै साइडमा माइक्रोपिपेटको सहायताले 3-5 μ l DNA marker रिफ्रेन्सको लागि राख्ने ।
- अन्य प्वालहरूमा प्रति प्वाल 5 μ l का दरले नमूना (DNA) लोड गर्ने ।
- १०० भोल्टमा २०-३० मिनेटसम्म electrophoresis संचालन (run) गर्ने र जेल बाहिर निकालि UV लाइटमा राखि band हेरी भाइरस पत्ता लगाउने र फोटो लिने ।

५.२ सूक्ष्म प्रसारण (Micro-propagation)

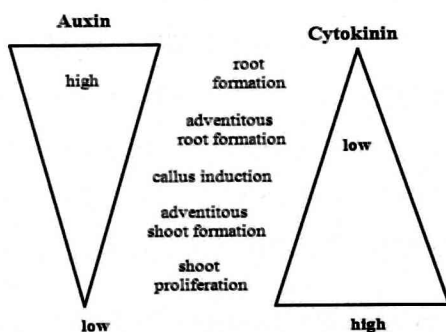
५.२.१ एकल आख्ले प्रविधि (Single nodal cuttings)

भाइरस मुक्त ठहरिएका माउ विरुवाहरूलाई एकल आख्ले प्रविधि (single nodal cuttings) द्वारा एम.एस.मिडियामा शिघ्र प्रसारण (rapid propagation) गरिन्छ । यो कार्य पनि माथी उल्लेख गरिए

जस्तै पूर्ण नियन्त्रित र निर्मलीकृत अवस्थामा गरिन्छ । यस चरणको प्रसारणमा धेरै विरुवाहरू छोटो समयमा उत्पादन गर्नुपर्ने भएकाले जाम बोटलमा गर्ने गरिएको छ । यसरी प्रसारण गरेपछि उक्त जाम बोटहरूलाई नियन्त्रित कोठा (incubation room) मा राखिन्छ । करिब ४-५ हप्ता पछि ८-१० से.मी. उचाई र ५-६ पात भएको विरुवाहरू तयार हुन्छ जुन पूर्व-मूल बीउ उत्पादन (pre-basic seed) गर्नका लागि सिसा वा जालीघरमा रोप्न प्रयोग गरिन्छ ।

५.२.२ डाँठको वृद्धि (Shoot proliferation)

विरुवाको प्रसारण हाँगा (axillary branch) तथा मूल डाँठको प्रयोग बाट गरिन्छ । डाँठको वृद्धिको लागि साइटोकीनिन (cytokinin) प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । प्रायः गरेर cytokinin र auxin को अनुपात उच्च भएमा डाँठको वृद्धिको नतिजा राम्रो हुनेगर्दछ (चित्र नं. १०) । डाँठको वृद्धिमा तत्वहरूको परिमाण, विरुवाको जात र अवस्थाले प्रभाव पार्ने गर्दछ । आलुको shoot inducton मा growth regulator को प्रयोग विना पनि प्रसारण गर्न सकिन्छ भने केही अवस्थामा auxin को सट्टामा gibberellic acid को प्रयोग गरिन्छ र साथमा cytokinin को पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ ।



चित्र नं. १० : विरुवाको वृद्धि र विकासमा auxin र cytokinin को प्रभाव

५.३ प्रयोगशालामा (इनभिट्रो) आलुको जर्मप्लाज्म संरक्षण (*In vitro* germplasm conservation)

भाइरस मुक्त गरिएका स्थानिय तथा विदेशबाट भिकाइएका आलुका जातहरू विभिन्न प्रयोजनका लागि खुमलटार स्थित प्रयोगशालामा संरक्षण गरिराखेको छ । त्यसमा धेरैजसो आलुका जातहरू पेरु, भारत र नेदरल्याण्डबाट ल्याइएका छन भने केहि स्थानिय जातहरू पनि छन् । यस किसिमको प्रसारण प्रायःजसो टेष्ट ट्यूब (test tube) मा गरिन्छ, जस्मा विरुवाहरू लामो समयसम्म राख्न सकिन्छ ।

प्रयोगशालामा प्रायः प्रयोग गरिने MS media, ३% सुक्रोज र ०.८% अगर मा विरुवा संरक्षणगर्दा हरेक २-३ महिनामा अर्को नयाँ कल्चरमा प्रसारण गर्दै जानुपर्दछ अन्यथा विरुवा बुढो भै समाप्त हुन जानेछ । यसरी छोटो समयमै प्रसारण गरिरहदा खर्च र समय बढी लाग्दछ । त्यसकारण एकपटक प्रसारण (सव-कल्चर) गरिसकेपछि कम्तीमा १०-१२ महिना सम्म ठिक अवस्थामा रहोस र आवश्यक परेको खण्डमा प्रयोग गर्न सकियोस भन्नु नै यसको मुख्य उद्देश्य हो । यस अवस्थामा विरुवाको वृद्धि अथवा तन्तुको बिभाजन दर कम हुने गर्दछ । यसरी विरुवाको वृद्धि र विकास कम गर्न विभिन्न तरिकाहरूमा मिडियामा खाद्यतत्वको कमी गरेर अथवा वृद्धि कम गर्ने खास तत्वहरू राखेर गर्ने गरिन्छ । त्यसैगरी अन्य प्रविधिमा प्रसारण गर्ने मिडियामा केही अन्य तत्वहरू (mannitol or sorbitol) प्रयोग गर्न पनि सकिन्छ जस्ले गर्दा विरुवामा पानीको उपलब्धता कम हुन गई विरुवाको वृद्धि र विकासलाई कम गरेर लामो समयसम्म भण्डारण गर्न सकिन्छ ।

Lizarraga र सहकर्मीहरू (1989) ले दिएको जानकारी अनुसार media मा mannital 30 g/l का दरले प्रयोग गरी १२ महिनासम्म राख्दा पनि करिब ६४% विरुवा बाँचेको छ । त्यसैगरी सोही उद्देश्यका लागि

प्रयोजनमा आउने प्रायःजसो तत्वहरूमा abscisic acid (ABA), B 995, maleic hydrazide (MH) chlorocholine chloride (ccc) and N-dimethy l-succinamic acid आदि छन् ।

त्यसैगरी कम तापक्रममा पनि विरुवालाई लामो समयसम्म संरक्षण गर्न सकिन्छ । जस्मा १२° से. तापक्रममा १६ घण्टा प्रकाश र ६° से. तापक्रममा ८ घण्टा अँध्यारो अवस्थामा राख्दा १२ महिना पछि करिब ७३% विरुवाहरू बाँचेको प्रतिवेदनले देखाएको छ ।

खण्ड-६

६. तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा आलुको जातीय सुधार (Tissue culture method for potato crop improvement)

आलुको जातीय सुधार तथा नयाँ जातको विकास गर्न विभिन्न प्रविधिहरू अपनाउन सकिन्छ, भने यहाँ केही सरल प्रविधिहरू; प्रोटोप्लास्ट कल्चर, एन्थर कल्चर, भ्रूण कल्चर गर्ने विधि बारेमा छोटकरीमा उल्लेख गरिएको छ।

६.१ आलुमा प्रोटोप्लास्ट कल्चर गर्ने विधि (Protoplast culture in potato)

A. Isolation of leaf protoplasts

- उपयुक्त उन्नत जातको आलुको विरुवा प्रयोगशालामा प्रसारण गर्ने।
- प्रयोगशालामा प्रसारण गरिएको विरुवालाई २५° से. तापक्रम भएको अर्ध्याँरो कोठामा २ दिनसम्म राख्ने।
- विरुवाबाट पातहरू लिने र नाइल ब्रसको प्रयोग गरी बिस्तारै पातको तल्लो भागको इपिडर्मिस (epidermis) कोट्याउने जस्लेगर्दा इन्जाइम सोलुसन भित्र जान सजिलो हुनेछ।
- उक्त पातहरूलाई स-साना टुक्रा बनाउने र त्यसलाई डाइजेशन इन्जाएम २५ एम.एल. प्रति ग्राम तन्तुका दरले १२५ एम. एल. साइजको side arm erlenmeyer flask मा राख्ने। उक्त इन्जाएम सोलुसन Ms media basal न्यूट्रेन्ट मा casein hydrolysate (50 mg/l), MES (97.0 mg/l), cellulase R-10 (0.5%), macerozyme R-10 (0.1%),

PVP-10 (10 g/l) र सुक्रोज (१०२.७ ग्रा./लि.) समावेश गरी तयार गर्नुपर्दछ ।

- पातको टुक्रा राखेको फ्लास्क (flask) लाई रबर स्टोपर (rubber stopper) ले सिल गर्ने र १ मिनेट सम्म भ्याकुम फिल्टर गर्ने । फ्लास्कलाई २८-२९^० से. तापक्रम भएको बाथ ट्रे (water bath) मा 60 rpm मा राख्ने र ४ घण्टा सम्म इन्कुबेट गर्ने ।
- उक्त सोलुसन सहितको पातलाई दुईतह सहितको सफा कटन कपडा (cheesecloth) मा छान्ने र उक्त प्रोटोप्लास्टलाई निर्मलीकृत (sterilized) सेन्ट्रिफ्यूज (centrifuge) बोटलमा जम्मा गर्ने र उक्त बोटललाई 1000 rpm मा १० मिनेट सम्म सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने ।
- निर्मलीकृत पास्चर पिपेट (pasteur pipettes) को सहायताले सोलुसनको माथिल्लो तहबाट प्रोटोप्लास्ट संकलन गर्ने र त्यसलाई पुनः वासिङ सोलुसन (washing solution) भएको सेन्ट्रिफ्यूज बोटलमा राख्ने, वारिङ सोलुसन बनाउँदा MS basal nutrient मा 10 mg casein hydrolysate, 97 mg/l MES र 102.7 g/l sucrose मिसाएर तयार गर्नुपर्दछ । त्यसलाई 1000 rpm मा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने र पिपेटको (pasteur pipettes) को सहायताले माथिल्लो भागको प्रोटोप्लास्ट जम्मा गर्ने र त्यसलाई ग्रोथ रेगुलेटर नमिसाइएको १ एम.एल. तरल मिडियामा राख्ने ।
- उक्त प्रोटोप्लास्टलाई करिब २ एम.एल. लिक्वड मिडिया भएको पेट्रिडिसमा राख्ने । उक्त लिक्वड मिडिया एम.एस. न्यूट्रेंट मिडियामा sucrose (0.2 M), mannitol (0.025 M), xylitol (0.025 M), sorbitol (0.025 M) MES (97.0

mg/l), casein hydrolyaste (50 mg/l), NAA (0.1 mg/l), र BA (0.05 mg/l) समावेश गरी तयार पार्नुपर्दछ (Naik, 2000)।

B. Protoplast fusion

- भिन्न भिन्न दुई प्रकारका प्रोटोप्लास्ट करिब ०.५ एम.एल. का दरले मिसाउने र त्यसमा ८ एम एल वास सोलुसन (wash solution) (0.5 M sorbitol,
- 5.0 mM $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ र pH 5.8) मा पतल्याउनु पर्दछ र ५ मिनेट सम्म १०० ग्रा. मा सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने ।
- बढी भएको इन्जाम सोलुसन निकाल्ने पुनः माथि १ नं. को तरिका दोहऱ्याउने र तल जम्मा भएको प्रोटोप्लास्टलाई १ एम.एल. वास सोलुसनमा पुनः मिसाउने ।
- पेट्रिडिसमा १ थोपा सिलिकन फ्ल्यूड (silicone fluid) राख्ने र सिलिकन फ्ल्यूडको माथि २२×२२ एम.एम. साइजको निर्मलीकृत ग्लास कभर स्लिप (glass coverslip) राख्ने । ग्लास कभर स्लिपमा १५० माइक्रोलिटर प्रोटोप्लास्ट पिपेटको सहायताले राख्ने र प्रोटोप्लास्टलाई ५ मिनेटसम्म रहन दिनुपर्दछ ।
- उक्त प्रोटोप्लास्टमा ४५० एम.एल. PEG fusion solution (0.2 M glucose, 10 mM $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 0.7 mM KH_2PO_4 , 50% PEG, र pH 5.8) मिसाउने र १५-२० मिनेट सम्म कोठाको तापक्रममा इन्क्यूबेट गर्ने ।
- उक्त प्रोटोप्लास्ट मिश्रणमा ९०० एम.एल. PEG eluting solution (50 mM glycine, 0.3 M glucose, 50 mM

CaCl₂H₂O, pH 10.5) मिसाउने र १० मिनेट सम्म इन्क्यूबेट गर्ने ।

- माथि ५ नं मा उल्लेख भएको कार्य एकपटक पुनः दोहोर्‍याउने र अन्तमा उक्त मिश्रणमा ५०० एम.एल. प्रोटोप्लास्ट कल्चर मिडिया (plating medium) मा मिसाउने र १० मिनेट पछि ५०० एम.एल. कल्चर मिडियम थप्ने ।
- प्रोटोप्लास्ट सहितको पेट्रिडिसलाई पारफिल्मले सिल गर्ने र त्यसलाई माइक्रोसकोपमा फ्यूजन भएको निरीक्षण गर्ने (Naik, 2000) ।

६.२ एन्थर कल्चर (Anther culture)

Haploids विरुवाहरू उत्पादनका लागि एन्थर कल्चर गरिन्छ जसबाट धेरै परिमाणमा एकनाश (homozygous) र शुद्ध जात भएका विरुवाहरू उत्पादन गर्न सकिन्छ । जातीय विभितता तयार गरी नयाँ जातको विकास गर्न यो प्रविधि अपनाइन्छ । परम्परागत रूपले एउटा नयाँ जात निकाल्न ६-८ वर्ष सम्म लाग्न सक्दछ भने एन्थर कल्चरबाट १ वर्ष भित्रमा नयाँ जात निकाल्न सकिन्छ ।

आलुमा एन्थर कल्चर गर्ने विधि (protocol) यस प्रकार छ :

- हल्का हरियो रंगको फूलको कोपिला (४-६ एम एम लामो) संकलन गर्ने ।
- सफा र सुख्खा टेष्ट ट्यूबमा राखी त्यसलाई ६० से. भएको कोठामा २ दिन सम्म प्रि-कल्चर गर्ने ।
- फूलको कोपिलालाई ७०% इथानोलमा ३० सेकेण्ड डुबाउने र १% को सोडियम हाइपोक्लोराइडको सोलुसनले ५-१० मिनेट सम्म डुबाइ सतह निर्मलीकरण गर्ने । आवश्यकता अनुसार

सोडियम हाइपोक्लोराइडमा १-२ थोपा Tween-20 मिसाउन पनि सकिन्छ ।

- कोपिलालाई निर्मलीकरण गरिएको पानी (SDH₂O) ले तीनपटक धुनुपर्दछ र लेमिनार फ्लोमा scapel र needle को सहायताले एन्थर निकाल्नु पर्दछ ।
- निकालिएको उक्त एन्थरलाई सेमिसोलिड न्यूट्रेन्ट मिडिया भएको पेट्रिडिसमा कल्चर गर्ने । MS basal nutrients मिडियामा 6.0 μ M IAA, 4.0 μ M BA, 0.5% activated charcoal, 60 g/l सुक्रोज र 8 g/l अगर समावेश भएको हुनुपर्दछ ।
- उक्त कल्चरलाई २४^० से. तापक्रम भएको अँध्यारो अवस्थामा राख्नुपर्दछ । जब त्यसमा calli or embryos देखिन थाल्दछ त्यसलाई १६ घण्टा प्रकाश र २४^० से. तापक्रम भएको कोठामा स्थानान्तर गर्नुपर्दछ ।
- भ्रूणबाट (embryo) पूर्ण विकसित विरुवालाई सामान्य प्रसारण मिडियामा कल्चर गर्नुपर्दछ ।
- विरुवाको ploidy level पत्ता लगाउन विरुवाको DNA र क्रोमोजोम नम्बर अध्ययन गर्नुपर्ने हुन्छ ।
- तयार भएको haploid विरुवालाई ०.२% को कोल्चिसिन (colchisine) ले उपचार गरी diploid विरुवाहरू उत्पादन गरी नयां शुद्ध आलुका जात तयार गरिन्छ ।

६.३ भ्रूण कल्चर (Embryo culture)

आलुको जातीय सुधार गर्न भ्रूण कल्चर (embryo culture) गरिन्छ । आलुको भ्रूण कल्चर (embryo culture) गर्ने विधि (protocol) यस प्रकारको छ :

- अपरिपक्व आलुभेंडाबाट बीउ दाना निकाल्ने र पानीले सफा गर्ने ।
- ७०% अल्कोहलले ३० सेकेण्ड र १% को सोडियम हाइपोक्लोराइडको सोलसनले ५-१० मिनेट बीउको सतह निर्मलीकरण गर्ने ।
- त्यसपछि बीउलाई निर्मलीकरण गरिएको (sterile distilled) पानीले २-३ पटक सम्म सफागरी पहिला प्रयोग गरेको सोलुसन पूर्णरूपले सफा गर्ने र stereoscopic zoom microscope प्रयोग गरी भ्रूण निकाल्ने ।
- बीउबाट भ्रूण निकाल्दा विस्तारै बीउको बाहिरी बोक्रा (seed coat) निकाल्ने र होसियारीसाथ हाइलम (hylum) लाई फुटाउने र निडलको चौडा भागले बीउलाई विस्तारै थिचि पुरै भ्रूण (embryo) निकाल्ने ।
- उक्त निकालिएको भ्रूणलाई सुक्नबाट बचाउन तुरुन्त PM-2 कल्चर मिडियामा स्थानान्तरण गर्नुपर्दछ । PM-2 कल्चर मिडियामा 2.69 μ M NAA, 1.1 μ M BA र १० ग्रा. सुक्रोज/लि. का दरले समावेश गर्नुपर्दछ ।
- कल्चर मिडिया राखिसकेपछि त्यसलाई १६ घण्टा प्रकाश र $24 \pm 1^\circ$ से. तापक्रम भएको कोठामा राख्नुपर्दछ ।

६.४ सिंथेटिक बीउ उत्पादन (Synthetic seed production)

आलुको जर्मप्लाज्म सम्बर्धन गर्ने सजिलो उपाय मध्य यो एक उपाय हो । यस प्रविधिद्वारा प्रयोगशाला भित्र छोटो समय र सानो क्षेत्र (limited space) मा रोग रहित बीउ उत्पादन गर्न सकिन्छ । यो मानव निर्मित बीउ (artificial seed) लामो समयसम्म भण्डारण गर्न सकिन्छ र आफूलाई आवश्यक परेको खण्डमा पुनः विरुवा बनाई प्रसारण गर्न सकिन्छ । साथै यसैलाई प्रयोग गरी PBS उत्पादन गर्न पनि सकिन्छ । यस प्रविधिमा स-साना एकल आख्ला प्रयोग गरिन्छ । एउटै विरुवाबाट धेरै भन्दा धेरै बीउ बनाउन सकिन्छ र छोटो समयमा धेरै बीउ तयार गर्नसकिने आदि कारणहरूले गर्दा यो प्रविधि आर्थिक दृष्टिकोणले लाभदायक (cost effective) पनि छ । नार्क अन्तर्गत राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रममा पनि परीक्षणको रूपमा सुरूवात गरिएको र यसलाई उत्पादन कार्यमा ल्याउन थप परीक्षण भैरहेको छ । यस प्रकारको बीउ उत्पादन गर्ने प्रविधिको प्रोटोकल तल उल्लेख गरिएको छ ।

सिंथेटिक (Synthetic) बीउ उत्पादन विधि (Protocal):

- प्रयोगशालामा रोगमुक्त विरुवाहरू तयार गरि प्रसारण गर्ने ।
- ३० ग्रा/लि. का दरले सोडियम एल्जिनेट (sodium alginate) सोलुसन र अर्को भाँडोमा १०० मि.मो. (100 mM) को क्यासियम क्लोराइड ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) सोलुसन र MS मिडिया समावेश गरी तयार गरेको सोलुसनलाई बेग्ला बेग्लै भाँडोमा राखि 929° से. मा २१ मिनेट निर्मलीकरण गर्ने ।

- ४-५ मि.मि. साइज पात नभएको एकल आख्ले प्रविधि (single node cuttings) अपनाई तयार गरिएका टुक्रालाई सोडियम एल्जिनेटमा डुबाउने ।
- उक्त सोडियम एल्जिनेटमा डुबाएको विरुवाको टुक्रालाई पिपेटको सहायताले क्याल्सियम क्लोराइड भएको भाँडोमा खसाल्ने र पूर्ण रूपले डल्ला (beads) नभए सम्म अर्थात करिब २० मिनेट सम्म विस्तारै हल्लाई राख्नुपर्दछ ।
- बीउको डल्ला (beads) मा लागेको CaCl_2 हटाउन निर्मलीकरण गरेको पानीले सफा गर्ने र त्यसलाई फिल्टर पेपर भएको पेट्रिडिसमा राखि १६ घण्टा २००० लक्स प्रकाश र 24° से. भएको अवस्थामा ३ दिनसम्म राख्नुपर्दछ ।
- त्यसपछि विरुवा भएको डल्लालाई २०० ग्रा/५० विरुवाका दरले जरा आउने हर्मोन (rooting hormone) ले उपचार गरी ग्लास हाउसमा रोप्न सकिन्छ ।
- विरुवाको डल्ला नसुकोस भन्नका लागि जरा राम्रो संग नआउन्जेल दैनिक ३-४ पटक मसिनो फोहरा प्रयोग गरी सफा पानी दिनुपर्दछ ।

खण्ड-७

७. प्रयोगशालामा सूक्ष्म बीउ आलु उत्पादन (Microtuber production)

७.१ आलुको सूक्ष्म बीउ (Microtuber) भनेको को हो ?

मेरिस्टिम टिप कल्चर (meristem tip culture) प्रविधि द्वारा आलुमा लाग्ने भाइरस तथा अन्य रोगहरू मुक्त र उन्नत जातको आलुको बोटलाई तन्तु प्रजनन (tissue culture) प्रविधिद्वारा द्रुतगतिमा प्रसारण गरिन्छ । प्रशस्त मात्रामा प्रसारण गरिसकेपछि विरुवाहरूलाई पुनः उपयुक्त तत्वहरू राखी उचित तापक्रम र उज्यालोको व्यवस्था मिलाई प्रयोगशाला भित्र हुर्कन दिइन्छ जसमा आलुका स-साना दानाहरू फल्दछन् । तन्तु प्रजनन प्रयोगशालामा सिसा भित्र हुर्काएको बोटमा फलेको आलुका यस्ता स-साना दानालाई सूक्ष्म बीउ आलु (micro-tuber) भनिन्छ (चित्र नं. ११) ।



चित्र नं. ११ : प्रयोगशालामा तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा प्रसारण गरिएका बोटल भित्रका विरुवामा फलेका रोगमुक्त सूक्ष्म बीउ (micro-tuber) आलु दानाहरू ।

७.२ सूक्ष्म बीउ (Microtuber) को महत्व

तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट प्रसारित विरुवाहरूको जस्तै बाह्रै महिनाको उपलब्धता, थोरै समयमा धेरै प्रसारण गर्न सकिने, रोगमुक्त बीउ उत्पादन र थोरै ठाउँ तथा कम खर्चमा ओसारपसार गर्न सकिने आदि फाइदाहरूका अतिरिक्त सूक्ष्म बीउ आलुलाई कम्तीमा चार महिना सम्म अध्यारोमा भण्डारण गरेर राख्दा पनि खासै असर नपर्ने हुन्छ । यस प्रकारको बीउ आलुलाई सिसा अथवा जालीघरमा वा सिधै सरकारी फार्म तथा कृषकस्तरमा रोपि क्रमशः पूर्व-मूल बीउ तथा मूल बीउ आलु उत्पादन गर्न सकिन्छ ।

७.३ सूक्ष्म बीउ (Microtuber) उत्पादन

टेष्ट ट्यूब, जाम बोतल, प्लाष्टिक भाँडो वा अन्य उपयुक्त भाँडोमा तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट विरुवा उत्पादन गरे जस्तै सूक्ष्म आलु दाना (micro-tuber) पनि उत्पादन गर्न सकिन्छ । सूक्ष्म बीउ आलु धेरै प्रकारका मिडियाहरूको प्रयोग गरी फलाउन सकिन्छ तर सस्तो मिडियाको प्रयोग गरी ठूला (१ ग्राम/दान भन्दा ठूला) साइजका बीउ आलु धेरै संख्यामा फलाउनु यसको मुख्य उद्देश्य हुनेछ । जसले गर्दा लागत खर्च घट्न जाने र उत्पादित बीउ आलु पहिलो पुस्तामा नै कृषकको खेतबारीमा प्रयोग गर्न सकिने हुन्छ । सूक्ष्म बीउ आलु उत्पादनका लागि एम्.एस. मिडिया ०.८% अगर र ६% सुक्रोज हालेर तयार गरेको मिडियामा भाइरसमुक्त विरुवाहरू प्रसारण गरी ६-७ हप्ता सम्म 25 ± 2 डिग्री सेल्सियस तापक्रममा दिनको १६ घण्टा उज्यालो (२००० लक्स) अवस्थामा विरुवा हुर्काइन्छ, र त्यसपछि अगर नराखेको एम्.एस. मिडियामा ८% सुक्रोज र वृद्धिवर्द्धक रसायन (plant growth substances) जस्तै: वि.ए.पि. (BAP) १० पिपिएम् र वि-९ (B-9) २०० पिपिएमका दरले समावेश गरी तयार पारेको भोल मिडिया त्यसै भाँडोमा थपेर अर्को १ हप्ता पछि २४ सै घण्टा अध्यारो

अवस्थामा ६-८ हप्ता राखेपछि विरुवाको आँख्लामा स-साना आलुका दाना फल्दछन् । विरुवा मर्दै जाँदा आलुदाना छिप्पिदै जान्छ र पूर्ण छिप्पेपछि दाना निकालिन्छ र त्यसलाई उपयुक्त तवरले भण्डारण गर्नुपर्दछ ।

आलुको सूक्ष्म बीउ उत्पादन गर्ने सम्बन्धमा धेरै थरीका तरिकाहरू (protocol) को विकास भैसकेका छन् । Wang Hu (1982) को पहिलो रिपोर्ट अनुसार ताईवानमा पहिलो पटक प्रयोगशालामा धेरै परिमाणमा सूक्ष्म बीउ उत्पादन भएको थियो र त्यसपछि उक्त प्रविधि क्रमशः अन्तराष्ट्रिय आलु केन्द्र (CIP) र अन्यत्र प्रयोग हुँदै आएको पाइन्छ । सूक्ष्म बीउ उत्पादनमा धेरैले ग्रोथ रेगुलेटर (growth regulators) प्रयोगमा ल्याएका छन् । यसप्रकार धेरै प्रयोगमा आउनेमा विशेष गरेर साइटोकाइनिन (Cytokinin) मा प्रमुख BA नै हो । त्यसैगरी Abscisic acid, NAA, CCC, Triazoles, Coumarin, Jasmonic acid आदि पनि प्रयोगमा छन् ।

दाना उत्पादनमा ग्रोथ रेगुलेटर बाहेक प्रत्यक्ष असर पार्ने तत्वहरूमा मिडियामा कार्बन श्रोतको प्रकार र परिमाण, नाइट्रोजन र पोटासको परिमाण, तापक्रम र प्रकाश अवधि प्रमुख छन् । सुक्रोज प्रमुख कार्बन श्रोतको रूपमा प्रयोग गरिन्छ । शुक्रोजको परिमाण १ बाट ८% सम्म बढाउदा उत्पादन छिटो हुन्छ भने ८% भन्दा बढी प्रयोग गरेमा उत्पादन घट्न थाल्दछ । प्रायः गरेर नाइट्रोजनको मात्रा बढी भएमा दाना उत्पादन घट्न सक्दछ । धेरै र ठूला दाना उत्पादनको लागि इन्कुवेसन कोठाको उपयुक्त तापक्रम २०° से. हुनुपर्दछ भने १२° से. भन्दा कम अथवा २८° से भन्दा बढी तापक्रम भएमा उत्पादनमा असर पर्न जानेछ । विरुवाबाट निकाल्ने बित्तिकै दानाहरू सुषुप्तावस्थामा हुने गर्दछन् । रोप्नु भन्दा पहिला ३-४ महिना यसलाई ५-६° से. तापक्रममा भण्डार गर्नुपर्दछ । भण्डारणमा दानाको कम

नोक्सान होस भन्नका लागि निकाल्नु भन्दा १०-१५ दिन पहिले १६ घण्टा प्रकाशमा २४° से. तापक्रममा राख्नु पर्दछ (Dhital et al, 2005)। जस्ले गर्दा दाना हरियो हुनेछ र भण्डारण क्षमतामा वृद्धि हुनेछ । खुमलटार स्थित प्रयोगशालामा पनि मुख्य आलुका जातहरूको सूक्ष्म बीउ उत्पादन गर्ने काम भैरहेको छ ।

७.४ उत्पादन निकाल्ने (Harvesting)

- (क) दाना १ ग्राम भन्दा ठूलो भएपछि (करिब ५०-६० दिन) दाना निकाल्नु पर्दछ ।
- (ख) दानामा चोटपटक नलाग्ने गरी बोटलबाट निकालि आवश्यकता हेरी स-साना ट्रेमा राख्नुपर्दछ ।
- (ग) दानामा लागेको मिडिया हटाउन पानीले सफा गर्ने र ०.२% वेभिष्टिन (Bavistin) को भोलले १० मिनेट सम्म उपचार गरी सुख्खा भएपछि २ दिन सम्म २२° से. तापक्रम भएको अँध्यारो कोठामा राख्नुपर्दछ ।
- (घ) दानालाई नाइलन जाली भोलामा राखी लेभलिङ्ग (नाम, मिती, साइज आदि) साथ बन्दगरी ४° से. तापक्रम भएको अँध्यारो कोठामा भण्डारण गर्नुपर्दछ ।
- (ङ) सुषुप्तावस्था समाप्त भै उम्रन शुरु भएपछि दाना रोप्न तयार हुन्छ ।

७.५ सिसाघर/जालीघरमा रोपाई

- (क) टुसाएको दानालाई सिधै सिसा/जालीघरमा लगेर तयार गरेको मिश्रण (माटो १ भाग बालुवा २ भाग) मा २०×१० से.मी. को फरकमा रोप्न सकिन्छ ।

- (ख) यसलाई आवश्यकता अनुसार पानी तथा विषादीहरूको प्रयोग गर्ने र उकेरा लगाउँदै जानुपर्दछ ।
- (ग) यदि दानालाई सिधै खेतवारीमा रोप्ने हो भने दानालाई पहिला स-साना कपमा रोपी २-३ हप्ता सम्म सिसाघर भित्रै राख्ने र त्यसपछि विरुवालाई खेतवारीमा रोप्नुपर्दछ ।
- (घ) आवश्यकता अनुसार पानी तथा विषादीहरूको प्रयोग र उकेरा लगाउने आदि कृषि कर्म गर्दै जानुपर्दछ ।
- (ङ) उत्पादित आलुदानाहरू अर्को वर्ष बीउ उत्पादन गर्नका लागि सुरक्षितसाथ भण्डारण गर्नुपर्दछ ।

खण्ड-८

८. हाइड्रोपोनिक प्रविधि (Hydroponic method) द्वारा पूर्व-मूल बीउ आलु उत्पादन

८.१ परिचय

माटोको प्रयोग विना बोट विरुवाहरूको खेती गर्ने तरिकालाई हाइड्रोपोनिक प्रविधि (hydroponic technology) भनिन्छ । जसलाई विना माटोको खेती प्रणाली पनि भनिन्छ । हाइड्रोपोनिक (hydroponic) शब्द ग्रीक भाषाबाट उत्पत्ति भएको र हाइड्रो (hydro) को अर्थ पानी र पोनिक्स (ponics) को अर्थ खेती गर्ने मानिस भन्ने बुझिन्छ । यो खेती प्रणाली धेरै पुरानो प्रविधि अन्तर्गत पर्दछ । विश्वयात्री मार्कोपोलोले ई.सं. १२९२ अगावै चीनमा "floating gardens" सम्बन्धि पत्ता लगाएका थिए भने जर्मन वैज्ञानिकहरू "Jubius Van Sachs र W. Knop" ले ई.सं. १८५६ तिर पानीमा गरिने खेतीको लागि आवश्यक खाद्य तत्वको विकास गरेका थिए । ई.सं. १९२० मा आएर यस प्रविधिको खास नामाकरण "Hydroponic" गरिएको पाइन्छ । ई.सं. १९४० अर्थात् दोश्रो विश्वयुद्धताका अमेरिकी सैनिकहरूले खेती गर्न नसकिने स्थानमा यसै प्रविधिद्वारा युद्धरत सैनिकहरूलाई आवश्यक ताजा खाद्य पदार्थ उत्पादन गरी आपूर्ति गरेको पनि लेखहरूमा पाइन्छ । ई.सं. १९५९ तिर मात्र यस सम्बन्धि विस्तृत अध्ययन तथा अनुसन्धानको सुरूवात भएको देखिन्छ । माटोमा हुने वा पानीमा हुने धेरै विरुवाहरू यो प्रविधि अन्तर्गतका विविध तरिकाहरू जस्तै : मिनरल सोलुसन मात्र वा सोलुसन र ग्राभल वा मिनरल उल आदि प्रयोग गरी खेती गर्न सकिनेछ ।

हाइड्रोपोनिक खाद्य तत्व (nutrient) मा विरुवालाई आवश्यक पर्ने सम्पूर्ण तत्वहरू (सूक्ष्म तथा प्रमुख तत्व) समावेश गरी तयार गरिएको हुन्छ । विकसीत मुलुकहरूमा आवश्यकता हेरी विभिन्न प्रकारका न्यूट्रिएन्ट मिडिया (nutrient media) तयारी अबस्था (ready-made) को रूपमा पनि उपलब्ध हुने गरेको पाइन्छ । विश्वका धेरै देशहरूमा यस प्रविधि प्रति आकर्षण बढ्दै गएको पाइन्छ र हाल यो प्रविधि अपनाउने देशहरू : जापान, दक्षिण कोरिया, भियतनाम, इजरायल, चीन आदि अग्रपंतिमा पर्दछन् । नेपालमा भने हालसम्म यस प्रविधि खासै प्रयोगमा आएको देखिदैन ।

आलुबालीको संदर्भलाई लिने हो भने यससंग सम्बन्धित वैज्ञानिकहरूले आलु बीउ उत्पादनमा माटोमा गरिने परम्परागत खेतीको तुलनामा करिब २९० प्रतिशत भन्दा बढीले उत्पादनमा वृद्धि भएको बताएका छन् । यस प्रविधिको अर्को राम्रो विशेषता आवश्यक बीउको साइज हेरी एकैपटक लगाएको बालीबाट पटक पटक उत्पादन लिन सकिन्छ जसले गर्दा बाँकी रहेका स-साना दानालाई ठूलो हुन प्रशस्त मात्रामा खाद्य तत्वहरू उपलब्ध हुन सक्दछ । नेपालमा पहिलो पटक २०६९ सालमा नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद् अन्तर्गत खुमलटार स्थित राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रममा परीक्षणको रूपमा यस प्रविधिबाट सफलता साथ पूर्व-मूल बीउ (PBS) आलु उत्पादन भएको थियो । यस प्रविधिबाट आलुबाली बाहेक छोटो अवधिका धेरै प्रकारका तरकारी बालीहरू विशेष गरी हरियो सागसब्जीहरू, गोलभेडा, काँको, करेला, प्याज, आदि को सहजै खेती गर्न सकिनेछ । यहाँ हाइड्रोपोनिक प्रविधिद्वारा आलुको पूर्व-मूल बीउ उत्पादन गर्ने तरिका वारे तल छोटकरीमा उल्लेख गरिएको छ ।

८.२ हाइड्रोपोनिक प्रविधिमा बिद्धमान सकरात्मक पक्षहरू (Positive points in hydroponic technology)

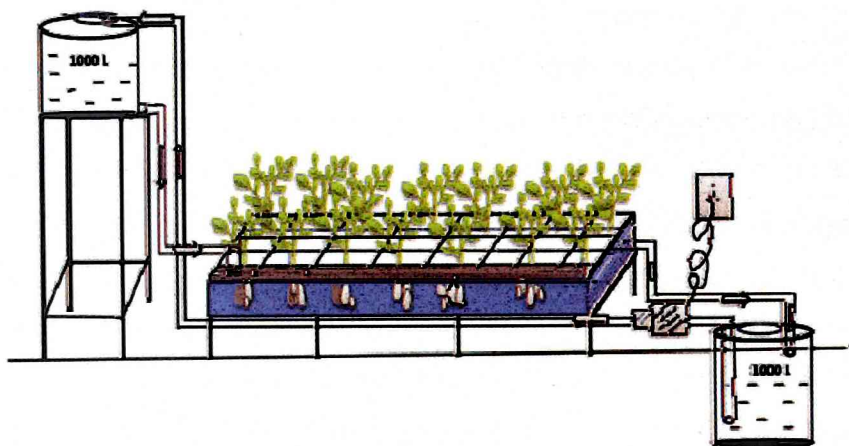
- यो तरिकाबाट लगाइएका बोट विरुवाहरूको वृद्धिदर माटोमा लगाइएका विरुवाको भन्दा करिब ३५-४५% ले बढी हुने गर्दछ ।
- यस प्रविधिमा विरुवालाई आवश्यक पर्ने खाद्य तत्वहरू पानीमा घोलिने हुनाले विरुवाको जराले सहजै ग्रहण गर्न सक्ने हुन्छ ।
- यस प्रविधिमा प्रयोग हुने सोलुसन (nutrient solution) लगातार चलिरहने हुनाले विरुवाको जरालाई आवश्यक पर्ने अक्सिजन प्रशस्त उपलब्ध हुने हुनाले विरुवाको वृद्धिदर राम्रो हुन्छ ।
- यस प्रविधिद्वारा खेती गदा रोग कीराहरूको प्रकोप कम हुने गर्दछ, जसले गर्दा विषादिहरूको प्रयोगमा कमी आउन सक्दछ ।
- बीउ आलु उत्पादनमा आवश्यकता अनुसार पटक पटक दाना निकाल्न (multiplication harvesting) सकिने छ ।
- यो प्रविधि विश्वको जुनसुकै कुनामा अथवा मरुभूमि वा खेती अयोग्य स्थानमा पनि सजिलै प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ ।
- बढ्दो जनसंख्या र सिमीत खेतीयोग्य जमिनको कारणले भविष्यमा यो नै एउटा भरपर्दो खेती प्रणालीको रूपमा स्थापित हुन सक्ने वैज्ञानिकहरूको विश्वास छ ।

८.३ हाइड्रोपोनिक प्रविधिमा विशेष ध्यान दिनु पर्ने कुराहरू (Major points to be considered)

- व्याक्टेरियाको संख्यामा वृद्धि हुने संभावना रहन्छ र जसको सहायताले फैलने रोगहरू (damping off, Verticillium wilt) को प्रकोपमा वृद्धि हुन सक्ने हुनाले त्यसमा विशेष ध्यान पुऱ्याउनुपर्दछ ।
- परम्परागत प्रणालीमा भन्दा यसमा प्राविधिक दृष्टिकोणले केही फरक हुने हुनाले शुरुका दिनहरूमा खेती गर्दा केही कठिनाइ हुन सक्दछ ।
- वरपरको आर्द्रता, पानीको पि.एच. र तापक्रम आदि बाली अनुसार उपयुक्त अवस्थामा राख्न ध्यान दिनुपर्दछ ।

यस प्रविधि संचालन गर्न आवश्यक सामानहरूको व्यवस्था गरि सकेपछि विरुवा रोपनकालागि आवश्यकता अनुसारका वेन्चहरू (चौडाई १-१.५ मिटर र लम्बाई आवश्यकता अनुसार ९-१० मिटर) तयार गर्नु पर्दछ । पानी राख्ने वेन्च तयार गर्दा त्यसमा दुईवटा प्वाल, एउटा बाट पानी वेन्चमा भर्ने (in-let) र अर्को पानी बाहिर जाने (out-let) को व्यवस्था मिलाउनुपर्दछ । वेन्च भित्र पानी रहने भाग करिब १५-१८ से.मी. गहिराइको हुनु पर्दछ । विरुवाहरूलाई आवश्यक पर्ने सोलुसन राख्नका लागि आवश्यकता अनुसार साइजका एउटा वेन्च भन्दा माथिको उच्चईमा over-head tank र अर्को वेन्च भन्दा तलको गहिराइमा under-ground tank गरी दुईवटा ट्याङ्की को व्यवस्था हुनुपर्दछ । माथिको ट्याङ्की (over-head tank) बाट वेन्चमा र वेन्चबाट तलको ट्याङ्की (under-ground tank) मा सोलुसन लगातार बगिरहनकालागि विद्युतीय स्वचालित पानी तान्ने पम्प अथवा टाइमर जडान गरिएको पम्प हुनु पर्दछ । वेन्चमा विरुवा रोपनका लागि

आवश्यक उचाईका फलामे फ्रेमहरू र त्यसमाथि करिब १ इन्च मोटाइका थर्मोकोल सिट राख्ने त्यस माथि कालो प्लाष्टिकले छोप्ने र थर्मोकोल र प्लाष्टिक दुवैमा पर्ने गरी प्वाल बनाउनु पर्दछ (चित्र नं. १२) । हाइड्रोपोनिक प्रविधिमा प्रयोग गरिने सम्पूर्ण सामानहरू धूलो अथवा फोहर रहित हुनु पर्दछ भने यसमा प्रयोग हुने पानी अल्ट्रा भ्वाइलेट (UV) प्रविधिद्वारा निर्मलीकरण गरिएको हुनु पर्दछ ।



चित्र नं. १२ हाइड्रोपोनिक प्रविधिबाट पूर्व-मूल बीउ (PBS) आलु उत्पादन गर्ने नमूनाको रेखा चित्र ।

८.५ विरुवाको तयारी तथा रोप्ने तरिका (Preparation of planting materials and planting method)

पूर्व-मूल बीउ (PBS) उत्पादनका लागि प्रयोशालामा उत्पादन गरिएका रोग रहित विरुवाहरू (in vitro plantlets) लिनुपर्दछ । ३-४ हप्ता उमेरका विरुवाहरूमा राम्रो संग जराको विकास भैसकेपछि प्रयोशालाबाट निकालि निसंक्रमित (sterilized) बालुवामा रोपि जरखन्याउनु (hardening) पर्दछ र करिब २-३ हप्ता पछि विरुवालाई आवश्यक खाद्य तत्व समावेश गरी तयार पारेको सोलुसन (nutrient

solution) भएको बेन्चमा रोप्नु पर्दछ । आवश्यक परेको खण्डमा रोप्नु भन्दा पहिला विरुवाको जरालाई ढुसीनासक विषादिको घोलमा (इण्डोफील एम-४५ वा बेभिस्टिन) उपचार गरी प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । सोलुसन बनाउँदा विरुवाको लागि आवश्यक पर्ने नाइट्रोजन २४४ मी.ग्रा./ली., फसफोरस २५३.४ मी.ग्रा./ली., पोटास ३१२ मी.ग्रा./ली., क्याल्सीयम २५ मी.ग्रा./ली., म्याग्नेसीयम ४७.८ मी.ग्रा./ली. र सल्फर ६३.७ मी.ग्रा./ली. का दरले (Park and Kim, 1998) र आवश्यक परेमा अन्य तत्वहरू पनि राखी मिलाउनु पर्दछ र विरुवा रोप्नुभन्दा पहिला त्यसको पि.एच. ५.८-६.३ मा मिलाउने र सम्भव भएसम्म पानीको तापक्रम पनि १८-२२^० सेल्सियसमा राख्नुपर्दछ । विरुवा रोप्नु भन्दा एक दिन पहिला आवश्यक सम्पूर्ण व्यवस्था मिलाई सोलुसन संचालनमा ल्याउनु पर्दछ । विरुवा रोप्नु भन्दा पहिला जरामा भएको बालुवा सफा पानीले राम्रोसंग पखाली विरुवाको जरा नचुडिने गरी थर्मोकोल र प्लाष्टिकमा बनाइएको प्वालमा रोप्नु पर्दछ र त्यसै दिन देखि सोलुसन लगातार संचालन हुने व्यवस्था मिलाउनु पर्दछ । विरुवाहरू रोप्दा आवश्यकता अनुसार करिब २०×१० से.मी. को फरकमा रोप्नुपर्दछ । विरुवा रोप्दा पुरै जराहरूले पानीमा छुने गरी रोप्नु पर्दछ ।

८.६ रोग तथा कीराहरूको नियन्त्रण (Diseases and pests management)

पूर्व-मूल बीउ (PBS) उत्पादन, सिसाघर अथवा जालीघर भित्र गरिने भएको हुनाले रोग तथा कीराहरूको प्रकोप कमै मात्रामा हुने गर्दछ, तैपनि अवस्था हेरि पछ्यौटे डढुवा रोग (late blight), अगौटे डढुवा रोग (early blight) आदि लाग्न सक्ने हुनाले आवश्यकता अनुसार ढुसीनासक विषादीहरूको प्रयोग गर्नुपर्ने हुन्छ । त्यसैगरी धेरै प्रकारका

कीराहरू नलागे पनि सिसा अथवा जालीघर भित्र सुलसुले (Mites), सेतो पुतली (white fly), पातमा सुरुङ बनाउने भिङ्गाहरू (leaf miner flies) र अन्य पात खाने कीराहरू लाग्न सक्ने भएकोले त्यसको नोक्सानी र कीरा पहिचान गरी उपयुक्त कीटनाशक विषादिको प्रयोग गरी नियन्त्रण गर्नु पर्दछ ।

८.७ आलु निकाल्ने (Harvesting)

माटोमा भन्दा यस प्रविधिमा आलु दाना लागि छिपिन केहि थप समय लाग्ने भएतापनि विरुवामा दाना लागि बीउ साइजको भएपछि पहिलो पटक ठूल-ठूला दाना निकाल्ने (टिप्ने) र पुनः पहिलेको अवस्थामा नै छोड्ने र फेरि करिब दुई हप्ता पछि दोश्रो टिपाई गर्न सकिन्छ । यस प्रकारले एक पटक लगाएको बालीबाट २-४ पटकसम्म बीउ आलु निकाल्न सकिन्छ र अन्तमा बोट सहित पुरै दाना निकाल्नु पर्दछ (चित्र नं. १३) । यसरी आलु निकाली सकेपछि दानालाई सफा (निर्मलीकृता) पानीले राम्रोसंग पखाली ओभाउन दिने र दानाको साइजको आधारमा ग्रेडिङ्ग गर्नु पर्दछ ।



चित्र नं. १३ : खुमलटारमा हाइड्रोपोनिक प्रविधिबाट उमारिएको आलुको विरुवा र फल्दै गरेको पूर्व-मूल बीउ (PBS) आलु (जात : कुफ्री ज्योती) ।

८.८ बीउ आलुको उपचार तथा भण्डारण (Seed treatment and storage)

बीउ आलु बेन्चबाट निकाली सकेपछि भण्डारण गर्नु भन्दा पहिला आलु दानालाई ०.३% को इण्डोफील एम-४५ वा ०.२% को बेभिस्टिनको घोलमा उपचार गर्नु पर्दछ । राम्रोसंग ओभाइ (curing) सकेपछि आलुको जात र दानाको साइज अनुसार लेभलिङ्ग गरी नाइलनको जाली भोलामा राखि कोल्ड स्टोर (४०° से.) मा भण्डारण गरी राख्ने र आवश्यक पर्दा मूल बीउ उत्पादन गर्नका लागि प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ । परम्परागत तरिका (माटोमा) बाट बीउ आलु उत्पादन गर्दा प्रति बोट सरदर ५-८ दाना र यो प्रविधिमा प्रति बोट सरदर १५-२४ दाना उत्पादन भएको पाइयो भने तौलमा पनि उल्लेखनीय वृद्धि भएको अनुसन्धानले देखाएको छ । यस प्रविधिमा लागत खर्चमा केहि बढी भए पनि व्यावसायीक खेती गर्दा समग्रमा फाइदा नै हुनेगर्दछ ।

खण्ड-८

९. परम्परागत प्रविधि (Conventional method) द्वारा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन

विभिन्न प्रविधिहरू अपनाई भाईरस तथा अन्य रोगबाट मुक्त गरिएका उन्नत जातको आलुको बोटलाई तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा द्रुतगतिमा प्रसारण गरी लाही कीरा छिर्न नसक्ने सिसा वा जालीघर भित्र जीवाणु रहित बालुवा र माटो (२:१) को मिश्रणमा रोपेर उत्पादन गरिएका ससाना आलुका दानाहरूलाई पूर्व-मूल बीउ (pre-basic seed अर्थात PBS) भनिन्छ । हरेक बर्ष लगातार पुरानै बालीबाट बीउ आलु छानेर प्रयोग गरिरहँदा आलुको उत्पादनमा ठूलो ह्रास आउँछ । प्रायःजसो ह्रास आउनुको मुख्य कारण आलुमा लाग्ने भाईरसजन्य रोगहरू नै हो । तसर्थ भाईरस रोगमुक्त बीउ आलु उत्पादन गर्ने उद्देश्यले नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद् अन्तर्गत राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रमले वि.सं. २०४६ सालदेखि तन्तु प्रजनन तथा भाईरसजन्य रोग परीक्षण प्रविधिहरू अपनाई उच्चकोटीको रोगमुक्त स्वस्थ पूर्व-मूल बीउ आलु उत्पादन गर्दै आइरहेको छ । यस खण्डमा आलुको पूर्व-मूल बीउ (PBS) उत्पादन गर्नका लागि सिसा तथा जालीघर निर्माणको बारेमा र विरुवा लगाउने माटो, लगाउने तरिका, त्यहाँ अपनाउनुपर्ने कार्यहरू देखि लिएर आलु खन्ने, ग्रेडिङ गर्ने र भण्डारण गरी बिक्री वितरण गर्ने कार्य सम्मको बारेमा विस्तृत रूपमा उल्लेख गरिनेछ ।

९.१ सिसाघर/जालीघरको निर्माण र संचालन

आवश्यकता अनुसार यसको साइज ठूलो सानो हुन सक्दछ । सिसा अथवा जालीघर बनाउँदा आकाशबाट परेको पानीबाट बचाउनका लागि सिसा राखेर छाउनु उपयुक्त हुन्छ । सिसा मुनी र साइड

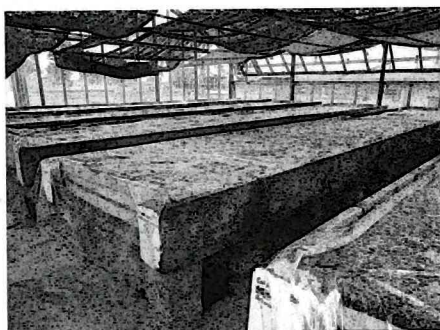
साइडमा लाही कीरा छिर्न नसक्ने नाइलनको जाली राखि बनाउनु पर्दछ । घर बनाउँदा प्रवेश द्वारामा करिब ८०-१०० बर्ग फिट जतिको एउटा बफर कोठा (buffer room) बनाउनु पर्दछ । यस कोठामा पस्नका लागि बाहिर एउटा ढोका र यसै कोठा भएर भित्र पस्नको लागि अर्को दोश्रो ढोकाको व्यवस्था हुनुपर्दछ । गर्मी मौसममा सिसा/जालीघर भित्र चिसो हावा आदानप्रदानका लागि घरको बलेसीको उचाइ ९-१० फिटको हुनुपर्दछ । यस कोठाबाट भित्र पसेपछि सिधा हिँड्ने बाटो (foot path) र त्यसको दायाँ वा बायाँ तर्फ विरुवा रोप्नको लागि बेन्च बनाउनु पर्दछ । यस्ता बेन्चको संख्या आफ्नो आवश्यकता अनुसार १५ देखि बढीमा २० वटा सम्म बनाउनु उपयुक्त हुनेछ ।

यसमा राख्ने जाली पूर्णरूपले कीरा विशेष गरी लाही कीरा छिर्न नसक्ने खालको हुनुपर्दछ भने एकवर्ष लगाएपछि कम्तीमा पनि ५-७ वर्ष टिक्नसक्ने हुनु पर्दछ । जाली बढी बाक्लो भएमा पनि हावाको आदान प्रदानमा रोकवट हुन गै गर्मी मौसममा भित्री तापक्रम अनावश्यक रूपले बढ्न गै उत्पादनमा प्रतिकूल असर पर्नेछ । यस घर भित्र पानी आपूर्तिको स्थाइ रूपले व्यवस्था गरेको हुनुपर्दछ भने पानी UV प्रविधिबाट निर्मलीकरण गर्ने व्यवस्था मिलाउनु पर्दछ । सिंचाइमा प्रयोगहुँदा पानी फोहराको रूपमा आपूर्ति होस भन्नका लागि १/२ HP को मोटरबाट पठाउने व्यवस्था मिलाएको हुनुपर्दछ । त्यसैगरी घरभित्र नियमित विद्युत आपूर्ति हुन जरूरी छ । गरम मौसममा भित्रको तापक्रम आवश्यकता अनुसार कम गर्न सिसा/जालीघरको चौडाइको एकतर्फ air color र अर्को तर्फ तातो हावा बाहिर फाल्ने पंखा (exhaust fan) को व्यवस्था हुनुपर्दछ भने जाडो मौसममा (पौष, माघ)

तापक्रम बढाउनका लागि ठाउँ ठाउँमा हिटरको व्यवस्था हुनुपनि उत्तिकै जरूरी हुन जानेछ ।

१.२ विरुवा रोप्ने बेन्चको निर्माण

घरभित्र कामगर्न छिटो छरितो र बाहिरी रोग कीराहरूको प्रकोप कम गर्नका लागि पनि विरुवा रोप्ने सिमेन्ट बेन्च बनाउनु उपयुक्त हुनेछ (चित्र नं. १४) ।



चित्र नं. १४: विरुवा रोप्ने बेन्च

बेन्चको उचाई करिब ३० से.मी., चौडाइ १.५ मिटर र लम्बाई आवश्यकता अनुसार

८-१० मिटर र विरुवा रोप्ने बालुवा राख्नको लागि बेन्चमा ३० से.मी. गहिरो डुढ बनाउनु पर्दछ । बेन्चमा सिंचाई गर्दा बढी भएको पानी तल जानको लागि बेन्चको पिधमा बालुवा/माटो नछिर्ने गरी प्वाल हुनु पर्दछ । बिचमा हिँडनको लागि दुईवटा बेन्चको विचमा करिब ५० से.मी. चौडा खाली भागको (बाटो) व्यवस्था भएको हुनुपर्दछ ।

१.३ माटोको मिश्रण

माटोको मिश्रण तयार गर्ने सन्दर्भमा यस प्रविधिको स्थापनाकाल देखि उपयुक्त मिश्रणको लागि धेरै अध्ययन अनुसन्धानहरू भए तिनीहरूमा माटो र बालुवाको विभिन्न भाग त्यसैगरी माटो, बालुवा र कम्पोष्टको विभिन्न भागहरू समावेश गरिएका थिए । ति विभिन्न मिश्रणहरू मध्य बालुवा दुई भाग र माटो एक भागले राम्रो नतिजा देखाएकोले हालसम्म पनि सोहि परिमाणको मिश्रण बनाई सिसा तथा जालीघर दुवैमा प्रयोग गर्ने गरिएको छ । यदि बालुवा अथवा माटो खस्रो अथवा

अन्य चिजहरूको मिसावट भएमा घर निर्माणमा प्रयोग गरिने खस्रो बालुवा चाल्ने फलामे जालीको प्रयोग गरि चाल्ने र बेन्च बाहिर नै २:१ को परिमाणमा बालुवा र माटो राम्रोसंग मिसाई बेन्चमा भर्नुपर्दछ ।

सिसा/जालीघरमा प्रयोग गर्नका लागि सकेसम्म उपलब्ध मध्य कम रोग कीरा तथा झारको बीउ नभएको र माटोको बनौटमा पनि आलुबालीलाई उपयुक्त हुने बलौटे दोमट माटोको छनौट गर्नु उत्तम हुनेछ । यदि तयारी अवस्थामा बलौटे दोमट माटो नपाइएमा बेग्लबेग्लै प्रकारले माटो र बालुवा मिसाई उपयुक्त मिश्रण बनाउनु पर्दछ । यसको लागि धेरै वर्ष सम्म खेती नगरेको स्थानबाट कम्तीमा पनि ४-५ फिट तलको माटो लिनु उपयुक्त हुन्छ र यसमा बालुवाको परिमाण कम भएमा बालुवा लिनका लागि पनि सोहि अनुसारको धेरैवर्ष सम्म खेती नगरेको बालुवाको खानीबाट मसिनो बालुवा लिनुपर्दछ । यसको लागि खोलाको बालुवा उपयुक्त हुँदैन ।

९.४ माटोको उपचार

सिसा अथवा जालीघरमा प्रयोग हुने माटो उपचार गर्न अति आवश्यक पर्दछ । बाहिरबाट ल्याइएको माटोमा विभिन्न प्रकारका रोगका जीवाणु, कीरा तथा झारका बीउहरू हुनसक्दछन् जसले गर्दा उद्देश्य अनुरूपको रोगमुक्त बीउ उत्पादन गर्न बाधा पुऱ्याउँछन् । उक्त समस्या हल गर्नका लागि प्रयोग गरिने माटोको उपचार सहि रसायनको सहि तरिकाले प्रयोग गर्नु अति आवश्यक पर्दछ । माटोको उपचार धेरै तरिकाहरू अपनाई गर्न सकिन्छ जस्तै steam sterilization, heat sterilization, solar sterilization, chemical sterilization आदि ।

राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम, खुमलटारमा यस प्रविधिको स्थापनाका शुरूका दिनहरूमा उपयुक्त रसायनको अभावमा heat

sterilization को प्रयोग गरिएको थियो जुन चर्को विद्युत् महशुलका कारणले बढी खर्चिलो, कम प्रभावकारी र समय लाग्ने आदि कारणहरूले गर्दा सो प्रविधि छाडि उपयुक्त रसायनको खोजिको क्रममा अस्ट्रेलिया स्थित एक कम्पनिबाट मिथाम सोडियम (metham sodium) भन्ने रसायन प्रयोग गरिएकोमा सो को प्रभाव पनि सन्तोषजनक रहयो । पछि त्यसको विकल्पको रूपमा स्थानिय बजारमा उपलब्ध फर्मालिन प्रयोगमा ल्याउने गरिएको छ । उपचार बढी प्रभावकारी होस भन्नका लागि उपचार गर्नुभन्दा पहिला बेन्चमा रहेको माटो राम्रोसंग सम्याउने र UV द्वारा उपचार गरिएको पानीले राम्रोसंग भिजाउनु पर्दछ । पानी दिएको २-३ दिन अर्थात् धेरै गिलो पनि नरहेको धेरै सुक्का पनि नभएको अवस्थामा च्याकको सहायताले माटोको माथिल्लो सतहलाई मसिना चिरा चिरा पर्ने गरी कोर्ने र त्यसमा उपचार गर्नका लागि फर्मालिनको भोल हाल्ने । फर्मालिनको १% को भोल बनाउँदा एक लिटर पानीमा १० एम् एल फर्मालिन मिसाउनु पर्नेछ । यसरी मिसाइ बनाएको १० लिटर भोलले बेन्चको १ वर्गमिटर क्षेत्रफलमा अर्थात् बेन्चको डिलमा हरेक मिटरमा चिन्ह लगाउने र एक मिटरमा १० लीटर भोल झारिको सहायताले सबैतिर एकनासले पर्ने गरी खन्याउनु पर्दछ । सोही तरिकाले हरेक बेन्च उपचार गरेपछि तुरुन्तै प्लाष्टिक सिटले बेन्चलाई कम्तीमा एक हप्ता सम्म छोप्नुपर्दछ । यसरी छोप्नाले फर्मालिनको ग्याँस उडेर जान पाउँदैन र माटोमा भएका रोग, कीरा तथा अन्य जीवाणु आदिलाई नष्ट गर्न बढी प्रभावकारी हुनेछ । उपचार गरेको एक हप्ता पछि ग्याँस उडाउनको लागि प्लाष्टिक झिक्ने र सावेलको सहायताले माटो पल्टाउनु पर्दछ । यसरी हरेक २ दिनको अन्तरालमा कम्तीमा पनि तीनपटक तलको माटो माथि, माथिको तल पर्ने गरी पल्टाउनु पर्दछ ।

यसरी माटो पल्टाउँदा माटो पल्टाउने व्यक्तिले बुट, ग्लोब तथा मास्क आदि प्रयोग गरी होसियारी साथ गर्नुपर्दछ ।

९.५ बेडको तयारी तथा मलखाद

माटो पल्टाउने काम सम्पन्न गरिसकेपछि सामान्य सम्याउने र त्यसमा फर्मालिनको ग्याँस समाप्त भए नभएको हेर्न हरेक बेन्चको बिच भागतिर एउटा एउटा परीक्षण विरुवा (test plant) लगाई २-३ दिन सम्म मरे नमरेको अवलोकन गर्नुपर्दछ । यदि विरुवा नमरेको खण्डमा माटो राम्रोसंग सम्याउने र अन्य कार्यहरू अगाडी बढाउने यदि विरुवा फर्मालिन ग्याँसको कारणले गर्दा मरेको हो भन्ने लागेमा माटोलाई पुनः एक दुई पटक पल्टाउने गर्नुपर्दछ ।

अन्तिम पटकको सम्याइपछि त्यसमा आवश्यक पर्ने खाद्यतत्वको रूपमा २००:२००:१२० एन.पि.के. केजी/हेक्टरका दरले माटोमा मिसाउनु पर्दछ (NPRP, 2008) । यसको लागि बेसल डोज (basal dose) मा डि.ए.पी ४५.४ ग्राम/वर्ग मिटर, १३.२ ग्राम/वर्ग मिटर यूरिया र म्युरेट अप पोटास २०.९ ग्राम/वर्ग मिटर दरले माटोमा एकनासले पर्ने गरी छर्ने माटोमा मिसाइ माटो राम्रो संग सम्याउनु पर्दछ र यूरिया १३.२ ग्राम/वर्गमिटर का दरले प्रथम पटक रोपेको ३०-४० दिनपछि र दोश्रो पटक उतिनै परिमाणमा ५०-६० दिनपछि टपड्रेसको (topdress) रूपमा प्रयोग गर्नुपर्दछ ।

९.६ विरुवा रोप्ने

बेन्चको चौडाइको दुवै तर्फ चिन्ह लगाउने काठ (Board Marker) को सहायताले २०/२० से.मी. को फरकमा चिन्ह लगाउने र बेन्चको शुरूमा १० से.मी. र बाँकीमा २० से.मी.को फरकमा ५-६ से.मी. अग्लो सिधा हुनेगरी डयाड उठाउनु पर्दछ । अब डयाड उठाउँदा बनेको

कुलेसो (furrow) मा विरुवा रोप्ने भएकाले त्यस भागमा चिन्ह लगाउन अर्को board marker को सहायताले १० से.मी. को फरकमा ३-४ से.मी. गहिरो र २-३ से.मी. फराकिलो प्वाल पार्नु पर्दछ । यसरी

प्वाल पारिसकेपछि त्यसैदिन माटो नसुकदै बोटल वा टेष्टट्यूबबाट जतनका साथ विरुवा निकाली त्यसको जरामा भएको अगर सफा पानीले हल्का संग पखाली प्वालमा



राख्दै बालुवाले जरालाई पुरी हल्का संग थिच्नुपर्दछ (चित्र नं. १५) ।

चित्र नं. १५: बेन्चमा *in vitro* विरुवा रोप्दै ।

तालिका २. हिउँदे सिजन (तराई) र बर्षे सिजन (पहाड) को लागि उपलब्ध हुनसक्ने पूर्व-मूल बीउ आलुका जातहरूको विवरण

हिउँदे सिजन को लागि उपलब्ध आलुका जातहरू	आलुको बोक्राको रंग	बर्षे सिजन को लागि उपलब्ध आलुका जातहरू	आलुको बोक्राको रंग
कुफ्रि ज्योती	सेतो	कुफ्रि ज्योती	सेतो
कुफ्रि सिन्धुरी	रातो	डेजिरे	रातो
डेजिरे	रातो	जनकदेव	रातो
जनकदेव	रातो	खुमल सेतो - १	सेतो
खुमल रातो - २	रातो	कार्डिनल	रातो
खुमल सेतो - १	सेतो	खुमल लक्ष्मी	रातो
कार्डिनल	रातो	खुमल उज्वल	सेतो
खुमल लक्ष्मी	रातो	खुमल उपहारा	सेतो
आइ पी वाई - ८	रातो		
खुमल उपहारा	सेतो		

विरुवालाई सिसा वा जालीघरमा सार्नु पहिला करिब तीन महिना अगाडी देखिनै प्रयोगशालामा माउ विरुवा छुट्याईन्छ र ६ प्रकारका भाइरसहरू (PLRV, PVA, PVM, PVS, PVX & PVY) मुक्त भएको खण्डमा मात्र सिंगल नोडल कटिड प्रविधिद्वारा द्रुतगतिमा प्रसारण गरिन्छ । यसरी आलुमा लाग्ने सबै प्रकारका भाइरस तथा अन्य रोगहरू मुक्त भएको प्रमाणित भएपछि मात्रै पूर्व-मूल बीउ आलु उत्पादनगर्न प्रयोग गरिन्छ (चित्र नं. १६) ।



चित्र नं. १६ : प्रयोगशाला भित्र तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा प्रसारण गरिएका रोगमुक्त विरुवाहरू र सिसाघरमा लगाइएका करिब २ महिना उमेर पुगेका स्वस्थ विरुवाहरू ।

९.७ पूर्व मूल बीउ आलुको भण्डारण तथा वितरण

अन्य प्रमुख वालीहरूको तुलनामा आलुको भण्डारण तथा ओसारपसारले निकै महत्वपूर्ण स्थान ओगटेको हुन्छ भने त्यसमा पनि पूर्व-मूल बीउ आलु निकै साना हुने भएकोले अझै बढी महत्वपूर्ण हुन जान्छ (चित्र नं. १७) । साधारणतया जेष्ठ/आषाढमा उत्पादन गरेको पूर्व-मूल बीउ आलु



चित्र नं. १७. तन्तु प्रजनन प्रविधिद्वारा उत्पादित पूर्व-मूल बीउ (प्रि-बेसिक) आलु दानाहरू

मंसिर/पौष सम्म शित भण्डारमा भण्डारण गरी पहाड तथा उच्च पहाडको लागि वितरण गरिन्छ भने मंसिर/पौषमा उत्पादन गरिएको पूर्व-मूल बीउ आलुलाई आश्विन/कार्तिकसम्म शित भण्डारमा भण्डारण गरी तराई वा उष्ण प्रदेशमा रोप्नको लागि वितरण गरिन्छ । शित भण्डारणमा भण्डार गर्ने उपयुक्त तापक्रम ४ डिग्री सेल्सियस हो । भण्डारणबाट भिकेपछि रोप्नु भन्दा

पहिला आंशिक उज्यालोमा राखि राम्रो संग टुसाउन दिनुपर्दछ । खासगरी पूर्व-मूल बीउ आलु बीउ उत्पादन गर्न प्रशिक्षण पाइसकेका बीउ आलु उत्पादक कृषक समूहहरूलाई प्राविधिकको रेखदेखमा मूल बीउ आलु (वेसिक सिड) उत्पादन गर्नको लागि वितरण गरिन्छ । केहि पूर्व-मूल बीउ आलु नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद र कृषि विभाग अन्तर्गतका फार्म तथा केन्द्रहरूलाई स्वस्थ मूल बीउ उत्पादनका लागि वितरण गरिन्छ । खेतबारीमा निश्चित दुरी निर्धारण गरी बीउ उत्पादन गर्ने आवश्यक प्रविधि अपनाउनुका साथै समय समयमा सुपरीवेक्षण गरिएको खण्डमा यी पूर्व-मूल बीउ आलुबाट उच्च पहाडी क्षेत्रमा ६-८ वर्ष सम्म तथा पहाडी र तराई क्षेत्रमा क्रमश ५-६ र ४-५ वर्ष सम्म गुणस्तरयुक्त स्वस्थ बीउ आलु उत्पादन गर्न सकिन्छ ।

१०. पूर्व-मूल बीउ (PBS) आलु उत्पादनका लागि अपनाउनु पर्ने मासिक कार्यतालिका

आलुको पूर्व-मूल बीउ अर्थात् PBS उत्पादन निकै खर्चिलो हुनुका साथै विशेष प्राविधिक रेखदेख र नियन्त्रित वातावरणमा गर्नुपर्ने हुन्छ । काठमाण्डौ उपत्यकाको आवहवामा पूर्व-मूल बीउ आलुको उत्पादन वर्षको दुई पटक गर्न सकिन्छ । पहिलो बाली अथवा बर्षे बालीको लागि सिसा वा जालीघरमा पुष/माघ महिनामा विरुवा सारिन्छ र बैशाख/जेष्ठ महिनामा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन गरिन्छ र यसलाई मुख्य बाली पनि भनिन्छ । दोस्रो बाली अथवा हिउँदे बालीका लागि श्रावण/भाद्र महिनामा विरुवा सारिन्छ र मंसिर/पुषमा उत्पादन गरिन्छ । साधारणतया बैशाख-जेष्ठमा उत्पादन गरेको पूर्व-मूल बीउ आलु पुष/माघ सम्म शित भण्डारमा भण्डारण गरी पहाड तथा उच्च पहाडको लागि वितरण गरिन्छ भने मंसिर/पुषमा उत्पादन गरिएको पूर्व-मूल बीउ आलुलाई आश्विन/कार्तिकसम्म शित भण्डारमा भण्डारण गरी तराई वा उष्ण प्रदेशमा रोप्नको लागि वितरण गरिन्छ । भण्डारणबाट भिकेपछि रोप्नु भन्दा पहिला आंशिक उज्यालोमा राखि राम्रो संग टुसाउन दिनुपर्दछ । खासगरी पूर्व-मूल बीउ आलु बीउ उत्पादन गर्न प्रशिक्षण प्राप्त बीउ आलु उत्पादक कृषक समूहहरूलाई प्राविधिकको रेखदेखमा मूल बीउ आलु (बेसिक सिड) उत्पादन गर्नको लागि वितरण गरिन्छ ।

काठमाडौं वा सो सरह हावापानी भएको मध्य-पहाडी क्षेत्रमा सिसाघर वा जालीघरमा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन गर्दा सम्पन्न गर्नु पर्ने कार्यहरूको मासिक कार्यतालिका तल प्रस्तुत गरिएको छ ।

मौसममा देखा परेको परिवर्तनका कारणले सिसाघर वा जालीघरमा विरुवा रोप्ने कार्यतालिकामा केहि फेर बदल हुन सक्ने भएकोले प्रयोगशाला भित्रको काममा पनि सोहि अनुसार फेर बदल हुन सक्नेछ ।

महिना	हप्ता	स्थान	कार्य विवरण
श्रावण	पहिलो	प्रयोगशाला	प्रसारण जारी राख्ने, incubation room बाट संक्रमण (contamination) भएका बोटल तथा टेष्ट-ट्यूबहरू हटाउने र जलेका चोक तथा ट्यूबलाइटहरू फेर्ने कार्य गर्ने । कोठा भित्रको आद्रता (humidity) ७०% भन्दा तल रहने ब्यवस्था मिलाउने । आद्रता बढी भएमा संक्रमण (contamination) बढी हुने संभावना रहन्छ ।
		सिसाघर/ जालीघर	माटो उपचार पछि सबै ढोकाहरू बन्द गरी राख्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	विरुवाको अवस्था अनुसार प्रकाश र तापक्रम ठीक भए नभएको जानकारी लिने र आवश्यक परेको खण्डमा विरुवाको बोटलहरू स्थानान्तर गर्ने । विरुवाको राम्रो वृद्धिको लागि २००० लक्स प्रकाश र $25 \pm 2^{\circ}$ से. तापक्रम उपयुक्त हुनेछ ।
		सिसाघर/ जालीघर	माटो उपचार गरेको ७ दिन पछि प्लाष्टिक निकालि फर्माकिन ग्याँस हटाउनको लागि सावेलको सहायताले माटो पल्टाउने । पुनः दुइ दिन बिराई कम्तीमा दुई पटकसम्म तलको माटो माथि र माथिको तलपर्ने गरी पल्टाउने र ग्याँस पुरै उडेपछि मात्र माटो सम्प्याउने ।
तेस्रो	प्रयोगशाला	Incubation room मा प्रकाश र तापक्रम ठीक भए नभएको जानकारी लिने र आवश्यक परेको खण्डमा विरुवाको	

		बोटलहरू स्थानान्तर गर्ने । संक्रमण (contamination) बढेको खण्डमा प्रयोगशाला कोठाहरू फर्मािलिनले फ्यूमिगेशन गर्नु पर्दछ ।
	सिसाघर/ जालीघर	हरेक बेन्चको विच विचमा परीक्षणको रूपमा एउटा विरुवा (test plant) रोपेर ग्याँसको असर हेर्ने । विरुवा नमरेको खण्डमा २००:२००:१२० एन.पि.के. केजी/हे. का दरले (४५.४ ग्राम डिएपी, १३.२ ग्राम युरिया र २०.९ ग्राम म्युरेट-अप-पोटास प्रति वर्ग मिटर) मिसाइ बेन्चको माटोमा एकनासले छन् । चिन्ह लगाउने बोर्ड (board marker) को सहायताले २० से.मी. को फरकमा डयाड बनाउन शुरू गर्ने । यदि विरुवा (test plant) मरेको खण्डमा माथि उल्लेख गरे बमोजिम पुनः १,२ पटक माटो पल्टाउने ।
चौथो	प्रयोगशाला	विरुवाको अवस्था हेर्ने र जात र प्रसारण मिति अनुसार क्रमशः राख्ने र सप्तान्तमा विरुवा छिप्याउन (hardening) का लागि बोटलहरू incubation room बाट अर्को बाहिरी कोठामा सार्ने ।
	सिसाघर/ जालीघर	विरुवाहरू सिसाघरमा लैजाने, चिन्ह लगाउने बोर्ड (board marker) को सहायताले कुलेसोमा १०/१० से.मी. को फरकमा १.५-२ इन्च गहिरो खोपिल्टा बनाउने र विरुवा रोप्दै जाने । विरुवा रोपिसकेपछि पानी दिने र त्यसै दिन ०.१% बेभिस्टिन (bavistin) (१ ग्राम/लिट्र पानी) को घोल बनाइ विरुवा र माटोमा पर्ने गरी छन् र बेन्चमा सेतो प्लाष्टिकको टनेला बनाइ छोप्ने । हरेक दिन UV लाइटले उपचार गरेको पानी दिने ।

भाद्र	पहिलो	प्रयोगशाला	छिप्याउन (hardening) को लागि विरुवाहरू incubation room बाट अर्को बाहिरी कोठामा सार्ने ।
	सिसाघर/ जालीघर		विरुवाहरू सिसाघरमा लैजाने, डयाड बनाउने, विरुवा रोप्ने काम गर्दै जाने र अघिल्लो दिन रोपेको विरुवा छोपेको प्लाष्टिक फ्रिकी UV लाइटले उपचार गरेको पानी हाल्ने, ढलेको विरुवा उठाउने आदि ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	रोप्न बाँकी रहेका विरुवाहरू सबै छिप्याउन (hardening) को लागि बाहिरी कोठामा पठाउने, इन्कुवसन कोठा (incubation room) सफा गर्ने र माउ विरुवा (mother plant) जात अनुसार मिलाइ राख्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	ढलेका विरुवाहरू उठाउने, पानी दिने र मरेका स्थानमा नयाँ विरुवा रोप्ने । PBS को माग संकलन गर्ने ।
	तेस्रो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने र आवश्यकता अनुसार माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	ढलेका विरुवाहरू उठाउने, पानी दिने, विरुवा मर्न थालेको खण्डमा पुनः ०.१% वेभिष्टिनको घोल बनाइ छर्ने, मरेको स्थानमा नयाँ विरुवाहरू रोप्ने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने । माउ विरुवाहरूको भाइरस परीक्षण गर्ने र भाइरस मुक्त विरुवाहरूको प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	आवश्यकता अनुसार पानी दिने, ढलेका विरुवा उठाउने, ढिलको माटो विरुवा भएको कुलेसोमा झारेर उकेरा लगाउने ।
आश्विन	पहिलो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने । माउ विरुवाहरूको भाइरस परीक्षण गर्ने र भाइरस मुक्त विरुवाहरूको प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	ढलेका विरुवाहरूमा उकेरा लगाउने, सिंचाई

		जालीघर	गर्ने । PBS कोल्ड स्टोरबाट फ्रिजी माग अनुसार वितरण शुरू गर्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	आवश्यकता अनुसार माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	बाँकी रहेको १/२ नाइट्रोजन मल (१३.२ ग्राम यूरीया प्रति बर्ग मिटर) टपड्रेस गर्ने, पानी दिने र आवश्यक परेको खण्डमा दुसिनाशक तथा कीटनाशक विषादी प्रयोग गर्ने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	माउ विरुवा (mother stock) को पातको नमूना लिने र DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरसहरू (PLRV, PVA, PVM, PVS, PVX, PVY) परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा पानी दिने, उकेरा लगाउने र भाइरस परीक्षणको लागि पातको नमूना लिने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	प्राप्त नमूनाहरूको DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा उकेरा लगाउने र पानी दिने ।
कार्तिक	पहिलो	प्रयोगशाला	प्राप्त नमूनाहरूको DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा पानी दिने र भाइरस परीक्षणको लागि पातको नमूना लिने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	जलेका चोक तथा ट्यूबलाइटहरू फेर्ने, A/C ममर्त गर्ने आदि । प्राप्त नमूनाहरूको DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा पानी दिने र भाइरस परीक्षणको लागि पातको नमूना लिने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	Incubation room बाट संक्रमण

			(contamination) भएका बोटलहरू हटाउने र जलेका चोक तथा ट्यूबलाइटहरू फेर्ने, A/C मर्मत गर्ने आदि । Mother stock विरुवाहरूको रेखदेख गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा पानी दिने र भाइरस परीक्षणको लागि पातको नमूना लिने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने, मिडिया बनाउने सिसाघरमा लगाउनका लागि बोटलमा ढिलो बढ्ने कुफ्रि ज्योती, कार्डिनल, खुमल सेतो-१ जस्ता जातहरूका विरुवाहरूको प्रसारण शुरू गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	अघौटे जात (डेजीरे) को बोट उखेल (haulm pulling) शुरू गर्ने ।
मंसिर	पहिलो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने, मिडिया बनाउने, विरुवा प्रसारण गर्ने र विरुवाहरूको रेखदेख गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	डेजिरेको PBS खन्ने र कार्डिनल, कुफ्रि ज्योतीको बोट उखेले कार्य गर्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने, मिडिया बनाउने, विरुवा प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	PBS खन्ने, माटोमा छुटेका PBS दानाहरू टिप्ने र जात अनुसारका पोकाहरूमा राख्ने ।
	तेस्रो	प्रयोगशाला	संक्रमण (contamination) भएका बोटलहरू हटाउने र प्रसारण जािर राख्ने ।
सिसाघर/ जालीघर		PBS खन्ने, ग्रेडिड (>५ ग्राम, >१-५ ग्राम, ०.५-१ ग्राम, <०.५-०.२५ ग्राम र <०.२५ ग्राम प्रति दाना) गर्ने, लेभलिड गर्ने र जात र साइज अनुसार छुट्टयाउदै जाली भोलामा स-सना पोका बनाउने र पुनः त्यसलाई ठूलो जुट बोरामा राखी कोल्ड स्टोरमा पठाउने । लेभलिड गर्दा आलुको जात, खनेको मिति, दाना को साइज र दाना संख्या आदि उल्लेख	

			गर्नु पर्दछ । जाली फेर्ने लगायत अन्य मर्मतका कामहरू तय गर्ने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	विरुवाको अवस्था निरीक्षण गर्ने, सबै विरुवाहरूमा प्रकाश नपरेको भए प्रकाश भएको तिर सार्ने आदि ।
		सिसाघर/ जालीघर	बेन्चको माटो सम्याउने, सफागर्ने, माटो फेर्नुपर्नेभए फेर्ने, सरसफाई गर्ने र माटोमा पानी हालेर (drenching) उपचारको लागि तयार पार्ने ।
पौष	पहिलो	प्रयोगशाला	जर्मप्लाज्म संरक्षण गर्नका लागि बुढो विरुवाहरू कटिङ्ग लिई नयाँ MS मिडियामा सार्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	अघिल्लो सिजनमा उल्लेख गरेको तरिका जस्तै गरी २% को फर्मालिनको घोलले माटो उपचार गर्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	हार्डिनिङ्कका लागि विरुवाहरू निकालेर बाहिरी कोठामा राख्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	माटो पल्टाउने । श्रावणको तेश्रो हप्तामा उल्लेख गरे जस्तै गरी २००:२००:१२० एन.पि.के. केजी/हे. का दरले प्रयोग गरी २० से.मी. को फरकमा डयाड बनाउन शुरू गर्ने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	विरुवाहरू सिसाघर/जालीघरमा पठाउने, incubation room सफागर्ने र जर्मप्लाज्म एकतर्फ राखेर प्रकाश (लाइट) मिलाउने आदि ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवाहरू सिसाघरमा लैजाने र विरुवा रोप्न शुरू गर्ने, पानी दिने, ०.१% को बेभिस्टिनको घोल बनाई विरुवा र माटोमा समेत पर्ने गरी छर्ने, प्लाष्टिक टनेला बनाई विरुवा छोप्ने आदि ।

	चौथो	प्रयोगशाला	प्रयोगशाला अन्तर्गतका सबै कोठाहरू (मिडिया बनाउने कोठा, सब कल्चर गर्ने कोठा, इन्कुबेसन कोठा) सफा गर्ने । माउ विरुवाहरू र जर्मप्लाज्मका लागि राखिएका विरुवाहरूको रेखदेख र आवश्यक परेको खण्डमा प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	बेन्चमा विरुवा छोपन राखिएको प्लाष्टिक निकाल्ने, पानी दिने, ढलेका विरुवाहरू उठाउने र विरुवा मर्न थालेको छ भने ०.१५% देखि ०.२% वेभिस्टिनको घोल बनाई छर्ने ।
माघ	पहिलो	प्रयोगशाला	नयाँ आलुका जातहरूको भाइरस निर्मूल गर्नुपर्ने भए त्यसको मेरिस्टिम टिप कल्चर (meristem tip culture) गर्ने, प्रमुख जातहरूको माउ विरुवाहरू र जर्मप्लाज्महरूको प्रसारण गर्ने काम जारी राख्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	ढलेका विरुवाहरू उठाउने, पानी दिने, उकेरा लगाउने काम जारी राख्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	माउ विरुवाहरूको DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	ढलेका विरुवाहरू उठाउने, पानी दिने, उकेरा लगाउने आवश्यक परेमा ढुसीनाशक तथा कीटनाशक विषादि छर्ने ।
	तेस्रो	प्रयोगशाला	माउ विरुवाहरूको DAS-ELISA प्रविधिद्वारा ६ प्रकारका भाइरस परीक्षण गर्ने, सब कल्चर गर्ने, ।
		सिसाघर/ जालीघर	विरुवामा पानी दिने, उकेरा लगाउने, मेन्कोजेब अथवा मेटालेक्जिल युक्त ढुसिनाशक विषादीहरू छर्ने, विरुवाको अवस्था हेरी करिब १३.२ ग्राम यूरीया प्रति वर्ग मिटरका दरले टपड्रेसिङ गर्ने ।

	चौथो	प्रयोगशाला	माउ विरुवाहरूको प्रथम पटकको प्रसारण सुरू गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	पानी दिने, उकेरा लगाउने, ढुसिनाशक विषादीहरू छर्ने ।
फाल्गुण	पहिलो	प्रयोगशाला	माउ विरुवाहरू प्रसारण शुरू गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	पानी दिने, उकेरा लगाउने, ढुसिनाशक विषादीहरू छर्ने, आवश्यक परे दोश्रो पटकको टपड्रेसिङ गर्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	Incubation room मा प्रकाश, तापक्रम, आद्रता आदिको निरीक्षण गरी आवश्यक व्यवस्था मिलाउने ।
		सिसाघर/ जालीघर	पानी दिने, उकेरा लगाउने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	माउ विरुवाहरूको प्रसारण गर्ने, कोठाहरू सफा गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	पानी दिने, दिउँसोको तापक्रम २५° से. भन्दा बढी हुन गएमा सिसाघर तथा जालीघर भित्र तापक्रम घटाउन पानीको फोहरा दिने, उकेरा लगाउने । बोटको बढी बृद्धि भएमा र स्टोलन बाहिर निस्कन थालेमा बोटको वृद्धि कमगर्न विरुवामा Chlorocholine chloride (CCC) (100-200 ppm) स्प्रे गर्नुपर्दछ ।
	चौथो	प्रयोगशाला	विरुवाहरूको प्रसारण जारी राख्ने, भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	पानी दिने, दिउँसोको तापक्रम २५° से. भन्दा बढी हुन गएमा तापक्रम घटाउन पानीको फोहरा दिने, उकेरा लगाउने र भाइरस परीक्षणको लागि नमूना संकलन गरी प्रयोगशालामा पठाउने ।
चैत्र	पहिलो	प्रयोगशाला	प्राप्त नमूनाहरूको भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	बढ्दो तापक्रम कमगर्न पानीको फोहरा

		जालीघर	प्रयोग गरी शितल बनाउन प्रयास गर्ने र विरुवामा पानी दिने काम जारी राख्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	प्राप्त नमूनाहरूको भाइरस परीक्षण गर्ने, विरुवाहरूको प्रसारण जारी राख्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	बढ्दो तापक्रम कमगर्न पानीको फोहरा प्रयोग गरी शितल बनाउन प्रयास गर्ने र विरुवामा पानी दिने काम जारी राख्ने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	प्राप्त नमूनाहरूको भाइरस परीक्षण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	अघाँटे जातमा पानी दिन बन्द गर्ने, बेन्च बाहिर पानीको फोहरा प्रयोग गरी तापक्रम कमगर्ने प्रयास जारी राख्ने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	माउ विरुवा र जर्मप्लाज्म विरुवाहरूको रेखदेख गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	अघाँटे आलुका जात (डेजिरे) को बोट उखेल्ने (haulm pulling) र अन्य जातहरूको अवस्था हेरि पानी दिन बन्द गर्ने ।
बैशाख	पहिलो	प्रयोगशाला	माउ विरुवा र जर्मप्लाज्म विरुवाहरूको रेखदेख गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	अघाँटे आलुका जातहरूको PBS खन्न शुरू गर्ने र मध्यम तयार हुने जातहरू (कार्डिनल, कुफ्रि ज्योती) मा पानी दिन बन्द गर्ने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	कोठाहरूको सरसफाई गर्ने, जलेका चोक र ट्यूब लाइटहरू फेर्ने काम गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	मध्यम तयार हुने जातहरूको बोट उखेल्ने कार्य गर्ने ।
	तेश्रो	प्रयोगशाला	कोठाहरूको सरसफाई गर्ने, जलेका चोक र ट्यूब लाइटहरू फेर्ने काम गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	मध्य तयार हुने जातहरूको PBS खन्न सुरु गर्ने र अन्य ढिलो तयार हुने जातहरूमा पानी दिन बन्द गर्ने । पछाँटे जातहरूको बोट उखेल्ने (haulm pulling) कार्य गर्ने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने ।

		सिसाघर/ जालीघर	पछ्छैटे जातहरूको PBS खन्ने कार्य गर्ने । PBS को ग्रेडिङ गर्ने (>५ ग्राम, >१-५ ग्राम, ०.५-१ ग्राम, <०.५-०.२५ ग्राम र <०.२५ ग्राम प्रति दाना), लेभलिङ गर्ने र जाली भोलामा राखी अस्थाइ भण्डारण गर्ने ।
जेष्ठ	पहिलो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने । माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	लेभलिङ गर्ने र संख्या गन्ति गरी जुट बोरामा राखी कोल्ड स्टोरमा पठाउने ।
	दोश्रो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउनु पूर्व तयारी गर्ने क्रममा टेस्ट ट्यूब तथा बोटलहरू सफा गर्ने, मिडिया बनाउन शुरू गर्ने । जलेका चोक तथा ट्यूबलाइटहरू फेर्ने, A/C ममर्त गर्ने आदि ।
		सिसाघर/ जालीघर	माटो केलाउने र छुटेका PBS छन् भने हटाउने ।
	तेस्रो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने र माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने । जलेका चोक तथा ट्यूबलाइटहरू फेर्ने, A/C ममर्त गर्ने आदि ।
		सिसाघर/ जालीघर	माटो केलाउने र छुटेका PBS को खोजी गरी हटाउने ।
	चौथो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने र माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	सिसा/जालीघरका बेन्चहरूको माटो फेर्नु पर्ने भए फेर्ने, माटो केलाउने, सरसफाई गर्ने ।
आषाढ	पहिलो	प्रयोगशाला	MS मिडियाको stock solution बनाउने, MS मिडिया बनाउनु पूर्व तयारि गर्नेक्रममा बोटल तथा टेस्ट-ट्यूबहरू सफा गर्ने मिडिया बनाउन शुरू गर्ने ।
		सिसाघर/ जालीघर	सिसा/जालीघरका बेन्चहरूको माटो फेर्नुपर्नेभए फेर्ने, माटो केलाउने, सरसफाई

		गर्ने ।
दोश्रो	प्रयोगशाला	सिसा/जालीघरमा पठाउनका लागि माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
	सिसाघर/ जालीघर	जाली फेर्ने लगायत अन्य मर्मतका कामहरू गर्ने ।
तेश्रो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने र माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
	सिसाघर/ जालीघर	माटो उपचारको लागि UV लाइटद्वारा उपचार गरिएको पानीले बेन्चको माटो पुरा भिज्नेगरी (बेन्चको माटो भिजि तल चुहिने गरी) पानी दिने र माटोको सुख्खापन हेरी तेश्रो वा चौथो दिनमा माटो उपचारका लागि तयार हुने ।
चौथो	प्रयोगशाला	MS मिडिया बनाउने र माउ विरुवाहरू प्रसारण गर्ने ।
	सिसाघर/ जालीघर	माटो उपचारका लागि आवश्यक सामग्रीहरू (फर्मालिन, झारि, फर्मालिन नाप्ने भाँडो, पानी, मास्क, ग्लोब, एप्रोन, उपचार पछि माटो ढाक्ने प्लाष्टिक, हातधुने साबुन आदि) र आवश्यक जनशक्तिको व्यवस्था गर्ने । फर्मालिनले माटो उपचारका लागि २% फर्मालिन (३७-४०%) अर्थात २० एम् एल/लि. पानीमा मिसाई १० लि. मिश्रणले १ वर्ग मिटरमा झारिको सहायताले एकनाशले हाल्ने र एक बेन्चमा पुरा हुने वित्तिकै हावा नछिँने गरी प्लाष्टिक सिटले बेन्चलाई एक हप्ता सम्म छोप्ने ।

खण्ड-११

११. नेपालमा हालसम्म उन्मोचन (Released) भै तन्तु प्रजनन् प्रविधिबाट पूर्व-मूल बीउ उत्पादित आलुका जातहरूको संक्षिप्त विवरण

हालसम्म राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम, नार्क मार्फत उन्मोचन गरिएका १० वटा र सिफारिस गरेको एक आलुका जातहरूको मुख्य पहिचान तथा जातीय गुणहरू छोटकरीमा प्रस्तुत गरिएको छ । यी आलुका जातहरूको तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा हाल नेपालमा पूर्व-मूल बीउ (PBS) उत्पादन गर्दै बीउ उत्पादनको लागि उपलब्ध गराउदै आइरहेको छ ।

११.१ कुफ्रि ज्योती (Kufri Jyoti)

यो आलुको जात सन् १९६८ मा भारतमा विकास गरिएको हो र त्यसको केहि बर्ष पछि नै नेपालमा भित्रिएको हो । यो जात नेपालको मध्य तथा उच्च पहाडी क्षेत्रमा व्यापक रूपमा फैलिएको पाइन्छ । यसमा विद्यमान राम्रा गुणहरूले गर्दा यो जात नेपालमा वि.सं. २०४९ मा आधिकारिक रूपमा उन्मोचन गरिएको हो ।



चित्र नं. १८: कुफ्रि ज्योतीको PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान : 3069 d (4) x 2814 a(1) = SLBZ-389(b)

जातीय श्रोत : केन्द्रीय आलु अनुसन्धान संस्थान, सिमला, भारत

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार	: मध्यम, अग्लो, गाँजिएको
पात	: चिल्लो, सतह मिलेको
फूल	: सेतो रंग र पूर्ण विकसित हुने किसिमको
आलुको दाना	: अण्डाकार, ठूलो, बोक्रा चिल्लो, हल्का सेतो र गुदी हल्का पहेँलो

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय	: उच्च पहाडमा ११०-१२० दिन र मध्य पहाडमा १००-११० दिन
दानामा सुषुप्तावस्था	: सरदर १२ हप्ता (मध्यम)
सरदर उत्पादन	: २०-२५ टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता	: ऐजेरु नलाग्ने, अघौटे डडुवा सामान्य अवरोधक र पछौटे डडुवा केहि लाग्ने
सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र	: मध्य तथा उच्च पहाडी क्षेत्रका लागि सिफारिस गरिएको ।

११.२ कुफ्रि सिन्धुरी (Kufri Sindhuri)

यो आलुको जात भारतको सिमलामा विकास गरिएको र नेपालमा सन् १९७८ तिर भित्रिएको हो र यसलाई नेपालमा वि.सं. २०४९ मा उन्मोचन गरिएको हो ।



चित्र नं. १९: कुफ्रि सिन्धुरीको PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान	: कुफ्रिरेड × कुफ्रि कुन्दन = सि १४
जातीय श्रोत	: केन्द्रीय आलु अनुसन्धान संस्थान, सिमला, भारत

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार	: अग्लो, ठाडो र खुल्ला किसिमको
पात	: सतह खुम्चिएको र सानो आकारको
फूल	: हल्का रातो र सेतो टुप्पा भएको
आलुको दाना	: गोलो, रातो बोक्रा र गुदी हल्का पहेँलो, आँखाको गहिराइ मझौला

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय	: ११०-१३० दिन
दानामा सुषुप्तावस्था	: १२ हप्ता (लामो)
सरदर उत्पादन	: २०-३० टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता	: ऐजेरु नलाग्ने, अघौटे डडुवा केहि सहन सक्ने, पछौटे डडुवा रोग लाग्ने, पात दोब्रने भाइरस (PLRV) रोग सहन सक्ने ।

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई तथा भित्री मधेस

११.३ डेजिरे (Desiree)

यो आलुको जात नेदरल्याण्डबाट सन् १९८०/८१ मा नेपालमा भित्रिएको हो । यसमा विद्यमान राम्रा गुणहरूले गर्दा वि.सं. २०४९ मा नेपालमा उन्मोचन भएको हो ।



चित्र नं. २०: डेजिरेको PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान	: अर्जेन्टा डिपेस्के
जातीय श्रोत	: नेदरल्याण्ड

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार	: होचो र फैलिने खालको
पात	: तुलनात्मक रूपमा साना र रंगिन
फूल	: गुलाबी रंगका धेरै फुले
आलुको दाना	: अण्डाकार लामो, बोक्रा रातो र चिप्लो, गुदी हल्का पहेँलो, आँखाको गहिराइ कम

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय	: ८०-९० दिन
दानामा सुषुप्तावस्था	: ८ हप्ता भन्दा कम
सरदर उत्पादन	: २०-२५ टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता	: ऐजेरु अवरोधक, पछ्यौटे डडुवा लाग्ने, पात दोब्रिने भाइरस रोग (PLRV) लाग्ने
सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र	: तराई, उपत्यका तथा मध्य पहाडी क्षेत्र

११.४ जनकदेव (Janak Dev)

यो आलुको जात नेपालमा अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र (CIP) बाट पहिलो पटक सन् १९९० मा भित्रिएको हो। यो जातमा विद्यमान उत्पादन क्षमता र अन्य विशेषताहरूका कारणहरूले गर्दा वि.सं. २०५६ मा नेपालमा उन्मोचन भएको हो।



चित्र नं. २१: जनकदेवको PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

जातीय पहिचान	: Atzimba x Desiree= Urgenta Depeache
जातीय श्रोत	: अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार	: अग्लो र ठाडो
पात	: खुल्ला किसिमको, हल्का हरियो, खस्रो सतह
फूल	: लामो दिनमा धेरै फुल्ने, हल्का बैजनी रंगको
आलुको दाना	: मध्यम देखि ठूलो आकारको, रातो बोक्रा, गुदी हल्का पहेँलो, लाम्चो आकार

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय	: १००-१२० दिन
दानामा सुषुप्तावस्था	: करिब ८ हप्ता (मध्यम)
सरदर उत्पादन	: २०-२५ टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता	: ऐजेरु अवरोधक, पछ्यौटे डडुवा सहन सक्ने
सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र	: तराई, उपत्यका तथा मध्य पहाडी क्षेत्र

११.५ खुमल सेतो-१ (Khumal Seto - 1)

नेपालमा यो जात सिप (CIP) ७२००८८ को नामबाट पहिलो पटक अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरुबाट सन् १९८२/८३ मा भित्रिएको हो। उत्पादन क्षमता र अन्य विशेषताहरूका कारणहरूले गर्दा वि.सं. २०५६ मा स्थानिय रूपले नामाकरण गरी खुमल सेतो-१ को नाममा नेपालमा उन्मोचन गरिएको हो।



चित्र नं. २१: खुमल सेतो-१ को PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान : MP161377.23 x B-5 = 65 Atlantic x Huinkul

जातीय श्रोत : अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु

बानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार : मध्यम खालको र फैलिएको

पात : खुल्ला, हल्का हरियो

फूल : सेतो रंगको, लामो दिनमा मात्र फुल्ने तर थोरै संख्यामा

आलुको दाना : मध्यम गोलो आकारको, सेतो बोक्रा, गुदीको रंग सेतो

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय : १००-१२० दिन

सरदर उत्पादन : २०-२५ टन/हेक्टर

दानामा सुषुप्तावस्था : करिब ८ हप्ता (मध्यम)

रोग अवरोधक क्षमता : ऐजेरु अवरोधक, पछ्र्रैटे डडुवा सहन सक्ने, पात दोब्रिने भाइरस (PLRV) अवरोधक

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई तथा भित्री मधेश देखि उच्च पहाड सम्म

११.६ खुमल रातो-२ (Khumal Rato - 2)

यो आलुको जात अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु बाट सन् १९८९ मा नेपालमा भित्रिएको हो । यसमा विद्यमान वनस्पतिक गुण तथा उत्पादन क्षमताका आधारमा वि.सं. २०५६ मा यो जातलाई नेपालमा खुमल रातो-२ का नामले उन्मोचलन गरिएको हो ।



चित्र नं. २२: खुमल सेतो-२ को PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान

: MUS136.6 x 3345D(1) x 2288 (2)

जातीय श्रोत

: अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा पेरु

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार

: ठाडो किसिमको

पात

: मध्यम खालको बनौट, सतह खुम्चिएको, हल्का हरियो

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय

: १००-१२० दिन

सुषुप्तावस्था

: ६-८ हप्ता (मध्यम)

सरदर उत्पादन

: २०-२५ टन/हेक्टर

रोग अवरोधक क्षमता

: ऐजेरु अवरोधक, पछ्र्रैटे डडुवा रोग अवरोधक, अगौटे डडुवा रोग केहि सहन सक्ने

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई तथा भित्री मधेश

११.७ खुमल लक्ष्मी (Khumal Laxmi)

यो जात अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरुबाट सन् १९८९/९० मा सिप (CIP) ३८८५७२.१ को नाममा नेपालमा भित्रिएको हो । पछि यो जातलाई खुमल लक्ष्मीको नामले नेपालमा वि.सं. २०६५ अर्थात् अन्तराष्ट्रिय आलु वर्षमा उन्मोचन गरिएको हो ।



चित्र नं. २३: खुमल लक्ष्मीको आलु दाना

जातीय पृष्ठभूमि

जातीय पहिचान

: ABWH-87.316 x BK (LB)

जातीय श्रोत

: अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार

: अग्लो कम फिँजिएको

पात

: गाढा हरियो, खस्रो सतह, केहि लाम्चो

डाँठ

: मध्यम खालको मोटाइ, रंगमा केहि रातो देखिने

फूल

: बैजनी रंगको वर्षा ऋतुमा धेरै फुल्ने

आलुको दाना

: गोलो, रातो, छाला चिल्लो, गुदी सेतो ।

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय

: १००-१२० दिन

दानामा सुषुप्तावस्था

: ६-८ हप्ता (मध्यम)

सरदर उत्पादन

: २०-२५ टन/हेक्टर

रोग अवरोधक क्षमता

: ऐजेरु अवरोधक, डडुवा सहन सक्ने

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र

: तराई, मध्य पहाड, भित्री मधेश र उच्च पहाड

११.८ आई.पि.वाई-८ (IPY - 8)

यो आलुको जात सन् १९८९/९० मा लिमा, पेरु बाट सिप (CIP) ३८०५७२.४ को नाममा नेपालमा भित्रिएको हो । यो आलुको जातलाई नेपालमा वि.सं. २०५६ अर्थात् अन्तराष्ट्रिय आलुवर्षमा आई.पि.वाई-८ को नाममा उन्मोचन गरिएको हो ।



चित्र नं. २४: आई.पि.वाई-८ को PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान

: BWH-87.316 x BK (LB)

जातीय श्रोत

: अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार

: मध्यम, खुल्ला, भर्नाङ्गिने खालको

पात

: केहि लाम्बिलो, चुच्चो परेको, हरियो रंग, समतल सतह

फूल

: मध्यम बैजनी रंगको छोटो दिनमा थोरै फुल्ने र आलुभँडा लाग्ने

आलुको दाना

: मध्यम आकारको, आँखाको गहिराई मध्यम, सेतो बोक्रा, समतल सतह, हल्का रातो आँखा, सेतो गुदी

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय

: १००-१२० दिन

दानामा सुषुप्तावस्था

: ६-८ हप्ता (मध्यम)

सरदर उत्पादन

: २०-२५ टन/हेक्टर

रोग अवरोधक क्षमता : ऐजेरु अवरोधक, पछौटे डडुवा सहन
सक्ने

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई तथा भित्री मधेश

११.९ खुमल उज्वल (Khumal Ujwal)

यो आलुको जात लिमा, पेरु बाट एन.एल.
२३५-४ को नाम ले नेपालमा भित्रिएको हो
। यसमा विद्यमान राम्रा गुणहरूले गर्दा
वि.सं. २०७१ मा नेपालमा खुमल उज्वल
(Khumal Ujwal) को नाममा उन्मोचन
गरिएको हो ।



चित्र नं. २५: खुमल उज्वलको
PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

विकसित गरिएको देश : संयुक्त राज्य अमेरिका

जातीय श्रोत : INIA Chile

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार : ठाडो किसिमको, मध्यम मोटाई

पात : बाक्लो, गाढा हरियो

फूल : सेतो रंग, धेरै फुल्ने

आलुको दाना : अण्डाकार, मध्यम आकार, सेतो, चिप्ला

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय : मध्यम (१००-१२० दिनमा तयार)

सरदर उत्पादन : २२-२५ टन/हेक्टर

रोग अवरोधक क्षमता : ऐजेरु नलाग्ने, डडुवा रोग सहन सक्ने,
भाइरस एक्स र वाई अवसोधक

सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : मध्य पहाड एवं बेशी

११.१० खुमल उपहार (Khumal Upahar)

यो आलुको जात लिमा, पेरुबाट CIP 389746.2 को नाममा भित्रिएको हो । यसमा विद्यमान राम्रा गुणहरूले गर्दा वि.सं. २०७१ मा नेपालमा खुमल उपहार (Khumal Upahar) को नाममा उन्मोचन गरिएको हो ।



चित्र नं. २६: खुमल उपहारको
PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

विकसित गरिएको देश : अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु
जातीय श्रोत : अन्तराष्ट्रिय आलुबाली केन्द्र, लिमा, पेरु

दानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार : मध्यम, फैलिने खालको
पात : बाक्लो, खस्रो गाढा रंग
फूल : हरियो बैजनी रंगको, थोरै फुल्ने
आलुको दाना : अण्डाकार, साना ठूला मिश्रीत, हल्का रातो र सेतो मिश्रीत, आँख बैजनी रंगको

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय : ११०-१२० दिन
सरदर उत्पादन : २०-२४ टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता : ऐजेरु नलाग्ने, डडुवा रोग सहन सक्ने
सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई देखि पहाड सम्म।

११.११ कार्डिनल (Cardinal)

यो आलुको जात नेदरल्याण्डबाट सन् १९००/०१ म नेपालमा भित्रिएको हो । यसमा विद्यमान राम्रा गुणहरूले गर्दा सन् १९८९/९० मा नेपालमा सिफारिस गरिएको छ ।



चित्र नं. २५: कार्डिनलको
PBS दाना

जातीय पृष्ठभूमि

पैतृक पहिचान : अर्जेन्टा डिपेस्के
जातीय श्रोत : नेदरल्याण्ड

वानस्पतिक स्वरूप

बोटको आकार : मध्यम होचो र फैलिने खालको
पात : मध्यम आकारका र हल्का हरियो
फूल : हल्का गुलाबी रंगका थोरै फुल्ने
आलुको दाना : लाम्बिलो, बोक्रा रातो र चिप्लो, गुदी हल्का पहेँलो, आँखाको गहिराइ कम

जातीय विशेषता

बाली तयार हुने समय : ९०-११० दिन
दानामा सुषुप्तावस्था : ८ हप्ता भन्दा कम
सरदर उत्पादन : २०-२५ टन/हेक्टर
रोग अवरोधक क्षमता : ऐजेरु नलाग्ने, पछ्रौटे डडुवा केहि लाग्न
सिफारिस भौगोलिक क्षेत्र : तराई, उपत्यका तथा मध्य पहाडी क्षेत्र

सन्दर्भ-सूची

- Anonymous. In vitro cultivation of potato cells, Butterworth-Heinemann Ltd. Linacre House, Jordan Hill, Oxford ox28dp 1993. pp 200.
- Brison M, MT Boucaud, A Pierronnet and F Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. Plant Sci. 123:189-196
- Clark MF and AH Adams. 1977. Characteristics of the microplant method for enzyme linked immunosorbent assay for the detection of potato viruses. J. General Virology. 34:475-483.
- Dhital SP and HT Lim. 2012. Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by supplementary nutrients, plant growth regulators, and *in vitro* culture conditions. Journal of the European Association for Potato Research, the Netherland. 55(2) 97-108.
- Dhital SP and HT Lim. 2011. Virus Elimination and seed production of potato (*Solanum tuberosum* L.), Publishing agency: LAP Lambert Academic Publication, Germany, pp 108.
- Dhital SP, HT Lim and HK Manandhar. 2009. Elimination of potato viruses (PLRV and PVY) by cryotherapy of in vitro grown shoot tips of potato. J. Hort. Envi. Biotechnol. 50(3):233-239.
- Dhital SP, HT Lim and BP Sharma. 2008. Electrotherapy and chemotherapy for eliminating double-infected potato

- virus (PLRV and PVY) from the in vitro plantlets of potato. *J. Hort. Envir. Biotechnol.* 49(1):52-57.
- Dhital and HT Lim. 2004. Microtuberization response in several genotypes of potato by direct addition of liquid medium to in vitro plantlets. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 45(6):281-286.
- Helliot B B, Y Poumay, R Swenen, P Lepoivre and E Frison. 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports.* 20:1117-1122.
- Lizarraga R, Z Huaman and JH Dodds. 1989. In vitro conservation of potato germplasm at the International Potato Center. *Amer. Potato J.* 66:253-269.
- Lozyoya-saldana H, JF Abello, RG Garcia. 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate Potato Virus X in potatoes. *Amer. Potato J.* 73:149-154.
- Lozyoya-saldana H and A Madrigal-Vargas. 1985. Kinetin, thermotherapy and tissue culture to eliminate potato virus (PVS) in potato. *Amer. Potato J.* 62:340-345.
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Naik PS (edi.). 2000. Potato biotechnology, Technical Bulletin No. 53. Central Potato Research Institute (Indian Council of Agricultural Research), Shimla 171 001, H.P., India.
- Novella MB, J L Andriolo, DA Bisognin, CM Cogo and MG Bandinelli. 2008. Concentration of nutrient solution in the hydroponic production of potato minitubers.

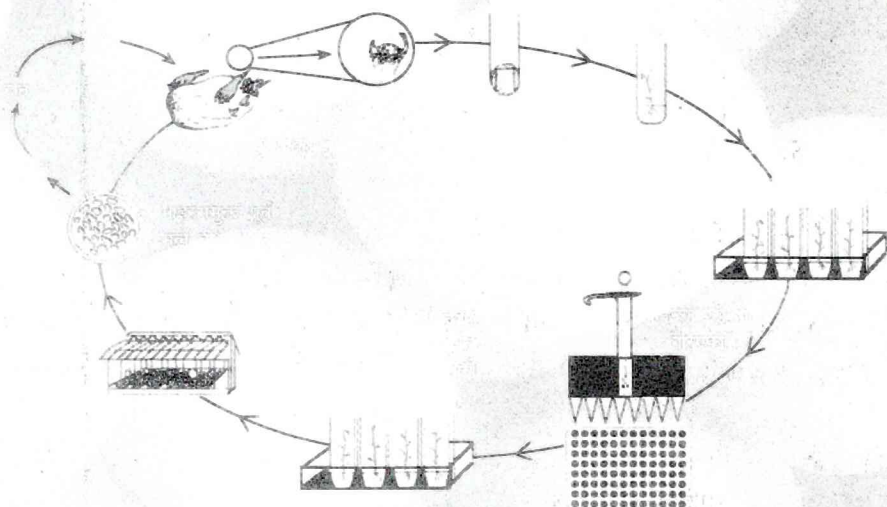
- Journal of the Ciencia Rural, Santa Maria, Brasil, 38(6), 1529-1533.
- NPRP. 2009. Annual Report 2008/09. National Potato Research Programme, Nepal Agricultural Research Council, Khumaltar, Lalitpur, Nepal. pp 120.
- Park KW and YS Kim. 1998. Hydroponic in horticulture (1st ed.), Academic Press, Seoul, Korea.
- Pierik RLM. 1987. In vitro culture of higher plants, Martinus nijhoff publishers, Dordrecht, The Netharlands, pp 344
- Singh BD. 1998. Biotechnology. Kalyani Publishers Rajinder Nagar, Ludhiana-141008, India. pp 574.
- Souza-Dais JAC, P Russo, JA Belli, L Miller and SA Slack. 1999. Simplified extraction method for ELISA and PCR detection of LRV primary infection in dormant potato tubers. Amer. J. Potato Res. 76:209-213.
- Stace-smith R and FC Mellor. 1970. Eradication of potato virus X and S by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology. 58:199-203.
- Wang Q, M Mawassi, P Li, R Gafny, I Sela and E Tanne. 2003. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro grown shoot tips of vitis vinifera L. Plant Sci. 165:321-327.
- खत्री, भीम बहादुर, विनोद प्रसाद लईटेल र दुर्योधन चौधरी, २०७२, नेपालमा हालसम्म उन्मोचित र पंजिकृत आलुका जातहरु: एक छोटो परिचय, नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद्, राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम ।

धिताल, शम्भु प्रसाद, २०७१, हाइड्रोफोनिक प्रविधि (Hydroponic technology) द्वारा पूर्व-मूल बीउ उत्पादन, नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद्, राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम ।

धिताल, शम्भु प्रसाद, २०६८, तन्तु प्रजनन् प्रविधिद्वारा रोग रहित पूर्व-मूल बीउ उत्पादन, नेपाल कृषि अनुसन्धान परिषद्, राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम ।

आलुको तन्तु प्रजनन र पूर्व-मूल बीड उत्पादन

आलुको तन्तु प्रजनन र पूर्व-मूल बीड उत्पादन



खुमलटार, ललितपुर

२०७२

लेखकको छोटो परिचय

नाम : डा. शम्भुप्रसाद धिताल
जन्म मिति : २०१६ साल आश्विन १५
जन्म स्थान : खरिबोट, गोरखा
ठेगाना :
स्थायी : गुन्जनगर गा.वि.स. वार्ड नं. २, चितवन, नेपाल
अस्थायी : बबरमहल, काठमाण्डौ-११, काठमाण्डौ, नेपाल ।



शिक्षा : बि.एस्सि. एजी. (B.Sc. Agri.); कृषि तथा पशु विज्ञान अध्ययन संस्थान, रामपुर, चितवन, बि.सं. २०३९
एम्. एस्सि. एजी. (M. Sc. Agri.); Kasetsart University, Bangkok, Thailand बि.सं. २०५२
पिएच.डि. (Ph.D.); Kangwon National University, Chunchon, South Korea बि.सं. २०६२
पोस्टडक (Postdoc); Kangwon National University, Chunchon, South Korea बि.सं. २०६६

कृति :

१. पुस्तक : Dhital, S.P. and H.T. Lim. 2011. Virus Elimination and Seed Production of Potato, LAP Lambert Academic Publication, Germany, pp 108.
२. International Journal: २२ वटा भन्दा बढी अनुसन्धानमुलक लेखहरू प्रकाशन गरेको
३. National Journal: २० वटा भन्दा बढी अनुसन्धानमुलक र अन्य विविध लेखहरू प्रकाशन गरेको
४. अन्य प्रकाशन: २० वटा भन्दा बढी आलुबाली संबन्धी Leaflet, Booklets, Folder, Poster आदि प्रकाशन गरेको

अनुभव :

बि.सं. २०४० देखि २०४५ सम्म राष्ट्रिय आलुबाली बिकास कार्यक्रम, कृ.वि.मा स.आ.बि.अधिवक्ता बि.सं. २०४५ देखि २०४८ सम्म हेलम्बु बागवानी फार्म, हेलम्बु, कृ.वि.मा स.बा. रोग विज्ञान बि.सं. २०४८ देखि २०५२ सम्म राष्ट्रिय आलुबाली अनुसन्धान कार्यक्रम, नार्कमा वैज्ञानिक (S) बि.सं. २०५२ देखि २०६२ सम्म रा. आलुबाली अनु. कार्यक्रम, नार्कमा वरिष्ठ वैज्ञानिक (S3) बि.सं. २०६२ देखि २०७१ पौषसम्म रा. आलुबाली अनु. कार्यक्रम, नार्कमा वरिष्ठ वैज्ञानिक (S) बि.सं. २०७१ माघ देखि हालसम्म रा.आलुबाली अनु. कार्यक्रममा वरिष्ठ वैज्ञानिक एवम् संयोजक

