রেজিস্টার্ড নং ডি এ-১

বাংলাদেশ গেজেট

অতিরিক্ত সংখ্যা

কর্তৃপক্ষ কর্তৃক প্রকাশিত

বুধবার, ডিসেম্বর ১১, ২০১৯

গণপ্রজাতন্ত্রী বাংলাদেশ সরকার

কৃষি মন্ত্রণালয়

বীজ অনুবিভাগ

প্রজ্ঞাপন

তারিখ : ২০ অগ্রহায়ণ ১৪২৬/০৫ ডিসেম্বর ২০১৯

নম্বর : **১২.০০.০০০০.০৯৮.১৭.০০১.০৪.৬৩৭**—গত ৩০.০৫.২০১৮ তারিখে অনুষ্ঠিত জাতীয় বীজ বোর্ডের ৯৬-তম সভায় সিদ্ধান্তের পরিপ্রেক্ষিতে টিস্যু কালচারের মাধ্যমে রোগমুক্ত মানসম্পন্ন বীজ আলু উৎপাদন কার্যক্রম জোরদার করিবার জন্য সরকার "বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি স্থাপন, মূল্যায়ন এবং নিবন্ধন নির্দেশিকা" প্রণয়ন করিয়াছে। এ লক্ষ্যে পূর্ববর্তী "বাংলাদেশে বীজ আলু উৎপাদনের লক্ষ্যে টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি স্থাপন ও পরিচালনা সংক্রান্ত গাইডলাইন"-এর প্রজ্ঞাপন বাতিলপূর্বক "বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি স্থাপন, মূল্যায়ন ও নিবন্ধন নির্দেশিকা"-এর প্রজ্ঞাপন সকলের অবগতি ও অনুসরণের জন্য জারি করা হইল। 'বীজ আইন, ২০১৮' ও জাতীয় বীজ বোর্ডের সিদ্ধান্তের পরিপন্থি না হইলে বীজ আলুর ল্যাবরেটরি নিবন্ধনের জন্য নিম্নবর্ণিত পদ্ধতি অনুসরণ করিতে হইবে।

বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি স্থাপন, মূল্যায়ন এবং নিবন্ধন নির্দেশিকা

আলু একটি গুরুত্বপূর্ণ খাদ্য ফসল। বাংলাদেশসহ এশিয়া মহাদেশের বিভিন্ন দেশে আলু প্রধানত সবজি হিসাবে ব্যবহৃত হইলেও শীত প্রধান দেশে এটি প্রধান খাদ্য হিসাবে বিবেচিত হইয়া থাকে। তুলনামূলকভাবে অধিক ফলন, স্বল্প জীবনকাল ও উচ্চ পুষ্টিমানের কারণে আলু বাংলাদেশে একটি গুরুত্বপূর্ণ ফসল হিসাবে স্থান দখল করিয়াছে। দেশের ক্রমবর্ধমান জনসংখ্যার খাদ্য পূরণে ও পুষ্টিহীনতা দূরীকরণে আলুর গুরুত্ব অপরিসীম। এই চাহিদা পূরণে ফলন বৃদ্ধি করা গুরুত্বপূর্ণ। আলুর

মূল্য : টাকা ২৪.০০

ফলন বৃদ্ধিতে মানসম্পন্ন রোগমুক্ত বীজ আলুর ব্যবহার অন্যতম ভূমিকা পালন করে। টিস্যু কালচারের মাধ্যমে রোগমুক্ত মানসম্পন্ন বীজ আলু উৎপাদন কার্যক্রম শুরু হওয়ায় দেশে আমদানি নির্ভরতা কমেছে। সরকারি প্রতিষ্ঠান, বিশ্ববিদ্যালয়, বেসরকারি প্রতিষ্ঠান এবং ব্যক্তি উদ্যোক্তাদের টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি তদারকি; ল্যাবরেটরিসমূহের মধ্যে সমন্বয়সাধন; দেশের মানসম্পন্ন টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি তালিকাভুক্ত করা; টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর গুণগতমান রক্ষা এবং রোগমুক্ত মানসম্পন্ন বীজ আলু উৎপাদন প্রযুক্তিকে উৎসাহিত করিবার জন্য নির্দেশিকাটি প্রণয়ন করা হইল।

১. সাধারণ নির্দেশনা :

(১) টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে বীজ আলু উৎপাদনের জন্য জাত উদ্ভাবনকারী প্রতিষ্ঠান শুধুমাত্র নিবন্ধিত ল্যাবরেটরিসমূহকে প্রজনন বীজ সরবরাহ করিবে;

(২) বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি শুধুমাত্র এই নির্দেশিকার অধীন নিবন্ধিত ল্যাবরেটরিসমূহের টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর প্রত্যয়ন সনদ প্রদান করিবে;

(৩) সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড ও মহাপরিচালক, বীজ অনুবিভাগ, কৃষি মন্ত্রণালয় টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন এবং নিবন্ধনের জন্য কর্তৃপক্ষ হিসেবে বিবেচিত হইবেন;

(৪) কৃষি মন্ত্রণালয়ে নিবন্ধিত বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরিসমূহের তথ্য সংরক্ষিত থাকিবে। নিবন্ধিত ল্যাবরেটরিসমূহ তাহাদের টিস্যু কালচারের মাধ্যমে বীজ উৎপাদনের তথ্য কৃষি মন্ত্রণালয়ে সরবরাহ করিবে;

(৫) টিস্যুকালচারের মাধ্যমে বীজ আলু উৎপাদনের একটি পদ্ধতি Annexure: 1-7 এ দেওয়া হইলো।

২. নিবন্ধন প্রক্রিয়া :

(১) টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন ও নিবন্ধনের জন্য সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড ও মহাপরিচালক, বীজ অনুবিভাগ, কৃষি মন্ত্রণালয় বরাবর নির্ধারিত ফরমে (ফরম-ক) আবেদন করিতে হইবে;

(২) আবেদনপত্র গৃহীত হইবার পর "বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি" ল্যাবরেটরি পরিদর্শন করিবে এবং বর্ণিত নম্বরের ভিত্তিতে ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন করিয়া নিবন্ধনযোগ্য হইলে নিবন্ধনের জন্য সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয় বরাবর সুপারিশ প্রেরণ করিবে;

(৩) কমিটির সুপারিশ বিবেচনাপূর্বক জাতীয় বীজ বোর্ডের সচিব কর্তৃক আবেদনকৃত টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরির নিবন্ধনের সনদপত্র প্রদান করা হইবে;

৩. নম্বর বন্টন :

(১) "বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি" ১০০ (একশত) নম্বরের ভিত্তিতে নিম্নবর্ণিতভাবে আবেদনকৃত টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন করিবে:

(ক) অবকাঠামো-৫০ নম্বর (ল্যাবরেটরি সুবিধা-৩৫ এবং হার্ডেনিং ও নেট হাউজ সুবিধা- ১৫);

(খ) মান নিয়ন্ত্রণ- ৪০ নম্বর (ভাইরাস ইনডেক্সিং- ২০, ন্যূনতম মান- ২০); এবং

(গ) কারিগরি তত্ত্বাবধায়ন ও মূল্যায়ন-১০ নম্বর (স্টাফ- ৫ ও অপারেটর- ৫)।

"বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি"-এর মূল্যায়নে প্রতিটি মানদন্ডে কমপক্ষে শতকরা ৫০ নম্বরসহ মোট ৬০ নম্বর পাইলে, বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি নিবন্ধনের যোগ্য বলিয়া বিবেচনা করিবে।

(২) বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়নের মানদন্ড 'ছক-১'-এ বিস্তারিত প্রদান করা হইল:

'ছক-১'

মানদন্ড		**নির্ণায়ক (Standard)**	নম্বর
১) অবকাঠামো (Infrastructure)			৫০
(ক) ল্যাবরেটরি সুবিধাসমূহ (Laboratory Facilities)			৩৫
ধৌতকরণ কক্ষ (Washing room)	:	• সাধারণ পানি দিয়ে ধৌত করার পর, টেস্টটিউব বা কালচার ভেসেলগুলো শুকানোর পূর্বে আবার পাতিত পানি (Distilled Water) দ্বারা ধৌত করিতে হইবে। • জারগুলো উল্টানো অবস্থায় শুকাইতে হইবে। কাঁচের উপকরণ/যন্ত্রপাতিগুলো ওভেনে শুকাইতে হইবে। • ব্যবহৃত এগার/মিডিয়াগুলো সঠিক পদ্ধতি ব্যবহার ও সঠিক নিয়ম অনুসরণ করিয়া অপসারণ করিতে হইবে। • ল্যাবরেটরির সার্বিক পরিস্কার পরিচ্ছন্নতা নিশ্চিত করিতে হইবে। • ব্যাকটেরিয়া ও ছত্রাক দ্বারা আক্রান্ত কন্টামিনেটেড ও নন-কন্টামিনেটেড বোতল বা টেস্টটিউব এর মিডিয়া যথাযথ প্রক্রিয়ায় জীবাণুমুক্ত (Disinfected) করিতে হইবে।	৫
মিডিয়া প্রস্তুতকরণ কক্ষ (Media preparation room)	:	• মিডিয়া প্রস্তুতকরণ কক্ষ অবশ্যই সকল ধরনের উপকরণ ও যন্ত্রপাতি যেমন-ইলেকট্রিক ব্যালেন্স, pH মিটার, রেফ্রিজারেটর, মাইক্রোওয়েব ওভেন, ডিস্টিলেশন ইউনিট, অটোক্লেভসহ প্রয়োজনীয় যন্ত্রপাতি থাকিতে হইবে। • ল্যাবরেটরিতে ব্যবহৃত রাসায়নিক দ্রব্যাদি অবশ্যই স্বীকৃত কোম্পানি হইতে গ্রহণযোগ্য মানের হইতে হইবে।	১০

মানদণ্ড		নির্ণায়ক (Standard)	নম্বর
		• বোতল/টেস্টটিউব/র‍্যাক ইত্যাদির গায়ে মিডিয়ার বিস্তারিত তথ্য লিপিবদ্ধ থাকিতে হইবে। • মিডিয়া অটোক্লেভ করিবার পর ৪-৫ দিন ল্যাবে সংরক্ষণ করিতে হইবে, যেন মিডিয়া তৈরির সময় কোন ভুলভ্রান্তি হইলে অথবা অণুজীবের সংক্রমণ হইলে তাহা মিডিয়া ব্যবহারের পূর্বেই দৃষ্টিগোচর হয়। • অটোক্লেভ সঠিকভাবে হইয়াছে কি-না তা বুঝতে ইন্ডিকেটর টেপ ব্যবহার করিতে হইবে। • মিডিয়া তৈরির পদ্ধতি ল্যাবরেটরিতে নির্ধারিত জায়গায় ঝুলানো থাকিতে হইবে।	
এক্সপ্লান্ট মিডিয়াতে স্থানান্তর কক্ষ (Inoculation room)	:	• সাধারণত বছরে ২-৩ বার উদ্বায়ী রাসায়নিক দ্রব্যাদি দ্বারা কক্ষটি ধূমায়িত (Fumigation) করিয়া জীবাণুমুক্ত করিতে হইবে। • ল্যামিনার এয়ার ফ্লো ক্যাবিনেট ব্যবহারের পূর্বেই আল্ট্রাভায়োলেট-রে (Ultrabiolet Ray) দ্বারা ১৫-২০ মিনিট জীবাণুমুক্ত করিয়া নিতে হইবে। তারপর ৭০% এলকোহল দ্বারা জীবাণুমুক্ত করিতে হইবে। • টিস্যু কালচার প্রক্রিয়ায় ব্যবহৃত সকল যন্ত্রপাতি, যেমন- চিমটি, স্কালপেল, ব্লেড ইত্যাদি ব্যবহারের পূর্বে অটোক্লেভে জীবাণুমুক্ত করিতে হইবে। ইহাছাড়া ব্যবহারের সময় ৭০% অ্যালকোহলে ডুবিয়ে নিতে হইবে। জ্বলন্ত আগুনের শিখায় পুড়িয়ে উহা তাৎক্ষণিকভাবে জীবাণুমুক্ত করিতে হইবে। এই ক্ষেত্রে ২৬০-২৮০ সেন্টিগ্রেড তাপমাত্রায় হট বিট ব্যবহার করা যাইতে পারে। মিডিয়া কেমিক্যাল ও অন্যান্য প্রয়োজনীয় জিনিস রাখার জন্য ট্রলি থাকিতে হইবে। • বাহির হইতে ময়লা ধুলাবালি যাহাতে ল্যাবরেটরির ভিতরে প্রবেশ না করিতে পারে সেই জন্য ল্যাবের মূল প্রবেশদ্বারে এয়ারকাটার ব্যবহার করিতে হইবে এবং প্রতিনিয়ত ল্যাবরেটরি পর্যবেক্ষণ করিতে হইবে। • ল্যাবরেটরিতে কর্মরত স্টাফ/কর্মীদের অবশ্যই পরিস্কার ও জীবাণুমুক্ত এ্যাপ্রোন, ক্যাপ, মাস্ক ও জুতা পরিধান করিয়া ল্যাবে প্রবেশ করিতে হইবে।	১০

মানদণ্ড		নির্ণায়ক (Standard)	নম্বর
		• ল্যামিনার এয়ার ফ্লো (Laminar Air Flow) এর কাজ শেষ হইলে পুনরায় ৭০% অ্যালকোহল দ্বারা পরিষ্কার করিয়া ১০ মিনিট চালু রাখিবার পর বন্ধ করিতে হইবে। • ল্যাবরেটরিতে ব্যবহৃত সকল জাত/ক্লোনের নাম ও ইনোকুলেশনের তারিখ লিপিবদ্ধ করিতে হইবে।	
জন্মানো কক্ষ (Growth room)	:	• প্রতিদিন পর্যবেক্ষণের মাধ্যমে Contamination আছে কি-না উহা নিশ্চিত করিতে হইবে। জন্মানো কক্ষে র‍্যাক, এসি, হাইগ্রোমিটার, লাক্সমিটার, থার্মোমিটার, টাইমার ইত্যাদি থাকিতে হইবে। • জন্মানো কক্ষটি সম্পূর্ণ জীবাণুমুক্ত অবস্থা নিশ্চিত করিতে বছরে কমপক্ষে ৩ বার ফিউমিগেশান করিতে হইবে। • জন্মানো কক্ষটিতে প্রবেশাধিকার সংরক্ষিত থাকিতে হইবে এবং লাইট ২৫০০—৩০০০ লাক্স, তাপমাত্রা ১৮-২২° C এবং আর্দ্রতা ৭০-৭৫% থাকা আবশ্যক।	১০
(খ) **হার্ডেনিং, নার্সারি এবং নেট হাউজ সুবিধাদি (Hardening, Nursery and Net House Facilities)**			১৫
হার্ডেনিং (Hardening)	:	• প্লান্টলেটসহ কনিক্যাল ফ্লাস্ক/জার/টেস্টটিউব ২-৩ দিন সাধারণ তাপমাত্রায় রাখিতে হইবে। • প্লান্টলেটের অতিরিক্ত মিডিয়া পরিস্কার করিবার পর পাতিত পানি (Distilled Water) দিয়ে ধৌত করিতে হইবে। তারপর প্লান্টলেট ছত্রাকনাশক বা ব্যাকটেরিয়ানাশক দ্বারা শোধন করিতে হইবে। • সঠিক পদ্ধতিতে লেবেলসহ হার্ডেনিং করিতে হইবে। • হার্ডেনিং প্রক্রিয়াটি অবশ্যই জীবাণুমুক্ত হইতে হইবে।	৫
নেট হাউজ (Net House)	:	• আশি (৮০) ম্যাশ নেট দ্বারা নেট হাউস তৈরি করিতে হইবে। • নেট হাউজের বেড আগাছা ও রোগজীবাণুমুক্ত হইতে হইবে। • ভালভাবে পঁচা জৈব সার জীবাণুমুক্ত করিয়া ব্যবহার করিতে হইবে।	১০

মানদণ্ড		নির্ণায়ক (Standard)	নম্বর
		• নেট হাউজের মাটি ৩% ফরমালডিহাইড-এর মিশ্রণ দ্বারা স্প্রে করিয়া পলিথিন দিয়ে ৩-৪ দিন ঢেকে শোধন করিতে হইবে। • রোপণকৃত প্লান্টলেটের জাত, রোপণ তারিখ ইত্যাদি সংরক্ষণ করিতে হইবে। • নেট হাউজের নেট কোথাও ছিদ্র বা ছেঁড়া না থাকা। • ছত্রাকের আক্রমণ রোধকল্পে উপযুক্ত ছত্রাকনাশক স্প্রে করিতে হইবে। • নেট হাউজে রোপণকৃত প্লান্টলেটের মরটালিটি রেকর্ড সংরক্ষণ করিতে হইবে। • নেট হাউজ অবশ্যই ভাইরাসের ভেক্টরমুক্ত রাখিতে হইবে। ভেক্টর নিয়ন্ত্রণের জন্য সিস্টেমিক কীটনাশক স্প্রে করিতে হইবে।	
২) মান নিয়ন্ত্রণ (Quality Control)			৪০
ভাইরাস ইনডেক্সিং (Virus Indexing)	:	• মাইক্রোপ্রোপাগেশনের পূর্বে জাতওয়ারি সংগৃহীত PLRV, PVY, PVA, PVM, PVS, PVX ভাইরাসের অনুপস্থিতি নিশ্চিত করিতে হইবে এবং ভাইরাসমুক্ত প্লান্টলেট নোডাল কাটিং এর মাধ্যমে মাইক্রো-প্রোপাগেশন করিতে হইবে।	২০
ন্যূনতম মান (Minimum Quality)	:	আলুর যে অংশ প্রি-নিউক্লিয়ার স্টক হিসাবে ব্যবহৃত হইবে উহার তথ্যাবলি/উপযোগিতা থাকিতে হইবে যাহা নিম্নরূপ : • প্রাথমিকভাবে ব্যবহৃত উপকরণগুলোর জাত/ক্লোনাল পরিচয় থাকিতে হইবে এবং সঠিকভাবে উহাদের উৎপত্তিগত তথ্য লিপিবদ্ধ থাকিতে হইবে। • প্রাথমিকভাবে আলুর জাত/ক্লোনগুলোর সমস্ত নমুনা কোন স্বীকৃত ল্যাবরেটরি কর্তৃক পরীক্ষার প্রতিবেদন থাকিতে হইবে। ভাইরাস যেমন- PLRV, PVY, PVA, PVM, PVS, PVX এবং অন্যান্য অণুজীব, যেমন-ব্যাকটেরিয়া ও ছত্রাক মুক্ত হইতে হইবে। • বংশ বিস্তারের প্রক্রিয়ায় ব্যবহৃত সকল প্রাথমিক সুবিধাদি অবশ্যই জীবাণুমুক্ত হইতে হইবে। • বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সির মূল্যায়ন ও নিরীক্ষার জন্য বংশবিস্তারে প্রাথমিকভাবে ব্যবহৃত উপকরণ ও সুবিধাদির তথ্য লিপিবদ্ধ রাখিতে হইবে।	২০

মানদণ্ড		নির্ণায়ক (Standard)	নম্বর
		• ৮ (আট) বারের বেশি সাবকালচার (Subculture) করা যাইবে না। • ক্লোনাল সামঞ্জস্যতা মাঠ পরীক্ষার মাধ্যমে অঙ্গসংস্থানিক বৈশিষ্ট্য পর্যবেক্ষণের মাধ্যমে নিশ্চিত করিতে হইবে।	
(৩) কারিগরি তত্ত্বাবধান এবং পরিবীক্ষণ (Technical Supervision and Monitoring			১০
উৎপাদন তত্ত্বাবধায়নকারী জনবলের কারিগরি দক্ষতা ও যোগ্যতা	:	• বিজ্ঞানী এবং তত্ত্বাবধায়নকারী/ব্যবস্থাপক যাহারা উৎপাদন প্রক্রিয়ায় সম্পৃক্ত তাহাদের উক্ত বিষয়ে অবশ্যই কারিগরী জ্ঞান থাকিতে হইবে। • তত্ত্বাবধায়কসহ অন্তত ০১ (এক) জন বিজ্ঞানী উৎপাদন প্রক্রিয়ার সাথে যুক্ত থাকিতে হইবে।	৭
অপারেটর (মিডিয়া তৈরি/ইনোকুলেশন)	:	• সংশ্লিষ্ট বিষয়ে প্রশিক্ষিত ও অভিজ্ঞ জনবল দ্বারা কার্যক্রম পরিচালনা করিতে হইবে।	৩
		মোট নম্বর=	১০০

৪. কমিটি গঠন।—নিম্নবর্ণিতভাবে "বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি" গঠন করা হইল:

(১) পরিচালক, কন্দাল ফসল গবেষণা কেন্দ্র, বাংলাদেশ কৃষি গবেষণা ইনস্টিটিউট, গাজীপুর; সভাপতি

(২) বিভাগীয় প্রধান অথবা মনোনীত প্রতিনিধি, বায়োটেকনোলজী বিভাগ, বঙ্গবন্ধু শেখ মুজিবুর রহমান কৃষি বিশ্ববিদ্যালয়, সালনা, গাজীপুর; সদস্য

(৩) মুখ্য বৈজ্ঞানিক কর্মকর্তা, শস্য বিভাগ, বাংলাদেশ কৃষি গবেষণা কাউন্সিল, ফার্মগেট, ঢাকা; সদস্য

(৪) যুগ্ম-পরিচালক, মান নিয়ন্ত্রণ, বাংলাদেশ কৃষি উন্নয়ন কর্পোরেশন, কৃষি ভবন, ৪৯-৫১, দিলকুশা বা/এ, ঢাকা; সদস্য

(৫) উপপরিচালক (মান নিয়ন্ত্রণ), বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি, গাজীপুর; সদস্য

(৬) টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরির দায়িত্বপ্রাপ্ত বিজ্ঞানী, কন্দাল ফসল গবেষণা কেন্দ্র, বাংলাদেশ কৃষি গবেষণা ইনস্টিটিউট, গাজীপুর; সদস্য

(৭) সভাপতি অথবা মনোনীত প্রতিনিধি, বাংলাদেশ সীড এসোসিয়েশন (বিএসএ), ঢাকা; সদস্য

(৮) সভাপতি অথবা মনোনীত প্রতিনিধি, অ্যাসোসিয়েশন অব অ্যাপ্লায়েড প্লান্ট টিস্যু কালচার ইন বাংলাদেশ (AAPTCB), ঢাকা; সদস্য

(৯) প্রধান বীজতত্ত্ববিদ, বীজ অনুবিভাগ, কৃষি মন্ত্রণালয়, বাংলাদেশ সচিবালয়, ঢাকা; সদস্য সচিব

৫. কমিটির কার্যপরিধি।—

(১) নির্দেশিকা অনুযায়ী বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন এবং নিবন্ধনযোগ্য হইলে নিবন্ধনের জন্য সুপারিশ প্রদান;

(২) নিবন্ধনের জন্য পরিদর্শনকালে বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরির সমস্যাসমূহ চিহ্নিত করিয়া উহার মান উন্নয়নের জন্য সুপারিশ প্রদান;

(৩) কমিটি নিবন্ধিত বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি প্রয়োজনে যেকোনো সময়ে পরিদর্শন করিতে পারিবে এবং পরিদর্শনকালে নির্দেশিকা অনুযায়ী যথাযথ মানদণ্ড বজায় না থাকিলে, সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয় বরাবর উক্ত বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরির নিবন্ধন বাতিলের সুপারিশ প্রদান;

(৪) টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর বিষয়ে অভিযোগ উত্থাপিত হইলে অভিযোগ তদন্ত করিয়া সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয়-এর নিকট সুপারিশ প্রেরণ;

(৫) টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে বীজ আলু উৎপাদনে বিদ্যমান সমস্যাসমূহ চিহ্নিত করা এবং সমাধানের জন্য সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয়-এর নিকট সুপারিশ প্রদান;

(৬) দেশে মানসম্পন্ন ও রোগমুক্ত বীজ আলু উৎপাদনের জন্য করণীয় বিষয়ে সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয়-এর নিকট সুপারিশ প্রদান;

৬. কমিটির পরিদর্শন ও সভা।—

(১) বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটির পরিদর্শন সভাপতি ও সদস্য সচিবসহ কমপক্ষে ৫জন সদস্যের প্রত্যক্ষ উপস্থিতিতে সম্পন্ন হইবে;

(২) সভাপতি বিশেষ অবদান রাখিতে সক্ষম এইরূপ কোনো বিশেষজ্ঞকে টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি পরিদর্শন অথবা কমিটির সভায় আমন্ত্রণ জানাইতে পারিবে;

(৩) সভাপতির সভাপতিত্বে কমিটির সভা অনুষ্ঠিত হইবে এবং কোনো বিষয়ে মতানৈক্য থাকিলে শুধুমাত্র সদস্যদের ভোটগ্রহণ সাপেক্ষে মীমাংসা হইবে;

(৪) কমিটির কোনো সদস্য অপারগ হইলে সভাপতির জ্ঞাতসারে তাঁহার পক্ষে ল্যাবরেটরি পরিদর্শন বা কমিটির সভায় অংশগ্রহণের জন্য একজন উপযুক্ত প্রতিনিধি প্রেরণ করিতে পারিবে;

৭. টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর শ্রেণি ও উৎস।—টিস্যু কালচার প্রযুক্তির মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর ৬টি শ্রেণি হইবে; যথা—

(১) **প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার** (Plantlet/Micro-Tuber)—প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার উৎপাদনের জন্য জাত উদ্ভাবনকারী প্রতিষ্ঠান হইতে প্রজনন বীজ/প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার/মিনি-টিউবার সংগ্রহ করিতে হইবে। প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার এর ক্ষেত্রে বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি কর্তৃক অনুমোদিত পত্রই বীজ প্রত্যয়ন ট্যাগ হিসাবে বিবেচিত হইবে;

(২) **মিনি-টিউবার** (Mini-Tuber)—মিনি-টিউবার বীজের উৎস হইবে প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার। মিনি-টিউবার এর ক্ষেত্রে বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি কর্তৃক অনুমোদিত পত্রই বীজ প্রত্যয়ন ট্যাগ হিসাবে বিবেচিত হইবে;

(৩) **প্রাক-ভিত্তি বীজ** (Pre-Foundation Seed)—প্রাক-ভিত্তি বীজের উৎস হইবে মিনি-টিউবার। প্রাক-ভিত্তি বীজ-এর ক্ষেত্রে বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি সাদা রংয়ের বীজ প্রত্যয়ন ট্যাগ প্রদান করিবে যেখানে 'প্রাক ভিত্তি বীজ' শব্দটি উল্লেখ থাকিবে;

(৪) **ভিত্তি বীজ** (Foundation Seed)—ভিত্তি বীজের উৎস হইবে প্রাক-ভিত্তি বীজ (Pre-Foundation Seed)। ভিত্তি বীজ-এর ক্ষেত্রে বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি সাদা রংয়ের বীজ প্রত্যয়ন ট্যাগ প্রদান করিবে;

(৫) **প্রত্যয়িত বীজ** (Certified Seed)—ইহা ভিত্তি বীজের বংশধর হিসাবে উৎপাদিত হইবে। প্রত্যয়িত বীজ-এর ক্ষেত্রে বীজ প্রত্যয়ন এজেন্সি নীল রংয়ের বীজ প্রত্যয়ন ট্যাগ প্রদান করিবে;

(৬) **মানঘোষিত বীজ** (Truthfully Labelled Seed)- যাহা ভিত্তি ও প্রত্যয়িত বীজের বংশধর হইবে। মানঘোষিত বীজের ধারকে নির্ধারিতভাবে বাজারজাতকারী প্রতিষ্ঠান কর্তৃক প্রদত্ত হলুদ রঙের ট্যাগ থাকিবে; যাহাতে প্রত্যয়িত শ্রেণির বীজের ট্যাগের অনুরূপ বীজমান ও অন্যান্য তথ্য উল্লেখ থাকিবে।

৮. টিস্যু কালচারের মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর মাঠমান এবং বীজমান (Field Standard and Seed Standard of Tissue Culture Seed Potato)

(ক) মাঠ মান (Field Standard)

ক্র.নং	মানদণ্ড/পরিমাপক	প্লান্টলেট/ মাইক্রোটিউবার	মিনিটিউবার	প্রাক-ভিত্তি বীজ	ভিত্তি বীজ	প্রত্যয়িত বীজ	মানঘোষিত বীজ
০১।	জাতের বিশুদ্ধতা (%)	১০০	১০০	১০০	১০০	৯৯.৫	৯৯.৫
০২।	অন্যান্য ফসল ও আগাছার সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
০৩।	আলুর অন্য জাতের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.২০	০.২০	০.২০
০৪।	পৃথকীকরণ দূরত্ব (মিটার)						
	ক) অবীজ আলু থেকে দূরত্ব	*	**	৩০	৩০	৩০	৩০
	খ) অন্য বেগুন গোত্রের ফসল থেকে দূরত্ব	*	**	১৫	১৫	১৫	১৫

ক্র.নং	মানদন্ড/পরিমাপক	প্লান্টলেট/ মাইক্রোটিউবার	মিনিটিউবার	প্রাক-ভিত্তি বীজ	ভিত্তি বীজ	প্রত্যয়িত বীজ	মানঘোষিত বীজ
০৫।	পিএলআরভি (PLRV) আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.৫০	২.০০	২.০০
০৬।	মোজাইক (PVY, PVA, PVM, PVS, PVX) আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	১.০০	৫.০০	৫.০০
০৭।	নাবী ধ্বসা (Late blight) আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.৫০	০.৫০	১.০০	৫.০০	৫.০০
০৮।	ব্যাকটেরিয়াল উইল্ট বা ব্রাউন রট (Bacterial wilt/Brown rot) আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
০৯।	ব্লাক লেগ (Black leg)/সফট্ রট (Soft rot) আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.৫০	১.০০	১.০০
১০।	রিং রট (Ring rot) *** আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
১১।	গোল্ডেন নেমাটোড (Golden Nematode) *** আক্রান্ত গাছের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০

বি:দ্র: ১। এই স্ট্যান্ডার্ডটি টিস্যু কালচারের মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর মাঠমান এবং বীজমান এর ক্ষেত্রে প্রযোজ্য। ২। প্লান্টলেট/মাইক্রো-টিউবার বীজের উৎস হইবে প্রজনন বীজ।

*ল্যাবরেটরিতে উৎপাদন; **গ্রীণ হাউজ/নেট হাউজে উৎপাদন; ***রিং রট এবং গোল্ডেন নেমাটোড রোগ বাংলাদেশে এখনো পরিলক্ষিত হয়নি।

Note:

1. PLRV= Potato Leaf Roll Virus
2. PVY= Potato Virus Y
3. PVS= Potato Virus S
4. PVM= Potato Virus M
5. PVA= Potato Virus A
6. PVX= Potato Virus X
7. Late blight = *Phytophthora infestans*
8. Bacterial wilt or Brown rot = *Ralstonia solanacearum*
9. Black leg and Soft rot = *Pectobacterium atrosepticum* (older synonym: *Erwinia carotovora subsp. astroseptica*), *Pectobacterium carotovorum* and *Dickeya dadantii*
10. Black scurf = *Rhizoctonia solani*
11. Common scab = *Streptomyces scabies*
12. Golden nematode = *Globodera rostochiennsis*
13. Ring rot = *Corynebacterium sopedomicum*

(খ) বীজ মান (Seed Standard)

ক্র. নং	মানদণ্ড/পরিমাপক	প্লান্টলেট/ মাইক্রো-টিউবার *	মিনি-টিউবার	প্রাক-ভিত্তি বীজ	ভিত্তি বীজ	প্রত্যয়িত বীজ	মানঘোষিত বীজ
০১।	অন্য জাত (Other Variety) কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.২০	০.২০	০.২০
০২।	পঁচা আলু (Rotten Tuber)						
	ক) ব্যাকটেরিয়াল উইল্ট বা ব্রাউন রট (Bacterial wilt or Brown rot) আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
	খ) অন্যান্য পঁচা আলু- নাবী ধ্বসা (Late blight), নরম পঁচা (Soft rot), শুকনা পঁচা (Dry rot) আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.১০	০.৫০	০.৫০

ক্র. নং	মানদণ্ড/পরিমাপক	প্লান্টলেট/ মাইক্রো-টিউবার *	মিনি-টিউবার	প্রাক-ভিত্তি বীজ	ভিত্তি বীজ	প্রত্যয়িত বীজ	মানঘোষিত বীজ
০৩।	কমন স্ক্যাব (Common scab)-(বীজের ত্বকে ১/৮ অংশ সুপারফিসিয়াল লেশন) (আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা %)	০.০০	০.০০	০.০০	৩.০০	৮.০০	৮.০০
০৪।	ব্লাক স্কার্ফ (Black scurf)/ রাইজোকটনিয়া (*Rhizoctonia*) (বীজের ত্বকে ১/৮ অংশ সুপারফিসিয়াল লেশন) আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	২.০০	৫.০০	৫.০০
০৫।	রিং রট (Ring rot) ** আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
০৬।	গোল্ডেন নেমাটোড (Golden Nematode) ** আক্রান্ত কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০	০.০০
০৭।	যেকোন ধরনের যান্ত্রিক ক্ষত (Mechanical damage) এবং সেকেন্ডারী গ্রোথ (Secondary growth) কন্দের সর্বোচ্চ সংখ্যা (%)	০.০০	০.০০	০.০০	০.১০	০.৩০	০.৩০
০৮।	বীজের আকার - গ্রেড এ: ২৫-৪০ মিমি ব্যাস, গ্রেড বি: ৪১-৫৫ মিমি ব্যাস - নির্ধারিত আকার বহির্ভূত বীজ শতকরা ৫ ভাগের বেশী হলে গ্রহণযোগ্য নয় - প্রকৃত আলুবীজ হতে উৎপাদিত বীজ আলু (টিউবারলেট) উল্লিখিত গ্রেডিং এর আওতাভুক্ত নয়	যে কোনো আকার	যে কোনো আকার	যে কোনো আকার	(গ্রেড-এ এবং গ্রেড-বি)	(গ্রেড-এ এবং গ্রেড-বি)	(গ্রেড-এ এবং গ্রেড-বি)

* প্লান্টলেট/ মাইক্রো-টিউবার বীজের উৎস হইবে প্রজনন বীজ।

**রিং রট এবং গোল্ডেন নেমাটোড রোগ বাংলাদেশে এখনো পরিলক্ষিত হয়নি।

বি:দ্র: এই স্ট্যান্ডার্ডটি টিস্যু কালচারের মাধ্যমে উৎপাদিত বীজ আলুর বীজমান এবং মাঠমান এর ক্ষেত্রে প্রযোজ্য।

'ফরম-ক'

বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি নিবন্ধনের আবেদন ফরম

(Application Form for the Registration of Seed Potato Tissue Culture Laboratory)

বরাবর

সচিব
জাতীয় বীজ বোর্ড
এবং মহাপরিচালক, বীজ অনুবিভাগ
কৃষি মন্ত্রণালয়
বাংলাদেশ সচিবালয়, ঢাকা-১০০০।

০১. আবেদনকারীর নাম (Name of Applicant) :

০২. প্রতিষ্ঠান/কোম্পানির নাম (Name of Organization/Company) :

০৩. বীজ ডিলার নিবন্ধন প্রত্যয়নপত্রের নম্বর ও তারিখ (Number and Date of Seed Dealer Registration Certificate):

০৪. যোগাযোগের ঠিকানা (Contact Address) :

(ক) অফিসের ঠিকানা (Office Address):

(খ) টেলিফোন/মোবাইল নম্বর (Telephone/Mobile Number) :

(গ) ইমেইল (Email) :

(ঘ) জাতীয় পরিচয়পত্র নম্বর (National ID Number) :

০৫. ল্যাবরেটরির ঠিকানা (Laboratory Address) :

০৬. টিস্যু কালচারের মাধ্যমে বীজ আলুর প্লান্টলেট উৎপাদন সক্ষমতা
(Seed potato plantlet production capability through Tissue Culture) :

০৭. ভৌত অবকাঠামোর ধরন ও পরিমাপের বিবরণ (Physical structure type and measurement) :

০৮. ল্যাবরেটরিতে প্লান্টলেট উৎপাদন পদ্ধতি
(Plantlet Production Techniques in Laboratories) :

০৯. ল্যাবরেটরিতে ব্যবহৃত যন্ত্রপাতি ও আসবাবপত্রের বিবরণ (Detail of Laboratory equipment & Furniture) :

১০. মাননিয়ন্ত্রণ ব্যবস্থাসমূহের বিবরণ (Detail of quality control systems) :

(ক) ল্যাবরেটরির অবকাঠামো

(খ) ল্যাবরেটরির রাসায়নিক দ্রব্যাদি

(গ) প্ল্যান্টলেট

১১. কারিগরি তত্ত্বাবধান এবং পরিবীক্ষণের জন্য জনবলের বিবরণ
(Manpower details for technical supervision and monitoring) :

১২. পরিবেশ বিষয়ক ছাড়পত্র আছে কিনা?
(Is there any environmental clearance certificate?)

আবেদনকারীর স্বাক্ষর (সীলসহ)
তারিখ: Signature of the Applicant (with Seal)

নির্দেশনা

১। আবেদনপত্রের সহিত বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি নিবন্ধন ফি বাবদ ২,০০০/- (দুই হাজার) টাকা চালানের মাধ্যমে কোড নম্বর : ১-৪৩৩৮-০০০০-২৬৮১ তে ব্যাংকে জমাদানপূর্বক চালানের মূলকপি পাঠাইতে হইবে;

২। আবেদন প্রাপ্তির পর 'বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি' নির্দেশিকা অনুযায়ী ল্যাবরেটরি পরিদর্শন ও মূল্যায়ন করিয়া সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড, কৃষি মন্ত্রণালয় বরাবর নিবন্ধনের জন্য সুপারিশ প্রদান করিবে;

৩। জাতীয় বীজ বোর্ডের পক্ষে সচিব, জাতীয় বীজ বোর্ড ও মহাপরিচালক, বীজ অনুবিভাগ, কৃষি মন্ত্রণালয়, কমিটির সুপারিশের ভিত্তিতে আবেদন অনুমোদন ও নিবন্ধনের প্রত্যয়নপত্র প্রদান করিবে;

৪। একই প্রতিষ্ঠান বা ব্যক্তি মালিকানায় একাধিক বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যবরেটরি থাকিলে প্রতিটি নিবন্ধনের জন্য আলাদা আলাদা আবেদন করিতে হইবে;

৫। নিবন্ধিত টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরিসমূহকে কৃষি মন্ত্রণালয়ের চাহিদা অনুযায়ী তথ্য সরবরাহ করিতে হইবে;

৬। 'বীজ আলুর টিস্যু কালচার ল্যাবরেটরি মূল্যায়ন কমিটি' যেকোনো সময়ে নিবন্ধিত ল্যাবরেটরি পরিদর্শন করিতে পারিবে এবং ল্যাবরেটরিতে যথাযথ মান অনুসরণ করা না হইলে নিবন্ধন বাতিলের সুপারিশ করিতে পারিবে।

Annexure – 1

FLOW CHART: MERISTEM CULTURE TECHNIQUE FOR VIRUS-FREE PLANTLET PRODUCTION LEADING TO TC-BASED SEED POTATO PRODUCTION

Sl. No.	Step	Activity
1	Sprouting of tuber	Induce sprouting of breeder grade seed tubers
2	Growing of plant	Raise plants in growth cabinet/ or in net-house
3	Collection of shoot tip	(a) Collect shoot tips and wash in distilled water containing few drops of Dettol and Tween 20 (b) Wash explants 2-3 times with distilled water
4	Disinfection of shoot tip	(a) Surface sterilize with 0.1% $HgCl_2$ for 5-8 minutes (b) Wash explants 4-5 times with sterile distilled water
5	Isolation of apical/axillary meristem *inside a Laminar Flow Cabinet*	Expose the meristem, and gently isolate the exposed meristem (*which looks like a dome*) under a stereomicroscope
6	Inoculation of Meristem *inside a Laminar Flow Cabinet*	Inoculate on agar MS medium solidified in test tube
7	Regeneration of plantlets	Incubate in culture room under fluorescent light (3-4 month)
8	**Virus indexing**	**Identify virus disease-free plantlets through ELISA test or Molecular test (DNA-PCR)**
9	Sub culturing/ micropropagation	Multiplication of virus-free plantlets through repeated sub-culturing of single node cuttings

Sl. No.	Step	Activity
10	Hardening of plantlets	Hardening of Plantlet outside of TC-lab as well as net-house beds or any other media like cocodust/ash etc.
11	Planting of plantlets in net-house beds and mini-tuber production	The hardened plantlet or cuttings taken from the hardened plantlets can be planted in net-house beds for the production of mini-tubers.
12	Production of pre foundation seed potato	Production of pre foundation seed potato from mini-tuber under the net house condition.
13	Production of Foundation seed potato	Production of foundation seed potato from pre foundation seed potato under open field condition.
14	Production of Certified seed potato	Production of Certified seed potatoes from foundation seed Potatoes through Contract grower farmer under open field Condition.

Annexure -2

FLOW CHART: MERISTEM CULTURE TECHNIQUE FOR VIRUS-FREE PLANTLET PRODUCTION LEADING TO TC-BASED SEED POTATO PRODUCTION

SEED TUBERS	▪ Surface sterilize of tubers for 10 minutes in 0.5% NaCl with drops of Tween 20 ▪ Wash and air dry
TUBER SPROUTING	Incubate at 18°C; TUBERS SPROUT within 7-10 days
GROWING OF PLANT	Sprouted tuber planted in net house/green house
COLLECTION OF SHOOT TIPS	Collection of shoot tips of 3-4 cm from the plants grown under net house/green house.
DISINFECTION OF SHOOT TIPS	▪ Briefly deep sprouts in 70% alcohol for 30 sec and wash with sterile distilled water ▪ Surface sterilize with 0.1% $hgcl_2$ for 5-10 minutes ▪ Wash explants 4-5 times with sterile distilled water
COLLECTION OF MERISTEM & INOCULATION	Collect of meristem with primordia from axillary buds within laminar airflow cabinet and inoculate it into artificial nutrient media/agar solidified MS media.
COMPLETE PLANTLET THROUGH REGENERATION	Incubate of inoculated meristem in the culture room under fluorescent light (2000 lux) at 25±2 °C for 3-4 months
VIRUS INDEXING	Virus indexing through ELISA & PCR Method
MICROPROPAGATION/ QUICK MULTIPLICATION	Nodal cutting/sub culturing of Virus free plantlet in laboratory
HARDENING OF PLANTLET	Hardening of Plantlet outside of TC-lab as well as net-house beds or any other media like cocodust/ash etc.
PRODUCTION OF MINITUBER	Production of mini tuber from plantlet/microtuber under Aphid protected net house/green house condition.
PRODUCTION OF PRE- FOUNDATION SEED POTATO	Production of pre- foundation Seed Potato from minituber under Aphid protected net house condition.
PRODUCTION OF FOUNDATION SEED POTATO	Production of foundation seed potato from pre-foundation Seed Potato under open field condition.

Annexure -3

LIST OF CHEMICALS COMMONLY USEDIN TISSUE CULTURE LABORATORY

1. Ammonium Nitrate (NH_4NO_3)
2. Potassium nitrate(KNO_3)
3. Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)
4. Sucrose
5. Agar
6. Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)
7. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
8. Potassium iodide (KI)
9. Boric acid (H_3BO_3)
10. Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)
11. Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)
12. diSodium molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$)
13. Cobalt chloride($CoCl_2.6H_2O$)
14. Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)
15. Sodium EDTA ($Na_2.EDTA.2H_2O$)
16. Nicotinic acid
17. Pyridoxine hydrochloride HCl, 99.0-100%
18. Thiamine hydrochloride HCl, 98.5-100%
19. L-Ascrobic acid
20. Ca-D-Pentothenate
21. Glycine
22. Myo-Inositol
23. lndole-3-acetic acid (IAA), 97%
24. Naphthalene acetic acid (NAA), 99%
25. 6-Benzylamino purine (BAP)
26. Kinetin 99%
27. Ethanol (absolute 100%)
28. Methanol (absolute 100%)
29. Calcium hypochlorite
30. Sodium hypochlorite
31. Sodium hydroxide
32. Hydrogen peroxide
33. Hydrochloric acid (HCI)
34. Mercuric chloride
35. Tween 20
36. Lysol

Annexure- 4

LIST OF COMMON EQUIPMENT AND GLASSWARE REQUIRED FOR A PROFESSIONAL TISSUE CULTURE LABORATORY

A. Media preparation equipment & glassware

Autoclave
Coarse balance for measuring in grams
Sensitive balance for measuring in milligrams
Distillation plant
Deep freezer
Refrigerator
Micro-wave oven
pH Meter
Hotplate with magnetic stirrer
Dispenser
Spatula
Metal/plastic racks
Basket
Wash bottle
Weighing bottle
Stirring bars and rod
Timer
Millipore filter system
Materials for closure of tubes or flasks
- Cotton plug
- Aluminum foil
- Metal caps plastic cap

Different types of glassware
- Measuring cylinder
- Volumetric flask
- Conical flask
- Bottle
- Screw neck reagent bottle
- Graduated bottle
- Petri dishes with cover
- Test tube
- Pipette
- Pipette pump
- Pipette holder etc.

B. Culture isolation equipment

- Laminar air flow cabinet
- Sprit lamp! hot bead
- Knives
- Scissors
- Forceps
- Scalpel
- Handle
- Scalpel blades
- Sterile petridish
- Hard board

C. General equipment

- Drying oven
- Drying rack
- Filter paper
- Gloves
- Tape (autoclavable)
- Trolley
- Detergent
- Brushes

D. For culture room

- Air condition
- Shelves
- Fluorescent tubes
- Timer
- Shaker

Annexure-5

COMPOSITION OF SELECTED PLANT TISSUE CULTURE MEDIA			
Compound	**Concentration (mg/L)**		
	White's	MS	B5
Inorganic			
NH_4NO_3	--	1650	--
KNO_3	80	1900	2527.5
$MgSO_4.7H_2O$	750	370	246.5
KH_2PO_4	--	170	--
$(NH_4)_2SO_4$	--	--	134
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300	--	--
Na_2SO_4	200	--	--
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	--	150
KCl	65	--	--
$CaCl_2.2H_2O$	--	440	150
Kl	0.75	0.83	0.75
H_3BO_3	1.5	6.2	3
$MnSO_4.H_2O$	5	22.3	--
$MnSO_4.H_2O$	--	--	10
$ZnSO_4.7H_2O$	3	8.6	2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	--	0.25	0.25
MoO_3	0.001	--	--
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	--	0.025	0.025
$Fe_2(SO4)_3$	2.5	--	--
$FeSO_4.7H_2O$	--	27.8	--
$Na_2.EDTA.2H_2O$	--	37.3	--
Sequestrene 330 Fe^4	--	--	28

Annexure -6

Composition of commonly used Murashiage and Skoog (MS) medium,1962

Components	Concentrations	
(Stock - 1) Macronutrients	mg/L	For 100 L
KNO_3	1900	190.00 g
NH_4NO_3	1650	165.00 g
KH_2PO_4	170	17.00 g
$MgSO_4, 7H_2O$	440	44.00 g
(Stock-2)		
$CaCl_2, 2H_2O$	370	37.00 g
(Stock-3) Micronutrients		
$FeSO_4, 7H_2O$	27.8	2.78 g
Na_2-EDTA	37.3	3.73 g
(Stock-4)		
$MnSO_4, 4H_2O$	22.0	2.20 g
H_3BO_3	6.2	0.62 g
$ZnSO_4, 4H_2O$	8.6	0.86 g
KI	0.83	0.083 g
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0.25	0.025 g
$CuSO_4, 5H_2O$	0.025	0.0025 g
$CoCl_2, 6H_2O$	0.025	0.0025 g
(Stock-5) Vitamins		
Glycine	2.00	0.200 g
Nicotinic acid	0.50	0.050 g
Pyridoxine-HCl	0.50	0.050 g
Thiamine-HCl	0.10	0.010 g
Myo-inositol	100.0	10.00 g

Annexure -7

MERISTEM CULTURE TECHNIQUE

Meristem culture

Meristem culture technique involves isolation and in vitro culture of shoot apices containing the apical dome with a few primordial leaves. In this method virus-free planting materials can be produced by micro section of the growing point, nourished in artificial media under controlled environment. This method is also known as apical-tip culture, shoot-tip culture or culture of shoot apices. Apical meristems are highly organized yet undifferentiated tissue of around 90-110 cells that are capable of rapid multiplication.

Advantages of meristem culture

Meristem culture is a specialized technique of plant tissue culture for generation of virus free plantlets for the following reasons:

- Generally healthy and vigorous shoot tips are selected resulting in rejuvenation of the plant.
- Virus particles within the plant system are translocated by the vascular system. Since the

  Meristems are devoid of vascular connections virus particles can hardly reach meristem.
- Virus particles invading meristems by chance cannot sustain there because of the very high concentration of growth hormones and other biochemical substances in the meristematic dome.
- Meristemic zones are covered with folds of leaf primordia which protect them from infection by insect vectors visiting the plant.
- Plant growth results from very rapid division of meristems and generally any invading microorganism cannot make pace with this rate of multiplication leaving the meristem free from infections.

A PRACTICAL PROTOCOL FOR PRODUCTION OF POTATO PLANTLET

In vitro culture using apical meristem of potato for shoot proliferation and root induction in MS medium supplemented with different types and concentration of phytohormones can produce virus free potato plantlets. The technique used for primary establishment of meristem culture is described below.

Explant Collection and Preparation

- Grow potato plants preferably either in the growth chamber or other controlled conditions.
- Excise shoot tips of 25-35 days old potato plants with the help of a sharp blade; collect shoot

  tips in a bottle containing distilled water with few drops of Detol and few drops of Tween-20 (Polyoxyethylene-20), and quickly bring to the laboratory.
- Wash the explants 2-3 times with gradual change of sterile distilled water.
- Carry out surface sterilization, meristem isolation and inoculations, and other aseptic manipulations (including sub culture) in a running laminar airflow cabinet.

Switch on the cabinet half an hour before use and clean with 70% ethyl alcohol to reduce the chances of contamination. Cover all instruments (scalpels, needle, forceps, tiles, petri dishes etc.) with aluminum foil and sterilize using the steam sterilization method. While working, sterilize these instruments periodically using 70% ethyl alcohol dip and the flaming method inside the inoculation chamber. To ensure complete aseptic condition wipe both hands with 70% ethyl alcohol.

Surface Sterilization of Explants

- Within a running laminar airflow cabinet, transfer explants to a 250 ml sterilized conical flask.
- Surface sterilize the explants by dipping in 0.1% HgCl2 solution with gentle shaking for 2-8

  minutes followed by 3-5 times washing with sterile distilled water.

Isolation of Meristem

- After sterilization place the explants on the sterile tiles using sterile forceps. Hold the shoot tip in one hand under the stereo-microscope with the help of a pair offorceps and snap the immature leaves and leaf primordia with slight pressure from the needle.
- Then gently isolate the exposed meristem tip that appears as shiny dome with a sharp blade.

Inoculation Technique

- After deplugging of culture tubes, very carefully place a single excised meristem tip (0.3 mm) on the 'M' shape filter bridge of the culture tubes containing liquid MS medium supplemented with different kinds of plant growth regulators for the establishment df primary meristem.
- Flame the neck of the tubes with sprit lamp and then plug. After inoculation, label the culture tubes by glass marker.
- The culture tubes are ready for incubation.

রাষ্ট্রপতির আদেশক্রমে

আশ্রাফ উদ্দিন আহমেদ
মহাপরিচালক, বীজ অনুবিভাগ।

মোঃ তারিকুল ইসলাম খান, উপপরিচালক, বাংলাদেশ সরকারী মুদ্রণালয়, তেজগাঁও, ঢাকা কর্তৃক মুদ্রিত।
মোঃ আব্দুল মালেক, উপপরিচালক, বাংলাদেশ ফরম ও প্রকাশনা অফিস, তেজগাঁও,
ঢাকা কর্তৃক প্রকাশিত। website: www.bgpress.gov.bd