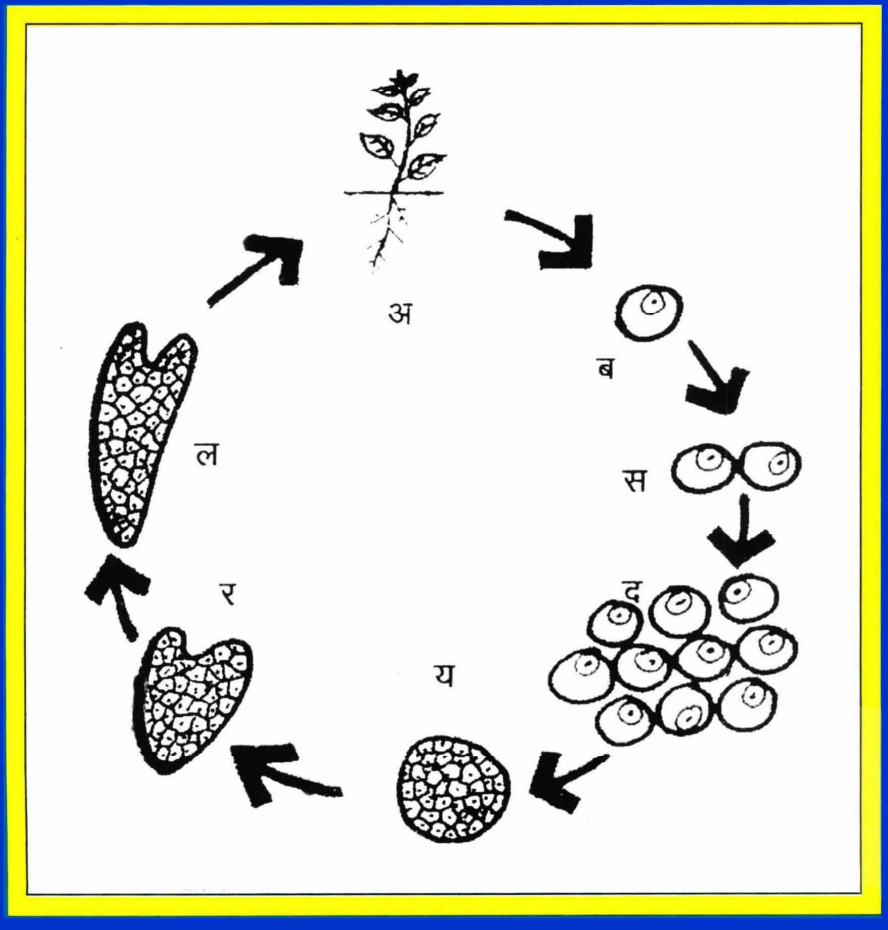
BT-06

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा



पादप जैवप्रौद्योगिकी



वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

पादप जैवप्रौद्योगिकी

पाठ्यक्रम अभिकल्प समिति

अध्यक्ष

प्रो. नरेश दाधीच

कुलपति

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा(राजस्थान)

संयोजक/ समन्वयक एवं सदस्य

संयोजक

प्रो. एच. सी. जैन (से. नि.)

वनस्पति शास्त्र विभाग

राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

सदस्य सचिव / समन्वयक

डॉ. अशोक शर्मा

एसोसियेट प्रोफेसर

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

सदस्य

1. **प्रो. एस. चाँद**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   लखनऊ विश्वविद्यालय, लखनऊ (उ.प्र.)
2. **प्रो. आर. सी. दुबे**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   गुरुकुल काँगड़ी विश्वविद्यालय, हरिद्वार(उत्तराखण्ड)
3. **प्रो. के. के. शर्मा**
   विभागाध्यक्ष, प्राणीशास्त्र विभाग
   महर्षि दयानन्द सरस्वती विश्वविद्यालय अजमेर,(राज.)
4. **प्रो. पी. एल. स्वर्णकार**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)
5. **प्रो. एस. डी. पुरोहित**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   मोहनलाल सुखड़िया विश्वविद्यालय, उदयपुर (राज.)
6. **प्रो. सी. के. ओझा**
   निदेशक अकादमिक
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)
7. **डॉ. विद्या पाटनी**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)
8. **डॉ. अरविन्द पारीक**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

संपादन एवं पाठ्यक्रम-लेखन

संपादक

प्रो. एच. सी. जैन (से. नि.)

वनस्पति शास्त्र विभाग

राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

लेखक

1. **डॉ. अरविन्द पारीक**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)
2. **डॉ. एकता मेंघानी**
   जैवप्रौद्योगिकी विभाग
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)
3. **डॉ. प्रमिला शर्मा**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   स्टेनी मेमोरियल महाविद्यालय, जयपुर
4. **डॉ. रिछपाल**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   बलदेवराम मिर्धा पी.जी.महाविद्यालय नागौर
5. **डॉ. सतीश कुमार**
   जैवप्रौद्योगिकी विभाग
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

अकादमिक एवं प्रशासनिक व्यवस्था

प्रो.(डॉ.) नरेश दाधीच	**प्रो.(डॉ.) अनाम जेटली**	**प्रो.(डॉ.) पी. के. शर्मा**
कुलपति	निदेशक	निदेशक
वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय,कोटा	संकाय विभाग	पाठ्य सामग्री उत्पादन एवं वितरण विभाग

पाठ्यक्रम उत्पादन

योगेन्द्र गोयल

सहायक उत्पादन अधिकारी

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

उत्पादन : जनवरी 2009

इस सामग्री के किसी भी अंश को व.म.खु.वि. कोटा की लिखित अनुमति के बिना किसी भी रूप में अथवा मिमियोग्राफी(चक्रमुद्रण) द्वारा या अन्यत्र पुनः प्रस्तुत करने की अनुमति नहीं है।

व.म.खु.वि. कोटा के लिये कुलसचिव व.म.खु.वि. कोटा (राज.) द्वारा मुद्रित एवं प्रकाशित

अनुक्रमणिका

क्रम सं.	इकाई का नाम	पृष्ठ संख्या
1.	पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत संकल्पनायें तथा इतिहास	8–29
2.	पादपों में कायिका भ्रूणोद्भवन तथा कोशिका संवर्धन	30–45
3.	प्रोटोप्लास्ट विलगन तथा संवर्धन	46–64
4.	अगुणित पादप संवर्धन	65–77
5.	पात्रे परागण तथा भ्रूण संवर्धन	78–90
6.	सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक	91–107
7.	सूक्ष्म प्रवर्धन के अनुप्रयोग	108–121
8.	पादप जैवप्रौद्योगिकी की विधियाँ	122–132
9.	पादप ऊतक संवर्धन के अनुप्रयोग	133–145
10.	द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-I : एक परिचय	146–164
11.	द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-II : उत्पादन	165–187
12.	द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-III : वृहत् उत्पादन	188–206
13.	द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-IV : औद्योगिक यौगिक	207–223
14.	पादप जैवप्रौद्योगिकी में आण्विक तकनीक	224–235
15.	पराजीनी पादप	236–271

प्रस्तावना

यह पुस्तक वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा के बी. एससी. द्वितीय वर्ष, जैवप्रौद्यौगिकी द्वितीय प्रश्न पत्र के पाठ्यक्रमानुसार लिखी गई है।

वर्तमान समय में जैवप्रौद्यौगिकी के बढ़ते उपयोग के साथ-साथ पादप जैवप्रौद्यौगिकी के अन्तर्गत हुये अनुसंधानो ने मानव जीवन को बेहतर बनाने में महती भूमिका अदा की है । पादप जैवप्रौद्यौगिकी ने न सिर्फ मानव को खाद्य सुरक्षा प्रदान करने में महत्वपूर्ण भूमिका अदा की है। बल्कि चिकित्सकीय महत्व के द्वितीयक मेटाबोलाइटों के उत्पादनों में भी अनेकों नवीन शोध हुए है। प्रस्तुत पुस्तक पादप जैवप्रोद्यौगिकी के विभिन्न आयामों को विद्यार्थियों के समक्ष समेकित रूप में रखने का प्रयास है।

पुस्तक की भाषा यथासंभव सरल और सारगर्भित रखी गई है। तकनीकी हिंदी शब्द, भारत सरकार द्वारा प्रकाशित पारिभाषिक वैज्ञानिक शब्दावली से लिए गए हैं। यथास्थान कोष्ठक में अंग्रेजी शब्द भी दिए गए है जो विद्यार्थी के लिए उपयोगी सिद्ध होंगे ।

पुस्तक को यथासंभव त्रुटिरहित रखने का प्रयास किया गया है। फिर मानव स्वभाव जनित त्रुटियां रहना संभव है। विद्धजनों से इस हेतु सुझाव आमंत्रित है।

लेखकगण

इकाई 1

पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत संकल्पनायें तथा इतिहास (BASIC CONCEPTS AND HISTORY OF PLANT TISSUE CULTURE)

इकाई की रूपरेखा

1.0 उद्देश्य

1.1 प्रस्तावना

1.2 एतिहासिक परिप्रेक्ष्य

1.3 पादप ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त

1.4 पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक

- 1.4.1 उचित पोषक माध्यम को तैयार करना
- 1.4.2 कर्तोत्तकों का चयन
- 1.4.3 कर्तोत्तकों का निर्जर्मीकरण
- 1.4.4 निवेशन/स्थानान्तरण
- 1.4.5 ऊष्मायन
- 1.4.6 पुनरुदभवन
- 1.4.7 अनुकूलन
- 1.4.8 पादप स्थानान्तरण

1.5 सतही निर्जर्मीकरण

- 1.5.1 ग्लासवेयर संवर्धन पात्र आदि का निर्जर्मीकरण
- 1.5.2 उपकरणों व औजारों का निर्जर्मीकरण
- 1.5.3 संवर्धन कक्ष तथा स्थानान्तरण क्षेत्र का निर्जर्मीकरण
- 1.5.4 पोषक माध्यम का निर्जर्मीकरण
- 1.5.5 पादप व पादप अंगों का निर्जर्मीकरण

1.6 निर्जर्मी ऊतक स्थानान्तरण

1.7 कोशिका की शक्तता का सिद्धान्त

1.8 अंतःपात्रे कोशिका की पोषण आवश्यकतायें-

1.9 विभिन्न प्रकार के पोषक माध्यम

- 1.9.1 पोषक माध्यम का संघटन

1.10 सारांश

1.11 बोध प्रश्नों के उत्तर

1.12 अभ्यासार्थ प्रश्न

1.13 शब्दावली

1.14 संदर्भ ग्रन्थ

1.0 उद्देश्य (Objective):

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप पादप ऊतक संवर्धन से सम्बन्धित निम्नलिखित तथ्यों के विषय में जानकारी प्राप्त कर सकेंगे-

- पादप ऊतक संवर्धन क्या है ?
- पादप ऊतक संवर्धन का ऐतिहासिक परिप्रेक्ष्य ।
- कोशिका एवं ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक ।
- सतही निर्जर्मीकरण की विधियाँ एवं उनका उपयोग ।
- पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले विभिन्न पोषक माध्यमों का रासायनिक संघटन।

1.1 प्रस्तावना (Introduction) :

पादप ऊतक संवर्धन जैव प्रौद्योगिकी की एक अत्यन्त उपयोगी तकनीक है । इस तकनीक का उपयोग कर आर्थिक रुप से महत्त्वपूर्ण अनेक पादप प्रजातियों का कृत्रिम संवर्धन करने में सफलता प्राप्त हुई है । इस तकनीक से ऐसी अनेक पादप प्रजातियों में प्रजनन संभव हो गया है जो किन्हीं कारणोंवश प्राकृतिक प्रजनन करने में विफल रहते हैं । पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का महत्त्वपूर्ण योगदान पादपों की उन्नत प्रजातियों का विकास करने में हुआ है । आज प्रमुख खाद्यान्नों, फलों, औषधीय पादपों तथा अन्य अनेक प्रकार के पादपों की उन्नत प्रजातियों का ऊतक संवर्धन सफलतापूर्वक किया जा रहा है । अनेक ऐसे पादप जो रोग अथवा संक्रमण के कारण स्वस्थ पौधों के रुप में विकसित नहीं हो पाते हैं उन्हें भी पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से स्वस्थ पौधों में परिवर्धित किया जा सकता है । पादपों में जीन स्थानान्तरण करके उन्नत प्रजातियों का विकास करने में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक एक वरदान सिद्ध हुई है ।

1.2 ऐतिहासिक परिप्रेक्ष्य (Historical Background):

पादप ऊतक संवर्धन के तकनीकी पहलुओं को जानने एवं समझने से पूर्व इसके विकास के इतिहास का पूर्वावलोकन कर लेना लाभदायक होगा । वस्तुत: पादप ऊतक संवर्धन तकनीक के रुप में विकसित होने से पूर्व वैज्ञानिकों को मात्र कोशिका की संरचना एवं पादपों की आधारीय प्रजनन विधियों के विषय में थोड़ी बहुत जानकारी थी । ऐसा माना जाता है कि **'हेनरी-लुई दुहामेल ड्यूमॉन्स्यू' (Henri-Louis Duhamel du Monceau, 1756)** ने सर्वप्रथम पौधों के क्षतिग्रस्त भागों का उपचार स्वत: उत्पन्न हुये कैलस (callus) की सहायता से प्रारम्भ किया । कैलस कोशिकाओं का असंगठित समूह होता है (Callus is unorganized mass of cells) । कोशिका एवं ऊतक संवर्धन की विज्ञान में उल्लेखनीय प्रगति **श्लेडन एवं श्वान (Schleiden and Schwann, 1939)** के द्वारा 'कोशिका ' को प्रतिपादित किये जाने के बाद से हुई । **वोक्टिंग (Vochting, 1878)** ने अपने प्रयोगों की सहायता से सुझाया कि पादपों के खण्डों को विकसित होने में ध्रुवता एक विशेष भूमिका का निर्वाह करती है। उन्नीसवीं शताब्दी के दौरान तने के कटे हुये टुकड़ों तथा मूल शीर्ष से कैलस के विकास का विचार अस्तित्व में आया। सन् 1902 में जर्मन वनस्पतिशास्त्री **गौटलीब हेबरलैंट (Gottlieb Haberandt**) ने कृत्रिम स्थितियों में ट्रैडेस्कैन्शिया (Tradescantia) की कोशिकाओं के संवर्धन की संकल्पना विकसित की

। यद्यपि उन्हें प्रारम्भ में अपने प्रयोगों में सफलता प्राप्त नहीं हुई तथापि अपने सतत् प्रयासों से उन्होंने कुछ पौधों की **मीजोफिल कोशिकाओं** (mesophyll cells), **अधिचर्म कोशिकाओं** (epidermal cells) तथा **रोम कोशिकाओं** (hair cells) के संवर्धन में आंशिक सफलता प्राप्त की । उनके उल्लेखनीय तथा विशिष्ट योगदान के लिये हैबरलैंट को **'ऊतक संवर्धन का पिता'** (Father of Tissue culture) के रुप में सम्मानित किया जाता है ।

हैबरलैंट के द्वारा पादप ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में प्रारम्भिक सफलता प्राप्त किये जाने से वैज्ञानिकों में एक नये उत्साह क्रा संचार हुआ और इस दिशा में अनेक प्रयास किये गये । सन् 1902 से 1930 तक प्रमुख रुप से अंग संवर्धन (organ culture) की तकनीक को विकसित करने का प्रयास किया गया । **हैन्निग (Hannig,1904)** ने सरसों कुल के कुछ पौधों (crucifers) के भ्रूण को विच्छेदित करके उन्हें सफलतापूर्वक शर्करा एवं खनिज लवणों से युक्त माध्यम पर संवर्धित किया। 1930 के पश्चात् अमेरिका के **आर.पी. व्हाइट (R.P. White)** तथा फ्राँस से **गौथ्रे व नोबरकोर्ट (Gautheret and Nobercourt)** ने अलग-अलग प्रयोगों में अनेक पादपों के विच्छेदित ऊतकों को एक लम्बे समय तक संवर्धित करने में उल्लेखनीय सफलता प्राप्त की । सन् 1940 से 1970 की अवधि पादप ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में विशेष उन्नति के लिये जानी जाती है । इस दौरान विभिन्न प्रकार के ऊतक संवर्धन जैसे - कोशिका, ऊतक आदि के लिये पोषक माध्यमों का संघटन किया गया । अनेक पादपों के ऊतकों को पोषक माध्यम पर संवर्धित करके सफलतापूर्वक संपूर्ण पादपों का पुनरुद्भवन प्राप्त किया गया जिसे अंतःपात्रे संरचना विकास (in vitro morphogenesis) के रूप में जाना जाता है ।

पादप ऊतक संवर्धन की दृष्टि से सन् 1958 को महत्त्वपूर्ण वर्ष के रुप में जाना जाता है । इस वर्ष **एफ.सी. स्टीवार्ट (F.C.Stewart)** तथा **जे. रेनर्ट (J. Reinert)** ने गाजर (Daucus carota) में भ्रूणजनक (embryogenic) कैलस के द्वारा अनेक पूर्ण पादपों का पुनरुद्भवन प्रदर्शित किया । **जी. एम. मोरल (G.M. Morel)** ने सन् 1760 में पादप ऊतक संवर्धन की प्रथम व्यवसायिक इकाई की आधारशिला रखी । उन्होंने बड़े पैमाने पर आर्किड (Cymbidium) के क्रत्तक, गुणन को प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की । पादप ऊतक संवर्धन में वृद्धि हार्मोनों की विशेष भूमिका की खोज **स्कूग** व उनके सहयोगियों (Skoog and coworkers) ने की जिससे पादप ऊतक संवर्धन को एक तीव्र गति प्राप्त हुई । इसी समय **मिलर** (Miller, 1955) ने एक प्रमुख वृद्धि हार्मोन काइनेटिन (Kinetin) की खोज की । यह वृद्धि हार्मोन पादप ऊतक संवर्धन माध्यम के एक प्रमुख घटक के रूप में प्रयोग में लाया जाता है । **स्कूग तथा मिलर** (Skoog and Miller,1975) ने संवर्धन माध्यम में ऑक्सिन (auxin) तथा साइटोकाइनिन(cytokinin)के अनुपात का समायोजन करके कैलस संवर्धन में अंगोद्भवन (organogenesis) की परिकल्पना को विकसित किया । पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले एक उत्कृष्ट माध्यम का संश्लेशण **मुराशिगे तथा स्कूग (Murashige and skoog, 1962)** ने किया । वस्तुतः इस माध्यम का विरचन तम्बाकू में पादप ऊतक संवर्धन के लिये किया गया था, परन्तु इसे अनेकानेक पादप प्रजातियों के ऊतक संवर्धन के अनुकूल माना गया है । वर्तमान में इसे एम.एस. माध्यम **(M.S. Medium)** के नाम से जाना जाता है । तरल माध्यम में कोशिका संवर्धित की शुरुआत मूर **(Muir,1953)** के द्वारा की गई । उन्होंने एकल कोशिकाओं को तरल माध्यम में संवर्धित करने की तकनीक सफलतापूर्वक विकसित की । इस क्षेत्र में उल्लेखनीय सफलता सन् 1960

में मिली, जब **ई.सी. कोकिंग(E.C. Cocking, 1960)** ने प्रोटोप्लास्ट संवर्धन की तकनीक का सफलतापूर्वक प्रदर्शन किया । उन्होंने पाया कि कोशिका संवर्धन में कोशिका भित्ति (cell well) एक अवरोध का कार्य करती है । इस कोशिका भित्ति को कुछ विकरों जैसे सैलुलेज तथा पैक्टिनेज से नष्ट करके प्रोटोप्लास्ट को प्राप्त किया गया । प्रोटोप्लास्ट को तरल संवर्धन माध्यम में संवर्धित करके नये पादप ऊतकों का निर्माण करने में उल्लेखनीय सफलता प्राप्त की गयी । इसी समय पादपों के छोटे-छोटे भागों कर्तोत्तक (explants=excised parts of plants) को संवर्धित करने की दिशा में विशेष अध्ययन किया गया । दिल्ली विश्वविद्यालय के वैज्ञानिकों **शिप्रा गुहा** तथा **एस.सी. महेश्वरी (Shipra Guha and S.C. Maheshwari, 1964)** ने सर्वप्रथम धतूरा (Datura) में परागकोष संवर्धन को सफलतापूर्वक प्रदर्शित किया ।

भारतवर्ष में पादप ऊतक संवर्धन का कार्य 1950 के दौरान दिल्ली विश्वविद्यालय के वनस्पतिशास्त्र विभाग में प्रारम्भ हुआ । इस विभाग के महान वनस्पतिशास्त्री **पंचानन महेश्वरी** (P. Maheshwari) जिन्हें भारत में 'पादप भ्रौणिकी के पिता' (Father of embryology) के रुप में सम्मानित किया जाता है, ने पादप ऊतक संवर्धन के कार्य को प्रारम्भ किया। इस दौरान अण्डाशय, भ्रूण, भ्रूणपोष, बीजाण्ड आदि के संवर्धन की अनेक विधियां विकसित की गई । इसी विश्वविद्यालय के **शिप्रा गुहा** तथा **एस.सी. महेश्बरी (Shipra Guha and S.C. Maheshwari, 1964-1967)** ने सर्वप्रथम धतूरा में परागकोष तथा परागकण संवर्धन के द्वारा अगुणित पौधों का निर्माण किया । अगुणित पौधों का विकास पादप ऊतक संवर्धन में एक उल्लेखनीय उपलब्धि के रुप में जाना जाता है ।

पादप ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में उल्लेखनीय प्रगति, संवर्धन माध्यम के संगठन के विकास के द्वारा ही संभव हुई है । पादप ऊतक संवर्धन की अनेक तकनीकों का विकास होने से वर्तमान में सूक्ष्म संवर्धन द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उत्पादन, रोगाणु-मुक्त पादपों का निर्माण आदि कार्य विस्तृत पैमाने पर किये जा रहे हैं । पादप ऊतक संवर्धन का विशेष योगदान आनुवांशिक रुपान्तरण, अंतःपात्रे परागण (in vitro pollination), कायिक संकरण (somatic hybridization), अगुणित पादपों का संवर्धन तथा पराजीनीय पादपों (transgenic plants) के निर्माण के क्षेत्र में रहा है ।

बोध प्रश्न

1. पादप ऊतक संवर्धन को परिभाषित कीजिये ।

   .....

2. कैलस से आप क्या समझते है ?

   .....

3. किस वैज्ञानिक को 'पादप ऊतक संवर्धन के पिता' के रूप में जाना जाता है ?

   .....

4. सर्वप्रथम भ्रूणजनन की प्रक्रिया का प्रायोगिक प्रदर्शन किस पादप में एवं किन वैज्ञानिकों ने किया?

   .....

5. वृद्धि हॉर्मोन काइटिन की खोज किसने की?

   .....

6. प्रोटोप्लास्ट को परिभाषित कीजिये ।

.....

7. पादप ऊतक संवर्धन में ई.सी कोकिंग का क्या योगदान है?

.....

8. परागकोष संवर्धन का प्रदर्शन सर्वप्रथम किसने किया?

.....

1.3 पादप ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त शब्दावली (Terminology used in plant tissue culture):

- **अपस्थानिक (Adventitious) -** पादप ऊतक संवर्धन में जब प्ररोह तथा मूलों की उत्पत्ति कैलस अथवा अयुग्मनजीय भ्रूण से हो तो इसे अपस्थानिक कहते हैं ।
- **अगार (Agar) -** शैवाल से प्राप्त एक बहु शर्करा जिसे सामान्यत पादप ऊतक संवर्धन माध्यम में एक जैलकारक पदार्थ के रूप में प्रयोग किया जाता है ।
- **पुमंगोदभवन (Androgenesis) -** नर युग्मकोद्भिदों से पादपों का परिवर्धन ।
- **परागकोश संवर्धन (Anther Culture) -** विच्छेदित परागकोशों का संवर्धन । यह तकनीक अगुणित पादपों के निर्माण के लिये प्रयोग की जाती है ।
- **शीर्ष (Apex) -** सिरा । पादपों में प्ररोह तथा मूल शीर्ष ।
- **शीर्ष विभज्योत्तक (Apical culture) -** प्ररोह तथा मूल शीर्ष पर स्थित विभज्योतक कोशिकाओं का समूह।
- **अपूयन सवर्धन (Aseptic Culture) -** किसी ऊतक अथवा अंग को जीवाणु कवक तथा अन्य सूक्ष्मजीवों से मुक्त करने के पश्चात् संवर्धन तैयार करना ।
- **अपूयन तकनीक (Aseptic Technique)-** कोशिका, ऊतक व अंग संवर्धन में जीवाणु कवक व अन्य सूक्ष्मजीवों को रोकने के लिये प्रयोग की जाने वाली तकनीक ।
- **ऑक्सिन (Auxins) -** पादप वृद्धि हॉमोर्नो का एक वर्ग जो कोशिकाओं की लम्बाई में वृद्धि, शीर्षस्थ प्रभाविता, मूल प्रेरण आदि के लिये उत्तरदायी है । IAA, IBA, NAA, 2,4-D आदि प्रमुख ऑक्सिन है जो पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाते हैं ।
- **असंदूषित संवर्धन (Axenic Culture) -** ऐसा संवर्धन जिसमें अवांछित जीव नहीं हो । इस संवर्धन के अन्तर्गत उद्देश्यपूर्ण कोशिका, ऊतक व अंग की संवर्धन तकनीक सम्मिलित की जाती है ।
- **बैच या भागश: संवर्धन (Batch Culture) -** एक निश्चित मात्रा में लिये गये तरल पोषक माध्यम पर तैयार किये गये निलंबित संवर्धन ।
- **कैलस (Callus) -** अंतःपात्रे संवर्धन अथवा प्रकृति में बनने वाला अविभेदित कोशिकाओं का समूह जिसमें संरचनात्मक व कार्यात्मक विभिन्नता नहीं होती है ।
- **कोशिका संवर्धन (cell Culture) -** एकल कोशिकाओं अथवा एक जैसी कोशिकाओं के छोटे समूहों का संवर्धन । कोशिका संवर्धन में कोशिकायें ऊतक के रूप में संगठित नहीं होती है ।

- **क्लोनीय प्रवर्धन (Clonal Multiplication) -** अंत: पात्रे स्थितियों में पादपों का प्रवर्धन जिनमें आनुवांशिक एकरूपता पाई जाती है । ये पादप प्राय: एक ही कर्तोत्तक अथवा कोशिका से उत्पन्न होते हैं ।
- **कृत्तक (Clone) -** एक ही कर्तोत्तक से उत्पन्न होने वाले जीनीय एकरूप पौधे ।
- **संदूषक (Contaminants) -** सूक्ष्मजीव जो संवर्धन में कोशिकाओं अथवा ऊतकों की वृद्धि को अवरोधित करते हैं ।
- **संवर्धन (Culture) -** निर्जर्म परिस्थितियों में, पोषक माध्यम पर कोशिकाओं, ऊतकों, पादप अंगों अथवा पूर्ण पादपों को तैयार करना । उदा. कोशिका संवर्धन, भ्रूण संवर्धन, प्ररोह-शीर्ष संवर्धन, परागकोष संवर्धन आदि ।
- **साइटोकाइनिन (Cytokinins) -** एडिनीन व्व्युत्पन्नों वाले पादप वृद्धि हार्मोनों का एक प्रकार । उदा. काइनेटिन बेंजाइलअमीनों प्यूरीन, नियाटिन आदि । ये कोशिका विभाजन, कोशिका विभेदन, प्ररोह विभेदन तथा शीर्ष प्रभाविता को रोकने का कार्य करते हैं ।
- **भ्रूण संवर्धन (Embryo Culture) -** परिपक्व अथवा अपरिपक्व बीजों से विच्छेदित भ्रूण का संवर्धन ।
- **भ्रूणोदभवन (Embryogenesis) -** बीज अथवा ऊतक संवर्धन में भ्रूण के आरंभन व परिवर्धन की प्रक्रिया ।
- **भ्रूणाभ (Embryoid) -** युग्मनजीय भ्रूण के समान संरचना । कायिक कोशिकाओं के विभाजन से यह संरचना ऊतक संवर्धन के दौरान बनती है ।
- **कर्तोत्तक (Explant) -** संवर्धन को आरम्भ करने हेतु प्रयोग किया जाने वाला पादप अंग अथवा ऊतक ।
- **जिबरेलिन (Gibberellins) -** पादप वृद्धि हॉर्मोनों का एक समूह जो कोशिकाओं की वृद्धि को प्रेरित करते हैं ।
- **वृद्धि नियंत्रक (Growth Regulators) -** कार्बनिक यौगिक जो अल्पमात्रा में वृद्धि, विभेदन तथा गुणन को प्रभावित करते हैं । उदा. ऑक्सिन, साइटोकाइनिन इथायलीन तथा जिबरेलिन ।
- **हेबिचएशन या अभ्यस्तन** (Habituation) - हॉर्मोनों की उपस्थिति में लम्बे समय तक व्रद्धि करते रहने के बाद कोशिकाओं का पोषक माध्यम पर बिना हॉर्मोनों के प्रेरण की वृद्धि करने की क्षमता।
- **अगुणित (Haploid) -** कोशिका अथवा केन्द्रक जिसमें गुणसूत्रों का एक ही युग्म पाया जाता है।
- **अनुकूलन (Hardening) -** हरित आवास अथवा शस्य परिस्थितियों में पादप ऊतक संवर्धन से प्राप्त पादपों का क्रमिक अनुकूलन ।
- **अंत:जीवे (In vivo) -** शाब्दिक अर्थ - जीव में । जीवित प्राणियों में होने वाली कोई प्रक्रिया ।
- **अंत:पात्रे (In vitro) -** शाब्दिक अर्थ - पात्र में । अपूयित संवर्धन के लिये प्रयोग किया जाने वाला शब्द ।
- **अंतःपात्रे प्रवर्धन (In vitro Propagation) -** नियंत्रित वातावरण में कृत्रिम पोषक माध्यम पर पादपों का संवर्धन।
- **प्रेरण (Induction) -** किसी प्रक्रिया अथवा संरचना का आरम्भन ।

- **संरोप (Inoculum) -** निलंबित संवर्धन के पुनःसंवर्धन हेतु लिया गया एक भाग अथवा आयतन।
- **विभज्योतक संवर्धन (Meristem Culture) -** प्ररोह शीर्ष का लगभग 0.1 मिली.मी. सूक्ष्म भाग जिसका संवर्धन कराया जाता है ।
- **मेरिसटेमोइड (Meristemoid) -** कैलस में उत्पन्न होने वाला विभज्योतक कोशिकाओं का एक स्थानिक समूह जो प्ररोह अथवा मूल का निर्माण करने में सक्षम होता है ।
- **सूक्ष्म प्रवर्धन (Micropropagation) -** अंतःपात्रे स्थिति में पादपों का अलैंगिक अथवा कायिक प्रवर्धन ।
- **पर्वसंधि (Node) -** स्तम्भ का वह भाग जहाँ से अक्षस्थ कलिकायुक्त पत्ती का उदय होता है।
- **पोषक माध्यम (Nutrient Medium) -** कोशिकाओं व अंगों के संवर्धन हेतु प्रयोग किया जाने वाला पोषक मिश्रण । इसे विभिन्न प्रकार के कार्बनिक व अकार्बनिक रसायनों जैसे कार्बोहाइड्रेट, विटामिन, अमीनो अस्ल तथा पादप हॉर्मोन्स आदि को मिलाकर बनाया जाता है ।
- **अंग संवर्धन (Organ Culture)-** संगठित संरचनाओं जैसे - मूल शीर्ष, प्ररोह शीर्ष, स्तम्भ खण्ड, भ्रूण आदि का संवर्धन।
- **अंगोद्भवन (Organogenesis)-** संवर्धित कोशिकाओं अथवा ऊतकों से अंगों का विभेदन ।
- **पुन:संवर्धन (Passage/Subculture)-** कोशिकाओं अथवा ऊतकों को पुराने पोषक माध्यम से हटाकर नये पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित करना । यह प्रक्रिया संवर्धनों को लम्बे समय तक स्थापित करने के लिये भी प्रयोग की जाती है ।
- **रोगकारक (Pathogen) -** रोग उत्पन्न करने वाले सूक्ष्मजीव ।
- **शिशु पादप / पौध (Plantlet)-** अंकुरित भ्रूण अथवा छोटा जड़युक्त प्ररोह/पादप ।
- **प्राथमिक संवर्धन (Primary Culture) -** पादपों से सीधे ही कोशिकाओं, ऊतकों अथवा अंगों को विच्छेदित करके संवर्धन प्रारम्भ करना ।
- **प्रस्फुटन (Proliferation) -** इकाईयों जैसे - कोशाओं, भ्रूणों, प्ररोह आदि का तीव्र निर्माण व गुणन।
- **प्रोटोप्लास्ट (Protoplast) -** कोशिका भित्ति रहित पादप कोशिका ।
- **प्रोटोप्लास्ट संलयन (Protoplast Fusion) -** वह तकनीक जिसमें संबद्ध अथवा असंबद्ध प्रोटोप्लास्ट का संलयन कराया जाता है । इसके फलस्वरूप समकेन्द्रकीय अथवा विषम केन्द्रकीय की रचना होती है ।
- **पुनरुद्भवन (Regeneration) -** किसी संवर्धित कर्तोत्तक अथवा कैलस से नये अंग, भ्रूण अथवा पूर्ण पादप का निर्माण होना ।
- **सोमाक्लोनीय विभिन्नतायें (Somaclonal Variations) -** एक ही मातृ पादप से ऊतक संवर्धन तकनीक से उत्पन्न किये गये पादपों में आनुवांशिक विभिन्नताये ।
- **निलंबित संवर्धन (Suspension Variations) -** एक प्रकार का संवर्धन जिसमें कोशिका अथवा कोशिका समूहों को तरल माध्यम पर संवर्धित किया जाता है ।
- **पूर्णशक्तता (Totipotency) -** कोशिका की ऐसी क्षमता अथवा गुण जिससे वह पूर्ण पादप का निर्माण करने में सक्षम होती है ।
- **विषाणु रहित (Virus Free) -** ऐसे पादप, अंग अथवा ऊतक जो विषाणु मुक्त होते हैं ।

1.4 पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक (Basic Technique of Plant Tissue Culture):

वास्तव में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक अनेक प्रयोगशाला विधियों तथा अन्य प्रक्रियाओं का सम्मिलन है । कुछ विशिष्ट सोपानों को छोड़कर आधारीय तकनीक लगभग समान है । पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से पादप तैयार करने की प्रक्रिया को कुछ प्रमुख चरणों में विभाजित किया जा सक्ता है । आइये पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक को निम्न चरणों में समझने का प्रयास करते हैं-

1.4.1 उचित पोषक माध्यम को तैयार करना (Preparation of Suitable Nutrient Medium)

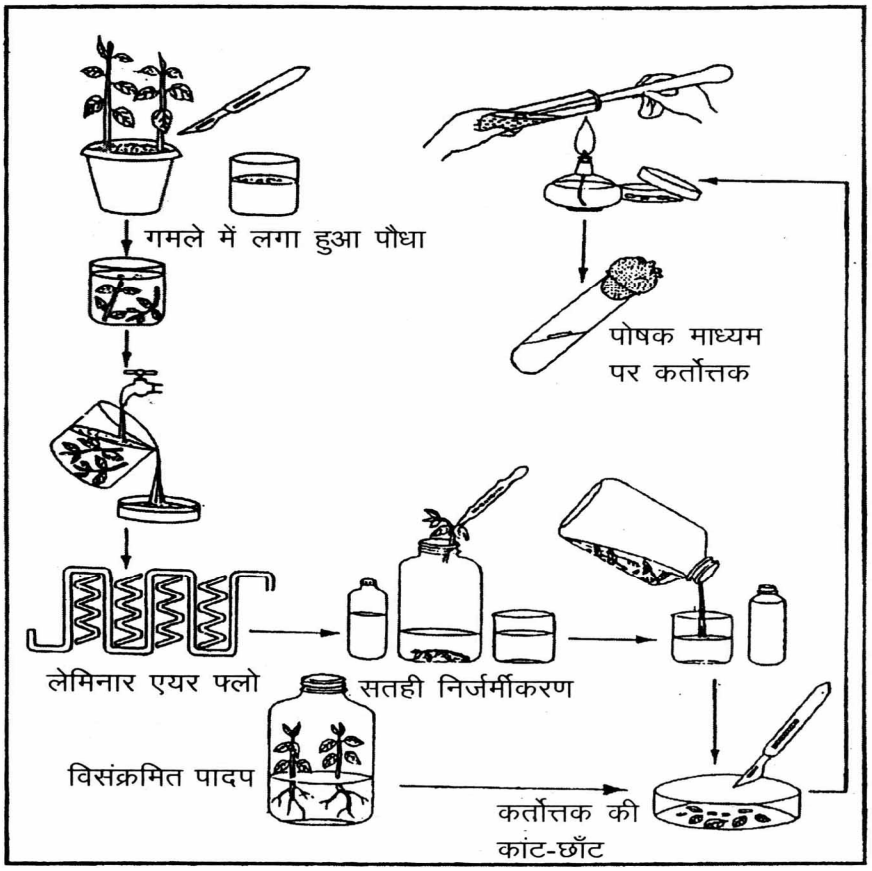
इस चरण में विभिन्न रासायनिक अवयवों को उचित मात्रा में लेकर एक पोषक माध्यम तैयार किया जाता है । पोषक माध्यम तैयार करते समय ऊतक संवर्धन के उद्देश्य को ध्यान में रखना आवश्यक होता है । इसके पश्चात् माध्यम को किसी उचित पात्र यथा - कोनिकल फ्लास्क, पैट्रीडिश, कल्चर ट्यूब अथवा कल्चर बॉक्स में स्थानान्तरित करने के बाद 15 lb psi दाब पर लगभग 30 मिनट तक ऑटोक्लेव की सहायता से निर्जर्मीकृत (sterilize) कर लेते हैं । पौधों को पर्याप्त एवं उचित पोषण प्रदान करने के लिये पोषक माध्यम में विटामिन व हार्मोन्स भी अल्प मात्रा में मिलाये जाते हैं ।

1.4.2 कर्तोत्तकों का चयन (Selection of Explants)

ऊतक संवर्धन में स्वस्थ पौधे के छोटे-छोटे कटे हुये खण्डों का प्रयोग किया जाता है जिन्हें कर्तोत्तक (explant) कहते हैं । उदाहरणस्वरूप - अक्षस्थ कलिका (axillary bud), पर्ण व तना खण्ड (।leaf and stem segments), मूल शीर्ष (root tip), प्ररोह शीर्ष (shoottip), परागकोष (anther), अण्डाशय (ovary), भ्रूणपोष (endosperm) आदि प्रमुख कर्तोत्तक हैं । प्राय: कर्तोत्तक के रुप में रोगरहित व तरुण भाग का ही चयन किया जाता है ।

1.4.3 कर्तोत्तकों का निर्जर्मीकरण (Sterilization of Explants)

निर्जर्मीकरण का तात्पर्य किसी सामग्री (material) की सतह पर उपस्थित सूक्ष्मजीवों को पूर्ण रुप से समाप्त करने से है । कर्तोत्तक को विसंक्रमण तत्वों (disinfectants) का उपयोग करके निर्जर्मीकृत किया जा सकता है । इसके लिये सोडियम हाइपोक्लोराइट (NaOCl), मरक्यूरिक क्लोराइड ($HgCl_2$) आदि रासायनिक यौगिकों को आसुत जल में घोलकर विलयन तैयार कर लिया जाता है । कर्तोत्तक को इस विलयन से उपचारित करके निर्जर्मीकृत किया जाता है ।



चित्र 1.1- सतही निर्जर्मीकृत तथा पोशाक माध्यम पर कर्तोत्तक का स्थानान्तरण

1.4.4 निवेशन; स्थानान्तरण (Incubation)

निर्जर्मीकृत करने के पश्चात् कर्तोत्तक एक्सप्लान्ट को विसंक्रमित परिस्थितियों (sterile conditions) में ठोस अथवा तरल पोषक माध्यम पर स्थानांतरित कर दिया जाता है । इस कार्य के लिये प्रयोग किया जाने वाला उपकरण लेमिनार एयर फ्लो कैबिनेट विसंक्रमित वातावरण प्रदान करता है ।

1.4.5 ऊष्मायन (Incubation)

तैयार किये गये संवर्धनों को एक विशेष कक्ष में रख दिया जाता है जहाँ एक निश्चित अवधि तक वद्धि का प्रेक्षण किया जाता है । इस कक्ष का तापमान लगभग 25^0C तथा लगभग 16 घंटे का दीप्तकाल (photoperiod) कृत्रिम प्रकाश की सहायता से दिया जाता है । कुछ समय पश्चात् कैलस की उत्पत्ति होती है अथवा माध्यम पर कर्तोत्तक से सीधे ही प्ररोह (shoots) अथवा मूल (roots) का निर्माण होने लगता है ।

1.4.6 पुनरुद्भवन (Regeneration)

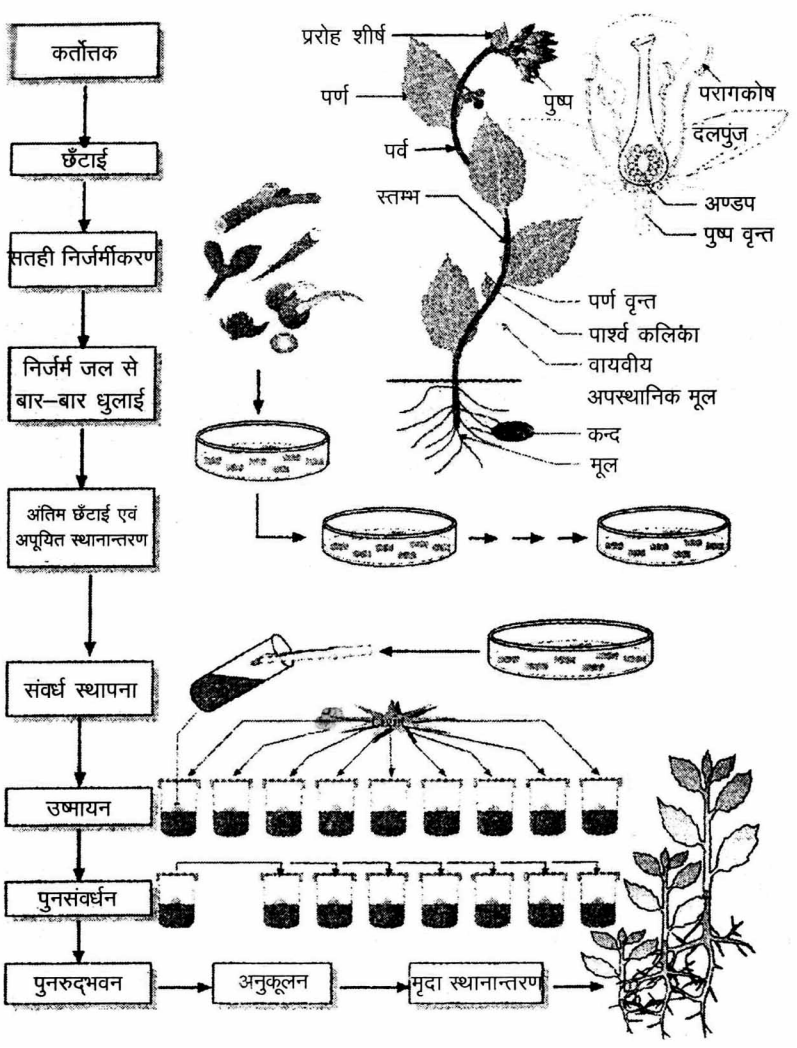
जब कैलस के भाग को अन्य पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दिया जाता है तो इससे पौधों की उत्पत्ति प्रारम्भ हो जाती है । प्राय: कैलस से सीधे ही प्ररोह व मूल का निर्माण होने लगता है ।

1.4.7 अनुकूलन (Hardening)

ऊतक संवर्धन तकनीक से तैयार किये जाने वाले पौधे प्राय: नियंत्रित परिस्थितियों में वृद्धि करते हैं अत: इन्हें प्राकर्तिक वातावरण के अनुरूप ढलने का धीरे-धोरे अभ्यास कराया जाता है । यह प्रक्रिया अनुकूलन कहलाती है ।

1.4.8 पादप स्थानान्तरण (Plantlet Transfer)

पादप अनुकूलन के पश्चात् पौधों को सीधे ही प्राकृतिक परिस्थितियों में भूमि में स्थानांतरित कर दिया जाता है । कभी-कभी कुछ पादपों की रिथति को ध्यान में रखते हुये उन्हें ग्रीन हाऊस में कुछ सप्ताह तक रखने के पश्चात् शस्य परिस्थितियों में स्थानान्तरित कर दिया जाता है ।
पादप ऊतक संवर्धन के विभिन्न सोपानों को चित्र संख्या 12 के माध्यम से व्यक्त किया जा सकता है ।



चित्र 1.2 पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक

बोध प्रश्न

9. पोषक माध्यम क्या है?

.....

10. पादप ऊतक संवर्धन तकनीक के विभिन्न चरणों के नाम लिखिये ।

.....

1.5 सतही निर्जर्मीकरण (Surface Sterilization):

अंत: पात्रे संवर्धन (in vitro culture) के दौरान विसंक्रमित वातावरण को बनाये रखना एक अत्यन्त कठिन कार्य है, क्योंकि संवर्धन सुगमतापूर्वक वायु में उपस्थित जैव प्रदूषकों जैसे कवक व जीवाणु के संपर्क में आकर खराब हो जाता है । ये प्रदूषक (contaminants) विषैले पदार्थों को स्रावित करते हैं जिनके कारण संवर्धन हेतु रखे गये पादप ऊतकों की वृद्धि पर विपरीत प्रभाव पड़ता है । कवक व जीवाणु जैसे सूक्ष्मजीव हमारे वातावरण में सर्वव्यापी हैं तथा पोषक माध्यम के सम्पर्क में आकर तेजी से वृद्धि करना प्रारम्भ कर देते हैं । परिणामस्वरूप पादप ऊतक नष्ट हो जाता है । अत: विभिन्न प्रकार की सामग्री का सतही निर्जर्मीकरण अलग-अलग विधियों से करके संवर्धन को खराब होने से बचाया जाना ही इस प्रक्रिया का उद्देश्य है । विभिन्न निर्जर्मीकरण विधियों का सूक्ष्म विवरण नीचे प्रस्तुत किया गया है

1.5.1 काँच के पात्र, संवर्धन पात्र आदि का निर्जर्मीकरण (Sterilization of Glassware, Culture Vessels etc.)

पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले ग्लासवेयर जैसे - पैट्रीप्लेट, संवर्धन नली, फ्लास्क, पिपेट, शीशी, बोतल आदि का निर्जर्मीकरण एक महत्त्वपूर्ण प्रक्रिया है । इन सभी का निर्जर्मीकरण उष्ण शुष्क वायु (तापमान160-180^{0}c) पर रख कर किया जाता है । इसके लिये सामग्री को एक गर्म वायु ओवन में 2-4 घंटे तक रख दिया जाता है । निर्जर्मीकरण से पूर्व समस्त सामग्री को सही तरह से बंद कर लेना चाहिये ।

1.5.2 उपकरणों व औजारों का निर्जर्मीकरण (Sterilization of Instruments and Tools)

विसंक्रमित वातावरण में प्रयोग किये जाने वाले उपकरण व औजार जैसे - चिमटी, चाकू सुई तथा चम्मच आदि धातु से बने होते हैं । इनका निर्जर्मीकरण 95% इथाईल एल्कोहॉल में डुबोने के पश्चात् आँच पर गर्म करके (flaming) तत्पश्चात् ठंडा (cooling) करके किया जाता है । यह प्रक्रिया भस्मीकरण (incineration) कहलाती है । धातु निर्मित औजारों व उपकरणों को निर्जर्मीकृत करने के लिये प्राय: आटोक्लेविंग का उपयोग नहीं करते हैं इससे इनमें जंग लगने (rusting) व कुठांत (blunt) हो जाने का खतरा रहता है ।

ऑटोक्लेविंग निर्जर्मीकरण की एक अन्य विधि है जिसमें उच्च दाब पर वाष्प की सहायता से निर्जर्मीकरण किया जाता है । ऑटोक्लेव में निर्जर्मीकरण के दौरान प्राय: समस्त सूक्ष्मजीव नष्ट हो जाते हैं । इस विधि से काँच पात्र व अन्य सामग्री जैसे रुई के बने डाट (cotton plugs), पट्टी, प्लास्टिक के ढक्कन,

फिल्टर अथवा पिपेट आदि का निर्जर्मीकरण किया जाता है । ऑटोक्लेव में निर्जर्मीकरण प्राय: 15 lb psi दाब पर 121^0c तापमान पर 15-20 मिनट के लिये किया जाता हैं ।

1.5.3 संवर्धन कक्ष तथा स्थानान्तरण क्षेत्र का निर्जर्मीकरण (Sterilization of Culture Room and Transfer Area)

संवर्धन कक्ष की दीवारों व फर्श का निर्जर्मीकरण पहले डिटर्जेंट से तत्पश्चात् 2% सोडियम हाइपोक्लोराइट के घोल से अथवा 95% इथाइल एल्कोहॉल से धोकर किया जा सकता है । पराबैंगनी विकिरण (UV radiation) भी निर्जर्मीकरण करने के लिये प्रयोग में लायी जाती है । पराबैंगनी विकिरण का उपयोग प्राय: लेमिनार एयरफ्लो कैबिनेट का निर्जर्मीकरण करने के लिये किया जाता है । पराबैंगनी विकिरण नेत्रों के लिये हानिकारक होता है अत: इसके प्रयोग के दौरान किसी भी व्यक्ति को इसे देखने नहीं देना चाहिये ।

1.5.4 पोषक माध्यम का निर्जर्मीकरण (Sterilization of Nutrient Medium)

पोषक माध्यम के समस्त संघटकों को आसुत जल में घोलकर मिश्रण तैयार कर लिया जाता है । इस पोषक माध्यम को काँच के पात्रों जैसे - फ्लास्क, कल्चर ट्यूब, कल्चर बोटल आदि में उड़ेल लिया जाता है । इसके पश्चात् इन पात्रों को रुई की डाँट (cotton plug) अथवा प्लास्टिक के ढक्कन की सहायता से सीलबंद करके ऑटोक्लेव में निर्जर्मीकृत किया जाता है । यह क्रिया वाष्प निर्जर्मीकरण कहलाती है । ऑटोक्लेविंग 15lb psi दाब पर 30 मिनट के लिये की जाती है। इस पर दाब लगभग 121^0 का तापमान हो जाता है जो संक्रमणकारी सूक्ष्मजीवों को नष्ट कर देता है ।

विटामिन, अमीनो अम्ल, पादप अर्क, हारमोन्स तथा शर्करा आदि अवयव उच्च ताप पर विघटित हो जाते हैं । ऐसी स्थिति में ऑटोक्लेविंग करने से इनके नष्ट हो जाने की आशंका रहती है । इन अवयवों को निर्जर्मीकृत करने के लिये फिल्टर की आवश्यकता होती है । इस प्रक्रिया में विलयनों को एक विशेष जीवाणुरोधी (bacteria proof) फिल्टर से छानकर निर्जर्मीकृत किया जाता है । फिल्टर निर्जर्मीकरण में प्राय: मिलीपोर अथवा सीट्ज फिल्टर (Millipore or Seitz) का प्रयोग किया जाता है जिसका छिद्र माप 0.20 माइक्रोमीटर होता है ।

1.5.5 पादप व पादप अंगों का निर्जर्मीकरण (Sterilization of plant and plant Material)

प्राय: समस्त पादप तथा उनके भाग सूक्ष्मजीवों से संक्रमित रहते हैं । अत: पादप सामग्री को निर्जर्मीकृत करने के लिये संक्रमणनाशकों (disinfectants) जैसे सोडियम हाइपोक्लोराइट, हाइड्रोजन परॉक्साइड, मरक्यूरीक क्लोराइड अथवा इथाइल एल्कोहॉल का प्रयोग करना चाहिये । इन साधनों का उपयोग करने के पश्चात् पादप ऊतकों को 6-8 बार आसुत जल से अवश्य धो लेना चाहिये । इसके पश्चात् कर्तोत्तकों को संक्रमण रहित वातावरण में पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दिया जाना चाहिये । पादप सामग्री को निर्जर्मीकृत करने के लिये प्रयोग किये जाने वाले रसायनों की आवश्यक सान्द्रता तथा उपचार अवधि का विवरण निम्नलिखित सारणी में दिया गया है -

	सान्द्रता (प्रतिशत)	उपचार अवधि (मिनट)
सोडियम हाइपोक्लोराइट	0.5-5	5-30
हाइड्रोजन परॉक्साइड	3-30	5-15
मरक्यूरीक क्लोराइड	0.1-1.0	2-10
सिल्वर नाइट्रेट	1-2	5-30
इथाइल एल्कोहॉल	75-95	30 सेकिण्ड से 2 मिनट
कैल्शियम हाइपोक्लोराइट	9-10	5-30

बोध प्रश्न

11. सतही निर्जर्मीकरण की परिभाषा दीजिये ।

    .....

12. पोषक माध्यम का निर्जर्मीकरण किस उपकरण द्वारा कराया जाता है?

    .....

13. कर्तोत्तकों (explants) के निर्जर्मीकरण में प्रयोग किये जाने वाले किन्हीं चार रसायनों के नाम लिखिये।

    .....

1.6 निर्जर्मी ऊतक स्थानान्तरण (Aseptic Tissue Transfer) :

पादप ऊतक संवर्धन एक अत्यन्त संवेदनशील क्रियाविधि है । सूक्ष्मजीवीय दूषण (microbial contamination) के कारण होने वाले विपरीत प्रभाव इसकी उपयोगिता को बुरी तरह प्रभावित करता है । ऊतक संवर्धन का एक प्रमुख पहलू संदूषण पर नियंत्रण करना है । इस तकनीक का उपयोग करने वाले व्यक्ति की कार्यशैली पर निर्भर करता है कि प्रयोग किस हद तक सफल होगा । विसंक्रमित स्थितियों में निर्जर्मीकृत पोषक माध्यम पर सूक्ष्मजीव रहित कर्तोत्तक को स्थानान्तरित करना सर्वाधिक महत्वपूर्ण कार्य है । इस कार्य को करने के दौरान धूल, बाल, हाथ व वस्त्र आदि दूषण के शक्तिशाली स्त्रोत है । इनके विषय में विशेष सावधानी रखना आवश्यक है । दूषण से होने वाले खतरों व आर्थिक हानि को समाप्त या कम करने के लिये यह परामर्श दिया जाता है कि व्यक्ति को संक्रमणरहित क्षेत्र में प्रवेश करने से पूर्व विसंक्रमित वस्त्रों को पहन लेना चाहिये तथा सिर पर संक्रमणरहित टोपी का प्रयोग करना चाहिये । प्रयोग प्रारम्भ करने से पूर्व हाथों को 90% एल्कोहॉल से स्वच्छ व सक्रंमणरहित कर लेना चाहिये । विसंक्रमित ऊतकों का उपयोग करते समय अथवा स्थानान्तरित करते समय खाँसना या छींकना नहीं चाहिये ।

विसंक्रमित स्थितियों में पादप ऊतकों अथवा कोशिकाओं को कृत्रिम वातावरण में प्रयोग करने के दौरान अनेक कारक प्रभावी होते हैं । ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला में स्वच्छता व उपकरणों, मशीनों आदि की नियमित । साफ-सफाई, रख रखाव एवं सही इस्तेमाल करना भी ऊतक संवर्धन के परिणामों को प्रभावित करते हैं । संक्षेप मे यह कहा जा सकता है कि कृत्रिम परिस्थितियो में ऊतक स्थानान्तरण की प्रक्रिया अत्यन्त सावधानीपूर्वक सम्पन्न की जानी चाहिये तभी इसके अपेक्षित परिणाम प्राप्त किये जा सकते हैं ।

1.7 कोशिका की पूर्णशक्तता का सिद्धान्त (Concept of totipotency of Cells) :

विज्ञान के कुछ सिद्धान्त इतने व्यापक रुप से स्वीकार्य होते हैं भले ही उनका प्रायोगिक निष्पादन अनेक वर्षों बाद हुआ हो । कुछ ऐसा ही उच्च पादपों की कोशिका की शक्तता के सिद्धान्त के बारे में कहा जा सकता है । कोशिकाओं में वृद्धि करने के लिये प्रमुख रुप से समसूत्री विभाजन होते हैं । इन विभाजनों के फलस्वरूप असंख्य पुत्री कोशिकायें उत्पन्न होती है जो कार्यों के अनुरूप विभेदित होकर पादपों के विभिन्न अगों का निर्माण करती है । कोशिका की शक्तता से तात्पर्य जीवित कोशिकाओं की उस क्षमता से है जिसके परिणामस्वरूप वे एक पूर्ण पादप अथवा जन्तु के रूप में पुनरुदभवित(regenerate) हो जाती है । दूसरे शब्दों में कोशिका की वह शक्ति जिसके फलस्वरूप वह एक पूर्ण पादप में विकसित हो जाती है, कोशिका शक्तता कहलाती है । वास्तव में कोशिका की शक्तता के सिद्धान्त का प्रतिपादन **जी. हैबरलैंट (Haberlandt, 1902)** के द्वारा किये गये प्रायोगिक कार्यों व उनके निष्कर्षों के आधार पर किया गया है । उन्होंने अपने प्रयोगों की सहायता से यह बताया कि जीवित कायिक कोशिकाओं से अलैंगिक विधि से अप्राकृतिक भ्रूण तैयार किये जा सकते हैं । एक कोशिका से पूर्ण पादप निर्मित होने की क्षमता वास्तव में कोशिकाओं की विभेदन (differentiation) क्षमता पर निर्भर करती है । बिभेदित ऊतकों की कोशिकायें प्राय: अविभाज्य (non-dividing) तथा शांत (quiescent)होती है । शक्तता की अभिव्यक्ति करने से पूर्व विभेदित कोशिकाओं में अविभेदन (dedifferentiation) की क्रिया होती है तत्पश्चात् पुनर्विभेदन ([rediffrentiation) के द्वारा नये ऊतकों का निर्माण होता है । उच्च पादपों व जन्तुओं में कोशिका विभेदन एक आधारभूत प्रक्रिया है जिसे प्रचलन में कोशाविभेदन (cytodifferentiation) के रुप में जाना जाता है ।

बोध प्रश्न

14. कोशिका शक्तता का प्रायोगिक प्रदर्शन किस वैज्ञानिक ने किया?
    .....
15. अंत:पात्रे स्थितियों में पोषण के लिये आवश्यक मुख्य अवयवों के नाम लिखिये।
    .....
16. किन्हीं चार पादप वृद्धि नियंत्रकों के नाम लिखिये।
    .....

1.8 अंत:पात्रे कोशिका की पोषण आवश्यकतायें (Nutritional Requirement of Cell in vitro):

हम यह भली भाँति जानते हैं कि पौधे अपनी वृद्धि के लिये जल, सूर्य का प्रकाश, कार्बनडाईऑक्साइड तथा सामान्य खनिज विलयन पर निर्भर रहते हैं । परन्तु जब पौधों को ऊतक संवर्धन तकनीक के द्वारा कृत्रिम परिस्थितियों में संवर्धित कराया जाता है तो उनकी पोषण संबंधी विशेष आवश्यकताओं का ध्यान रखना अत्यन्त आवश्यक है । इसके अतिरिक्त तापमान को अधिकतम वृद्धि के अनुकूल स्थिर रखना आवश्यक होता है । उचित प्रकाश तथा प्रकाश गुणवत्ता (light quality) का विशेष ध्यान रखना भी आवश्यक है ।

अतःपात्रे स्थितियों में ऊतक की सर्वोत्तम वृद्धि के लिये आवश्यक पोषण पादप प्रजातियों के अनुसार भिन्न-भिन्न होता है । यहाँ तक कि एक ही पौधे के विभिन्न कर्तोत्तकों (explants) की पोषण आवश्यकतायें भिन्न-भिन्न हो सकती हैं। इन स्थितियों में अनेक पादपों के लिये किसी एक पोषण माध्यम को सबसे अनुकूल मानना सही नहीं होगा । अनेक ऊतक अंतःपात्रे स्थितियों में प्रकाश संश्लेषण नहीं करते हैं । ऐसी स्थिति में पोषक माध्यम में एक स्थिर कार्बन के श्रोत को मिलाया जाना आवश्यक है । प्राय: कार्बन के स्रोत के रुप में सुक्रोज (sucrose) को पोषक माध्यम में मिलाया जाता है । अन्य आवश्यक तत्वों को एक पोषक माध्यम की सहायता से प्रदान किया जाता है । वास्तव में पोषक माध्यम एक ऐसा मिश्रण (solution) है जो विभिन्न लवणों को आवश्यक मात्रा में लेकर तैयार किया जाता है । पोषक माध्यम में अमीनों अम्ल तथा विटामिन भी अल्पमात्रा में मिलाये जाते हैं क्योंकि कोशिकायें अतःपात्रे स्थिति में इन्हें स्वयं संश्लेषित करने में सक्षम नहीं होती हैं ।

संक्षेप में अंतः पात्रे स्थितियों में कोशिकाओं की पोषण आवश्यकता को निम्न बिन्दुओं में प्रकट किया जा सकता है -

- ऐसे तत्त्व जो अधिक मात्रा में आवश्यक होते हैं जैसे - नाइट्रोजन (N), कैल्शियम (Ca) मैग्निशियम (Mg), पोटेशियम (K), फास्फोरस (P), सल्फर (S) । इन तत्त्वों को वृहद् तत्व (macro-elements) कहते हैं ।
- ऐसे तत्त्व जो अल्पमात्रा में आवश्यक होते हैं जैसे - जिंक (Zn), कोबाल्ट (Co) कॉपर (Cu), मैंगनीज (Mn), मोलीब्डेनम (Mo), आयोडीन (I) व बोरोन (B) । इन तत्वों को सूक्ष्म तत्व (micro elements) कहा जाता है ।
- एक लौह स्रोत (उदाहरणस्वरूप - फेरस सल्फेट) । इसे एक अन्य यौगिक - चिलेटर (Chelator) के साथ पोषक माध्यम में मिलाया जाता है जिससे यह माध्यम में धीरे-धीरे स्रावित होता है ।
- कार्बनिक पूरक यौगिक जैसे विटामिन ।
- कार्बन स्रोत - प्राय: सुक्रोजू ।
- पादप वृद्धि नियंत्रक (Plant Growth Regulator)

उपरोक्त पोषण संबंधी आवश्यकताओं के अतिरिक्त वातावरणीय परिस्थितियाँ (environmental conditions) भी पादप वृद्धि के लिये महत्त्वपूर्ण होती है । उचित तापमान, उचित प्रकाश व उचित pH भी पादपों की अंतःपात्रे स्थितियों में वृद्धि को प्रभावित करते हैं ।

1.9 विभिन्न प्रकार के पोषक माध्यम (Different Types of Nutrient media):

जैसा कि ऊपर स्पष्ट किया गया है कि अंतःपात्रे स्थितियों में ऊतक की तीव्रतम वृद्धि के लिये आवश्यक पोषण माध्यम का संगठन भिन्न-भिन्न पादप प्रजातियों के लिये अलग-अलग होता है । यहाँ तक कि एक ही पौधे के विभिन्न ऊतकों की पोषण आवश्यकता भी भिन्न-भिन्न होती है । अत: समस्त प्रकार के पादप ऊतकों व अंगों के संवर्धन के लिये किसी एक पोषक माध्यम का सुझाव नहीं दिया जा सकता है । गत 50 वर्षों में ऊतक संवर्धन के उद्देश्यों को ध्यान में रखते हुये अनेक पोषक माध्यमों का विकास किया गया है ।

पादप ऊतक संवर्धन के प्रारंभिक दौर में वैज्ञानिकों ने पूरे पादप को संवर्धित करने का प्रयास किया । इस कार्य के लिये उन्होंने कुछ लवणों का मिश्रण तैयार करके पौधों को संवर्धित किया । **व्हाइट (White, 1934)**तथा **गौथ्रे(Gautheret,1939)** ने सर्वप्रथम क्रमशः मूल संवर्धन माध्यम तथा कैलस संवर्धन माध्यम का विकास किया । उन्होंने अपना पोषक माध्यम **नौप (knop, 1865)** लवण विलयन के आधार पर तैयार किया । व्हाइट ने अपने प्रयोगों में यह प्रेक्षण किया कि विच्छेदित मूल ऊतकों में असीमित वृद्धि होती है जबकि उन्हें ऐसे पोषक माध्यम पर संवर्धित किया जाये जिसमें अकार्बनिक लवण, शर्करा, विटामिन, वृद्धि हार्मोन तथा कुछ अमीनों अम्ल मिलाये गये हों । एक ऐसा पोषक माध्यम जिसमें केवल रासायनिक यौगिक ही मिलाये गये हों, **संश्लेषित माध्यम** (Synthetic medium) कहलाता है । अनेक पादप प्रजातियों के संवर्धन में यह देखा गया है कि पोषक माध्यम की भौतिक अवस्था भी इनकी अंतःपात्रे वृद्धि को प्रभावित करती है । उदाहरणस्वरूप कुछ ऊतक ठोस माध्यम (solid medium) पर अच्छी वृद्धि प्रदर्शित करते हैं जबकि अन्य ऊतक तरल माध्यम (liquid medium) पर ।

1.9.1 पोषक माध्यम का संघटन (Composition of Nutrient Media)

अकार्बनिक पोषक (inorganic nutrients), कार्बन श्रोत (carbon source), कार्बनिक पूरक (organic supplements) वृद्धि नियंत्रक (growth regulators|) तथा जैल कारक - अगार (gelling agent- Agar) आदि अधिकांश पोषक माध्यमों के प्रमुख संघटक हैं । कुछ ऊतक सामान्य माध्यम पर वृद्धि प्रदर्शित करते हैं जिसे केवल अकार्बनिक लवण व कार्बन श्रोत (शर्करा) मिलाकर तैयार किया जाता है परन्तु अन्य प्रकार के ऊतक संवर्धन के लिये पोषक माध्यम में विटामिन, अमीनो अम्ल तथा वृद्धि नियंत्रक आदि मिलाना आवश्यक होता है ।

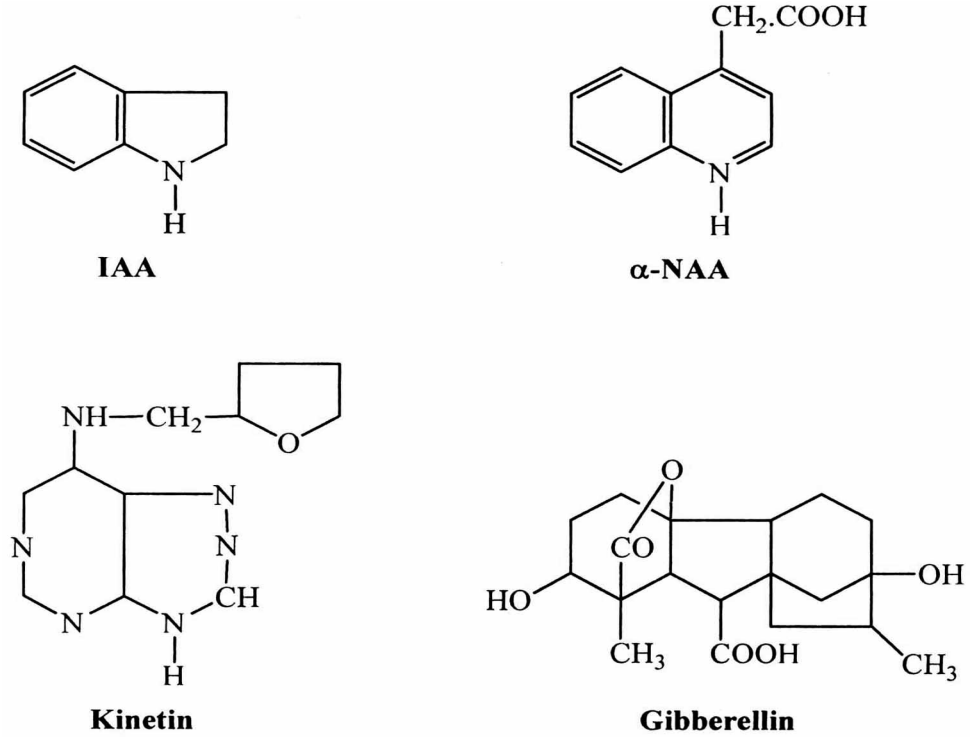
विशेष प्रकार के ऊतकों एवं कर्तोत्तक (explant) संवर्धन हेतु अनेक पोषक माध्यमों का विकास (formulation) किया गया । पादप ऊतक संवर्धन की अनेक विधियों में संवर्धित ऊतक से अंगोद्भवन (organogenesis) तथा पादप पुनरुदभवन (plant regeneration) कराने के लिये **एम.एस.** (मुराशिगे तथा स्कूग:Murashige and Skoog, 1962) तथा एल.एस. (लिन्समायर तथा स्कूग; Linsmaier and Skoog.1965) माध्यम प्रमुखता से प्रयोग किये जाते हैं । इन माध्यमों में आवश्यक लवण उचित मात्रा में मिलाये जाते हैं । **B5 माध्यम**, जिसे मूलतः कोशिका निलंबन (cell suspension) तथा कैलस संवर्धन के लिये तैयार किया गया, कुछ परिवर्तनों के साथ प्रोटोप्लास्ट संवर्धन के लिये आदर्श सिद्ध हुआ । इसका अयोग प्रोटोप्लास्ट से पादप पुनरुद्भवन(protoplast-to-plant) के लिये भी किया जाता है । एक अन्य माध्यम - **N_6 माध्यम** (Chu, 1978) को विशेष रुप से धान्य पादपों (cereal plants) के परागकोश (anther) संवर्धन हेतु विकसित किया गया । इसके अतिरिक्त अन्य माध्यमों को विकसित किया गया जिनकी सफलता माध्यम में मिलाये गये पोषक पदार्थों (nurients) के अनुपात तथा सान्द्रता पर निर्भर करती है । पोषक माध्यम के संघटकों की आधारभूत जानकारी लेने के पश्चात् इनकी मात्रा एवं इनके प्रकारों के बारे में जान लेते हैं -

अकार्बनिक खनिज (Inorganic Minerals)

पोषक माध्यम में मिलाये जाने वाले अकार्बनिक पोषकों को दो श्रेणियों में विभाजित किया जा सकता है - Macronutrients (उदा. नाइट्रोजन, फॉस्फोरस, पोटेशियम, कैल्शियम, मैग्नीशियम तथा सल्फर) जो लवणों के रुप में मिलाये जाते हैं तथा अधिक मात्रा में आवश्यक होते हैं तथा Micronutrients (उदा. बोरोन, मोलीब्डेनम् कॉपर, जिंक, मैंगजीन, आयरन तथा क्लोराइड) जो सूक्ष्म मात्रा में आवश्यक होते हैं। माध्यम बनाने से पूर्व इन सभी लवणों का एक स्टॉक विलयन तैयार कर लेते हैं तथा आवश्यकता पड़ने पर इसकी उचित मात्रा मिलाकर तैयार कर लेते हैं । विलेयता की समस्या को दूर करने के लिये आयरन का स्टॉक विलयन चिलेट (chelated) अवस्था में तैयार करते हैं । उदाहरण के लिये फेरिक इथाइलीन-डाईएमीन टैट्रा एसिटेट (FEDTA)का सोडियम लवण ।

वृद्धि हारमोन्स (Growth Hormones)

अंतः पात्रे स्थितियों में संवर्धन हेतु रखे गये ऊतकों की कोशिकाओं की जैविक क्रियाओं को प्रेरित (induce) करने के लिये पोषक माध्यम में कुछ पादप वृद्धि हॉर्मोनो को भी मिलाया जाता है । इन वृद्धि हॉर्मोनों को प्रमुख रुप से तीन वर्गों में बाँटा जा सकता है - **ऑक्सिन, साइटोकाइनिन** तथा **जिबरेलिन** (Auxins, Cytokinins and Gibberellins) । ऑक्सिन रासायनिक रुप से इन्डोल एसिटिक अम्ल (Indole-acetic acid) के समान होते हैं तथा प्ररोह शीर्ष (shoot) की लम्बाई बढ़ाने के लिये उत्तरदायी होते हैं । साइटोकाइनिन कोशिका विभाजन को प्रेरित करते है तथा (Kinetin;6-furfuryl aminopurine) की भाँति वृद्धि को नियंत्रित करते हैं । जिबरेलिन कम महत्वपूर्ण होते हैं तथा इनका उपयोग कभी-कभार शीर्ष विभज्योतक (apical meristein) के संवर्धन में किया जाता है । बहुतायत में प्रयोग किये जाने वाले साइटोकाइनिन के प्रमुख उदाहरण हैं - एडिनीन, काइनेटिन, जियाटिन, बेंजाइलएडिनीन (Adenine, Kinetin, Zeatin, Benzyladenine) । इसी प्रकार इंडोल ऐसिटिक अम्ल, α-नेफ़्थालीन एसिटिक अम्ल 2,4-डी (IAA, α-NAA and 2,4-D) आदि प्रमुख ऑक्सिन हैं जो पोषण हेतु प्रयोग किये जाते हैं । कैलस उत्प्रेरण हेतु काइनेटिन का अल्प मात्रा में (0.1 मिली.ग्रा./ली.) प्रयोग किया जाता है ।



चित्र 1 : ऑक्सिन,साइटोकाइनिन तथा जिबरेलिन के संरचना सूत्र

कार्बनिक संघटक (Organic Constituents)

कार्बनिक यौगिक, कार्बन और ऊर्जा के स्रोत के रुप में कार्य करते हैं तथा संवर्धित ऊतक के लिये त्वरित ऊर्जा की आपूर्ति करते हैं । इन्हें पोषक माध्यम में उच्च सान्द्रता - 20 से 30 ग्रा./ली. में मिलाया जाता है । सुक्रोज तथा डी-ग्लूकोज (कार्बोहाइड्रेट) का प्राय: प्रयोग किया जाता है परन्तु ग्लिसरोल व मायोआइनोसीटोल (Glycerol and Myoinositol) भी कार्बन के अन्य प्रमुख स्रोत है । इनके अतिरिक्त पेप्टोन, यीस्ट अर्क, माल्ट अर्क, नारियल पानी तथा टमाटर रस(Peptone, Yeast extract, Malt extract, Coconut water and Tomato juice) आदि भी प्रमुख जटिल कार्बनिक यौगिक हैं जो पोषक माध्यम में प्रयोग किये जाते हैं ।

विटामिन (Vitamins)

निर्जर्म अवस्था में ऊतक संवर्धन करने हेतु पोषक माध्यम में सूक्ष्म मात्रा में विटामिन भी मिलाये जाते हैं । विटामिन कोशिकाओं के एन्जाइम तंत्र (enzyme system) को उत्प्रेरित करते है । सभी प्रकार के ऊतक संवर्धन हेतु विटामिन बी, (Thiamine) सबसे अधिक प्रयोग किया जाने वाला विटामिन है । कुछ अन्य विटामिन जो कृत्रिम परिस्थितियों में पादप ऊतकों की वृद्धि को प्रेरित करते हैं - निकोटिनिक अम्ल, राइबोफ्लेविन, पाइरीडॉक्सिन एस्कॉर्बिक अम्ल आदि है।

अमीनो अम्ल (Amino acids)

विभिन्न चयापचयी (metabolic) गतिविधियों के लिये आवश्यक अमीनों अम्लों का संश्लेषण करने में संवर्धित ऊतकों की कोशिकायें सक्षम होती है । इसके अतिरिक्त माध्यम में अमीनो अम्ल की उपस्थिति कोशिकाओं व ऊतकों की वृद्धि को उत्प्रेरित करती है । केसीन हाइड्रालाइसेट, ग्लूटामीन,

एस्पैराजीन, ग्लाइसीन आदि कार्बनिक नाइट्रोजन के सामान्य स्रोत हैं जो पोषक माध्यम के द्वारा संवर्धित ऊतकों को प्रदान किये जाते हैं ।

जैल कारक पदार्थ

पादप ऊतक संवर्धन माध्यम में प्राय: अगार (Agar) एक जैलकारक पदार्थ के रुप में प्रयोग किया जाता है । इसे एक समुद्री लाल शैवाल - Gelidium amansii से तैयार किया जाता है । अगार की विशेष बात यह है कि यह पोषक माध्यम के संघटकों के साथ प्रतिक्रिया नहीं करता है और ना ही यह पादप एन्जाइम्स के द्वारा अपघटित किया जाता है । सामान्यत: 0.5-1% अगार को पोषक माध्यम में मिलाया जाता है जो एक ठोस माध्यम तैयार करने के लिये पर्याप्त होता है ।

पोषक माध्यम का पी.एच. (pH of Nutrient Medium)

पी.एच. का प्रभाव आयनों की क्रियाशीलता पर पड़ता है । संवर्धित ऊतकों की वृद्धि के लिये सर्वाधिक अनुकूल पी.एच. मान 5.0 से 6.0 के मध्य रहता है । अत: माध्यम के निर्जर्मीकरण से पूर्व इसका पी.एच. मान व्यवस्थित कर लेना आवश्यक होता है । पादप ऊतक संवर्धन के लिये सर्वाधिक प्रयोग किये जाने वाले पोषक माध्यम --एम.एस. (1962) माध्यम के लिये आदर्श पी.एच. मान 5.8 होता है। सारणी 1.1 में विभिन्न पोषक माध्यमों के संघटकों व उनकी आवश्यक मात्रा का विवरण दिया गया है ।

सारिणी 1.1 प्रमुख पादप ऊतक संवर्धन माध्यमों का पोषक संघटन

संघटक	मात्रा (मिली.ग्रा./ली.)				
	व्हाइट	एम.एस.	बी-5	निश	एन-6
1. वृहद पोषक तत्व					
$MgSO_4.7H_2O$	750	310	250	185	185
KH_2PO_4	-	170	-	68	400
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	-	150	-	-
KNO_3	80	1900	2500	950	2830
NH_4NO_3	-	1650	-	750	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	440	150	-	166
$(NH_4)_2.SO$	-	-	134	-	463
2. सूक्ष्म पोषक तत्व					
H_3BO_3	1.5	6.2	3	-	1.6
$MnSO_4.H_2O$	5	22.3	-	25	4.4
$ZnSO_4.H_2O$	3	8.6	2	10	1.5
$Na_2MnO_4.2H_2O$	-	0.25	0.25	0.25	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.025	0.025	0.025	-
$CoCl_2.5H_2O$	-	0.025	0.025	0.025	-
KI	0.75	0.83	0.75	-	0.8
$FeSO_4.7H_2O$	-	27.8	-	27.8	27.8

$Na_2EDTA.2H_2O$	-	37.3	-	37.3	37.3
EDTA Na Ferric Salt	-	-	43	-	-
3. विटामिन व अन्य कार्बनिक पूरक					
थायमीन हाइड्रोक्लोराइड	0.01	0.5	10	0.5	1.0
पिरीडॉक्सिन हाइड्रोक्लोराइड	0.01	0.5	1	0.5	0.5
निकोटिनिक अम्ल	0.05	0.5	1	5	0.5
मायो आइनोसिटोल	-	100	100	100	-
4. अन्य					
ग्लाइसीन	3	2	-	2	-
फोलिक अम्ल	-	-	-	0.5	-
बायोटिन	-	-	-	0.05	-
सुकोज (ग्रा.)	20	30	20	20	50
पी.एच. (pH)	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

शब्द संकेत -

- व्हाइट – White's Medium (1953)
- एम.एस. – Murashige and Skoog (1962)
- बी.5 – Gamborg etal. (1968)
- निश – Nitsch and Nitsch (1969)
- एन. 6 – Chu (1978)

1.10. सारांश (Summary) :

प्रस्तुत इकाई में पादप ऊतक संवर्धन व इसकी आधारभूत तकनीक का सविस्तार वर्णन किया गया है । इस इकाई में दिये गये संदर्भ इस तकनीक को भली-भाँति समझने व इसे स्वयं प्रयोग करके देखने की दृष्टि से अत्यधिक महत्वपूर्ण है । यदि पादप ऊतक संवर्धन के ऐतिहासिक परिप्रेक्ष्य पर नजर डालें तो हैबरलैण्ट, हैन्निग, मुराशिगे, व्हाइट, स्कूग तथा अन्य प्रमुख वैज्ञानिकों का योगदान इस तकनीक को विकसित करने व निरन्तर परिष्कृत करने में उल्लेखनीय है । पादप ऊतक तकनीक के अनेक चरण हैं जिसमें प्रयोगशाला की स्थितियाँ, पोषक माध्यम का संघटन, इसका विरचन, निर्जर्मीकरण, निर्जर्म, ऊतक स्थानान्तरण तथा संवर्धन कक्ष का व्यवहार आदि प्रमुख है । पादप व पादप अंगों का निर्जर्मीकरण कुछ रसायनों जैसे इथायल एल्कोहॉल, मरक्यूरिक क्लोराइड, सोडियम हाइपोक्लोराइट आदि की सहायता से किया जा सकता है ।

पादप ऊतक संवर्धन में कोशिका शक्तता प्रभावी भूमिका का निर्वाह करती है । किसी भी कर्तोत्तक की कोशिकाओं में शक्तता का होना आवश्यक है । यदि कर्तोत्तक कोशिकाओं में पूर्णशक्तता का अभाव होगा तो यह अंतःपात्रे स्थितियों में अपेक्षित परिणाम नहीं दे सकेगा । ऊतक संवर्धन अनेक कारकों से प्रभावित होने वाली प्रक्रिया है जिसमें पोषक माध्यम का संघटन व पादप वद्धि हॉर्मोन प्रमुख है । पादप ऊतक संवर्धन हेतु अनेक वैज्ञानिकों ने विभिन्न संघटनों वाले पोषक माध्यमों को तैयार किया

है । मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम एक अत्यधिक उपयोगी माध्यम है जिसे अनेक पादप प्रजातियों पर प्रयोग करके देखा गया है तथा इसे अत्यन्त अनकूल पाया गया है । पोषक माध्यम में वृद्धि हॉर्मोन्स को मिलाने से वांछित परिणाम प्राप्त किये जा सकते हैं । आक्सिन, साइटोकाइनिन तथा जिबरेलिन आदि मुख्य वृद्धि नियंत्रक है जो अंतःपात्रे स्थिति में कर्तोत्तकों में विभेदन/पुनर्विभेदन को प्रेरित करते हैं । ऊतक संवर्धन के लिये प्रयोग में लाया जाने वाला पोषक माध्यम, पादप कोशिकाओं की सभी पोषण आवश्यकताओं की पूर्ति करता है । एक नियंत्रित वातावरण में पादपों को त्वरित पोषण हेतु कार्बोहाइड्रेट की आवश्यकता होती है इसके लिये पोषक माध्यम में किसी शर्करा को मिलाना आवश्यक होता है । प्राय: 2-3% के अनुपात में सुक्रोज को पोषक माध्यम में मिलाने पर कोशिकाओं की ऊर्जा आवश्यकता की पूर्ति हो जाती है ।

1.11 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. अंतःपात्रे स्थिति में कृत्रिम माध्यम पर पादप पुनरुत्पादन की प्रक्रिया पादप ऊतक संवर्धन कहलाती है ।
2. कैलस अविभेदित कोशिकाओं का समूह होता है ।
3. हैबरलैण्ट (1902)
4. एफ.सी. स्टीवार्ट तथा जे. रेनर्ट ने गाजर में ।
5. मिलर (1902)
6. कोशिकाभित्ति रहित पादप कोशिकायें प्रोटोप्लास्ट कहलाती है ।
7. कोकिंग ने प्रोटोप्लास्ट संवर्धन की तकनीक विकसित की ।
8. शिप्रा गुहा तथा एस.सी. महेश्वरी (1964-1967) ने ।
9. अनेक कार्बनिक यौगिकों, अकार्बनिक यौगिकों तथा वृद्धि नियंत्रकों का जलीय मिश्रण जिसका ऊतक संवर्धन हेतु उपयोग किया जाता है ।
10. क. पोषक माध्यम का निर्माण
    - ख. कर्तोत्तकों का निर्जर्मीकरण
    - ग. निर्जर्म ऊतक स्थानान्तरण
    - घ. ऊष्मायन
    - ङ. पुनरुद्भवन
    - च. अनुकूलन
11. रसायनों की सहायता से पादप अंगों से सूक्ष्मजीवों व संदूषकों को नष्ट करने की प्रक्रिया सतही निर्जर्मीकरण कहलाती है ।
12. ऑटोक्लेव की सहायता से ।
13. इथायल एल्कोहॉल, मरक्यूरिक क्लोराइड, सोडियम हाइपोक्लोराइट तथा सिल्वर नाइट्रेट आदि।
14. जी. हैबरलैंट (1902)
15. कार्बनिक यौगिक, अकार्बनिक यौगिक, विटामिन, ई.डी.टी.ए., शर्करा व वृद्धि हॉर्मोन ।
16. इण्डोल एसिटिक अम्ल, नैफ़्थालीन एसिटिक अम्ल, काइनेटिन बेंजाइल अमीनो प्यूरीन ।

1.12 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions) :

1. पादप ऊतक संवर्धन के ऐतिहासिक परिप्रेक्ष्य पर एक निकध लिखिये ।
2. पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक के प्रमुख चरणों को संक्षेप में वर्णित कीजिये ।
3. सतही निर्जर्मीकरण से आप क्या समझते हैं ? विभिन्न निर्जर्मीकरण विधियों का सविस्तार वर्णन कीजिये ।
4. निम्नलिखित पर संक्षिप्त टिप्पणियां लिखिये -
   क. निर्जर्म ऊतक स्थानान्तरण
   ख. कोशिका की शक्तता
   ग. अंतःपात्रे स्थितियों में पोषण की आवश्यकता
   घ. वृद्धि हॉर्मोन्स
5. पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले विभिन्न पोषक माध्यमों का परिचय दीजिये । इसके प्रमुख संघटकों का उल्लेख कीजिये ।

1.13 शब्दावली (Glossary) :

1.	Embryogenesis	–	भ्रूणजनन
2.	Tissue Culture	–	ऊतक संवर्धन
3.	Totipotency	–	पूर्णशक्तता
4.	Explants	–	कर्तोत्तक
5.	Sterilization	–	निर्जर्मीकरण
6.	Inoculation	–	निवेशन
7.	Incubation	–	ऊष्मायन
8.	Hardening	–	अनुकूलन
9.	Growth Regulator	–	वृद्धि नियंत्रक
10.	Aesptic Tissue Transfer	–	निर्जर्मी ऊतक स्थानान्तरण

1.14 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books):

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स, स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेकनोलॉजी, लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. क. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इंटरोडक्शन दू प्लान्ट टिश्यू कल्वर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 2

पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन तथा कोशिका संवर्धन (SOMATIC EMBRY OGENESIS CELL CULTURE IN PLANTS)

इकाई की रूपरेखा

2.0 उद्देश्य
2.1 प्रस्तावना
2.2 पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन तथा अंगोद्भवन
2.3 ऊतक संवर्धन में विविधताएं
2.4 कायिक क्लोनीय तथा अन्य विविधताऐं
2.5 कोशिकाओं का विलगन
2.6 एकल कोशिका संवर्धन तथा क्लोनिंग
2.7 कृत्रिम बीज उत्पादन
2.8 बोध प्रश्न
2.9 सारांश
2.10 बोध प्रश्नों के उत्तर
2.11 अभ्यासार्थ प्रश्न
2.12 शब्दावली
2.13 संदर्भ ग्रन्थ

2.0 उद्देश्य (Objectives) :

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप समझ पायेंगे कि -

1. पादपों में ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा किस प्रकार कायिक भ्रूणोद्भवन तथा अंगोद्भवन किया जाता है, यह किन-किन जैविक, रासायनिक एवम् भौतिक कारकों द्वारा प्रभावित होता है तथा इनके क्या उपयोग हैं?
2. पादप ऊतक संवर्धन में विविधताऐं किस प्रकार एवं किन-किन कारणों से उत्पन्न होती है? कायिक क्लोनीय एंव गेमिटोक्लोनीय विविधताओं से क्या अभिप्राय है? पादप प्रजनन एवं कृषि के क्षेत्र में इनके क्या उपयोग हैं?
3. संवर्धनों से पादप कोशिकाओं को किस प्रकार विलगित किया जाता है ? एकल कोशिका संवर्धन एवं इसकी क्लोनिंग किस प्रकार की जाती है? एकल कोशिका संवर्धन के क्या उपयोग है ?
4. कायिक भ्रूणो से कृत्रिम बीज उत्पादन कैसे किया जाता है तथा इसके क्या उपयोग है ?

2.1 प्रस्तावना (Introduction)

पादप कोशिकाएं पूर्णशक्त (totipotent) होती हैं, अर्थात् प्रत्येक पादप कोशिका से संपूर्ण पादप विकसित किया जा सकता है । पादप कोशिकाओं की पूर्णशक्तता प्रदर्शित करने का प्रयास सर्वप्रथम **हैबरलैण्ड** (Heberlandt) नामक वैज्ञानिक ने 1902 में किया था । तत्पश्चात् कई वैज्ञानिकों द्वारा पादप कोशिकाओं, ऊतकों एवं अंगों को संवर्धन माध्यम पर संवर्धित करने के प्रयास किये गये । संवर्धित पादप कोशिकाओं से कायिक भ्रूणोदभवन का प्रदर्शन सर्वप्रथम **स्टीवार्ट एवं रेनर्ट** (Stewart and Reinert) द्वारा तथा अंगोद्भवन का प्रदर्शन **वहाइट** (White) द्वारा किया गया । ऊतक संवर्धनों द्वारा विकसित कायिक भ्रूणों से कृत्रिम बीज बनाये जा सकते हैं तथा अंगोद्भवन से प्ररोहों अथवा जड़ों का विकास किया जा सकता है । इस प्रकार प्रवर्धित प्ररोहों से पूर्ण पादप क्लोन विकसित किये जा सकते हैं, जिनका उपयोग पादपों के सूक्ष्म प्रवर्धन में किया जाता है । कोशिकाओं अथवा ऊतकों के कैलस संवर्धनों से कायिक क्लोनीय विविधताएं उत्पन्न की जाती है जिनका उपयोग पादप प्रजनन, कृषि एवं औद्योगिक क्षेत्रों में किया जाता है । वर्तमान समय में पादप कोशिका क्लोन विकसित करने के लिए कैलस के स्थापित निलम्बन संवर्धनों का उपयोग किया जाता है ।

इस इकाई में आपको ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा कायिक भ्रूणोदभवन, अंगोद्भवन, कृत्रिम बीज, काय क्लोनीय एवं गेमिटो क्लोनीय विविधताएं तथा एकल कोशिका क्लोन किस प्रकार विकसित किये जाते हैं तथा इनके क्या अनुप्रयोग है के बारे में विस्तार से समझाया गया है ।

2.2 पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन तथा अंगोद्भवन (Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Plants) :

2.2.1 पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन

पादप कोशिकाओं, ऊतकों अथवा अंगों को कृत्रिम संवर्धन माध्यम पर निर्जर्मीकृत एवं नियंत्रित अवस्थाओं में संवर्धित करने पर उत्पन्न/विकसित होने वाले भ्रूण, कायिक तथा अलैंगिक भ्रूणोदभवन की प्रक्रिया कायिक भ्रूणोद्भवन कहलाती है । सामान्यतय: कायिक भ्रूणों का निर्माण युग्मज भ्रूणों की ही तरह एकल कोशिका से होता है तथा ये दोनों ही द्विध्रुवीय संरचनाएं है । कायिक एवं युग्मज भ्रूणों का अंकुरण भी समान होता है । अमेरिकी वैज्ञानिक **स्टीवार्ड** (Steward) एवं जर्मन वैज्ञानिक **रेनर्ट** (Renert) ने 1958 में गाजर (Daucus Carota) की मूल से विकसित संवर्धन से सर्वप्रथम कायिक भ्रूणोदभवन के बारे में बताया । तत्पश्चात् सन् 1964 में भारतीय आण्विक जीव वैज्ञानिक **गुहा एवं माहेश्वरी** (Guha and Maheshwari) के बारे में बताया । ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा कायिक भ्रूणोद्भवन निम्न चार प्रावस्थाओं में सम्पन्न होता है

(i) प्रेरण प्रावस्था

संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त होने वाले पादप वृद्धि नियंत्रक (भ्रूण जनन के लिए सामान्यत: ऑक्सिन का उपयोग किया जाता है) के कारण कायिक कोशिकाओं में भ्रूण जनन की क्षमता आ जाती है, जिससे यह कोशिकाएँ अनेक समसूत्री विभाजनों के द्वारा भ्रूण की गोलाकार अवस्था का निर्माण करती है ।

(ii) विकास प्रावस्था

भ्रूण विकास की गोलाकार अवस्था के बाद की सभी अवस्थाएँ संयुक्त रूप से विकास प्रावस्था कहलाती है ।

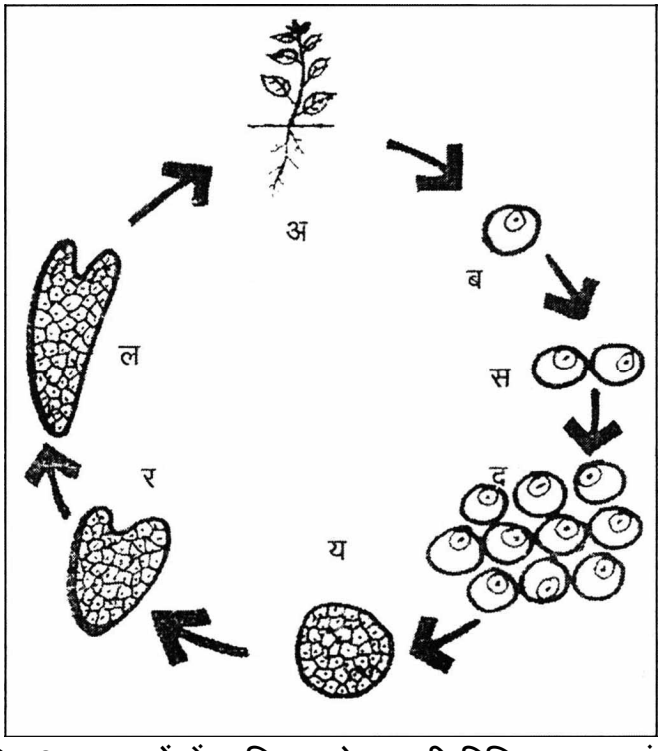
(iii) परिपक्वन प्रावस्था

इस प्रावस्था में कायिक भ्रूण के आकार में वृद्धि नहीं होती परन्तु यह कठोर होने लगता है । कायिक भ्रूण की परिपक्वता को एबसिसिक अम्ल (ABA) तथा उच्च शर्करा सांद्रता से बढाया जा सकता है।

(iv) अंकुरण प्रावस्था

इस प्रावस्था में कायिक भ्रूण अंकुरित होकर पूर्ण पादप में विकसित हो जाता है । कायिक भ्रूण के अंकुरण को जिबरेलिक अम्ल (GA_2) द्वारा उपचारित कर बढाया जा सकता है ।

पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन की प्रक्रिया को चित्र 2.1 के द्वारा समझा जा सकता है ।



चित्र 2.1 : पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन की विभिन्न प्रावस्थाएं -

(अ) पादप, (ब) पादप की पत्ती से पृथक्कृत एकल कोशिका , (स) एकल कोशिका के समसूत्री विभाजन द्वारा बना कोशिका युग्म,(द) कोशिका समूह (प्राकभ्रूण), (य) गोलाकार भ्रूण (र) हृदयकार भ्रूण,(ल) भ्रूण की टोरपीडो अवस्था

कायिक भ्रूणोद्भवन के प्रकार

शार्प एवं साथियों (Sharp et al., 1980) के अनुसार पादपों में कायिक भ्रूणोंद्भवन दो प्रकार से होता है जो निम्न है-

(क) प्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन

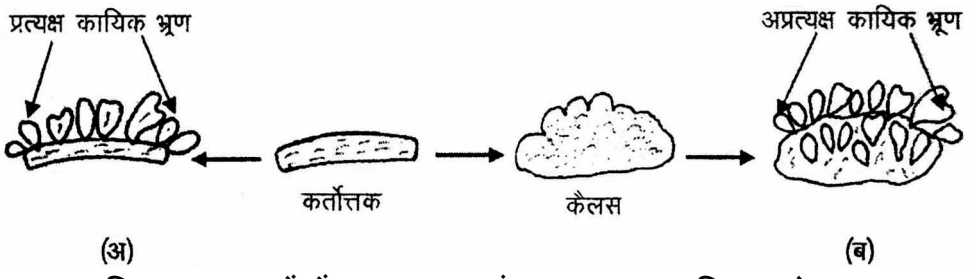
इस प्रकार के भ्रूणोद्भवन में कायिक भ्रूणों का विकास प्रत्यक्ष रूप से (सीधे) कर्तोत्तको से ही हो जाता है अर्थात इस प्रकार के जनन में कैलस प्रावस्था पूर्ण रुप से अनुपस्थित होती है । इस प्रक्रिया में प्रयुक्त

होने वाले कर्तोत्तकों की कायिक कोशिकाएँ सीधे ही भ्रूणों में विकसित हो जाती है । इस प्रकार का भ्रूणजनन सामान्यत: भ्रूणीय ऊतकों में पायी जाने वाली कोशिकाओं में देखा गया है । इस प्रकार के भ्रूणजनन में भाग लेने वाली कोशिकाएं प्रेरित भ्रूणजनिक निर्धारक कोशिकाएं(pre-embryogenic determined cells) कहलाती है ।

(ख) अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन

इस प्रकार के कायिक भ्रूणोद्भवन में कर्तोत्तकों से आरम्भ में कैलस (विभज्योतकी कोशिकाओं का असंगठित समूह) का निर्माण / विकास होता है, तत्पश्चात् इस कैलस से सीधे ही अथवा इससे स्थापित निलम्बन संवर्धनों द्वारा कायिक भ्रूणों का निर्माण होता है । इस प्रकार के भ्रूणजनन में भाग लेने वाली कोशिकाएं प्रेरित भ्रूणजनिक निर्धारक कोशिकाएं (induced embryogenic determined cells) कहलाती है । पादपों में प्रत्यक्ष एवं अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन की प्रक्रिया को चित्र 2.2 में समझाया गया है ।

ऊतक संवर्धन में पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन प्रयुक्त होने वाले कर्तोत्तक की प्रकृति, पादप के नि प्रारुप माध्यम, पादप वृद्धि नियंत्रकों की सांद्रता, प्रकृति एवं सम्मिश्रण आदि कारकों द्वारा प्रभावित होता है।



चित्र 2.2 : पादपों में (अ) प्रत्यक्ष एवं (ब) अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन

कायिक भ्रूणोद्भवन के अनुप्रयोग

पादप सूक्ष्म प्रवर्धन में कायिक भ्रूणोद्भवन के निम्न अनुप्रयोग है ।

(i) कायिक भ्रूणों के संपुटिकरण से कृत्रिम बीजों का उत्पादन किया जा सकता । इस प्रकार विकसित कृत्रिम बीजों को सामान्य बीजों की तरह प्रयोग में लिया जा सकता है ।

(ii) सूक्ष्म प्रवर्धन में कायिक भ्रूणों का महत्वपूर्ण योगदान है, क्योंकि इन्हें एक स्थान से दूसरे स्थान पर आसानी से ले जाया जा सकता है ।

(iii) कायिक भ्रूणों का विकास एकल कोशिकाओं से होता है अत: इनमें कायिक क्लोनीय विविधताओं की कोशिकीय स्तर पर पहचान की जा सकती है ।

(iv) कायिक भ्रूण एक द्विध्रुवी संरचना है, अत: इसमें जड़ जनन के पद की आवश्यकता नहीं होती।

कायिक आजनन द्वारा पादप सूक्ष्म प्रवर्धन की समस्याएं -

कायिक भ्रूणजनन द्वारा पादप सूक्ष्म प्रवर्धन की प्रमुख समस्याएं निम्न है -

(क) वृहत स्तर पर पादप उत्पादन कठिन होता है ।

(ख) विकसित भ्रूण सामान्यत: कम गुणवत्ता वाले होते हैं ।

(ग) कायिक भ्रूणों के विकास की कम खर्चीली तकनीक का उपलब्ध नहीं होना तथा

(घ) कायिक क्लोनीय विभिन्नताओं की उत्पत्ति की संभावनाएं ।

2.3.2 पादपों का अंगोद्भवन

ऊतक संवर्धन की इस प्रक्रिया में पादप कोशिकाओं अथवा ऊतकों से अंगों (मूल अथवा प्ररोह या दोनों ही) का विकास होता है, अंगों का यह विकास ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त होने वाले कर्तोत्तकों की कोशिकाओं की पूर्णशक्तता की अभिव्यक्ति पर निर्भर करता है । अंगोद्भवन की प्रक्रिया में कर्तोत्तकों को रासायनिक रुप से ज्ञात संवर्धन माध्यम पर निर्जर्मीकृत एवं नियंत्रित अवस्थाओं में संवर्धित किया जाता है । संवर्धनों के लिए प्रयुक्त संवर्धन माध्यम में पादप वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति एवं मात्रा भिन्न-भिन्न होती है । इस प्रक्रिया में अंगों का विकास संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त पादप वृद्धि नियंत्रक की प्रकृति पर निर्भर करता है । अंगोद्भवन में बनने वाले अंग (मूल या प्ररोह) एक ध्रुवी संरचनाएं होते है तथा इनका मातृ ऊतकों से सम्बन्ध बना रहता है ।

पात्रे अंगोद्भवन के बारे में **व्हाइट** (White, 1939) ने तम्बाकू के संकर पादप से उत्पन्न कैलस से प्ररोह जनन एवं इस वर्ष ही **नोबेकोर्ट** (Nobecort) ने गाजर के कैलस से मूल जनन के बारे में जानकारी दी । अंगोद्भवन की प्रक्रिया में ऑक्सिन के महत्व को बताने का श्रेय **स्कूग** (Skoog,1994) को जाता है । **स्कूग** के अनुसार ऊतक संवर्धन में ऑक्सिन जड़ जनन को उद्दीप्ति करता है जबकि प्ररोह जनन का संदमन करता है । **स्कूग एबं मिल्लर** (Skoog and Miller, 1957) ने सबसे पहले यह बताया कि पात्रे अंगोद्भवन में मूल अथवा प्ररोह का विकास साइटोकाइनिन व ऑक्सीन के संतुलित सम्मिश्रण पर निर्भर करता है । **स्कूग** जिन्हें साइटोकाइनिन की खोज का भी श्रेय है ने तम्बाकू के कैलस पर अपने प्रयोगों से यह बताया कि संवर्धन माध्यम में साइटोकाइनिन की अपेक्षा उच्च ऑक्सिन सान्द्रता जड़ जनन को प्रोत्साहित करती है जबकि प्ररोह जनन में इसका प्रतिकूल प्रभाव होता है । ऑक्सिन व साइटोकाइनिन का समअनुपात (बराबर मात्रा) कैलस जनन में सहायक होता है । इस तकनीक का उपयोग कर सैकड़ों पादप प्रजातियों में अंगोदभवन की प्रक्रिया को सुनिश्चित किया जा चुका है ।

पादपों में पात्रे अंगोदभवन की प्रक्रिया निम्न दो प्रकार से सम्पन्न होती है -

(1) प्रत्यक्ष अंगोद्भवन

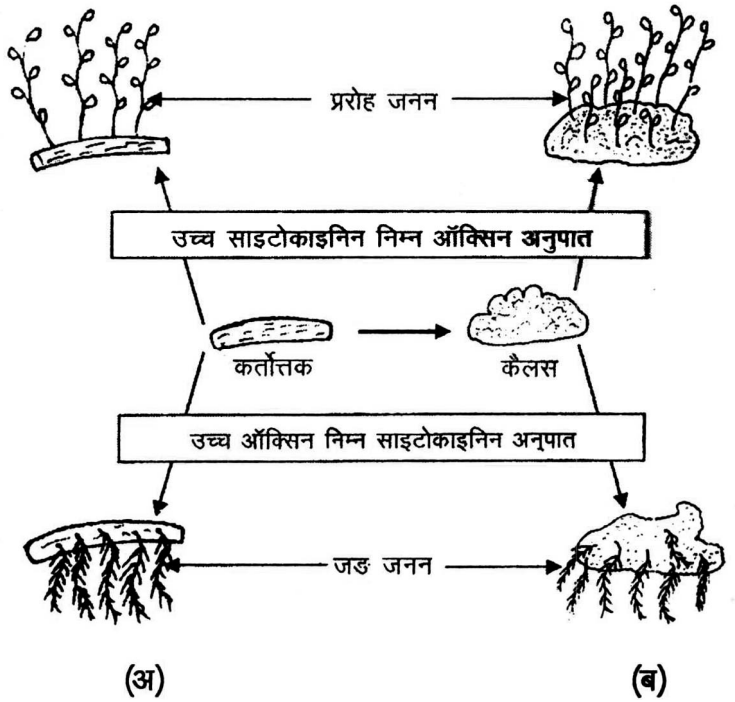
(2) अप्रत्यक्ष (परोक्ष) अंगोदभवन

(1) प्रत्यक्ष अंगोद्भवन

इस प्रकार के अंगोद्भवन में पादप ऊतकों द्वारा प्राप्त कर्तोत्तको को संवर्धन माध्यम में संवर्धित करने पर कैलस रहित अंगों का (जड़ या प्ररोह अथवा दोनों ही) विकास होता है । इस विधि से बनने वाले प्ररोहों को अपस्थानिक कलिकाएं तथा यह प्रक्रिया अपस्थानिक कलिका प्रवर्धन कहलाती है, जबकि इस प्रकार बनने वाली जडें अपस्थानिक जड़ें व यह प्रक्रिया अपस्थानिक जड़ जनन कहलाती है । इस प्रकार के प्रवर्धन (अंगोद्भवन) में प्ररोह कलिकाएँ प्रत्यक्ष रुप से पादप के विभिन्न भागों जैसे - जड, तना, पत्ती, पुष्पीय भाग आदि से प्रयुक्त कर्तोत्तकों से विकसित हो जाती है । यह प्रक्रिया शाकीय पादपों में अधिक विकसित है । प्रकृति में इस प्रकार का प्ररोह जनन ब्रायोफिल्लम पादप में देखा जा सकता है । ऊतक संवर्धन में प्रत्यक्ष अगोदभवन कई जैविक, रासायनिक एवं भौतिक कारकों जैसे - दाता पादप की आयु एवं कार्यकी अवस्था, पादप कर्तोत्तक की प्रकृति, ऊतक, संवर्धन माध्यम, संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त होने वाले पादप वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति एवं मात्रा, मौसम व संवर्धन अवस्थाओं जैसे प्रकाश, आर्द्रता, तापमान आदि पर निर्भर करता है । (चित्र 2. 3)

(2) अप्रत्यक्ष अंगोद्भवन

इस प्रकार के अंगोदभवन में पादप कर्तोत्तकों से पहले कैलस का विकास होता है, तत्पश्चात् इस कैलस के विभेदन से प्ररोहों एवं जड़ों का निर्माण होता है । कैलस से प्ररोह जनन अथवा जड़ जनन मुख्य रुप से संवर्धन माध्यम के संगठन तथा इसमें प्रयुक्त होने वाले साइटोकाइनिन व ऑक्सिन के अनुपात पर निर्भर करता है जिसे चित्र सं. 2.3 में दर्शाया गया है । विभिन्न प्रकार के कर्तोत्तक जैसे बीजपत्र, अधोबीजपत्र, पत्ती, जड़, तना, नवजात पुष्पक्रम, पुष्पीय भाग, भ्रूण, भ्रूणपोष आदि का उपयोग कर कई पादप प्रजातियों में कैलस से अंगोद्भवन किया जा चुका है । पादप के परिपक्व ऊतकों एवं अंगों से प्राप्त कर्तोत्तकों की तुलना में अपरिपक्व ऊतकों व अंगों से प्राप्त कर्तोत्तक कैलस एवं इससे अंगोद्भवन के लिए अधिक उपयोगी है । प्रत्यक्ष अंगोद्भवन की तरह ही अप्रत्यक्ष अंगोद्भवन भी कई जैविक, रासायनिक एवं भौतिक कारको पर निर्भर करता है ।



चित्र 2.3 : पादपों में (अ) प्रत्यक्ष एवं (ब) अप्रत्यक्ष अंगोद्भवन

2.4 कायिक क्लोनीय एवं अन्य विविधताएं (Somaclonal and Other Variations) :

सैद्धान्तिक रुप से पादप कोशिकाएं पूर्णशक्त होती है तथा एकल पादप कोशिका के विभेदन से पूर्ण पादप विकसित किया जा सकता है, परन्तु ऊतक संवर्धन की इस प्रक्रिया में कोशिका को सैकड़ो बार विभाजित होना पड़ता है जिससे पहले कैलस, तत्पश्चात् इस कैलस विभेदन से पूर्ण पादप का विकास होता है । विभाजन की इस प्रक्रिया के दौरान कोशिका अनेक बाह्य एवं आंतरिक कारकों के द्वारा प्रभावित होती है । इस प्रकार प्रभावित करने वाले बाह्य एवं आंतरिक कारकों के कारण कोशिका संवर्धनों में विविधताएं उत्पन्न हो जाती है, यह विविधताएं कायिक क्लोनीय विविधताएं कहलाती है। ऊतक संवर्धन

में अंगोद्भवन, कैलस कोशिका संवर्धन तथा अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन इस प्रकार की विविधताओं के मुख्य स्रोत है । कायिक कोशिकाओं एवं युग्मक अथवा युग्माकोदभिदों की कोशिकाओं से उत्पन्न होने वाली विभिन्नताएं क्रमश: कायिक क्लोनीय एवं गेमिटो क्लोनीय विविधताएं कहलाती है । ऊतक संवर्धन में इस प्रकार की विविधताएं कोशिकीय विषम अनुवांशिकी के कारण उत्पन्न होती है जिसके मुख्य कारण (i) स्त्रोत कर्तोत्तक में विद्यमान अनुवांशिक विकारों की अभिव्यक्ति तथा (ii) संवर्धन चक्रों के दौरान प्रयुक्त होने वाले वृद्धि नियंत्रकों, संवर्धन माध्यम, संवर्धन अवस्थाओं के कारण उत्पन्न होने वाली नई आनुवंशिक अनियमितताएं है ।

अगुणित जनन कोशिकाओं से उत्पन्न गेमिटोक्लोन कायिक क्लोनों से निम्न प्रकार भिन्न होते हैं -

(i) गेमिटोक्लोनीय विविधताओं से विकसित अगुणित पादपों में प्रभावी तथा अप्रभावी दोनों प्रकार के उत्परिवर्ती जीनों की अभिव्यक्ति अगुणित पादपों में होती है, जिससे प्रत्यक्ष रुप से नये वेरियेंट की पहचान आसानी से की जा सकती है ।

(ii) इन गेमिटोक्लोनो से अर्धसूत्री विभाजन द्वारा उत्पन्न पुनर्योजन प्राप्त किये जा सकते हैं

(iii) इन गेमिटोक्लोनों का पादप प्रजनन में उपयोग गुणसूत्रों के द्विगुणन के पश्चात् ही संभव है ।

आधुनिक शोध कार्यों से यह पता चला है कि ऊतक संवर्धन में निरन्तर उत्पन्न होने वाले इन आनुवांशिक परिवर्तनों/पुनर्योजनों की अभिव्यक्ति जैव रासायनिक एवं आण्विक स्तर पर होती रहती है । अत: पादप ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा विभिन्नताएं सुगमतापूर्वक एवं बिना किसी परिष्कृत तकनीक द्वारा उत्पन्न की जा सकती है । यह विविधताएं कायिक क्लोनों एवं गेमिटोक्लोनों में आनुवांशिक पुनर्योजनों का मुख्य स्त्रोत है । पादप ऊतक संवर्धन में उत्पन्न इस प्रकार के क्लोनों का उपयोग पादप प्रजनन, कृषि एवं औद्योगिक क्षेत्रों में किया जाता है । कायिक क्लोनों द्वारा आलू में अगेती एवं पछेती अंगमारी एवं गन्ने में मृदुरोमिल आसिता रोगरोधी किस्में विकसित की गई है ।

2.5 कोशिकाओं का विलगन (Isolation of Cells) :

पादप अंगों के ऊतकों, जैसे - पत्ती के पर्णमध्योत्तक तथा कैलस संवर्धनों से कोशिकाओं का पृथक्करण कोशिका विलगन कहलाता है । इन विलगित पादप कोशिकाओं से स्थापित सवधर्नों से कोशिका पंक्तियों का विकास किया जाता है । इन कोशिका पक्तियों का चयन कर उनका उपयोग उच्च द्वितीयक उपापचयन उत्पादकता वाले संवर्धन, विकसित करने एवं उच्च कृषि सम्बन्धित लक्षणों वाले पादप विकसित करने में किया जाता है । कोशिकाओं का विलगन उपयोग में लिये जाने वाले पादप ऊतकों की प्रकृति पर निर्भर करता है । पादप कोशिकाओं का विलगन निम्न दो प्रकार से किया जा सकता है -

(i) पादप अंगों से (प्रत्यक्ष कोशिका विलगन)

(ii) संवर्धित पादप कैलस से (अप्रत्यक्ष कोशिका विलगन)

(i) पादप अंगों से

पादपों की पत्तियों की कोशिकाएँ समरुपी होने के कारण यह कोशिका विलगन के लिए सबसे उपयोगी अंग है । इसकी सहायता से निश्चित एवं बृहत् स्तर पर नियंत्रित कोशिका संवर्धन तैयार किये जा सकते हैं । अंगों से कोशिका विलगन निम्न दो विधियों से किया जा सकता है -

(क) यांत्रिक विधि द्वारा कोशिका विलगन

इस विधि द्वारा कोशिका विलगन के लिए सबसे उपयुक्त ऊतक पर्ण मध्योत्तक है । इस विधि का उपयोग कर कई एकबीजपत्री एवं द्विबीजपत्री पादपों से प्रकाश संश्लेषण एवं श्वसन सक्रिय एकल कोशिकाओं का विलगन सफलतापूर्वक किया जा चुका है । इस विधि का उपयोग कर सर्वप्रथम **बॉल एवं जोशी** (Ball and Joshi, 1965) ने मूंगफली की पत्तियों से विलगित कोशिकाओं द्वारा संवर्धनों की स्थापना की थी ।

नानम एवं कुलांडेइवेल (Ginanam and Kulandaivelu) ने इस विधि द्वारा कोशिकाओं के विलगन की तकनीक विकसित की जिसके अनुसार पादप ऊतकों अथवा अंगों का पहले पेषण (grinding) माध्यम में खरल एवं मूसली की सहायता से द्रव्य सम्मर्दन किया जाता है, तत्पश्चात् इस समागीकृत विलयन को दोहरी परत मलमल के कपड़े से छाना जाता है । इस प्रकार विलगित कोशिकाओं को पुनःपेषण माध्यम में अपकेन्द्रण द्वारा धोया जाता है । इस विधि द्वारा मृदुत्तकीय कोशिकाओं को ही विलगित किया जा सकता है । यह विधि एन्जाइमी कोशिका विलगन की विधि से अधिक उपयोगी है क्योंकि-

(i) इस विधि में विलगित कोशिकाओं पर एन्जाइमों के हानिकारक प्रभाव नहीं पड़ते

(ii) इसमें कोशिकाएं जीवद्रव्य कुंचित नहीं होती ।

(ख) एन्जाइमी कोशिका विलगन विधि

टकेबे एवं सहयोगियों (Takabe et al.) ने 1968 में तम्बाकू की पत्तियों को पैक्टिनेज एन्जाइम से उपचारित कर सबसे पहले इस विधि से उपापचयी रुप से सक्रिय पर्ण मध्योत्तक कोशिकाओं को विलगित करने में सफलता प्राप्त की थी । तत्पश्चात् इन्होंने यह भी बताया कि द्रव्य सम्मर्दन मिश्रण में पोटेशियम डेक्सट्रांन सल्फेट मिलाकर विलगित कोशिकाओं की उत्पादकता को बढाया जा सकता है । एन्जाइमी कोशिका विलगन की विधि की सहायता से पर्ण मध्योत्तक की स्पांजी मृदुत्तकीय एवं खम्भ ऊतक की कोशिकाओं को अलग-अलग तथा कोशिका क्षति के बिना विलगित किया जा सकता है।

(ii) संवर्धित ऊतकों से कोशिकाओं का विलगन

पादप कोशिकाओं के विलगन में इस विधि का सबसे अधिक उपयोग किया जाता है । इस विधि में सबसे पहले सतही निर्जर्मीकृत कर्तोत्तकों को अर्द्धठोस संवर्धन माध्यम पर संवर्धित किया जाता है । इस माध्यम में कैलस जनन के लिए उपयोगी पादप वृद्धि नियंत्रकों की उचित मात्रा एवं सम्मिश्रण होता है । इस प्रकार संवर्धित कर्तोत्तकों से कैलस का विकास होता है । इस कैलस का बार-बार उपसंवर्धन किया जाता है जिससे यह कैलस भुरभुरा अथवा सुचुर्ण्य हो जाता है । कैलस का सुचुर्ण्य होना सूक्ष्म कोशिका निलम्बन संवर्धन स्थापित करने की पहली आवश्यकता है । इस प्रकार विकसित कैलस को सतत् प्रक्षोभित तरल माध्यम युक्त फ्लास्कों में स्थानान्तरित कर दिया जाता है तथा इन फ्लास्कों को प्रक्षोभन के लिए घूर्णी हल्लित पर रखा जाता है । संवर्धनों का प्रक्षोभन एकल कोशिका संवर्धन हेतु आवश्यक है क्योंकि - (i) पादप कैलस पर प्रक्षोभन द्वारा पड़ने वाले दाब के कारण यह कैलस पहले छोटे-छोटे टुकड़ों में व तत्पश्चात् एकल कोशिकाओं में विलगित हो जाता है । (ii) प्रक्षोभन के कारण माध्यम में एकल कोशिकाऐं एवं कोशिका समूह समान रुप से वितरित रहते हैं, जिससे संवर्धन माध्यम में गैसों का आदान-प्रदान होता रहता है ।

विलगित एकल कोशिकाओं का उपयोग कोशिका पंक्तियां तथा कोशिकीय क्लोन विकसित करने में किया जाता है ।

2.6 एकल कोशिका संवर्धन तथा क्लोनिंग (Single Cell Culture and Cloning) :

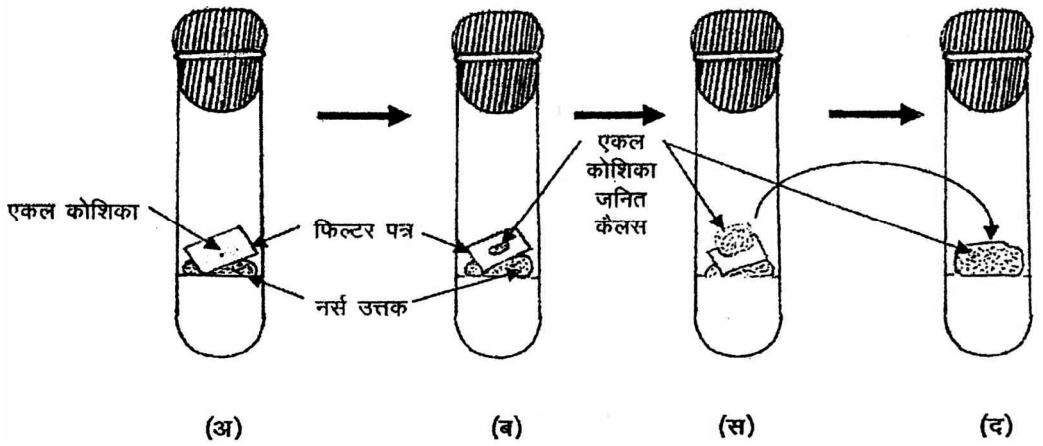
एकल कोशिका संवर्धनों की स्थापना, कोशिकाओं के स्थापित द्रव्य संवर्धनों अथवा निलम्बन संवर्धनों से की जाती है । कोशिका निलम्बन संवर्धनों में एकल कोशिकाओं के साथ-साथ कोशिका समूह भी पाये जाते हैं, अत: इस प्रकार के तरल संवर्धन से प्राप्त कैलस वास्तव में कोशिका पंक्ति का क्लोन नहीं होता है । **म्यूर एवं साथियों** (Muir et al.) ने 1954 में पहली बार नर्स कोशिका संवर्धन विधि द्वारा तम्बाकू एवं मेरी गोल्ड पादप में एकल कोशिका संवर्धन से क्लोन प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की थी । इस प्रकार स्थापित, विलगित एकल कोशिका संवर्धनों में कोशिका विभाजन, विभेदन एवं इनमें होने वाले परिवर्तनों का अवलोकन सूक्ष्मदर्शी द्वारा किया जा सकता है ।
पादप एकल कोशिकाओं का संवर्धन निम्न विधियों द्वारा किया जा सकता है -

2.6.1 बर्गमेन की कोशिका प्लेटन विधि

बर्गमेन (Bergmann, 1960) द्वारा प्रतिपादित एकल कोशिका संवर्धन की यह विधि सबसे अधिक प्रचलित है । इस विधि में निलम्बित मुक्त कोशिकाओं युक्त द्रव्य संवर्धन को समान आयतन के पिघले हुए (30-35^{0}C) 0.6-1.0% (w/v) अगरयुक्त माध्यम में मिलाकर पेट्री प्लेट्स में इस प्रकार फैला दिया जाता है, जिससे कोशिकाएं समान रुप से वितरित होकर एक परत बना सकें । ठंडी होने पर पेट्री प्लेट्स के चारों ओर पेराफिल्म लगा दी जाती है । इस विधि में प्लेटन से पूर्व एकल कोशिका युक्त द्रव्य संवर्धनों को सूक्ष्म छलनी के द्वारा छाना जाता है जिससे सामान्यत: एकल कोशिकाओं का ही प्लेटन होता है । इन पेट्री प्लेट्स का सूक्ष्मदर्शी की सहायता से अवलोकन कर एकल कोशिकाओं को चिन्हित कर लिया जाता है, जिससे एकल कोशिका क्लोन को पृथक किया जा सके । इन संवर्धनों को 25^{0}C तापमान पर अंधेरे में रखा जाता है ।

2.6.2 फिल्टर पत्र रेफ्ट नर्स तकनीक

इस तकनीक में एकल कोशिका के विलगन के कई दिनों पूर्व एक छोटे (8×8mm) निर्जर्मीकृत फिल्टर पत्र को जर्म रहित अवस्थाओं में स्थापित कैलस संवर्धन पर रख दिया जाता है । यह कैलस नर्स ऊतक कहलाता है । कुछ दिनों में यह फिल्टर पत्र इस नर्स ऊतक द्वारा स्त्रावित द्रव्य एवं पोषकों द्वारा गीला हो जाता है, तत्पश्चात् निलम्बन संवर्धन से माइक्रोपाइपेट की सहायता से एकल कोशिका को पृथक कर इस भीगे हुए फिल्टर पत्र रेफ्ट पर स्थापित कर दिया जाता है । कुछ दिनों पश्चात् यह एकल कोशिका विभाजित होकर कोशिकाओं का समूह बनाती है जिसे माइक्रोकेलाई कूहा जाता है । इस माइक्रोकेलाई को अर्ध ठोस माध्यम पर स्थानान्तरित कर दिया जाता है । जहां यह एकल कोशिका पंक्ति का विकास करता है । इस विधि द्वारा चावल तथा मक्के की शुद्ध कोशिका पंक्तियां स्थापित की जा चुकी है । (चित्र2.4)

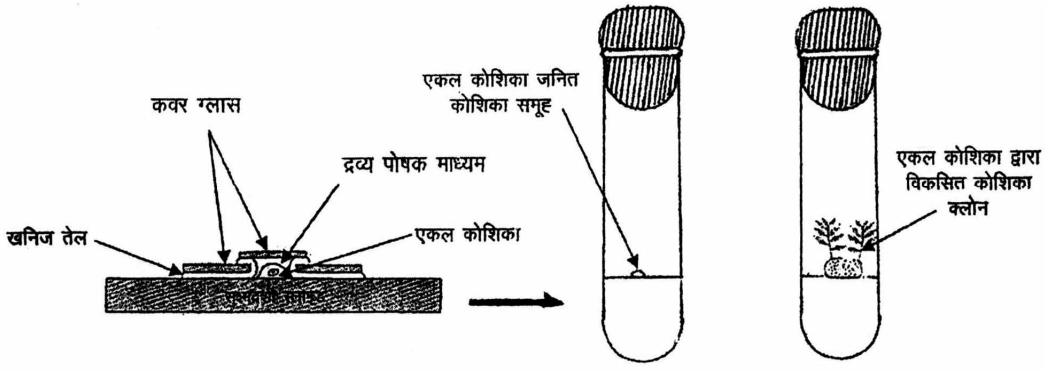


(चित्र2.4) : नर्स ऊतक संवर्धन तकनीक द्रवरा विकसित कोशिक क्लोन (अ) नर्स ऊतक पर स्थित फिल्टर पत्र पर पृथक्कृत एकल कोशिका, (ब-स) कोशिका विभाजनों के परिणामस्वरूप विकसित कैलस (कोशिका क्लोन)

सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीक

एकल कोशिका संवर्धन की यह तकनीक जोंस (jones, 1960) द्वारा विकसित की गई थी । इस तकनीक में कोशिका निलम्बन संवर्धनों से एकल कोशिका युक्त संवर्धन माध्यम की बूंद को पृथक कर लिया जाता है, तथा इसे कवर स्लिपों एवं सूक्ष्मदर्शी स्लाइड की सहायता से बने सूक्ष्म प्रकोष्ठ में निर्जर्मीकृत अवस्थाओं में स्थानान्तरित कर दिया जाता है। इस एकल कोशिका युक्त माध्यम को निर्जर्मीकृत खनिज तेल (पैराफीन) द्वारा धोया जाता है एवं कवर स्लिप से ढककर इस सूक्ष्म प्रकोष्ठ को पैराफीन से सील कर दिया जाता है । (चित्र 2.5)

इस सूक्ष्मदर्शी स्लाइड को जर्मरहित/निर्जमीकृत पेट्री प्लेट में रखकर संवर्धन कक्ष में रख दिया जात है जहाँ समय-समय पर इसका अवलोकन कर एकल कोशिका में विभाजन एवं विकास का अध्ययन किया जाता है । कुछ ही दिनों में इस एकल कोशिका से कैलस का निर्माण होने लगता है, जिसका उपयोग कोशिका पंक्ति के विकास में किया जाता है । इस तकनीक में एकल कोशिका का संवर्धन सूक्ष्म प्रकोष्ठ में होता है इस कारण इसे सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीक कहा जाता है।



चित्र 2.5 : कोशिका क्लोनिंग की सूक्ष्प्रकोष्ठ तकनीक की विभिन्न

सूक्ष्म बूंद विधि

इस तकनीक का उपयोग पृथककृत एकल प्रोटोप्लास्ट के लिए किया जाता है ।

एकल कोशिका संवर्धन में संवर्धन माध्यम के संगठन एवं प्लेटित कोश्कि।ओ के घनत्व की महत्त्वपूर्ण भूमिका रहती है । जिसके कारण संवर्धित एकल कोशिका में विभाजन प्रभावित होते हैं ।

एकल कोशिका संवर्धन के ऊतक संवर्धन में कई अनुप्रयोग है, जिनमें से कुछ मुख्य निम्न है -

(i) एकल एवं कोशिका समूह की कार्यकी के अध्ययन में

(ii) प्रोटोप्लास्ट के पृथक्करण में

(iii) कोशिका क्लोन एवं कोशिका पंक्तियों के विकास में

(iv) कोशिकाओं की पोषण संबंधित आवश्यकताओं के अध्ययन में

(v) द्वितीयक उपापचयों के उत्पादन में

2.7 कृत्रिम बीज उत्पादन (Artificial Seed Production) :

ऊतक संवर्धन में कायिक भ्रूण जनन से विकसित भ्रूणों के सम्पुटिकरण द्वारा कृत्रिम बीज बनाने की अवधारणा का प्रतिपादन सन् 1978 में **मूरासिगे** (Murashige) ने किया था । इस प्रक्रिया में कायिक भ्रूणों को एक सुरक्षा आवरण द्वारा सम्पुटित किया जाता है तथा इन्हीं सम्पुटित कायिक भ्रूणों को कृत्रिम बीज कहा जाता है । सामान्यत: यह सम्पुटक/आवरण कैल्सियम ऐल्जिनेट का बना होता है । कई पादप प्रजातियों में जैसे - एल्फाएल्फा, सरसों की प्रजातियां, चावल, मक्का, सतावर, कॉटन, पाल्म युकेलिप्टस आदि में कृत्रिम बीजों द्वारा पूर्ण पादप विकसित करने की तकनीक विकसित की जा चुकी है । इस तकनीक का उपयोग सामान्य बीजों के तुलनात्मक मूल्यों पर क्लोनल बीज तैयार करना है । इस कारण भविष्य में फसल उत्पादन के क्षेत्र में इस तकनीक का महत्त्वपूर्ण योगदान रहेगा। वर्तमान में निम्न दो प्रकार के कृत्रिम बीज उत्पादित किये जाते हैं -

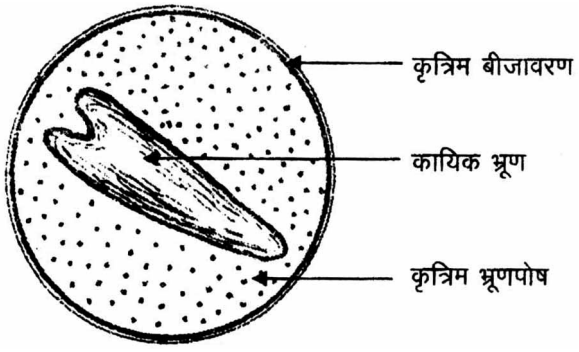
(i) जल शुष्कित कृत्रिम बीज

कृत्रिम बीज उत्पादन की इस विधि में पहले कायिक भ्रूणों के मिश्रण को पॉलीऑक्सीइथाइलीन ग्लाइकोल से आवरित किया जाता है तत्पश्चात इस आवरित कायिक भ्रूणों के मिश्रण को कई घंटों तक सूखने के लिए छोड़ दिया जाता है । इस सुखे हुये आवरित कायिक भ्रूणों के मिश्रण को पुन जलयोजन के लिए संवर्धन माध्यम पर रखकर भण्डारण कर लिया जाता है ।

(ii) जलयोजित कृत्रिम बीज

जलयोजित कृत्रिम बीजों में एकल कायिक भ्रूण का हाइड्रो जेल जैसे कैल्सियम ऐल्जिनेट द्वारा सम्पुटिकरण किया जाता है । इस तकनीक से कृत्रिम बीज बनाने की विधि सबसे पहले के. रेडनबौ एवं साथियों (K. Redenbaugh et al.) ने एल्फाएल्फा पादप के जलयोजित एकल कायिक भ्रूण के सम्पुटिकरण के लिए विकसित की थी ।

इस प्रकार के कृत्रिम बीज उत्पादन में प्रारंभ में कायिक भ्रूणों को 2% (w/v) सोडियम ऐल्जिनेट (हाइड्रो जेल) में मिश्रित किया जाता है तत्पश्चात् पिपेट की सहायता से एकल कायिक भ्रूण को कैल्सियम क्लोराइड विलयन में डाला जाता है। आयन विनिमय की क्रिया द्वारा कायिक भ्रूण के चारों ओर कैल्सियम ऐल्जिनेट का आवरण (सम्पुटक) बन जाता है। इस प्रकार बने कृत्रिम बीजों को बोने से पहले जल द्वारा धोया जाता है । इस प्रकार बने आवरण में भ्रूण के अतिरिक्त आवश्यकतानुसार अन्य पोषक (भ्रूणपोष के रुप में) वृद्धि नियंत्रक पीड़ानाशी तथा प्रतिजैविक पदार्थ का भी समायोजन किया जा सकता है| (चित्र 2.6)



चित्र 2.6 : कृत्रिम बीज

उपयोग

(i) कृत्रिम बीजों का उपयोग पादप प्रजनन के लिए किया जाता है ।

(ii) वानिकी के क्षेत्र में इनका उपयोग निम्न लागत से उच्च गुणवत्ता वाले पादप विकसित करने में किया जाता है ।

(iii) कायिक भ्रूणों के सम्पुटिकरण की प्रक्रिया का यांत्रिकरण कर ऊतक संवर्धन द्वारा बनने वाले पादपों की लागत कम की जा सकती है ।

2.8 बोध प्रश्न :

1. निम्नलिखित कथनों में सत्य/असत्य बताइये -
   (क) कायिक तथा युग्मज भ्रूण दोनों ही द्विधुवी संरचनाएं है (सत्य/असत्य)
   (ख) सबसे पहले कायिक भ्रूणोद्भवन की प्रक्रिया गाजर की मूल से विकसित संवर्धनों में देखी गई (सत्य/असत्य)
   (ग) प्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोदभवन में भाग लेने वाली कोशिकाएं प्रेरित भ्रूणजनिक निर्धारक कोशिकाएं कहलाती है (सत्य/असत्य)
   (घ) अंगोद्भवन में बनने वाले अंग द्विधुवी संरचनाएं होती हैं (सत्य/असत्य)
   (ङ) एकल कोशिका संवर्धनों की स्थापना कोशिकाओं के स्थापित द्रव्य संवर्धनों से की जाती है । (सत्य/असत्य)
2. कायिक भ्रूणों की परिपक्वता को..... तथा उच्च..... सांद्रता से बढ़ाया जा सकता है ।
3. कायिक भ्रूणों के अंकुरण को..... द्वारा उपचारित कर बढ़ाया जा सकता है।
4. सम्पुटिक्रत कायिक भ्रूण..... कहलाते हैं ।
5. स्कूग के अनुसार ऑक्सिन..... को उद्दीपित करता है जबकि..... का संदमन करता है।
6. कायिक कोशिकाओं से उत्पन्न विविधताएं..... विविधताएं तथा युग्मक कोशिकाओं से उत्पन्न विविधताएं..... विविधताएं कहलाती है ।
7. कोशिका पंक्तियों का विकास विलगित पादप..... से स्थापित संवर्धनों द्वारा किया जाता है ।
8. ऊतक संवर्धन के दौरान कायिक कोशिकाओं से उत्पन्न विविधताएं क्या कहलाती है?

9. फिल्टर पत्र रफ्ट नर्स तकनीक द्वारा..... का विकास किया जाता है ।
10. एकल कोशिका संवर्धन की कौनसी तकनीक जोंस द्वारा विकसित की गई?
11. कृत्रिम बीज कितने प्रकार के होते हैं?
12. कायिक भ्रूणों के... .. .. की प्रक्रिया का यांत्रिकरण कर विकसित होने वाले पादपों की.....को कम किया जा सकता है ।

2.9 सारांश (Summary) :

- पादप कोशिकाओं, ऊतकों अथवा अंगों को कृत्रिम संवर्धन माध्यम पर निजर्मीकृत एवं नियंत्रित अवस्थाओं में संवर्धित करने पर विकसित होने वाले भ्रूण, कायिक भ्रूण तथा अलैंगिक भ्रूणोद्भवन की यह प्रक्रिया कायिक भ्रूणोद्भवन कहलाती है ।
- ऊतक संवर्धन विधि में कायिक भ्रूणोद्भवन चार प्रावस्थाओं में सम्पन्न होता है - (i) प्रेरण प्रावस्था, (ii) विकास प्रावस्था, (iii) परिपक्वन प्रावस्था तथा (iv) अंकुरण प्रावस्था ।
- शॉर्प के अनुसार पादपों में कायिक भ्रूणोदभवन दो प्रकार से होता है - (i) प्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोदभवन तथा (ii) अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन ।
- कायिक भ्रूणों का उपयोग कृत्रिम बीज बनाने में किया जाता है ।
- ऊतक संवर्धन में पादप कोशिकाओं अथवा ऊतकों से अंग विकास की प्रक्रिया अंगोद्भवन कहलाती है ।
- अंगोदभवन भी भ्रूणोदभवन की तरह दो प्रकार से होता है - (i) प्रत्यक्ष अंगोद्भवन तथा (ii) अप्रत्यक्ष अंगोद्भवन।
- ऊतक संवर्धन में कायिक भ्रूणोदभवन व अंगोद्भवन पादप जीन प्रारुप, कर्तोत्तक की प्रकृति, संवर्धन माध्यम एवं संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त होने वाले पादप वृद्धि नियंत्रकों की मात्रा तथा उनके सम्मिश्रण अनुपात पर निर्भर करता है ।
- ऊतक संवर्धन में कायिक कोशिकाओं से विकसित होने वाले पादपों में उत्पन्न विविधताएं कायिक क्लोनीय विविधताएं तथा इस प्रकार विकसित होने वाले पादप कायिक क्लोन कहलाते हैं ।
- युग्मकों अथवा युग्मकोदभिद् कोशिकाओं से विकसित होने वाले अगुणित पादपों में उत्पन्न विविधताएं गेमिटोक्लोनीय विविधताएं तथा इस प्रकार प्राप्त पादप गेमिटोक्लोन कहलाते हैं ।
- पादप, ऊतक संवर्धनों से उत्पन्न कायिक एवं गेमिटो क्लोनीय विविधताओं का उपयोग पादप प्रजनन कृषि एवं औद्योगिक क्षेत्रों में किया जाता है ।
- पादप अंगों, ऊतकों एवं कैलस संवर्धनों से कोशिकाओं का पृथक्करण कोशिक विलगन कहलाता है ।
- कोशिकाओं का विलगन दो प्रकार से किया जा सकता है -
  - (i) पादप अंगों से अथवा प्रत्यक्ष कोशिका विलगन तथा
  - (ii) संवर्धित पादप कैलस से अथवा अप्रत्यक्ष कोशिका विलगन
- पादप अंगों से कोशिकाओं का विलगन दो विधियों से किया जा सकता है -
  - (i) यांत्रिक विधि द्वारा कोशिका विलगन
  - (ii) एन्जाइमी कोशिका विलगन विधि

- एकल कोशिकाओं का संवर्धन सर्वप्रथम म्यूर एवं साथियों द्वारा तम्बाकू तथा मेरीगोल्ड पादपों से प्राप्त संवर्धनों से किया गया ।
- एकल कोशिका संवर्धन निम्न विधियों द्वारा किया जाता है -
  (i) वर्गमेन की कोशिका प्लेटन विधि
  (ii) फिल्टर पत्र रेफ़्ट नर्स विधि तथा
  (iii) सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीक
- फिल्टर पत्र रेफ़्ट नर्स तथा सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीकों का उपयोग एकल कोशिकीय क्लोन प्राप्त करने में किया जाता है ।
- सम्पुटिकृत कायिक भ्रूण कृत्रिम बीज कहलाता है ।
- कृत्रिम बीज दो प्रकार के होते है -
  (i) जल शुष्कित कृत्रिम बीज तथा
  (ii) जलयोजित कृत्रिम बीज
- कृत्रिम बीजों का उपयोग पादप प्रजनन एवं वानिकी के क्षेत्रों में प्रमुखता से किया जाता है ।

2.10 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. (क) सत्य (ख) सत्य
   (ग) असत्य (घ) असत्य
   (ङ) सत्य
2. एबसिसिक अप्ल (ABA), शर्करा
3. जिबरेलिक अम्ल (GA_3)
4. कृत्रिम बीज
5. जड़ जनन, प्ररोह जनन
6. कायिक क्लोनीय गेमिटो क्लोनीय
7. कोशिकाओं
8. कायिक क्लोनीय विविधताएं कहलाती है ।
9. एकल कोशिका क्लोन
10. सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीक
11. दो प्रकार के
12. सम्पुटीकरण, लागत

2.1 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question) :

1. पादपों में कायिक भ्रूणोद्भवन की प्रक्रिया को समझाइये ।
2. कायिक भ्रूणोद्भवन के क्या-क्या अनुप्रयोग है ?
3. पादपों में अंगोद्भवन की प्रक्रिया का सचित्र वर्णन कीजिए ।
4. कायिक भ्रूणोद्भवन एवं अंगोद्भवन के वानिकी के क्षेत्र में क्या अनुप्रयोग है? समझाइये ।

5. कायिक क्लोनीय विविधताओं से क्या अभिप्राय है? ऊतक संवर्धनों द्वारा इस प्रकार की विविधताएं कैसे उत्पन्न की जाती है ?
6. पादप कोशिकाओं का विलगन किस प्रकार किया जाता है? समझाइये ।
7. एकल कोशिका क्लोन विकसित करने की किसी एक विधि का वर्णन कीजिये ।
8. निम्नलिखित पर टिप्पणियां लिखिए -
   (क) प्रत्यक्ष अंगोद्भवन
   (ख) अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन
   (ग) कायिक क्लोनीय विविधताएं
   (घ) गेमिटो क्लोनीय विविधताएं
   (ङ) फिल्टर पत्र रेपट नर्स तकनीक
   (च) सूक्ष्म प्रकोष्ठ तकनीक
   (छ) कायिक भ्रूणोद्भवन की प्रावस्थाएं
   (ज) संवर्धित ऊतकों से कोशिका विलगन
9. कृत्रिम बीज से क्या अभिप्राय है? ये कितने प्रकार के होते हैं वर्णन कीजिए ।

2.12 शब्दावली (Glossary) :

कर्तोत्तक	Explant
पूर्णशक्त	Totipotent
कायिक भ्रूण	Somatic embryo
पूर्णशक्तता	Totipotency
कायिक भ्रूणोद्भवन	Somatic embryogenesis
जलयोजित	Hydrated
अंगोद्भवन	Organogenesis
जल शुष्कित	Desiccated
कायिक क्लोन	Somaclones
वानिकी	Forestory
कायिक क्लोनीय विविधताएं	Somaclonal variations
द्वितीयक उपापचयज	Secondary Metabolites
कृत्रिम बीज	Artificial seeds
कोशिका पंक्ति	cell Line
अनुप्रयोग	Application
सूक्ष्म प्रकोष्ठ	Microchamber
संवर्धन माध्यम	Culture medium
जर्मरहित	Sterile

नियंत्रित अवस्थाएं	Controlled conditions
युग्मज भ्रूण	Zygotic embryo
परिपक्कवन प्रावस्था	Maturation phase
उत्परिवर्ती/म्यूटैन्ट	Mutant
प्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोद्भवन	Direct somatic embryogenesis
अप्रत्यक्ष कायिक भ्रूणोदभवन	Indirect Somatic embryogenesis
घूर्णी हल्लित्र	Rotary Shaker
पृथक्करण/विलगन	Isolation
पादप प्रजनन	Plant breeding
अनुवांशिक अनियमितताएं	Genetic irregularities
द्विधुवी	Bipolar
सम्मिश्रण	combination
सूक्ष्म प्रवर्धन	Micropropagation
सम्पुटीकरण	Encapsulation
पुनर्योग/पुनर्योजन	Recombination
निर्जमीकृत	Aseptic

2.13 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली ।
4. राजदान, इंटरोडक्शन टू प्लान्ट टिश्यू कल्वर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
5. भोजवानी एण्ड राजदान, थ्योरी एण्ड प्रेक्टिसेज, एल्सवेयर इण्डिया प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 3

प्रोटोप्लास्ट विलगन तथा संवर्धन

(ISOLATION AND CULTURE OF PROTOPLASTS)

इकाई की रूपरेखा

3.0 उद्देश्य
3.1 प्रस्तावना
3.2 ऊतक संवर्धन द्वारा रोग रहित पादप उत्पादन
3.3 प्रोटोप्लास्ट विलगन तथा संवर्धन
3.4 प्रोटोप्लास्ट संलयन
3.5 कायिक संकर
3.6 चयन विधियां एवम् कायिक संकर में जीन अभिव्यक्ति
3.7 सारांश
3.8 बोध प्रश्नों के उत्तर
3.9 अभ्यासार्थ प्रश्न
3.10 शब्दावली
3.11 संदर्भ ग्रन्थ

3.0 उद्देश्य (Objectives)

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप समझ पायेंगे कि -

1. ऊतक संवर्धन तकनीक से रोग रहित पादप किस प्रकार विकसित किये जा सकते हैं?
2. पादप कोशिकाओं, ऊतकों एवं अंगों से किस प्रकार जीवद्रव्यकों का विलगन किया जाता है? एवम् विलगित प्रोटोप्लास्टों से कैसे संवर्धन स्थापित किये जाते हैं?
3. विलगित प्रोटोप्लास्टों को किस प्रकार यांत्रिक एवम् प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन की विधियों द्वारा संलयित किया जाता है?
4. प्रोटोप्लास्ट संलयन से कायिक संकर किस प्रकार विकसित किये जाते हैं तथा इनका क्या उपयोग है?
5. ऊतक संवर्धन द्वारा विकसित कायिक संकरों का चयन किस प्रकार किया जाता है एवं इनमें जीन अभिव्यक्ति किस प्रकार होती है?

3.1 प्रस्तावना (Introduction) :

अधिकांश वानिकी एवम् उद्यानिकी फसलें सर्वांगी रुप से रोगजनकों द्वारा संक्रमित होती है । इस कारण इन फसलों की पैदावार एवम् गुणवत्ता में कमी आती है । कभी-कभी किसी पादप क्लोन का सम्पूर्ण समूह ही सर्वांगी रोग (systemic disease) द्वारा ग्रसित हो जाता है, तब ऊतक संवर्धन की प्ररोह शीर्ष संवर्धन तकनीक द्वारा ही रोग रहित पादप विकसित किये जा सकते हैं । सबसे पहले मोरेल एवम्

मार्टिन (Morel and Martin) नामक वैज्ञानिकों ने डाहलीया में इस तकनीक का उपयोग कर वायरस मुक्त पादप विकसित करने में सफलता प्राप्त की । आज इस तकनीक का उपयोग उद्यानिकी वानिकी एवम् कृषि के क्षेत्रों में रोग रहित पादपों के उत्पादन में किया जा रहा है ।

कृषि एवम् पादप प्रजनन की दृष्टि से उपयोगी एवं वांछित आनुवांशिक विभिन्नताएं परम्परागत पादप प्रजनन की विधियों द्वारा नहीं लाई जा सकती है । वर्तमान में पादपों में इस प्रकार के वांछित आनुवांशिक संयोजन गैर-परम्परागत तकनीकों द्वारा लाये जा सकते हैं । इनमें प्रमुख तकनीक प्रोटोप्लास्टों का विलगन, संवर्धन एवम् पात्रे अवस्थाओं में इन विलगित प्रोटोप्लास्टों का संलयन कराना है । प्रोटोप्लास्टों के संलयन की तकनीक कायिक संकरण कहलाती है । इस तकनीक द्वारा आनुवांशिक सूचनाओं को एक पादप से दूसरे पादप में सरलतापूर्वक एवं कम समय में स्थानान्तरित किया जा सकता है तथा इसका उपयोग कायिक संकर पादप विकसित करने में किया जा सकता है ।

इस इकाई में ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा रोग रहित पादप विकसित करने के साथ-साथ, प्रोटोप्लास्ट संवर्धन तकनीक एवं इस से वांछित लक्षणों वाले कायिक संकर पादप विकसित करने की विधियों के बारे में विस्तार से समझाया गया है ।

3.2 ऊतक संवर्धन द्वारा रोगरहित पादप उत्पादन (Production of Disease Free Plants by tissue Culture):

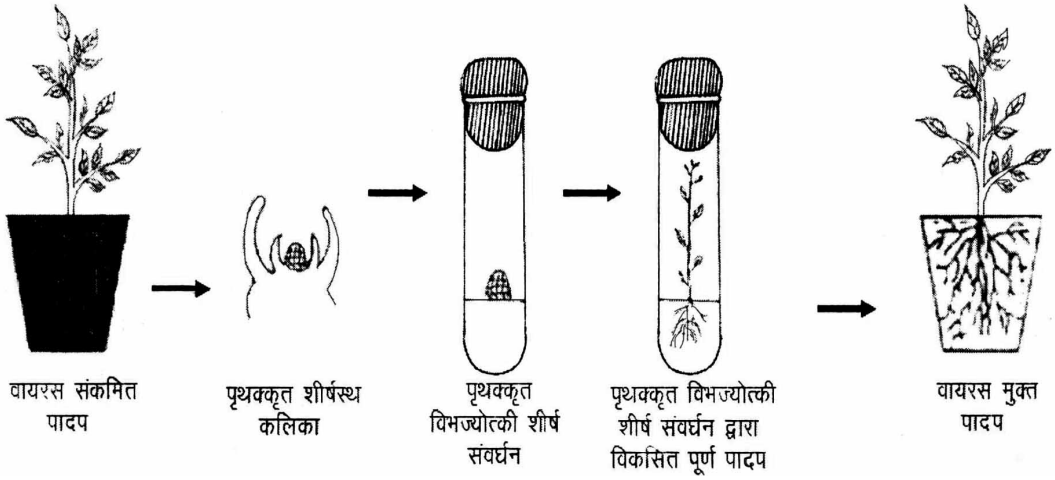
अधिकांश वानिकी एवं उद्यानिकी फसलें कवकों, माइकोप्लाज्मा, जीवाणुओं, सूत्रकृमियों तथा विषाणु जनित सर्वांगी (systemic) रोगों से ग्रसित होती है । इन रोगजनकों का फसलों में स्थानान्तरण पादपों के कायिक जनन द्वारा होता है । वायरस (विषागु जनित रोग प्राय: बीजों एवं कायिक जनन द्वारा प्रवर्धित फसलों में पाये जाते हैं । कवकों एवं जीवाणु जनित रोगों का नियंत्रण सर्वांगी जीवाणुनाशियों (Bactericides) एवं कवकनाशियों (Fungicides) द्वारा किया जा सकता है, परन्तु विषाणु जनित रोगों के उपचार के लिए इस प्रकार के रसायन उपलव्य नहीं है । अत: सामान्य अवस्था में विषाणुओं द्वारा संक्रमित पादप समूह में से कुछ रोग रहित पादपों का चयन कर उन्हें कायिक जनन द्वारा प्रवर्धित किया जा सकता है परन्तु यदि सम्पूर्ण पादप समूह ही विषाणु जनित रोग से संक्रमित हो तो, रोग रहित पादप केवल ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा ही विकसित किये जा सकते हैं ।

यह भली-भाँति स्थापित है कि सर्वांगी रुप से विषाणु द्वारा संक्रमित पादपों में विषाणुओं की सांद्रता प्ररोह शीर्ष में कम पायी जाती है तथा उन्होंने यह भी बताया कि लगभग 50 प्रतिशत पादपों के प्ररोह शीर्ष विषाणु मुक्त होते हैं । शीर्षस्थ विभज्योतक के विषाणुओं रहित होने के निम्न कारण हो सकते हैं - (i) शीर्षस्थ विभज्योतक में संवहन ऊतक का नहीं होना (सामान्यत: विषाणुओं का संचरण परिवहन ऊतकों द्वारा होता है), (ii) विभज्योतकी कोशिकाओं की अत्यधिक क्रियाशीलता का विषाणुओं के गुणन में बाधक होना, तथा (iii) प्ररोह शीर्ष में ऑक्सिन के अन्तर्जात स्तर का अधिक होना विषाणुओं के गुणन में बाधक है ।

प्ररोह/विभज्योतकी शीर्ष संवर्धन

मोरेल एवं मार्टिन (Morel and Martin, 1952) ने प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा विषाणु संक्रमित डाहलिया पादप से विषाणु मुक्त डाहलिया के पादप प्रवर्धन में सफलता प्राप्त की । यह ऊतक संवर्धन विधि द्वारा रोग रहित पादप उत्पादन के बारे में प्रथम जानकारी थी, तत्पश्चात् इस तकनीक का उपयोग कई पादप

प्रजातियों में विषाणु रहित पादप प्राप्त करने में किया जाने लगा है । इस तकनीक द्वारा जीवाणु माइकोप्लाज्मा एवं कवकों द्वारा संक्रमित पादपों से भी रोग रहित पादप विकसित किये जा सकते हैं (चित्र 3.1) ।



चित्र 3.1 : प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा वायरस मुक्त पादप विकसित करना

प्ररोह शीर्ष/विभज्योतकी शीर्ष संवर्धन की विधि

प्ररोह शीर्ष सक्रिय रुप से विभाजनशील कोशिकाओं का समूह है जिसका आकार 0.1 मिलीमीटर (mm) मोटा (व्यास) तथा 0.25 मिमी. लम्बा होता है । विभज्योतकी शीर्ष संवर्धन में शीर्षस्थ एवं कक्षस्थ दोनों प्रकार के विभज्योतकी ऊतकों का उपयोग किया जा सकता है । पादप ऊतक संवर्धन/पात्रे संवर्धन तकनीक मे प्ररोह शीर्ष की जगह विभज्योतकी शीर्ष शब्द का प्रयोग अधिक उपयुक्त है ।

प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा रोग रहित पादप निम्न चरणों में प्राप्त किये जाते हैं -

(क) विभज्योतकी शीर्ष का उच्छेदन (Excision)

विषाणु मुक्त पादप प्राप्त करने के लिए उपयोग में लाये जाने वाले कर्तोत्तक जैसे - शीर्षस्थ कलिका अथवा कक्षस्थ कलिका का शीर्ष भाग (0.1 मिमी. व्यास तथा 0.2-0.3 मिमी. लम्बा) विभज्योतकी शीर्ष कहलाता है । यह भ्रूण से बनने वाला प्रथम विभज्योतकी ऊतक है तथा यह पादप की कायिक अवस्था में सदैव क्रियाशील रहता है । इसे पादप प्ररोह शीर्षों से पृथक करना विभज्योतकी शीर्ष उच्छेदन कहलाता है ।

प्ररोह शीर्ष का सतही निर्जर्मीकरण एवं संवर्धन स्थापन

विषाणुमुक्त संवर्धन स्थापित करने के लिए उच्छेदित विभज्योत्तकी शीर्षों का सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है । कर्तोत्तकों का सतही निर्जर्मीकरण विभिन्न प्रकार के उपलब्ध निर्जर्मीकारकों की सहायता से किया जाता है । सतही निर्जर्मीकारक की प्रकृति एवं सांद्रता तथा सतही निर्जर्मीकरण का समय ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त किये जाने वाले कर्तोत्तकों की प्रकृति पर निर्भर करते हैं । निर्जर्मीकारक से उपचारित प्ररोह शीर्षों का कई बार निर्जर्मीकृत जल द्वारा प्रक्षालन (washing) किया जाता है, जिससे इन्हें निर्जर्मीकारक के कुप्रभावों से बचाया जा सकें । सतही निर्जर्मीकृत प्ररोह शीर्षों के स्टीरियो बाइनोकूलर सूक्ष्मदर्शी में देखते हुए चिमटियों तथा चाकू की सहायता से गुम्बदाकार प्ररोह शीर्ष से पत्तियों को सावधानीपूर्वक हटाते हैं, तथा शीर्षस्थ (0.2 मिमी. लम्बा) भाग काटकर संवर्धन माध्यम पर स्थापित कर देते हैं । यह प्रक्रिया संवर्धन स्थापन कहलाती है । इस प्रकार से स्थापित संवर्धनों को संवर्धन कक्ष

में रख दिया जाता है । कर्तोत्तकों से संवर्धन स्थापन, पादपजीन प्रारुप कर्तोत्तक की प्रकृति, संवर्धन माध्यम, संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त पादप वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति, सान्द्रता एवं सम्मिश्रण तथा भौतिक कारकों पर निर्भर करता है ।

संवर्धनों का आरम्भन एवं गुणन

सामान्यत: प्ररोह प्रवर्धन के लिए इन संवर्धनों को संवर्धन कक्ष में प्रकाशीय अवस्थाओं एवं 28 ± 2^0से 2^0 तापमान पर रखा जाता है । इन संवर्धनों से लगभग 7 से 21 दिनों के भीतर प्ररोह जनन आरम्भ हो जाता है । प्ररोह आरम्भन की यह प्रक्रिया ही संवर्धन आरम्भन कहलाती है ।

इस प्रकार प्रवर्धित प्ररोहों को गुणन के लिए नये संवर्धन माध्यम पर स्थापित किया जाता है अथवा पूर्ण पादप विकास के लिए इन 2-3 सेमी लम्बे प्ररोहों को पादप जनन के लिए उपयुक्त माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है ।

जड़ जनन एवं दृढ़ीकरण

जड़ जनन के लिए ऊतक संवर्धन में विभज्योतकी शीर्ष से विकसित प्ररोहों (2.0-3.0 सेन्टीमीटर लम्बे) को पृथक कर इन्हें ऑक्सिन युक्त माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है । 3 से 10 दिनों में इन पृथक्कृत प्ररोहों में जड़ जनन आरंभ हो जाता है तथा अब ये पूर्व रोगरहित पादपक (plantlet) में विकसित हो जाते हैं । पूर्ण विकसित रोग रहित पादपको का ग्रीन हाऊस में दृढ़ीकरण करने के पश्चात् आवश्यकता अनुसार उपयोग हेतु नर्सरी में संग्रहित कर लिया जाता है ।

उपरोक्त विभिन्न पदों में वायरस संक्रमित पादपों से रोग रहित पादपों को विकसित किया जा सकता है, तथा इस तकनीक का उपयोग वानिकी एवं उद्यानिकी के क्षेत्रों में किया जाता है ।

ऊतक संवर्धन की विभज्योतकी शीर्ष तकनीक की खोज से पूर्व विषाणु संक्रमित पादपों के ऊष्मीय उपचार द्वारा रोग रहित पादप प्राप्त किये जाते थे । इस प्रक्रिया में पादपों को गरम वायु ($35\text{-}40^0$C) में प्रवाह से प्रकाश एवं आवश्यक आद्रता की उपस्थिति में उपचारित किया जाता है । इस प्रक्रिया में वायु का तापमान धीरे-धीरे बढ़ाया जाता है । ऊष्मीय उपचार के पश्चात् कम पादप ही जीवित रह पाते हैं तथा कुछ विषाणु इस प्रकार के होते हैं जिन पर ऊष्मीय उपचार का कोई प्रभाव नहीं पड़ता । अत: इस प्रकार के पादपों से विषाणु मुक्त पादप केवल विभज्योतकी शीर्ष संवर्धन द्वारा ही प्राप्त किये जा सकते हैं। ऊष्मीय उपचारित पादप के प्ररोह शीर्ष संवर्धन से प्राप्त होने वाले विषाणु रहित पादपों की प्रतिशतता बढ़ जाती है ।

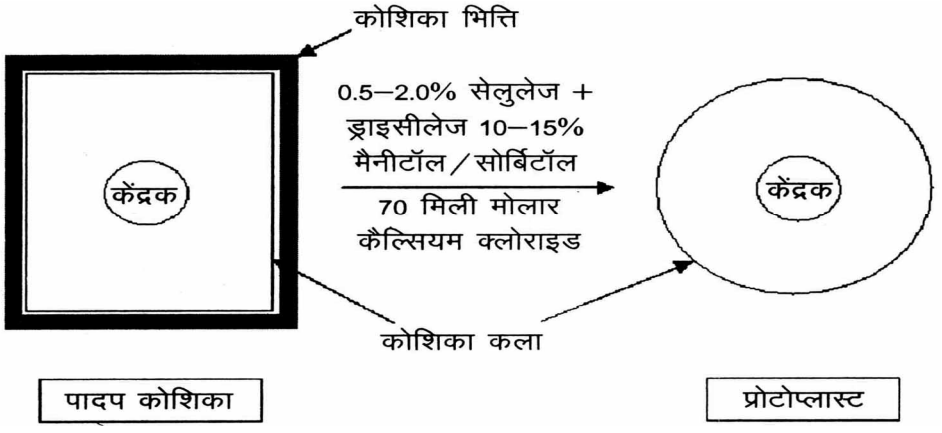
3.3 प्रोटोप्लास्ट विलगन तथा संवर्धन (Protoplast Isolation and Culture) :

पादप कोशिकाएं सेलुलोस द्वारा बनी भित्ति द्वारा आवरित होती है तथा पास-पास की कोशिकाएं पैक्टिन नामक पदार्थ से आपस में जुड़ी रहती हैं । एन्जाइमी अथवा यांत्रिक प्रक्रिया के द्वारा इन भित्ति युक्त कोशिकाओं से भित्ति रहित कोशिकाएं प्राप्त करने की क्रिया प्रोटोप्लास्ट विलगन कहलाती है । इस प्रकार प्राप्त होने वाली भित्ति रहित पादप कोशिकाएं प्रोटोप्लास्ट (जीवद्रव्यक) कहलाती हैं।

कोशिका भित्ति द्वारा आवरित सजीव पदार्थ के लिए प्रोटोप्लास्ट शब्द का प्रयोग सर्वप्रथम हैंस्टीन (Hanstein) द्वारा किया गया था । यांत्रिक विधि द्वारा जीवद्रक कुंचित कोशिका से प्रोटोप्लास्ट पृथक

करने का श्रेय केलेरकर (Klercker, 1892) एवं एन्जाइमी प्रक्रिया द्वारा प्रोटोप्लास्ट विलगन का श्रेय ई.सी. कोकिंग (E.C. Cocking, 1960) को जाता है।

प्रोटोप्लास्ट विलगन की यांत्रिक विधि का केवल ऐतिहासिक महत्त्व है, अत: इस अध्याय में प्रोटोप्लास्ट विलगन की एन्जाइमी प्रक्रिया को विस्तार से समझाया गया है (चित्र 3.2 व 3.3) ।



चित्र 3.2 : एन्जाइमी प्रक्रिया से प्रोटोप्लास्ट विलगन का चित्रण

3.3.1 पादप प्रोटोप्लास्ट विलगन की एन्जाइमी प्रक्रिया

एन्जाइमी प्रक्रिया द्वारा प्रोटोप्लास्टों के विलगन के लिए पत्तियों की पर्णमध्योत्तक कोशिकाओं अथवा स्थापित कोशिका निलम्बन संवर्धनों का उपयोग किया जाता है ।

एन्जाइम उपचार के द्वारा प्रोटोप्लास्टों को दो प्रकार से पृथक किया जा सकता है -

अनुक्रमिक एन्ताइम उपचार विधि

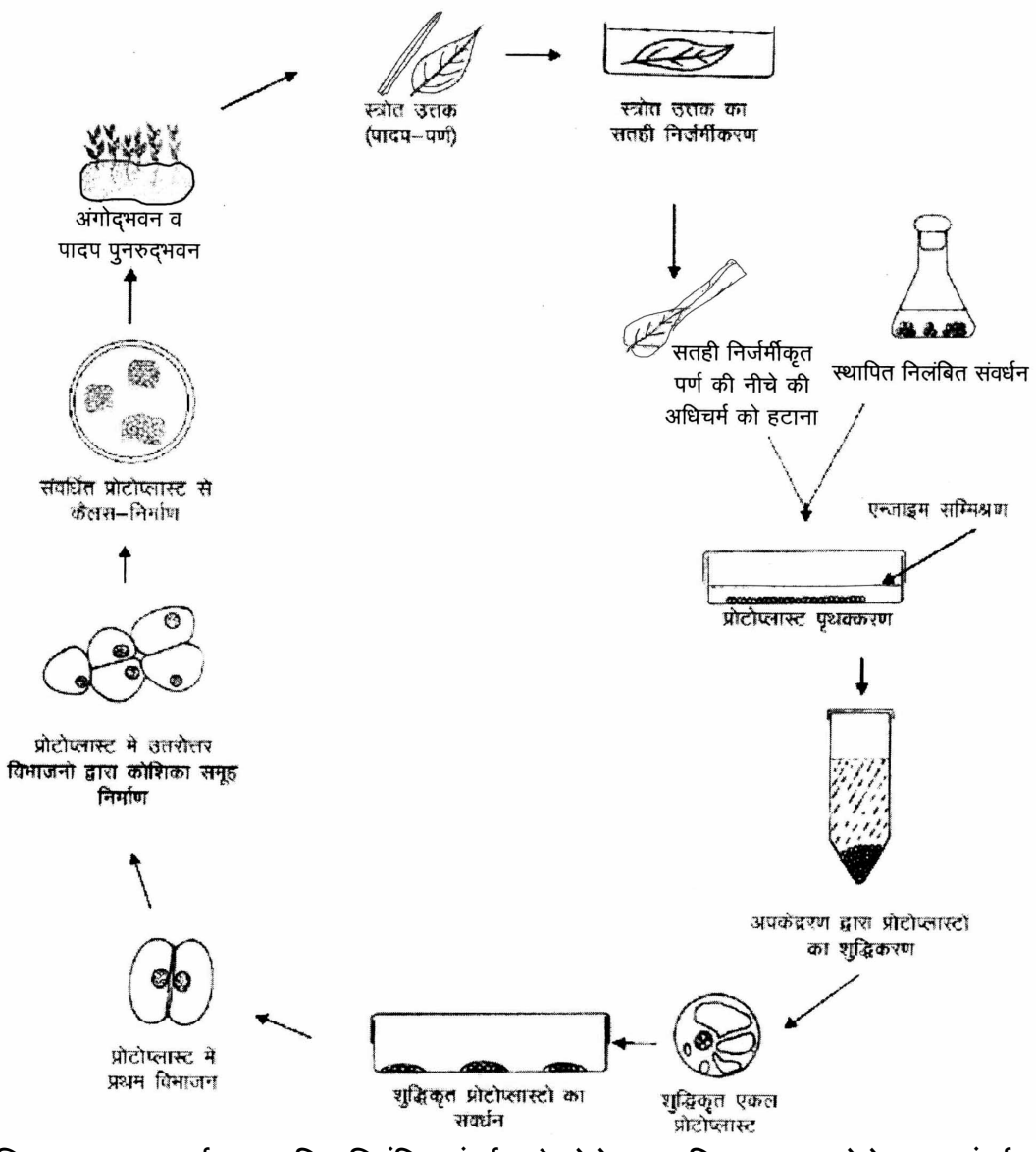
इस विधि में कोशिकाओं में उपस्थित मध्य पट्टलिका को अपघटित करने के लिए पहले पैक्टिनेज एन्जाइम का उपयोग करते हैं तत्पश्चात् विलगित कोशिकाओं की कोशिका भित्ति को अपघटित करने के लिए सेलुलेज हेमीसेलुलेज आदि एन्जाइमों का प्रयोग किया जाता है ।

एन्जाइम सम्मिश्रण विधि

इस विधि में कोशिका भित्ति को विघटित करने के लिए आवश्यक एन्जाइमों जैसे सेलुलेज, हेमीसेलुलेज, पेक्टीनेज के मिश्रण का उपयोग करते हैं । सामान्यत: इस विधि का प्रोटोप्लास्ट विलगन में अधिक उपयोग किया जाता है ।

पादपों, जिनकी पत्तियों से प्रोटोप्लास्ट विलगित किया जाता है को ग्रीन हाऊस में उगाया जाता है, तथा इन पादपों से प्राप्त पत्तियों का प्रोटोप्लास्ट विलगन से पूर्व, इकाई 1 में बताये अनुसार सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है । सतही निर्जर्मीकरण की प्रक्रिया जर्मरहित स्थितियों (लेमिनार एयर फ्लो बैच) में सम्पन्न की जाती है । निर्जर्मीकृत पत्तियों की निचली अधिचर्म को चिमटी की सहायता से हटाया जाता है । इन निचली अधिचर्म रहित पत्तियों को छोटे-छोटे टुकडों में काट लिया जाता है, जबकि स्थापित कोशिका निलम्बन संवर्धनों को सीधे ही प्रोटोप्लास्ट विलगन के लिये उपयोग में लिया जाता है ।

इन पत्तियों के टुकड़ों एवं कोशिका संवर्धनों को प्रोटोप्लास्ट विलगन के लिए प्रयुक्त होने वाले एन्जाइमी सम्मिश्रण में रखा जाता है । एन्जाइमी सम्मिश्रण में प्रयुक्त एन्जाइमों की प्रकृति एवं सांद्रता, प्रोटोप्लास्ट विलगन में प्रयुक्त पादप ऊतकों एवं संवर्धनों की प्रकृति पर निर्भर करती है ।



चित्र 3.3- पादप पर्ण व स्थापित निलंबित संवर्धन से प्रोटोप्लास्ट विलगन तथा प्रोटोप्लास्ट संवर्धन का चित्रीय निरूपण

सतही निर्जर्मीकृत पत्तियों के खण्डों एवं कोशिका निलम्बन संवर्धनों से पादप प्रोटोप्लास्टों का विलगन निम्नानुसार किया जाता है -

(क) एन्जाइमों का सम्मिश्रण विलयन तैयार करना

पादप कोशिकाओं के मध्य उपस्थित पैक्टिन नामक पदार्थ की मध्य पट्टलिकाओं को घोलने एवं कोशिका भित्तियों को विघटित करने के लिए कई एन्जाइम उपयोग में लाये जाते है जैसे - ड्राइसीलेज, पैक्टिनेज, सेलुलेज ओनोजुका - आर-10, मेसरोजाइम-आर-10, हेमीसेलुलेस आदि । एक ग्राम पादप ऊतक से

पर्याप्त मात्रा में प्रोटोप्लास्ट प्राप्त करने के लिए उपरोक्त एन्जाइमों का विलयन तैयार किया जाता है । इस विलयन में एन्जाइमों की सांद्रता 0.5 -2.0% तक रखी जाती है । सामान्यत: प्रोटोप्लास्ट विलगन के लिए ड्राइसीलेज एवं सेलुलेज एन्जाइमों के सम्मिश्रण का ही उपयोग किया जाता है ।

प्रोटोप्लास्ट विलगन के लिए प्रयुक्त होने वाले एन्जाइम सम्मिश्रण का विलयन, परासरणी सांद्रता बढ़ाने के लिए 10-15 प्रतिशत मेनीटॉल अथवा सॉर्बिटॉल में बनाया जाता है जो प्रोटोप्लास्टों को फटने से रोकने में सहायक होता है । इस विलयन में कोशिका झिल्ली के स्थायित्व के लिए 70 mmol कैल्सियम क्लोराइड ($CaCl_2$) का उपयोग किया जाता है ।

उपयोग में लिये जाने से पूर्व एन्जाइम सम्मिश्रण विलयन का जर्मरहित अवस्थाओं में फिल्टर निर्जर्मीकरण किया जाता है । इस निर्जर्मीकृत एन्जाइम विलयन युक्त पेट्रीप्लेटों में निर्जर्मीकृत पत्तियों के खण्डों अथवा 1 gm कैलस को रखा जाता है ।

इन पेट्रीप्लेटों को पेराफिल्म से मुहर बंद/सील करके शेकर पर 4-12 घण्टों के लिए ऊष्मायन किया जाता है ।

प्रोटोप्लास्टों का शुद्धिकरण

12-18 घंटों के इक्यूबेशन के पश्चात् इस प्रोटोप्लास्ट युक्त एन्जाइमी विलयन को 60 से 70 माइक्रोमीटर माप के छिद्रों वाले स्टील अथवा नाइलोन के फिल्टरों से छाना जाता है, जिससे इसमें उपस्थित अपचित (undigested) पादप कोशिकाएं, ऊतक एवं टूटी हुई कोशिकाएं अलग कर ली जाती है । इस प्रकार प्राप्त छनित्र को चुड़ीद्वार ढक्कन वाली जर्मरहित अपकेन्द्रण नलिकाओं में भर कर 7000-10000 घूर्णन प्रति मिनट की गति से अपकेन्द्रण किया जाता है जिससे प्रोटोप्लास्ट अपकेन्द्रण नलिका के आधार भाग में जमा हो जाता है तथा कोशिकाओं का अपशिष्ट (cell debris) अधिप्लवी(supernatant) में रह जाता है ।

इन प्रोटोप्लास्ट युक्त अपकेन्द्रण नलियों में ताजा निर्जर्मीकृत सॉर्बिटॉल विलयन डालकर पुन: अपकेन्द्रण किया जाता है । इस प्रक्रिया को 2-3 बार दोहराया जाता है जिससे वियोजित प्रोटोप्लास्टो को अच्छी तरह से साफ किया जा सकें।

इस प्रकार प्राप्त प्रोटोप्लास्टों का अंत में 20% शर्करा विलयन में अपकेन्द्रण किया जाता है । हल्के होने के कारण यह प्रोटोप्लास्ट शर्करा विलयन की सतह पर तैरने लग जाते हैं, तथा मलबा (debris) अपकेन्द्र नलिका के आधार भाग में जमा हो जाता है ।

शर्करा सतह पर तैरते प्रोटोप्लास्टों को सावधानीपूर्वक पीपेट(pipette) की सहायता से अलग कर लिया जाता है । प्रोटोप्लास्ट वियोजन की संपूर्ण प्रक्रिया जर्मरहित अवस्थाओं में सम्पन्न की जाती है तथा प्रक्रिया में प्रयोग में लाये जाने वाले रसायन/विलयन/औजार आदि सभी निर्जर्मीकृत होते हैं ।

(ख) प्रोटोप्लास्ट संवर्धन

शुद्धिकृत प्रोटोप्लास्ट को निम्नलिखित विधियों द्वारा संवर्धित किया जा सकता है -

(i) अगर-अगर युक्त माध्यम पर प्रोटोप्लास्ट संवर्धन

प्रोटोप्लास्टों का अगर-अगर युक्त माध्यम पर संवर्धन इकाई 2 में बताई गई बर्गमेन की कोशिका पटटन तकनीक द्वारा किया जाता है । इस विधि में 2.0 मिली लीटर प्रोटोप्लास्ट निलम्बन में समान आयतन 1.2% अगर-अगर युक्त माध्यम मिलकार जर्मरहित पेट्रीप्लेट्स में पट्टन कर दिया जाता है । अगर-अगर युक्त माध्यम का तापमान 4००ए से अधिक नहीं होना चाहिए । अगर-अगर के जमने के पश्चात्

पेट्रीप्लेट्स को पैराफिल्म की सहायता से सील करके संवर्धन कक्ष में 24^0-26^0 सेन्टीग्रेड ताप पर इंक्यूबेट किया जाता है ।

(ii) सूक्ष्म बूंद संवर्धन विधि

इस विधि में विलगित प्रोटोप्लास्टों की परासरणता बनाये रखते हुए द्रव्य संवर्धन माध्यम में छोटी-छोटी बूंदों के रुप में जर्मरहित पेट्रीप्लेट्स में संवर्धित किया जाता है ।

(iii) अवलंबी बूंद संवर्धन विधि

विलगित प्रोटोप्लास्ट को जर्मरहित पेट्री प्लेट्स में लटकती (अवलंबी) बूंदों के रुप में संवर्धन की विधि, अवलंबी बिन्दु संवर्धन विधि कहलाती है । इस विधि में प्रोटोप्लास्ट संवर्धन माध्यम में निलम्बित रहते हैं । इस प्रकार के संवर्धन में प्रोटोप्लास्टों में गैसों का आदान-प्रदान सुगमतापूर्वक होता है, जिससे प्रोटोप्लास्ट की मृत्यु दर कम होती है ।

(ग) प्रोटोप्लास्ट संवर्धन को प्रभावित करने वाले कारक

उपरोक्त किसी भी विधि द्वारा प्रोटोप्लास्ट को संवर्धित करने का मुख्य उद्देश्य विलगित प्रोटोप्लास्ट के चारों ओर कोशिका भित्ति का निर्माण एवं इन कोशिकाओं मे कोशिका विभाजन की प्रक्रिया का आरम्भ होना है । प्रोटोप्लास्टों का संवर्धन निम्न कारकों द्वारा प्रभावित होता है ।

(i) संवर्धन माध्यम

सामान्यत: प्रोटोप्लास्ट संवर्धन के लिए, कोशिका हेतु प्रयोग किये जाने वाले संवर्धन माध्यमों जैसे मुरासिगे एवं स्कूग का माध्यम, गेम्बोर्ग का B_5 माध्यम आदि का ही उपयोग किया जाता है । प्रोटोप्लास्ट की प्रकृति एवं रत्रोत व पादप के जीन प्रारुप को ध्यान में रखते हुए प्रयुक्त संवर्धन माध्यम में कार्बनिक एवं अकार्बनिक घटकों की सांद्रता में परिवर्तन किया जा सकता है । एक ही प्रजाति के कैलस एवं प्रोटोप्लास्ट संवर्धन के लिए एक ही प्रकार का संवर्धन माध्यम प्रयोग में लिया जाता है ।

(ii) परासरणता

जब तक विलगित प्रोटोप्लास्ट के चारों ओर कोशिका भित्ति का निर्माण नहीं होता इन्हें परासरण सुरक्षा की आवश्यकता होती है । अत: प्रारम्भ में संवर्धन माध्यम की परासरण सान्द्रता मेनीटॉल अथवा सॉर्बिटॉल नामक पदार्थों द्वारा प्रोटोप्लास्ट विलगन में प्रयुक्त एन्जाइमी विलयन की परासरण सान्द्रता के बराबर रखी जाती है । संवर्धन माध्यम की परासरण सांद्रता प्रोटोप्लास्ट में कोशिका भित्ति के निर्माण एवं कोशिका विभाजन के साथ-साथ कम की जाती है ।

(iii) पादप वृद्धि नियंत्रक

प्रोटोप्लास्ट संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त होने वाले वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति, सान्द्रता एवं इनका सम्मिश्रण अनुपात, प्रोटोप्लास्ट एवं स्त्रोत पादप के जीन प्रारुप पर निर्भर करती है । सामान्यत: निलम्बन संवर्धन से प्राप्त प्रोटोप्लास्ट को निलम्बन संवर्धन के लिए उपयोग में लिए गये पादप वृद्धि नियंत्रकों के सम्मिश्रण एवं सांद्रता पर ही संवर्धित किया जाता है ।

(iv) संवर्धन अवस्थाएं

पादप प्रोटोप्लास्टों में कोशिका भित्ति का निर्माण एवं तदुपरांत कोशिका विभाजन संवर्धन अवस्थाओं पर निर्भर करता है । सामान्यत: प्रोटोप्लास्ट संवर्धनों को प्रारम्भ में प्रकाश रहित अवस्थाओं में 24-26^0C सेन्टीग्रेड तापमान पर इनक्यूबेट किया जाता है ।

(v) प्रोटोप्लास्ट घनत्व (Protoplast Fusion)

प्रोटोप्लास्ट संवर्धन की सफलता प्रति मिलीमीटर संवर्धन माध्यम में उपस्थित प्रोटोप्लास्टों की संख्या पर निर्भर करती है । यह संख्या प्रति मिलीमीटर माध्यम में 0.5 से 2.0×10^5 तक हो सकती है । इस प्रकार संवर्धित प्रोटोप्लास्ट में पहले कोशिका भित्ति का विकास होता है, तदुपरांत इन कोशिकाओं में समसूत्री विभाजन होते हैं । कोशिका विभाजन के कारण कोशिका समूह का निर्माण होता है, इस सम्पूर्ण प्रक्रिया का प्रतिदिप्ति अभिरंजन तकनीक के द्वारा प्रतिलोमित सूक्ष्मदर्शी (inverted microscope) में निरन्तर निरीक्षण किया जाता है ।

इस प्रकार विकसित कोशिका समूह को उचित पादप वृद्धि नियंत्रक युक्त माध्यम पर संवर्धित करने पर कैलस का विकास होता है । इस प्रकार विकसित कैलस से अप्रत्यक्ष अंगोद्भवन अथवा कायिक अंगों अथवा कायिक लगे के विकास से पूर्ण पादपों का निर्माण होता है (कैलस से कायिक भ्रूणोद्भवन एवं अंगोद्भवन की प्रक्रिया इकाई 2 में विस्तार से समझाई गई है)

3.4 प्रोटोप्लास्ट संलयन (Protoplast Fusion) :

कोशिका भित्ति रहित संरचना होने के कारण प्रोटोप्लास्ट पात्रे संलयन का एक सरल माध्यम है । प्रोटोप्लास्ट संलयन में अन्तरजातीय, अन्तरवंशीय एवं अन्तरप्रभागीय असंगतताए भी रोधक नहीं होती है । अत: प्रोटोप्लास्ट संलयन का उपयोग कायिक कोशिका अनुवांशिकी एवं फसल सुधार के क्षेत्रों में किया जाता है ।

प्रोटोप्लास्ट संलयन की प्रक्रिया में प्रारम्भ में संयलित होने वाले प्रोटोप्लास्टों के कोशिकाद्रव्य संलयित होते हैं तथा केन्द्रक अलग-अलग रहते है, इस अवस्था में यह द्विकेन्द्री कोशिका **विषमकेन्द्री कोशिका** कहलाती है । जब संलयित कोशिकाओं के केन्द्रक सयंलित हो जाते हैं तो यह रचना हाइब्रिड कहलाती है । जब इन प्रोटोप्लास्टों के कोशिकाद्रव्य आपस में संलयित हो जाते है लेकिन दोनों केन्द्रकों में से एक केन्द्रक की आनुवांशिक सूचनाएं विलुप्त हो जाती है तो बनने वाली उत्पाद **साईब्रिड** अथवा **कोशिकाद्रव्यी** संकर कहलाता है । पादपों में प्रोटोप्लास्ट संलयन निम्न विधियों द्वारा किया जा सकता है -

(i) यांत्रिक विधि द्वारा प्रोटोप्लास्ट संलयन

इस विधि में दो प्रोटोप्लास्टों को साथ लाकर इन पर यांत्रिक बल द्वारा दबाव डाला जाता है जिससे ये प्रोटोप्लास्ट संपीड़ित होकर संलयित हो जाते है । इस विधि में किसी भी प्रकार के संयलन-प्रेरित करने वाले पदार्थ की आवश्यकता नहीं होती है । इस विधि में प्रोटोप्लास्टों में टूट-फूट होने की संभावना अधिक होती है ।

(ii) प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन

प्रेरित प्रोटोप्लास्ट कई प्रकार के फ़्यूजोजन (fusogen) के द्वारा किया जाता है । फ्यूजोजन नियंत्रित प्रोटोप्लास्ट संलयन की प्रमुख विधियां निम्न है -

(क) सोडियम नाइट्रेट उपचार विधि

प्रोटोप्लास्ट संलयन की इस विधि का प्रदर्शन सर्वप्रथम पॉवर एवं साथियों (Power et al.) द्वारा किया गया था । इस विधि में शुद्धिकृत प्रोटोप्लास्टों का 0.25 मोलर सोडियम नाइट्रेट विलयन में

अपकेन्द्रण किया जाता है । सोडियम नाइट्रेट विलयन में अपकेन्द्रण के कारण प्रोटोप्लास्ट संलयित हो जाते हैं ।

(ख) उच्च pH पर Ca^{++} आयनों के द्वारा

प्रोटोप्लास्ट संलयन की इस विधि को विकसित करने का श्रेय कैलर एवं मैलचर्स (Keller and Melchers) को है । इन्होंने इस विधि के द्वारा तम्बाकू के अलग-अलग प्रकार के प्रोटोप्लास्टों का संलयन करने में सफलता प्राप्त की । इस विधि में प्रोटोप्लास्टों को उच्च pH (10.5)पर 0.4 मोलर मेनीटॉल एवं 0.05 मोलर कैल्सियम क्लोराइड विलयन से 37^0C तापमान पर इंक्यूबेट किया जाता है । लगभग 10 मिनट में प्रोटोप्लास्ट संलयन की प्रक्रिया आरंभ हो जाती है । अधिकांश अन्तरा व अंतरजातिय कायिक संकर इसी विधि द्वारा विकसित किये जाते हैं ।

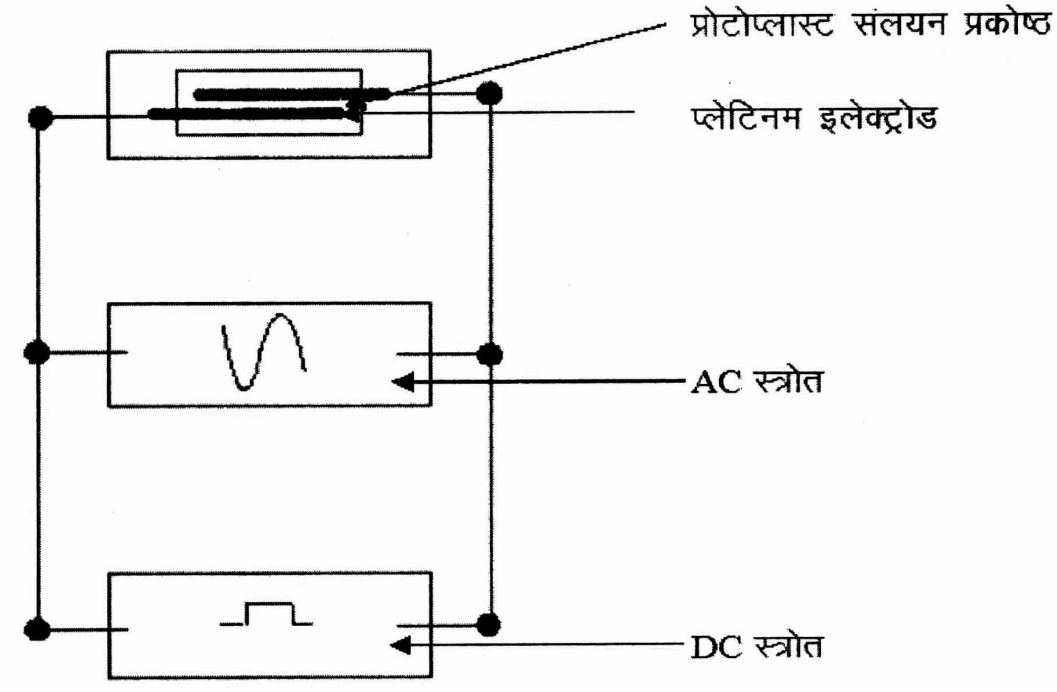
(ग) पॉलीइथाइलीन ग्लाइकॉल (PEG) उपचार द्वारा

प्रोटोप्लास्ट संलयन की इस विधि में पॉलीइथाइलीन ग्लाइकॉल का उपयोग फ्यूजोजन (संलयनकारी) के रुप में किया जाता है । यह प्रोटोप्लास्ट संलयन की सबसे उपयुक्त विधि है ।

प्रोटोप्लास्ट संलयन की इस प्रक्रिया में प्रोटोप्लास्ट के पैलेट युक्त नलिका में 0.6 मिलीलीटर PEG विलयन (1 ग्राम PEG+2.0 मिलीलीटर, 0.1 मोलर ग्लुकोज+ 10 मिली मोलर, $CaCl_2$+0.7 मिली मोलर को मिलाकर इसे सामान्य ताप पर लगभग 40 मिनट तक इंक्यूबेट किया जाता है जिससे प्रोटोप्लास्ट पास-पास आ जाते हैं । तदुपरान्त प्रोटोप्लास्ट संवर्धन माध्यम से PEG का क्षालन (elution) किया जाता है, यह प्रक्रिया प्रत्येक 10 मिनट में दोहराई जाती है जिससे संलयित प्रोटोप्लास्ट PEG मुक्त हो जाते हैं तथा इन्हें पुन: संवर्धन माध्यम में स्थापित कर दिया जाता है ।

(घ) विद्युतीय संलयन विधि

इस विधि में प्रोटोप्लास्टों का संलयन उच्च वोल्टता की सूक्ष्म स्पन्द द्वारा प्रेरित किया जाता है । इसलिए यह विधि विद्युतीय संलयन कहलाती है । प्रोटोप्लास्टों की रासायनिक संलयन की विधियों की अपेक्षा यह विधि अधिक सरल, तीव्र एवं अधिक प्रभावी है । इस विधि का सबसे पहले राउल्फिया (Rauvolfia) के प्रोटोप्लास्टों के संलयन हेतु सेण्डा एवं साथियों (senda et al।.,1979) ने प्रयोग किया था । उच्च वोल्टता स्पंद के कारण प्रोटोप्लास्टों की झिल्लियों में क्षणिक विक्षोभ उत्पन्न हो जाते हैं, जिससे प्रोटोप्लास्टों का संलयन हो जाता है । यह संपूर्ण प्रक्रिया जर्मरहित स्थितियों में सूक्ष्मदर्शी के नीचे एक विशिष्ट प्रकार के यंत्र जिसे इलेक्ट्रोपोरेटर कहते हैं, की सहायता से सम्पन्न होती है । इस प्रक्रिया में सर्वप्रथम निम्न वोल्ट विद्युतीय स्पंदों के द्वारा प्रोटोप्लास्टों की श्रृंखला बनाते हैं । माइक्रोमैनीपुलेटर की सहायता से इन श्रृंखलाबद्ध प्रोटोप्लास्टों को दो प्लेटिनम इलेक्ट्रोडों के बीच सरकाते हैं । जब दो वांछित प्रोटोप्लास्ट जिन्हें संलयित करना है, इलेक्ट्रोडों के मध्य आते हैं तो उच्च वोल्टता का सूक्ष्म स्पन्दन देकर इन्हें संलयित कर दिया जाता है (चित्र 3.4) ।

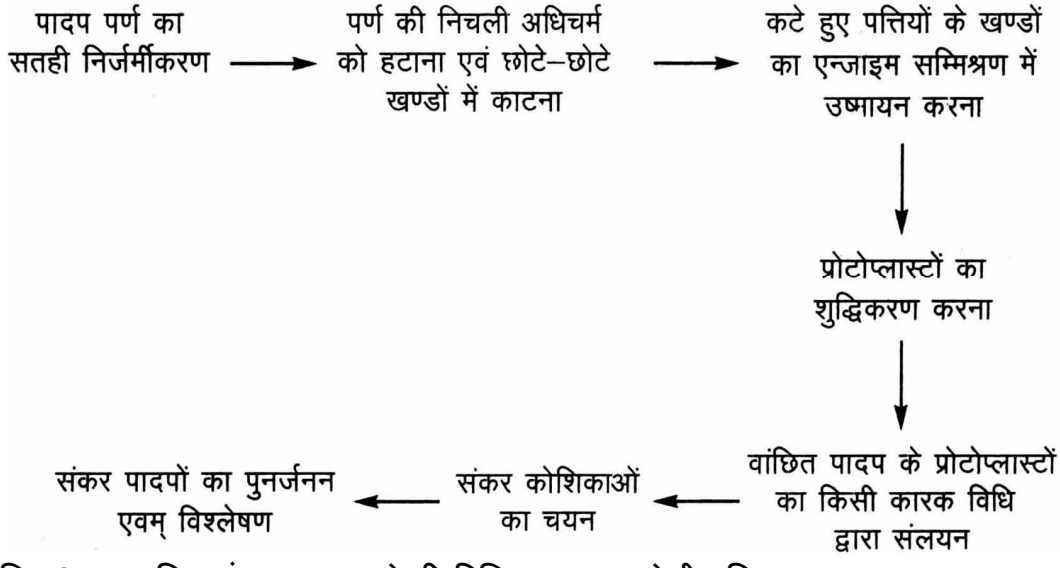


चित्र 3.4 - सूक्ष्मविद्युतीय स्पन्दन द्वारा प्रोटोप्लास्टों का संलयन

3.5 कायिक संकर (Somatic Hybirds) :

कायिक संकर

दो भिन्न प्रजातियों के प्रोटोप्लास्टों के संलयन से प्राप्त संकर पौधे कायिक संकर कहलाते हैं तथा कायिक संकर पौधे प्राप्त करने की यह विधि कायिक संकरण कहलाती है । कायिक संकरण निम्न चार पदों में सम्पन्न होता है (आरेख 3.5) -



चित्र 3.5 : कायिक संकर प्राप्त करने की विधि का सरल आरेखीय निरूपण

(i) प्रोटोप्लास्ट विलगन, (ii) प्रोटोप्लास्टों का संलयन, (iii) संकर कोशिकाओं का चयन तथा (iv) संकर पादपों का पुनर्जनन।

3.6 चयन विधियाँ एवं कायिक संकर में जीन अभिव्यक्ति (Selection Method and Gene Expression in Somatic Hybirds) :

3.6.1 चयन विधियां (Setreetion Methods)

प्रोटोप्लास्ट संलयन के लिए दिये गए उपचार के पश्चात् निम्न प्रकार के प्रोटोप्लास्ट प्राप्त होते हैं -

(i) दोनों प्रजातियों के अंसलयित प्रोटोप्लास्ट

(ii) एक ही प्रजाति के संलयित प्रोटोप्लास्ट जिसे समकेन्द्रक कहते हैं, तथा

(iii) दोनों प्रजातियों के आपस में संलयित प्रोटोप्लास्ट जिसे विषमकेन्द्रक कहते हैं (चित्र3.6) ।

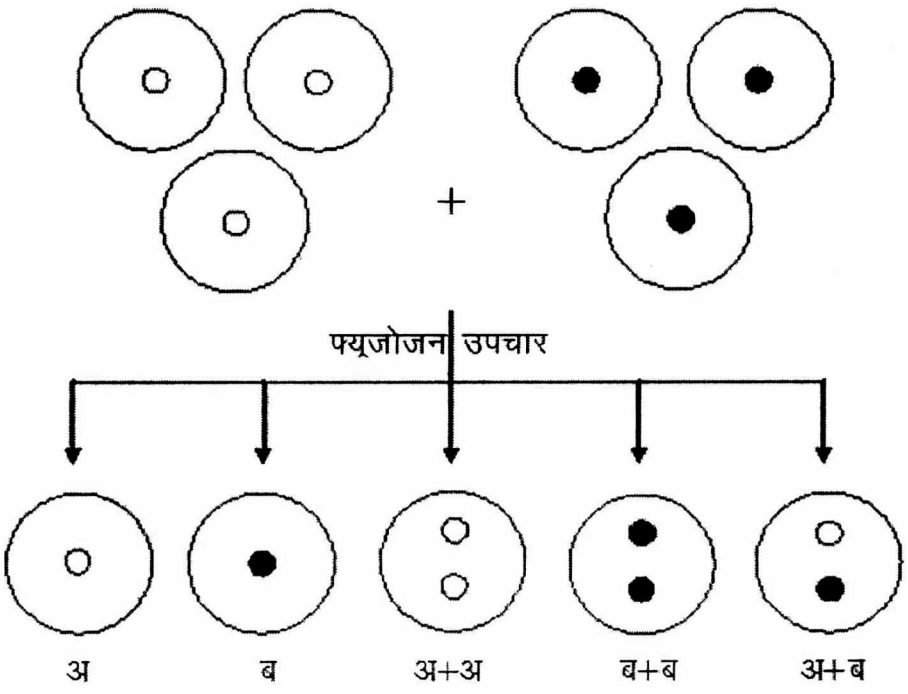
उपरोक्त तीनों प्रकार के प्रोटोप्लास्टों में से कायिक संकरण के लिए केवल ऐसे विषम केन्द्रकी प्रोटोप्लास्ट ही उपयोगी है, जो दोनों प्रजातियों के केवल एक-एक प्रोटोप्लास्ट के संलयन से प्राप्त होते हैं । इस प्रकार के प्रोटोप्लास्टों की उपलब्धता केवल 0.5-10% तक ही होती है । अत: प्रोटोप्लास्ट संकरण में उपयुक्त संकर प्रोटोप्लास्टों का वरण/चयन महत्वपूर्ण है, जो निम्न विधियों द्वारा संभव है -

(i) दृश्य चयन

अधिकांश कायिक संकरण के प्रयोगों में जिनमें एक जनक से प्राप्त प्रोटोप्लास्ट वर्णकहीन होते हैं तथा दूसरे जनक से प्राप्त प्रोटोप्लास्ट हरे होते हैं, में सूक्ष्मदर्शी की सहायता से ही विषम केन्द्रकों की पहचान की जा सकती है । इस विधि के लिए वर्णकहीन प्रोटोप्लास्ट संवर्धित कोशिकाओं अथवा प्रतिजैविक-प्रेरित वर्णकहीन पादपों से प्राप्त किये जा सकते हैं । ऊतक संवर्धन से कायिक संकर पादप प्राप्त करने के लिए इन विषमकेन्द्रकों की विभेदक वृद्धि एवं पूरकीकरण एवं विषमकेन्द्रों का यांत्रिक पृथक्करण द्वारा किया जा सकता है ।

(ii) जैव रासायनिक आधार पर पूरकीकरण एवम् चयन

इस मुक्ति का उपयोग ऐसी प्रजातियों के प्रोटोप्लास्टों के संलयन से प्राप्त विषमकेन्द्रों के चयन के लिए किया जाता है, जिनमें से एक प्रजाति में कोई एक कमी एवम् दूसरी प्रजाति में कोई अन्य कमी होती है, तथा इन दोनों प्रजातियों के प्रोटोप्लास्टों के संलयन से प्राप्त विषमकेन्द्रों में ये दोनों ही कमियां छिप जाती है । यह अवस्था पूरकीकरण कहलाती है । इस प्रकार की कमियां जैसे - पोष पदार्थ के किसी घटक, प्रतिजैविक, तापमान आदि के प्रति संवेदनशीलता अथवा किसी अनिवार्य जैव रसायन के संश्लेषण में अक्षमता आदि हो सकती है । उदाहरणार्थ, पिटूनिया हाइब्रिड़ा (Petunia hybrida) प्रतिजैविक एक्टिनोमाइसिन-डी (actinomycine-D) के प्रति तो संवेदी है, परन्तु इसकी पर्णमध्योत्तक कोशिकाओं से प्राप्त प्रोटोप्लास्टों से MS माध्यम पर स्थूलदर्शीय कैलस का निर्माण होता है, जबकि पिटूनिया पेरोडाई के पर्णमध्योतक से प्राप्त प्रोटोप्लास्टों से MS माध्यम पर केवल छोटी-छोटी कैलस कोलोनिया ही बनती है । एक्टिनोमाइसिन-डी मुक्त MS माध्यम पर केवल पि. हाइब्रिड़ा+पि. पेरोड़ाई प्रोटोप्लास्ट ही स्थूलदर्शीय कैलस का निर्माण कर सकता है । अत: इस प्रकार वांछित विषमकेन्द्रो का चयन किया जा सकता है ।



(i) अ तथा ब - असंलयित प्रोटोप्लास्ट

(ii) अ + अ तथा ब + ब - एक ही संलयित प्रोटोप्लास्ट(समकेन्द्रक)

(iii) अ + ब - दोनों प्रजातियों के आपस में संलयित प्रोटोप्लास्ट(विषम केन्द्रक)

चित्र 3.6 : संलयन उपचार के द्वारा प्राप्त विभिन्न प्रकार के प्रोटोप्लास्ट

उपरोक्त विधियों के अतिरिक्त एक अन्य विधि द्वारा भी विषमकेन्द्रों का चयन किया जा सकता है । इस विधि में समस्त प्रोटोप्लास्टों को बिना किसी चयन के संवर्धित करते हैं । इस प्रकार संवर्धित प्रोटोप्लास्टों से प्राप्त कैलस कोलोनियों अथवा उनसे प्राप्त पादपों में से संकर कोशिकाओं / पादपों की पहचान - (क) कैलस अथवा पादप की आकारिकी, (ख) कैलस अथवा पादप में क्रोमोसोम की संख्या तथा (ग) कैलस अथवा पादपों में उपस्थित प्रोटीन/एन्जाइम आदि के इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा प्राप्त पट्ट प्रतिरुप (band pattern) आदि के आधार पर की जाती है । विषमकेन्द्रकों की पहचान अथवा चयन के लिए प्रजाति-विशिष्ट डी.एन.ए. (DNA) अन्वेषियों का भी उपयोग किया जा सकता है ।

(iii) विषमकेन्द्रकों से संकर पादपों का पुनर्जनन

कायिक संकरों का पादप प्रजनन में उपयोग निम्न दो बातों पर निर्भर करता है -

(i) विषमकेन्द्रकों से संकर पादपों का पुनर्जनन तथा

(ii) विकसित कायिक संकरों का कम से कम आंशिक उर्वर होना । ऊतक संवर्धन की प्रोटोप्लास्ट संलयन तकनीक से अब तक कई प्रजातियों में पुनर्जनन द्वारा कायिक संकरों से पादप विकसित किए जा चुके है, परन्तु बहुत से कायिक संकरों से पादपों का पुनर्जनन नहीं हो सका है ।

कायिक संकरों की पुनर्जनन की यह अक्षमता कायिक असंगतता कहलाती है । कायिक संकर दो प्रकार के होते हैं - (क) सममित तथा (ख) असममित ।

(क) **सममित कायिक संकर -** इस प्रकार के कायिक संकरों में दोनों जनक प्रजातियों के कायिक क्रोमोसोम पूरक होते हैं । अत: इस प्रकार के संकर स्वयं एक नई प्रजाति होते हैं ।

(ख) **असममित कायिक संकर -** इस प्रकार के कायिक संकरों में एक प्रजाति का पूर्ण कायिक क्रोमोसोम पूरक तथा दूसरी प्रजाति का केवल एक अथवा कुछ क्रोमोसोम उपस्थित रहते हैं । कायिक संकर कोशिकाओं में समसूत्री विभाजनों के दौरान एक जनक प्रजाति के गुणसूत्रों का स्वत: ही लोप हो जाता है । इस प्रक्रिया में लुप्त हुए जिनोम के कुछ क्रोमोसोम खण्डों का शेष बचे जीनोम में समाकलन हो जाता है । अत: किसी प्रजाति से कुछ वांछित गुणसूत्र-खण्डों का किसी अन्य प्रजाति में स्थानान्तरित करने के लिए असममित कायिक संकर विकसित किए जा सकते हैं ।

3.6.2 कायिक संकरों में जीन अभिव्यक्ति (Gene Expression in Somatic Hybrids)

प्रोटोप्लास्ट संलयन के द्वारा विकसित कायिक संकरों की प्रकृति इनकी अकारिकी एवम् गुणसूत्रीय लक्षणों के द्वारा निर्धारित की जाती है । इन परीक्षणों का सत्यापन, कायिक संकर एवम् दोनों जनकों जिनके प्रोटोप्लास्टों के संलयन से इस कायिक संकरण का निर्माण हुआ है, के आइसो एन्जाइमों के इलेक्ट्रोफोरेटिक प्रतिरुपों द्वारा किया जाता है । इस प्रकार विकसित किये जाने वाले कायिक संकरों का पूर्व निर्धारण राइबुलोज-1.5-बाईफॉस्फेट कार्बोक्सिलेज की पोलीपेप्टाइड सब यूनिट के प्रतिरुपों द्वारा भी किया जाता है ।

कई आण्विक तकनीकों जैसे प्रतिबंध खण्ड लम्बाई बहुरुपता [Restriction Fragment Lenght Polymorphism(RFLP)] तथा यादृच्छिक प्रवर्धित बहुरुपी डीएन.ए. [Randamly Amplified Polymorphism DNA(RAPD)] द्वारा भी कायिक संकरों का लक्षणीकरण (Characterisation) किया जाता है । प्रोटोप्लास्ट संलयन से बने कायिक संकर के केन्द्रीय (nuclear) जीनोम के विश्लेषण (analysis) में सदर्न ब्लॉट(southern blot) विश्लेषण का उपयोग किया जाता है ।

बोध प्रश्न

1. निम्नलिखित कथनों में सत्य/असत्य बताइये -
   - (क) सर्वांगी रूप सेरोग ग्रसित पादपों से रोग रहित पादप प्ररोह शीर्ष संवर्धन तकनीक द्वारा विकसित किये जाते हैं (सत्य/असत्य)
   - (ख) उच्छेदित विभज्योतकी शिर्षों का सतही निर्जमीकरण जर्मरहित अवस्थाओं में किया जाता है। (सत्य/असत्य)
   - (ग) पूर्ण विकसित पादप का दृढ़ीकरण संवर्धन कक्ष में किया जाता है। (सत्य/असत्य)
   - (घ) ऊष्मीय उपचारित पादप के प्ररोह शीर्ष संवर्धन से प्राप्त होने वाले विषाणु रहित पादपों की प्रतिशतता घट जाती है। (सत्य/असत्य)
   - (ड़) प्रोटोप्लास्ट विलगन की यांत्रिक विधि का केवल एतिहासिक महत्व है। (सत्य/असत्य)
   - (च) विलगित प्रोटोप्लास्टों का शुद्धिकरण एन्जाइम उपचार द्वारा किया जाता है। (सत्य/असत्य)

(छ) अवलंबी बूंद संवर्धन विधि में प्रोटोप्लास्टों की मृत्यु दर अधिक होती है । (सत्य/असत्य)

(ज) प्रोटोप्लास्ट संवर्धन की प्रक्रिया प्रोटोप्लास्ट घनत्व पर निर्भर करती है । (सत्य/असत्य)

(झ) दो भिन्न-भिन्न प्रजातियों के प्रोटोप्लास्टों के संलयन से प्राप्त पादप वर्ण संकर कहलाते हैं । (सत्य/असत्य)

2. ..... एवम्..... नामक वैज्ञानिकों ने..... पादप में प्ररोह शीर्ष संवर्धन तकनीक द्वारा नये रोग रहित पादप विकसित करने में सफलता प्राप्त की थी ।
3. विषाणु मुक्त पादप विकसित करने के लिए..... व..... कलिकाओं को कर्तोत्तक के रूप में प्रयुक्त किया जाता है ।
4. विभज्योतकी शीर्ष संवर्धन तकनीक की खोज से पूर्व रोग रहित पादप..... द्वारा प्राप्त किये जाते थे ।
5. कोशिका भित्ति रहित पादप कोशिका..... कहलाती है ।
6. एन्जाइम उपचार की प्रमुख दो विधियां..... तथा..... है?
7. एन्जाइमी उपचार द्वारा प्रोटोप्लास्टों के विलगन का श्रेय..... को जाता है ।
8. प्रेटोप्लास्टो के संलयन से बनने वाली द्विकेन्द्रीय कोशिका..... कहलाती है ।
9. प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन में कई प्रकार के..... का उपयोग किया जाता है ।
10. सेण्डा एवम् साथियों ने प्रोटोप्लास्ट संलयन की..... विधि का उपयोग किया ।
11. प्रोटोप्लास्ट संलयन के लिए दिये गए उपचार के पश्चात् कितने प्रकार के प्रोटोप्लास्ट प्राप्त होते हैं?
12. संकर प्रोटोप्लास्टों का चयन.....एवम्.....आधार पर किया जाता है
13. कायिक संकर..... व..... प्रकार के होते हैं ।
14. कायिक संकरों के लक्षणीकरण के लिए..... व..... नामक आण्विक तकनीकों का उपयोग किया जाता है ।

3.7 सारांश (Summary) :

– अधिकांश वानिकी, उद्यानिकी फसलें कवकों, माइकोप्लाज्मा, जीवाणुओं, सूत्रकृमियों तथा वायरस / विषाणु जनित सर्वांगी रोगों से ग्रसित होती है ।

- सर्वप्रथम मोरेल एवम् मार्टिन ने प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा विषाणु मुक्त डाहलीया पादप प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की थी ।
- प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा रोग रहित पादप निम्न चरणों में प्राप्त किये जाते हैं -
  (i) विभज्योतकी शीर्षों का सतही निर्जर्मीकरण
  (ii) संवर्धनों का स्थापन एवम् गुणन, तथा
  (iii) मूलोद्भवन एवम् दृढ़ीकरण
- कोशिका भित्ति रहित पादप कोशिका प्रोटोप्लास्ट कहलाती है ।
- एन्जाइम उपचार द्वारा प्रोटोप्लास्टों को निम्न दो प्रकार से पृथक किया जा सकता है -
  (i) अनुक्रमिक एन्जाइम उपचार विधि
  (ii) एन्जाइम सम्मिश्रण विधि
- एन्जाइम सम्मिश्रण विलयन को जर्मरहित अवस्थाओं में फिल्टर निर्जर्मीकरण की विधि द्वारा निर्जर्मीकृत किया जाता है ।
- प्रोटोप्लास्ट विलगन के लिए सामान्यत: ड्राइसीलेज एवम् सेलुलेज एन्ताइमों के सम्मिश्रण का उपयोग किया जाता है ।
- परासरणी सांद्रता बढ़ाने के लिए एन्जाइम सम्मिश्रण 10-15 प्रतिशत मैनीटॉल / सॉर्बीटॉल में बनाया जाता है।
- प्रोटोप्लास्टों की प्लाजा झिल्ली का स्थायित्व बनाये रखने के लिए एन्जाइम सम्मिश्रण में 70 mM कैल्शियम क्लोराइड का उपयोग किया जाता है ।
- विलगित प्रोटोप्लास्टों का शुद्धिकरण अपकेन्द्रण द्वारा किया जाता है ।
- शुद्धिकृत प्रोटोप्लास्टों को निम्न विधियों द्वारा संवर्धित किया जा सकता है -
  (i) अगर-अगर युक्त माध्यम पर प्रोटोप्लास्ट संवर्धन
  (ii) सूक्ष्म बूंद संवर्धन तथा
  (iii) अवलंबी बूंद संवर्धन विधि
- प्रोटोप्लास्ट संवर्धन को निम्न कारक प्रभावित करते हैं -
  (i) संवर्धन माध्यम
  (ii) परासरणता
  (iii) पादप वृद्धि नियंत्रक
  (iv) संवर्धन अवस्थाएं तथा
  (v) प्रोटोप्लास्ट घनत्व
- प्रोटोप्लास्टों के संलयन से बनने वाली कोशिका विषमकेन्द्री कोशिका कहलाती है ।
- पादप प्रोटोप्लास्टों का संलयन यांत्रिक एवम् प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन की विधियों द्वारा किया जा सकता है।
- सोडियम नाइट्रेट उपचार, उच्च pH पर Ca^{++} के द्वारा, पॉलीइथाइलीन ग्लाइकॉल उपचार एवं विद्युतीय संलयन आदि प्रमुख प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन विधियां है ।
- दो भिन्न प्रजातियों के प्रोटोप्लास्टों के संलयन से प्राप्त संकर पौधें कायिक संकर कहलाते हैं ।
- कायिक संकर सममित एवम् असममित प्रकार के होते हैं ।

3.8 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. (क) सत्य (ख) सत्य
   (ग) असत्य (घ) असत्य
   (ङ) सत्य (च) असत्य
   (छ) असत्य (ज) सत्य
   (झ) सत्य (ञ) सत्य
2. मोरेल, मार्टिन, डाहलीया
3. शीर्षस्थ, कक्षस्थ
4. उष्मीय उपचार
5. प्रोटोप्लास्ट
6. (i)अनुक्रमिक एन्जाइम उपचार विधि (ii) एन्जाइम सम्मिश्रण विधि
7. ई.सी. कोकिंग
8. विषम केन्द्रक कोशिका
9. फ्यूजोजनों
10. विद्युतीय संलयन
11. तीन प्रकार के
12. दृश्य चयन, जैवरासायनिक
13. सममित कायिक संकर, असममित कायिक संकर
14. RFLP व RAPD

3.9 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions) :

1. प्ररोह शीर्ष संवर्धन से क्या अभिप्राय है ? वानिकी एवम् उद्यानिकी के क्षेत्रों में इसकी क्या उपयोगिता है ? समझाइये।
2. प्ररोह शीर्ष संवर्धन से रोगरहित पादप विकसित करने की विभिन्न प्रावस्थाओं का सचित्र वर्णन कीजिए ।
3. प्रोटोप्लास्ट को परिभाषित कीजिए । पादप कर्तोत्तकों अथवा स्थापित संवर्धनों द्वारा प्रोटोप्लास्ट विलगन/ पृथक्करण, शुद्धिकरण एवम् संवर्धन स्थापन की विधि को सचित्र समझाइये ।
4. प्रोटोप्लास्टों के एन्जाइमी विलगत की प्रक्रिया को उचित चित्र की सहायता से समझाइये ।
5. प्रोटोप्लास्ट संवर्धन की विभिन्न विधियों का वर्णन कीजिए ।
6. प्रोटोप्लास्ट संवर्धन को प्रभावित करने वाले मुख्य कारक कौन-कौन से है? समझाइये ।
7. कायिक संकर को परिभाषित कीजिए । प्रोटोप्लास्ट संलयन द्वारा कायिक संकर पादप विकसित करने के विभिन्न पदों का संक्षिप्त में वर्णन कीजिए ।
8. प्रोटोप्लास्ट संलयन की विभिन्न विधियों का वर्णन कीजिए ।

9. कायिक संकरों की विभिन्न चयन विधियाँ कौन'-कौनसी है ? समझाइये ।

10. निम्नलिखित पर संक्षिप्त टिप्पणियां लिखिए -

(क) प्ररोह शीर्ष संवर्धन

(ख) कायिक संकरण

(ग) विभज्योतकी शीर्ष उच्छेदन

(घ) एन्जाइमी सम्मिश्रण विधि द्वारा प्रोटोप्लास्ट विलगन

(ङ) प्रोटोप्लास्ट शुद्धिकरण

(च) प्रोटोप्लास्ट संलयन

(छ) प्रेरित प्रोटोप्लास्ट संलयन की विधियां

(ज) विद्युतीय संलयन विधि द्वारा प्रोटोप्लास्ट संलयन

(झ) कायिक संकरों में जीन अभिव्यक्ति

(ञ) जैव रासायनिक आधार पर पूरकीकरण

3.10 शब्दावली (Glossary) :

वानिकी	Forestry
उद्यान कृषि/उददद्यानिकी	Horticulture
उच्छेदन	Excision
सूत्रकृमि	Nematode
रोगजनक	Pathogen
सर्वांगी	Systemic
संक्रमित	Infected
शीर्षस्थ विभज्योतक	Apical Meristem
कक्षस्थ	Axillary
कायिक असंगतता	Somatic incompatibility
प्रक्षालन	Washing
समसूत्री	Mitosis
संवर्धन कक्ष	Culture Room
दृढ़ीकरण	Hardening
पादपक	Plantlet
पूरकीकरण	Complementation
विलगन	Isolation
संलयन	Fusion
उष्मायन	Incubate

अधिप्लवी	Supernatent
मलबा	Debris
अवलंबी बूंद	Hanging Drop
वर्णकहीन	Albino
समकेन्द्रक	Homokaryon
विषम केन्द्रक	Heterokaryon

3.11 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Book) :

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन प्लान्ट टिश्यू कल्चर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 4

अगुणित पादप संवर्धन
(HAPLOID PLANT CULTURE)

इकाई की रुपरेखा

4.0 उद्देश्य

4.1 प्रस्तावना

4.2 अगुणित पादप उत्पादन

4.2.1 परागकोश संवर्धन

4.2.2 परागकण संवर्धन

4.2.3 अण्डाशय संवर्धन

4.3 समयुग्मजी क्रम उत्पादन

4.4 जननद्रव्य संरक्षण हेतु निम्नताप संरक्षण, मंद वृद्धि एवं डी.एन.ए. बैंकिग

4.5 सारांश

4.6 बोध प्रश्नों के उत्तर

4.7 अभ्यासार्थ प्रश्न

4.8 शब्दावली

4.9 संदर्भ ग्रन्थ

4.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप समझ पायेंगे कि -

1. परागकोष, परागकण एवं अण्डाशय के संवर्धन से अगुणित पादप कैसे तैयार/विकसित किए जाते हैं ।
2. ऊतक संवर्धनों द्वारा विकसित अगुणित पादपों से किस प्रकार समयुग्मजी क्रमों का विकास किया जाता है ।
3. इस प्रकार विकसित समयुग्मजी क्रमों का पादप प्रजनन में क्या महत्त्व है ?
4. निम्नताप संरक्षण एवं मंद वृद्धि, पादप जननद्रव्य संरक्षण में किस प्रकार उपयोगी है?
5. डीएनए. बैंकिग से क्या अभिप्राय है, जननद्रव्य संरक्षण व ट्रांसजैनिक पादप विकास में डी.एन.ए. बैंकों का क्या योगदान है?.

4.1 प्रस्तावना (Introduction) :

परम्परागत पादप प्रजनन की विधियों द्वारा अगुणित पादप एवं समयुग्मजी क्रमों का विकास बहुत कठिन है । आधुनिक ऊतक संवर्धन की तकनीक द्वारा पादपों की युग्मकोद्भिद कोशिकाओं, जैसे - परागकोष, परागकण, अनिषेचित अण्ड युक्त अण्डाशय आदि के अन्तःपात्रे संवर्धन से अगुणित पादप एवम् समयुग्मजी क्रम आसानी से विकसित किये जा सकते हैं। इस तकनीक द्वारा विकसित युग्मकोद्भिद पादपों का पादप प्रजनन के क्षेत्र में महत्वपूर्ण योगदान है ।

पादप प्रजनन के लिए वृहत् मात्रा एवम् अल्प अवधि में अगुणित पादप विकसित करने की तकनीक सबसे पहले **शिप्रा गुहा** एवम् **एस.सी. महेशवरी** द्वारा विकसित की गई थी । उन्होंने इस तकनीक द्वारा धतुरा पादप के परागकोष एवम् परागकण संवर्धन द्वारा अगुणित पादप विकसित करने में सफलता प्राप्त की थी । तत्पश्चात् इस तकनीक के उपयोग द्वारा कई फसली पादपों में वृहत् स्तर पर अगुणित पादप एवम् समयुग्मजी क्रम विकसित किये जा चुके हैं ।

प्राचीन काल से ही कृषक बीजों एवम् कायिक प्रवर्ध्य (propagules) का एक ऋतु से अगली ऋतु के लिए चयन करता आया है । यह प्रक्रिया उच्च कोटि के जननद्रव्य का संरक्षण एवम् भविष्य के उपयोग हेतु इसका प्रबन्धन करना ही है। जीवद्रव्य संरक्षण का मुख्य उद्देश्य किसी पादप प्रजाति विशेष की अधिक से अधिक आनुवंशिक विभिन्नताओं का संरक्षण करना है । भूमण्डलीय वातावरणीय परिवर्तनों तथा प्राकृतिक आपदाओं के कारण पादपों के प्राकृतिक आवास भी प्रभावित हो सकते हैं । अत: पादपों की आनुवंशिक विभिन्नताओं के संरक्षण हेतु इनके जननद्रव्य का संरक्षण आवश्यक है । पादप जननद्रव्य संरक्षण मुख्य रुप से दो प्रकार से किया जाता है - (i) स्वस्थाने संरक्षण (in situ conservation) तथा (ii) बाह्यस्थाने संरक्षण (ex situ conservation) । इस इकाई में बाह्यस्थाने संरक्षण की विभिन्न विधियों को समझाया गया है ।

4.2 अगुणित पादप उत्पादन (Haploid Plant Production) :

तुलेके (Tulecke, 1953) ने अनावृत बीजी पादप गिंगों बाइलोबा (Ginkgo biloba) के परिपक्व परागकणों के संवर्धन से कैलस विकसित करने में सफलता प्राप्त की थी, तत्पश्चात् 1964 में भारतीय वैज्ञानिकों **शिप्रा गुहा** एवं **एस.सी. महेश्वरी** ने डटूरा इन्नोस्किया (Datura innoxia) पादप के परागकणों से असंख्य अगुणित पादप प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की । अगुणित पादप उत्पादन तकनीक का उपयोग प्रमुख रुप से पादप प्रजनन के क्षेत्र में संकुमजी पादप विकसित करने में है । इस तकनीक का उपयोग कई फसली पादपों में कम समय में अधिक से अधिक संयुग्मजी पादप प्राप्त /विकसित करने में किया जाता है । पादपों में अगुणित पादप सामान्यत: अगुणित पादप अंगों एवं उत्तकों जैसे - अनिषेचित अण्ड युक्त अण्डाशयों, परागकोषों, परागकणों आदि के संवर्धन से विकसित किये जाते हैं ।

4.2.1 परागकोष संवर्धन (Anther Culture)

पादप ऊतक संवर्धन तकनीक अगुणित पादप प्राप्त करने की एक प्रभावी तकनीक है । सामान्यत: स्त्रोत पादप (जिससे अगुणित पादप विकसित करने है) को नियंत्रित अवस्थाओं में रखा जाता है । इस स्त्रोत पादप/प्रायोगिक पादप (source plant / experimental plant) से बंद पुष्पी कलिका को पृथक् कर लिया जाता है । परागकणों के विकास की अवस्था का पता लगाने के लिए एक परागकोष का संदलन (crush) कर सूक्ष्मदर्शी में देखा जाता है । संवर्धन के लिए उपयुक्ता पुष्पी कलिकाओं का सतही निर्जमीकरण किया जाता हैं । निर्जमीकृत पुष्पी कलिकाओं से पुंकेसरों को पृथक कर लिया जाता है, तथा परागकणों की विकास की उपयुक्त अवस्थाओं की पहचान करने के पश्चात् परागकोषों को पूतंतुओं से पृथक् कर निर्जमीकृत अवस्थाओं में संवर्धन माध्यम पर स्थापित कर दिया जाता है । सूक्ष्म पुष्पी पादपों में यह प्रक्रिया स्टीरियो सूक्ष्मदर्शी की सहायता से सम्पन्न की जाती है ।

अगुणित पादप संवर्धन के लिए सामान्यत: निश्च एवं निश्च (Nitsch and Nitsch, 1967) द्वारा विकसित संवर्धन माध्यम का उपयोग किया जाता है । परागकोष संवर्धन तरल अथवा अर्ध ठोस माध्यम पर किया जा सकता है । संवर्धन माध्यम पर स्थापित परागकोषों को संवर्धन कक्ष में 24-28^0 C तापमान एवम् आवश्यकतानुसार 2500-3000 लक्स प्रकाश तीव्रता अथवा प्रकाशहीन अवस्था में रखा जाता है। 3 से 8 हफ्तों में संवेदनशील / अन्तक्रियाशील परागोषों में विकसित होने वाले कैलस अथवा भ्रूणाभों के द्वारा पड़ने वाले दबाव से परागकोष की भित्ति फट जाती है । इस प्रकार से विकसित कैलस अथवा प्रत्यक्ष रुप से बनने वाले भ्रूणाभों को दूसरे माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है । 3-5 सेंटीमीटर लम्बें अगुणित प्ररोहों को जड़ जनन के लिए उपयुक्त संवर्धन माध्यम पर संवर्धित करने पर पूर्ण अगुणित पादप का विकास होता है । इस प्रकार विकसित अगुणित पादपों को छोटे-छोटे गमलों में स्थापित किया जाता हैं । एक ही परागकोष के विभिन्न परागकणों से विकसित होने वाले पादप आनुवंशिक रुप से भिन्न-भिन्न होते हैं अत: उपयुक्त जीन प्रारुप का चयन कर उसका सूक्ष्म प्रवर्धन की क्लोनिंग तकनीक द्वारा गुणन किया जाता है ।

4.2.2 परागकण संवर्धन (Pollen Culture)

जैसा कि पहले बताया जा चुका है, एक ही परागकोष मे पाये जाने वाले परागकण सामान्यत: आनुवांशिक रूप से विजातीय होते हैं, इस कारण इनसे विकसित होने वाले अगुणित पादप भी विजातीय होते हैं । इसी प्रकार विभिन्न परागकणों से विकसित होने वाले कैलस के मिश्रण के परिणामस्वरूप कीमेरिक अगुणित पादप भी विकसित हो सकते हैं, तथा परागकणों के अतिरिक्त दूसरे ऊतकों जैसे - परागकोष भित्ति एवं टेपेटम से विकसित पादप द्विगुणित भी हो सकते हैं अत: परागकोष संवर्धन से विकसित पादप शुद्ध रुप से अगुणित नहीं होते हैं । परागकोष संवर्धित अगुणित पादपों में उपरोक्त विसंगतियों को पृथक्कृत परागकण संवर्धन द्वारा दूर किया जा सकता है ।

पृथक्कृत परागकण संवर्धन के मुख्य लाभ निम्न है -

(i) यह एक एकल अगुणित कोशिकीय तंत्र है ।

(ii) प्रवणता अपकेन्द्रण के द्वारा परागकण संवर्धन के लिए सबसे उपयुक्त परागकण प्राप्त किये जा सकते हैं, तथा

(iii) पृथक्कृत परागकणों को आसानी से आनुवंशिक रुप से रुपान्तरित किया जा सकता है ।

कामेया एवं हिनाटा (Kameya and Hinata) ने सर्वप्रथम 1970 में ब्रेसिका ऑलिरेसिया के पृथक्कृत परागकणों से कैलस प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की थी ।

परागकण संवर्धन द्वारा अगुणित पादप निम्न विधि द्वारा विकसित किये जा सकते हैं -

बन्द पुष्पी कलिकाओं का सतही निर्जमीकरण करने के पश्चात् उपयुक्त आकार एवं अवस्था के परागकोषों को 13% शर्करा युक्त संवर्धन माध्यम में संदलित किया जाता है । तदुपरांत इस परागकण युक्त संवर्धन माध्यम को नाइलॉन की छलनी द्वारा छानकर इसमें से बड़े आकार के कचरे को अलग किया जाता है । इस प्रकार प्राप्त छनित्र का 1000 rpm पर 5 मिनट तक अपकेन्द्रण किया जाता है । अपकेन्द्रण के पश्चात् अधिप्लवी को अलग कर दिया जाता है, तथा पैलेट को 13% शर्करा युक्त संवर्धन माध्यम में निलंबित किया जाता है । इस परागकण निलंबन को सावधानीपूर्वक 24%, 32%, 40% परकोल (percoll) प्रवणता विलयन पर स्थानान्तरित किया जाता है तथा पुन: 1000 rpm पर 5 मिनट तक

अपकेन्द्रण किया जाता है । पिपेट की सहायता से ऊपरी दो परतों को पृथक कर पुन: संवर्धन माध्यम के साथ अपकेन्द्रण किया जाता है तथा अधिप्लवी विलयन को संवर्धन माध्यम पर प्लेटित किया जाता है । यह संपूर्ण प्रक्रिया जर्मरहित अवस्थाओं में सम्पन्न की जाती है ।

संवर्धन माध्यम पर प्लेटन के पश्चात् संवर्धनों को आरम्भ के 3-4 दिनों तक 32 ± 2^0 C ताप पर अंधेरे में रखा जाता हैं, तदुपरांत इन्हें 25^0 C ताप एवं 2500-3000 लक्स प्रकाश तीव्रता में रखा जाता है। 3 से 4 हफ्तों में संवर्धित परागकणों से कैलस अथवा भ्रूणाभों का विकास होता है जिनसे पूर्ण विकसित अगुणित पादप प्राप्त किये जा सकते हैं ।

पृथक्कृत परागकण संवर्धन तकनीक, परागकोष संवर्धन तकनीक से अधिक प्रभावी एवं सुविधाजनक तकनीक है ।

परागकोष व परागकण संवर्धन को प्रभावित करने वाले कारक

पादप ऊतक संवर्धन में परागकोष व परागकण संवर्धन द्वारा अगुणित पादप विकसित करना विभिन्न कारकों जैसे - स्त्रोत पादप की कार्यकी अवस्था, परागकण विकास की अवस्था, परागकोष भित्ति, स्त्रोत पादप का जीन प्रारुप, परागकोष /परागकणों का संवर्धन पूर्व उपचार, संवर्धन माध्यम, संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त पादप वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति, सांद्रता एवं सम्मिश्रण अनुपात, परागकणों के संवर्धन घनत्व तथा भौतिक कारकों जैसे ताप, प्रकाश तीव्रता, एवं दीप्तिकाल आदि कारकों पर निर्भर करता है ।

अगुणित पादप उत्पादन की उपलब्धियां

अगुणित पादप उत्पादन से धान, गेहूँ, जौं, तम्बाकू इत्यादि व्यवसायिक रुप से महत्वपूर्ण पादप प्रजातियों की अधिक उत्पादक, रोग एवम् शीतरोधी किस्में विकसित की जा चुकी है । इस विधि द्वारा अकेले चीन (China) में धान की 100 से अधिक किस्में विकसित की जा चुकी है । इन किस्मों में से Xin Xia, Zhonghua-8 एवं Zhonghua- 9 की पैदावार पहले की किस्मों की तुलना में 17-23 प्रतिशत अधिक है । इस विधि द्वारा विकसित धान, जौं, तम्बाकू एवम् गेहूँ की प्रमुख किस्में निम्न है -

धान - Hua-03 - अधिक उपज एवम् उच्च प्रोटीन मात्रा युक्त

जौं - मिंगो एवम् ग्विलैन - चुर्णिल आसिता एवम् जौं पीत मोजेक वाइरस रोधी

तम्बाकू - F211- बैक्टिरियाई म्लानी रोधी

गेंहूँ - Hua Pei 1 जिंगडेन 2288 अधिक उत्पादक

अगुणित पादप उत्पादन के महत्व

पादप प्रजनन के क्षेत्र में अगुणित पादप उत्पादन एवम् इनसे विकसित समयुग्मजी पक्तियों / अनुक्रमों के निम्न महत्व है -

लाभ

(i) अल्पकाल में समयुग्मजी द्विगुणित पादप विकसित करना ।

(ii) अगुणितों के उपयोग से उत्परिवर्तनों की पहचान का सुविधाजनक होना (अगुणितों में अप्रभावी उत्परिवर्तनों की भी अभिव्यक्ति होती है)

(iii) परागकणों द्वारा विकसित भ्रूणों का उपयोग जीन स्थानान्तरण में किया जा सकता है ।

सीमाएं

(i) अधिकांश पादप प्रजातियों में अगुणित पादप विकसित करने की तकनीक का अभाव होना ।

(ii) अगुणित एवम् द्विगुणन अगुणितों के उत्पादन की लागत का अधिक होना ।

(iii) ऊतक संवर्धन तकनीक के द्वारा अगुणित उत्पादन के दौरान हानिकारक उत्परिवर्तनों का प्रेरित होना ।

(iv) विकसित पादपों के वातानुकूलन एवम् दृढ़ीकरण हेतु ग्रीन हाऊस की सुविधा का आवश्यक होना।

(v) उच्च दक्षता की आवश्यकता का होना । इस विधि द्वारा अगुणित पादप उत्पादन एवं समयुग्मजी पक्तियों के विकास में मुख्य सीमाएँ है ।

4.2.3 अण्डाशय संवर्धन (Ovary Culture)

मादा युग्मकोदभिद् (embryosac) की अनिषेचित कोशिकाओं जैसे अण्डाशय एवं अण्डप से पादप विकसित करने की तकनीक अण्डाशय संवर्धन / गाइनोजिनेसिस कहलाती है । नोइयम (Noeum) ने 1976 में सबसे पहले अन्त:पात्रे अनिषेक जनन के बारे में बताया तथा इन्होंने जौं (Barley) पादप में अण्डाशय संवर्धन द्वारा अगुणित पादप प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की । गाइनोजेनिक अगुणित पादप प्रत्यक्ष अथवा अप्रत्यक्ष भ्रूणोद्भवन अथवा अंगोद्भवन द्वारा विकसित किये जा सकते हैं । अब तक लगभग 25 से अधिक पादप प्रजातियों में विभिन्न प्रकार के कर्तोत्तकों जैसे - अण्डाशय, अण्डप, पुष्पी कलिकाएं पुष्पक्रम आदि के संवर्धन से गाइनोजेनिक अगुणित पादप प्राप्त किये जा चुके है । अण्डाशय संवर्धन मुख्य रूप से कर्तोत्तक के जीन प्रारुप, प्रयुक्त कर्तोत्तक, पोषण माध्यम, माध्यम में प्रयुक्त पादप वृद्धि नियंत्रकों की प्रकृति व सांद्रता तथा भौतिक अवस्थाओं जैसे - ताप, प्रकाश तीव्रता, दीप्तिकाल आदि द्वारा प्रभावित होता है ।

4.3 समयुग्मजी क्रम उत्पादन (Production of Homozygous Lines) :

परागकोष, परागकण अथवा अण्डाशय संवर्धन द्वारा विकसित पादप सामान्यत: पुष्यीय अवस्था तक वृद्धि तो करते हैं, लेकिन इनमें समयुग्मजी गुणसूत्रों के अभाव के कारण सामान्य अर्धसूत्री विभाजन नहीं होता । सामान्य अर्धसूत्री विभाजन के अभाव में जीवनक्षम (viable) युग्मक नहीं बनते हैं । अत: नीषेच्य / जननक्षम समयुग्मजी द्विगुणित पादप प्राप्त करने के लिए इन अगुणित पादपों में गुणसूत्रों का द्विगुणन कराना आवश्यक होता है । अगुणित पादपों से समयुग्मजी क्रम उत्पादन हेतु इन पादपों में गुणसूत्रों का कृत्रिम विधि द्वारा द्विगुणत किया जाता है ।

अगुणित पादपों में गुणसूत्रों के द्विगुणन के लिए कॉल्विसीन नामक रसायन का उपयोग किया जाता है । इस प्रक्रिया में पराग जनित पादपों को पहले अतिसूक्ष्म निस्पंदन द्वारा निर्जर्मीकृत **कॉल्चिसीन विलयन** में लगभग 96 घण्टों तक डुबोकर रखा जाता है, तत्पश्चात् इन्हें पुन: संवर्धन माध्यम पर स्थापित कर दिया जाता है । इस प्रकार विकसित समयुग्मजी क्रम की क्लोनिंग से असंख्य समयुग्मजी पादपों की संतति तैयार की जा सकती है । अगुणित पादपों के वायवीय भागों पर **लेनोलिन पेस्ट** लगा कर भी द्विगुणित जननक्षम समयुग्मजी शाखाओं का विकास किया जा सकता है । **कॉल्चिसीन** विलयन की सान्द्रता एवं उपचार की अवधि पादप जीन प्रारुप पर निर्भर करती है ।

इस विधि द्वारा समयुग्मजी क्रम का विकास एक वर्ष की अवधि में ही किया जा सकता है, जो परम्परागत विधि द्वारा समयुग्मजी क्रम तैयार करने में लगने वाले समय से बहुत कम है। इस प्रकार विकसित समयुग्मनजी क्रम का उपयोग पादप प्रजनन के क्षेत्र में किया जाता है ।

4.4 निम्नताप संरक्षण एवं मंद वृद्धि (Cryopreservation and Slow Growth) :

4.4.1 निम्नताप संरक्षण

कोशिकाओं, ऊतकों एवं अंगों का तरल नाइट्रोजन (-196^{0}C) में संरक्षण निम्न ताप संरक्षण (cryopreservation) कहलाता है । इस तकनीक का उपयोग पादप कोशिकाओं, प्ररोहशीर्ष, कायिक एवं युग्मज भ्रूणों के संरक्षण के लिए किया जाता है । निम्न ताप संरक्षण की प्रक्रिया निम्न चार चरणों में सम्पन्न होती है -

(i) हिमीकरण (Freezing)

इस प्रक्रिया में पादप कोशिकाओं, ऊतकों एवं अंगों का हिमीकरण किया जाता है । हिमीकरण की प्रक्रिया से पहले इन पादप ऊतकों का आंशिक निर्जलीकरण किया जाता है । निर्जलीकरण की प्रक्रिया में इन पादप कोशिकाओं, ऊतकों एवं अंगों आदि को विशेष रूप से तैयार किये गये विभिन्न यौगिकों जैसे - ईथाइलीन ग्लाइकोल, सुक्रोज आदि के उच्च सांद्रता वाले विलयनों से उपचारित किया जाता है । यह विलयन पादप काचन विलयन कहलाता है तथा वह प्रक्रिया जिसमें पादप काचन विलयन (plant vitrification solution) से उपचारित पादप कोशिकाओं का कोशिका द्रव्य काचाभ हो जाता है 'काचन' (vitrification) कहलाती है । इस प्रकार से निर्जलीकृत/काचाभ पादप कोशिकाओं/ऊतकों/अंगों को तरल नाइट्रोजन में हिमशीतित किया जाता है ।

हिमीकरण की प्रक्रिया विभिन्न ऊतकों के लिए अलग-अलग होती है -

(अ) धीमा हिमीकरण (Slow Freezing)

शीत संरक्षण में सबसे अधिक उपयोग में आने वाली प्रक्रिया/तकनीक है । इस प्रक्रिया में पादप ऊतकों का हिमीकरण 0^{0}C से -100^{0}C तक नियंत्रित एवं धीमी (0.5-2^{0}C प्रति मिनट) गति से किया जाता है ।

(ब) तीव्र/शीघ्र हिमीकरण (Rapid Freezing)

हिमीकरण की इस प्रक्रिया में पादप ऊतकों/अंगों का 1000^{0}C/मिनट से अधिक की दर से हिमीकरण किया जाता है । आरंभ में हिमीकरण की दर धीमी (5^{0}C/मिनट) होती है तथा इस तापमान पर लगभग 30 मिनट तक रखने के पश्चात् इन पादप ऊतकों का शीघ्र हिमीकरण किया जाता है अर्थात् पादप कोशिकाओं एवं ऊतकों युक्त पात्रों को सीधे ही तरल नाइट्रोजन में निमज्जित कर दिया जाता है ।

(स) बिन्दु हिमीकरण (Droplet Freezing)

इस प्रक्रिया में शीतरक्षित पदार्थों से उपचारित विभज्योतकी ऊतकों को 2-3 माइक्रोलीटर आकार की बूंदों के रुप में पेट्री प्लेट में रखी एल्यूमिनीयम पन्नी पर परिक्षेपित (dispense) करने के पश्चात् इन्हें 0.5^{0}C/मिनट की दर से -20 से -40^{0}C तक हिमीकरण किया जाता है ।

हिमीकरण से पूर्व पादप कोशिकाओं, ऊतकों व अंगों को 1-2 मिलीलीटर क्षमता वाली पॉली प्रोपेलीन के पात्रों में शीतरक्षी विलयन युक्त माध्यम में रखा जाता है । पादप कोशिकाओं को शीत आघातों से बचाने के लिए संरक्षण माध्यम में शीतरक्षी पदार्थ जैसे डाईमिथाइलसल्फोक्साइड [Dimethylsulfoxide (DMSO 5.8%)], ग्लिसरॉल, प्रोलीन (10%) आदि का मिलाया जाना आवश्यक है । ये शीतरक्षी पदार्थ कोशिकाओं में बड़े आकार के हिम क्रिस्टलों को नहीं बनने देते तथा यह कोशिकाओं की जल हानि द्वारा उत्पन्न टॉक्सिक पदार्थों से रक्षा करते हैं । DMSO सबसे अधिक प्रयोग में लिए जाने वाला शीतरक्षी पदार्थ है । संवर्धनों में यह 0^0C तक ताप नियंत्रक तक लगातार/सतत् मिलाया जाता है ।

(ii) संग्रहण (Storage)

हिमीकृत कोशिकाओं, ऊतकों, एवं अंगों को तरल नाइट्रोजन रेफ्रिजरेटर में -196^0C ताप पर संग्रहित किया जाता है ।

(iii) हिमद्रवण (Thawing)

हिमीकृत पादप ऊतकों का हिमद्रवण, संरक्षण पात्र को 37^0-40^0C ताप मान के जल में निमज्जित करके किया जाता है । हिमद्रवण की दर 500 से 700^0C प्रति मिनट होती है । पादप ऊतकों को पुन:संवर्धन तक हिम बाथ (ice bath) में रखा जाता है । हिमद्रवण की दर तीव्र होती है जिससे इसमें हिम क्रिस्टल नहीं बनते ।

(iv) पुन:संवर्धन (Reculture)

सामान्यत: हिमद्रवित पादप ऊत्तकों को कई बार धोया जाता है जिससे इन्हें शीतरक्षी पदार्थों से मुक्त किया जा सके। परन्तु आधुनिक समय में पादप ऊत्तकों को शीतरक्षी पदार्थों के साथ ही पुन:संवर्धित किया जाता है । इस प्रक्रिया में हिमद्रवित पादप ऊत्तकों को पहले फिल्टर पत्र डिस्क पर रखा जाता है तथा इन ऊतकों सहित फिल्टर पत्र डिस्क को संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है । यह प्रक्रिया शीघ्रतापूर्वक बार-बार दोहराई जाती है जिससे शीतरक्षी पदार्थ तनु (dilute) हो जाते हैं । अंत में पादप ऊतकों को प्रत्यक्ष रुप से संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरित कर दिया जाता है । हिम संरक्षण की इस तकनीक का उपयोग आलू के प्ररोह शीर्ष के जनन द्रव्य संरक्षण के लिए किया जाता रहा है ।

4.4.2 मंद वृद्धि (Slow Growth)

मंद वृद्धि पादप जननद्रव्य संरक्षण तकनीक आसान, कम खर्चीली एवं अधिक प्रभावी है । अत: ऊतक संवर्धन में जननद्रव्य संरक्षण हेतु इस तकनीक का उपयोग निम्न ताप संरक्षण की वैकल्पिक तकनीक के रुप में किया जाता है । पादप ऊतक संवर्धन में संवर्धनों की वृद्धि, इन्हें निम्न ताप (5^0C-15^0C) पर अथवा संवर्धन माध्यम की परासरणता बढ़ाकर अथवा अल्प पोषक माध्यम पर संवर्धित कर मंदित की जा सकती है । संवर्धन माध्यम में एबसिसिक अम्ल (ABA) का प्रयोग करके भी संवर्धनों की वृद्धि दर में कमी लाई जाती है । संवर्धनों की धीमी वृद्धि के कारण इनके उपसंवर्धन अधिक अंतराल के बाद किये जाते हैं । कुछ पादप प्रजातियों में उप संवर्धन का अंतराल मंद वृद्धि के कारण 20-25 दिनों से बढ़ाकर एक वर्ष तक किया जा सकता है । मंद वृद्धि विधि का उपयोग सीमित स्तर पर कई क्लोनीय

फसलों के जननद्रव्यों के संरक्षण हेतु किया जा रहा है । हमारे देश में इस क्षेत्र में NBPGR (National Bureau of plant Genetic Resources, New Delhi) सराहनीय कार्य कर रहा है ।

4.4.3 जननद्रव्य संरक्षण हेतु डी.एन.ए. बैंकिंग (DNA Banking for Germplasm Preservation) :

यह बाहय स्थाने (ex situ) जननद्रव्य संरक्षण की विधि है । इस विधि में डी.एन.ए. बैंकों में संग्रहित संजीन/जिनोम के डी.एन.ए. खण्डों को कॉस्मिड क्लोनों, फेज लाइसेटो अथवा शुद्ध डी.एन.ए. के रुप में 4^0C ताप पर हिम शुष्क अवस्था में सुरक्षित रखा जाता है । इन डी.एन.ए. खण्डों का मानकीकरण किया जा सकता है तथा आवश्यकतानुसार वांछित डी.एन.ए. खण्डों का उपयोग ट्रांसजैनिक पादप विकसित करने में किया जा सकता है । इस जनन द्रव्य संरक्षण तकनीक का उपयोग लुप्त प्राय: प्रजातियों के हरबेरियम प्रतिदर्श द्वारा प्राप्त डी.एन.ए. की क्लोनिंग करके भी किया जा सकता है । यह तकनीक अत्यधिक खर्चिली एवं सोफिस्टिकेटेड है ।

जननद्रव्य संरक्षण की उपरोक्त तीनो विधियों के तुलनात्मक अभिलक्षणों को सारणी 4.1 में प्रदर्शित किया गया है ।

सारणी 4.1

क्र.सं.	अभिलक्षण	निम्न ताप संरक्षण	मंद वृद्धि	डी.एन.ए बैंकिंग
1.	संरक्षित ऊतक/अंग	प्ररोह शीर्ष, भ्रूण, कायिक भ्रूण आदि	प्ररोह एवम् स्थापित संवर्धन	डीएनए. खण्डों का कॉस्मिड, फास्मिड अथवा यीस्ट क्रोमोसोम के रूप में
2.	उपापचयी क्रिया दर	शून्य	मंद	शून्य
3.	भंडारण का तापमान	- 196^0C	5.0-15^0C	4^0C हिम शुल्क अवस्था में
4.	भंडारण में रखरखाव	तरल नाइट्रोजन की आपूर्ति	6-12 महिनों में उपसवर्धन	-
5.	भंडारण स्थल	तरल नाइट्रोजन रेफ्रिजरेटर	घरेलू रेफ्रिजरेटर	घरेलू रेफ्रिजरेटर/डीप फ्रीज
6.	आशंकाएं	समय के साथ उत्तरजीविता में कमी	उपसंवर्धन एवम् रखरखाव के दौरान संदूषण की संभावनाएं	-
7.	उपयोग	ऊतक संवर्धन की जा सकने ऊतक सवर्धन की जा सकने वाली सभी प्रजातियों के लिए उपयोगी	ऊतक संवर्धन की जा सकने ऊतक सवर्धन की जा सकने वाली सभी प्रजातियों के लिए उपयोगी	मूल्यवान एवम् दुर्लभ जीनों (डीएनए. खण्डो के संरक्षण हेतु)

8.	प्रक्रिया	मंद वृद्धि की तुलना में जटिल	काफी सरल	अत्यधिक जटिल
9.	लागत	मंद वृद्धि की तुलना मे अधिक	कम	सबसे अधिक

जननद्रव्य संरक्षण विधियों के महत्व

पात्रे जननद्रव्य संरक्षण के निम्न लाभ एवम् सीमाएं है -

(क) लाभ

(i) अपेक्षाकृत कम स्थान की आवश्यकता

(ii) जननद्रव्य संरक्षण जर्मरहित (रोगों, कीटों एवम् खरपतवारों से मुक्त) होता है ।

(iii) इन विधियों द्वारा जननद्रव्य संरक्षण दीर्घ अवधि तक किया जा सकता है ।

(iv) इस प्रकार संरक्षित जननद्रव्य का आयात/निर्यात आसानी से किया जा सकता है ।

(ख) सीमाएं

निम्न ताप संरक्षण एवम् डी.एन.ए. बैंकिंग के लिए

(i) उच्च स्तरीय सोफिस्टिकेटेड सुविधाओं की आवश्यकता होती है ।

(ii) अत्यधिक दक्षता की आवश्यकता होती हैं ।

(iii) निम्न ताप संरक्षण के दौरान ऊतकों के क्षतिग्रस्त हो जाने की संभावना ।

बोध प्रश्न

1. निम्नलिखित कथनों में सत्य/असत्य बताइये -
   - (क) परम्परागत पादप प्रजनन तकनीकों द्वारा अगुणित पादप एवम् समयुग्मजी क्रमों का विकास बहुत आसान है । (सत्य/असत्य)
   - (ख) जननद्रव्य संरक्षण का मुख्य उद्देश्य किसी पादप प्रजाति विशेष की अधिक से अधिक आनुवंशिक विभिन्नताओं का संरक्षण करना है । (सत्य/असत्य)
   - (ग) अगुणित पादपों का विकास भ्रूण संवर्धन की तकनीक द्वारा किया जाता है। (सत्य/असत्य)
   - (घ) तुलेके ने गिंगो बाइलोबा पादप के परिपक्व परागकणों के संवर्धन से अगुणित पादप प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की थी । (सत्य/असत्य)
   - (ड़) परागकोष संवर्धन से विकसित पादप शुद्ध रूप से अगुणित होते हैं । (सत्य/असत्य)
   - (च) परागकोष संवर्धन तकनीक पृथक्कृत परागकण संवर्धन तकनीक से अधिक प्रभावी एवम् सुविधाजनक है । (सत्य /असत्य)
   - (छ) अगुणित पादप, परागकोष/परागकण संवर्धन तकनीक द्वारा अल्प अवधि में विकसित किये जा सकते हैं । (सत्य/ असत्य)
   - (ज) निम्न ताप संरक्षण तकनीक अलैंगिक जनन द्वारा गुणित फसलों के लिए उपयोगी है। (सत्य/असत्य)

(झ) हिमीकृत कोशिकाओं, ऊतकों एवम् अंगों को सामान्य घरेलू रेफ्रिजरेटर में संग्रहित किया जाता है । (सत्य/असत्य)

(ञ) डीएनए. बैंकिंग तकनीक का उपयोग लुप्त प्राय: प्रजातियों के जननद्रव्य संरक्षण हेतु किया जा सकता है । (सत्य /असत्य)

2. भारतीय वैज्ञानिकों .. .. एवम् .... ने डटूरा इन्नेडाक्सियापादप के परागगणों के संवर्धन से अगुणित पादप प्रविकसित किये थे।
3. पादपों मै अगुणित पादप संवर्धन के लिए कौन-कौन से कर्तोत्तकों का उपयोग किया जाता है?
4. एक ही परागकोष के विभिन्न परागकणों से विकसित पादप.....रूप से ....होते हैं।
5. परागकोष एवम् परागकण संवर्धन कौन-कौन से कारकों द्वारा प्रभावित होता है?
6. परागकण /परागकोष/ अनिषेचित अण्डाशय से विकसित पादप .... अवस्था तक वृद्धि करते हैं, परन्तु इनमें सामान्य..... .... विभाजन नहीं होता है ।
7. अगुणित पादपों में..... ..... के द्विगुणन के लिए..... नामक रसायन का उपयोग किया जाता है ।
8. निम्न ताप संरक्षण की प्रक्रिया के मुख्य पद कौन-कौन से है? जननद्रव्य संरक्षण की निम्न ताप संरक्षण विधि की तुलना में..... तकनीक.. ..... एवम्..... है ।
10. निम्न ताप जननद्रव्य संरक्षण तकनीक में संरक्षित पादप ऊतकों/अंगों का भंडारण..... में किया जाता है तथा भण्डारण का तापमान..... रखा जाता है ।
11. अगुणित पादप उत्पादन तकनीक द्वारा विकसित तीन पादप किस्मों के नाम बताइये।
12. पादप कोशिकाओं को शीत आघातों से बचाने के लिए..... आदि..... पदार्थों का उपयोग किया जाता है।

4.5 सारांश (Summary) :

- पादपों में अगुणित पादपों का उत्पादन सामान्यत: परागकोष, परागकण एवं अण्डाशय संवर्धन द्वारा किया जाता है ।
- परागकोष एवं परागकण संवर्धन हेतु बंद पुष्प कलिकाओं का उपयोग किया जाता है ।
- कामेया एवं हिनाटा ने सर्वप्रथम ब्रैसिका ओलिरेसिया पादप में पृथकृत परागकणों से कैलस विकसित करने में सफलता प्राप्त की थी ।
- भारतीय वैज्ञानिक शिप्रा गुहा एवं एस. सी. महेश्वरी ने डटूरा इन्नोक्सिया पादप के परागकोष एवमू परागकण संवर्धन से सर्वप्रथम अगुणित पादप विकसित किये ।
- अण्डाशय संवर्धन से विकसित अगुणित पादप गाइनोजैनिक अगुणित पादप कहलाते हैं ।

- ऊतक संवर्धनों से विकसित अगुणित पादपों में से चयन के पश्चात् समयुग्मजी क्रम विकसित किये जाते हैं ।
- अगुणित पादपों से विकसित होने वाले समयुग्मजी क्रमों का उपयोग पादप प्रजनन में किया जाता है ।
- पादप कोशिकाओं, ऊत्तकों अथवा अंगों का तरल नाइट्रोजन (-196^0C) में संरक्षण निम्न ताप संरक्षण कहलाता है ।
- निम्न ताप संरक्षण की प्रक्रिया निम्न चार चरणों/पदों में सम्पन्न होती है -
  (i) हिमीकरण
  (ii) संग्रहण
  (iii) हिमद्रवण तथा
  (iv) पुनसंवर्धन
- पादप ऊत्तकों की प्रकृति के आधार पर संरक्षित ऊत्तकों का हिमीकरण निम्न तीन प्रकार से किया जाता है -
  (i) धीमा हिमीकरण
  (ii) तीव्र/शीघ्र हिमीकरण तथा
  (iii) सूक्ष्म बूंद हिमीकरण
- पादप ऊतक संवर्धन में संवर्धनों की वृद्धि, निम्न ताप पर रखकर अथवा संवर्धन माध्यम की परासरणता बढ़ाकर अथवा संवर्धन माध्यम में वृद्धि मंदकों जैसे ABA का उपयोग कर मंदित की जा सकती है ।
- वृद्धि मंदित संवर्धनों का उपकल्चर अंतराल 3-4 हफ्तों से बढ़ाकर एक वर्ष तक किया जा सकता है ।
- डीएनए. बैंकों में जिनोम के डीएनए. खण्डों को कॉस्मिड क्लोनों, फेज लाईसेटों तथा शुद्ध डी.एन.ए. खण्डों के रुप में संरक्षित किया जाता है ।
- डीएनए. बैंकों में संरक्षित डीएनए. खण्डों का उपयोग ट्रांसजैनिक पादप विकसित करने में किया जाता है ।

4.6 बोध प्रश्नों के उत्तर

1. (क) असत्य (ख) सत्य
   (ग) असत्य (घ) असत्य
   (ङ) असत्य (च) असत्य
   (छ) सत्य (ज) सत्य
   (झ) असत्य (ञ) सत्य
2. शिप्रागुहा, एस.सी. महेश्वरी
3. परागकोष, परागकण एवम् अनिषेचित अण्डाशय
4. आनुवंशिक, भिन्न-भिन्न

5. स्त्रोत पादप की कार्यिकी अवस्था, परागकोष भित्ति, स्त्रोत पादप का जीन प्रारुप, कर्तोत्तकों का संवर्धन पूर्व उपचार, संवर्धन माध्यम, परागकणों का संवर्धन घनत्व एवम् भौतिक कारक जैसे - ताप, प्रकाश तीव्रता एवम् दीप्तिकाल आदि।
6. पुष्पी, अर्धसूत्री
7. गुणसूत्र, कॉल्चिसीन
8. (i) हिमीकरण (ii) संग्रहण (iii) हिमद्रवण एवम् पुन: संवर्धन
9. मंदवृद्धि, आसान, कम खर्चीली
10. तरल नाइट्रोजन रेफ्रिजरेटर, -196^0C
11. धान की Hua-03
    जौं की मिंगो
    गेहूँ की Hui Pei 1
12. डाईमिथाइल सल्फोक्साइड, ग्लिसरॉल, प्रोलीन शीतरक्षी

4.7 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions) :

1. अगुणित पादपों से क्या अभिप्राय है? तथा पादप प्रजनन में इनका क्या उपयोग है ?
2. परागकोष संवर्धन से अगुणित पादप विकसित करने की विधि का सचित्र वर्णन कीजिए ।
3. अगुणित पादप विकसित करने के लिए परागकण संवर्धन विधि, परागकोष संवर्धन विधि की तुलना में अधिक उपयोगी है । समझाइये तथा परागकण संवर्धन द्वारा अगुणित पादप विकसित करने की विधि का वर्णन कीजिए।
4. जननद्रव्य संरक्षण से क्या अभिप्राय है ' जननद्रव्य संरक्षण की विभिन्न विधियों का संक्षिप्त में वर्णन कीजिए।
5. निम्न ताप संरक्षण से क्या अभिप्राय है? जननद्रव्य संरक्षण की इस विधि को विस्तार से समझाइये ।
6. समयुग्मजी क्रम से क्या अभिप्राय है ? अगुणित पादप संवर्धन द्वारा समयुग्मजी क्रम कैसे विकसित किये जाते हैं? वर्णन कीजिए ।
7. निम्नलिखित पर टिप्पणीयां लिखिये -
   (क) निम्न ताप संरक्षण (ख) मंदवृद्धि
   (ग) समयुग्मजी क्रम उत्पादन (घ) डी.एन.ए. बैंकिग
   (ङ) अण्डाशय संवर्धन (च) अगुणित पादप उत्पादन की उपलब्लियां

4.8 शब्दावली (Glossary) :

संदलन	Crush
संतति	Progeny
अधिप्लवी	Supernatant
भ्रूणोदभवन	Embryogenesis

अंगोद्भवन	Organogenesis
दीप्तिकाल	Photoperiod
जीवनक्षम	Viable
हिमशीतित	Frozen
निम्न ताप संरक्षण	Cryopreservation
काचन	Vitrification
परासरणता	Osmotic
परिक्षेपित	Dispensed
शीतरक्षी	Cryoprotectent
हिमशुष्क	Lyophylized
चुर्णिल आस्ता	Powdery Mildew
अतिसूक्ष्म निस्पंदन	Ultrafilteration
व्यवसायिक	Economically
म्लानी	Wilt
हानिकारक	Deliterious
परागकोष	Anther
परागकण	Pollen
समयुग्मजी	Homozygous
परम्परागत	Traditional
पादप प्रजनन	Plant Breeding
प्रवर्ध्य	Propagules
प्रवणता अपकेन्द्रण	Gradient Centrifugation

4.9 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी, लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन टू प्लान्ट टिश्यू कल्चर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
5. भोजवानी एण्ड राजदान, थ्योरी एण्ड प्रेक्टिसेज, एल्सवेयर इण्डिया प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 5

पात्रे परागण तथा भ्रूण संवर्धन
(IN VITRO POLLINATION AND EMBRYO CULTURE)

इकाई की रूपरेखा

5.0 उद्देश्य
5.1 प्रस्तावना
5.2 पात्रे परागण तथा निषेचन
5.3 भ्रूणपोष संवर्धन तथा इसके अनुप्रयोग
5.4 भ्रूण संवर्धन
5.5 व्यापक संकरण के उपरांत भ्रूण संरक्षण तथा इसके अनुप्रयोग
5.6 सारांश
5.7 बोध प्रश्नों के उत्तर
5.8 अभ्यासार्थ प्रश्न
5.9 शब्दावली
5.10 संदर्भ ग्रन्थ

5.0 उद्देश्य (Objectives):

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात आप समझ पायेंगे कि -

1. पादपों में पात्रे परागण एवं निषेचन की क्रिया किस प्रकार सम्पन्न की जाती है ।
2. भ्रूणपोष का संवर्धन किस प्रकार किया जाता है? तथा इसके क्या-क्या अनुप्रयोग हैं?
3. पात्रे भ्रूण संवर्धन कैसे सम्पन्न होता है? तथा इससे क्या लाभ हैं ?
4. पादपों में व्यापक संकरण के उपरान्त बनने वाले भ्रूण को ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा किस प्रकार संरक्षित किया जाता है?
5. व्यापक संकरण द्वारा बनने वाले भ्रूण के क्या अनुप्रयोग हैं?

5.1 प्रस्तावना (Introduction) :

इस इकाई में ऊतक संवर्धन तकनीक की महत्वपूर्ण प्रक्रियाएं जैसे - पात्रे परागण एवम् निषेचन, भ्रूणपोष एवम् भ्रूण संवर्धन तथा व्यापक संकरण उपरान्त बनने वाले अगे के संरक्षण के बारे में विस्तार से बताया गया है । यह सभी विधियां गैरपरम्परागत पादप फसल सुधार एवम् पादप प्रजनन की विधि है, जिनका उपयोग ऐसे संकर पादप विकसित करने में किया जाता है, जो सामान्यत: परपम्परागत पादप प्रजनन की विधियों द्वारा विकसित नहीं किये जा सकते हैं । हमारे देश के दिल्ली विश्वविद्यालय के वनस्पति शास्त्री जौहरी एवम् भोजवानी (Johari and Bhojwani) का पादप भ्रूणपोष संवर्धन तकनीक द्वारा त्रिगुणित पादप विकसित करने में महत्वपूर्ण योगदान रहा है ।

पात्रे निषेचन एवम् परागण की क्रिया द्वारा बनने वाले व्यापक भ्रूणों के संरक्षण में भी ऊतक संवर्धन का महत्वपूर्ण योगदान है जिसका विस्तृत अध्ययन इस इकाई में किया गया है । इन प्रक्रियाओं द्वारा विकसित त्रिगणित पादपों एवम् व्यापक संकरों का चीन में फसल सुधार के क्षेत्र में व्यवसायिक एवम् वृहत् स्तर पर उपयोग किया जा रहा है ।

5.2 पात्रे परागण तथा निषेचन (In Vitro Pollination and Fertilization) :

पात्रे अवस्थाओं में संवर्धित किये गये स्त्रीकेसर के वर्तिकाग्र, अण्डाशय अथवा सीधे ही बीजाण्डों पर परागकणों को पहुंचाने की प्रक्रिया पात्रे परागण तथा पात्रे-अवस्थाओ में नर युग्मक एवं मादा युग्मक का संयोजन पात्रे निषेचन कहलाता है । पात्रे परागण एवं पात्रे निषेचन द्वारा ऐसे संकर भ्रूणों को विकसित किया जा सकता है, जो सामान्यत: पादप प्रजनन की परम्परागत विधियों द्वारा विकसित नहीं किये जा सकते हैं । प्राकृतिक अवस्थाओं में वर्तिकाग्र पर परागकणों का अंकुरण तथा परागनली की वृद्धि में भौतिक एवं कार्यकी अवरोधों के कारण अन्तरवंशीय (intergeneric) एवं अंतरजातीय (interspecific) संकरण सामान्यत: संभव नहीं होता है । भोजवानी एवं राजदान (Bhojwani and Razdan) के अनुसार खुली हुई अवस्थाओं में अण्डपों के पात्रे परागण द्वारा बीज विकसित करने की प्रक्रिया परखनली निषेचन कहलाती है जबकि पात्रे संवर्धित संपूर्ण स्त्रीकेसर के वर्तीकाग्री परागण द्वारा बीज बनने की प्रक्रिया पात्रे परागण कहलाती है ।

पादपों में पात्रे परागण की क्रिया निम्न चरणों में सम्पन्न होती है -

5.2.1 पात्रे परागण में प्रयुक्त पादप भागों का सतही निर्जर्मीकरण एवम् संवर्धन

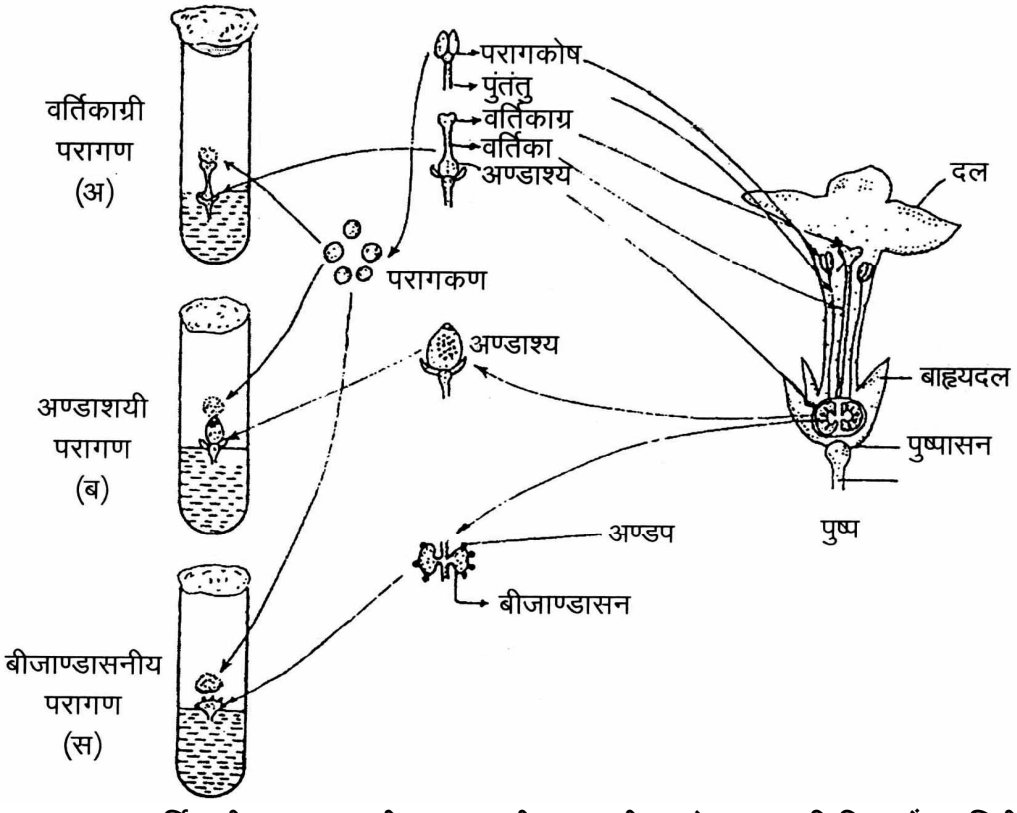
(क) स्त्रीकेसर का सतही निर्जर्मीकरण एवम् संवर्धन स्थापन

पात्रे परागण में उपयोग में आने वाले पादप भाग जैसे - स्त्रीकेशर, अण्डाशय, अण्डप एवं पुंकेसर आदि का निर्जर्म होना परमावश्यक है । पात्रे परागण की प्रक्रिया में उपयोग में लिये जाने वाले पादप के मादा जननांग अर्थात् स्त्रीकेसर के लिए उपयोग में ली जाने वाली पुष्पीय कलिका का पुष्पन से पहले विपुंसन (emasculation) कर अवांछित परागण को रोकने के लिए इसे थैली से ढक दिया जाता है । इन विंपुसित पुष्पीय कलिकाओं को परागकोषों के प्रस्फुटन के समय प्रयोगशाला में लाया जाता है तथा पूर्व में बताई विधि के अनुसार इनका सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है । वर्त्तिकाग्री परागण (stigmatic pollination) के लिए पुष्प से संपूर्ण स्त्रीकेसर को विच्छेदित कर एवं बीजांडासनीय परागण (placental pollination) के लिए चाकू चिमटी एवं सूई की सहायता से अण्डाशय की भित्ति को अलग कर संपूर्ण बीजाण्डन्यास अथवा इसके छोटे-छोटे खण्डों को संवर्धन माध्यम पर संवर्धित किया जाता है । उपरोक्त संपूर्ण प्रक्रिया निर्जर्म अवस्थाओं में सम्पन्न की जाती है ।

(ख) परागकण संग्रहण एवं परागण

परागकणों के संग्रहण हेतु पुष्पीय कलिकाओं अथवा खिले हुए पुष्पों से पुंकेसरों को पृथक कर इन्हें निर्जर्म अवस्थाओं में निर्जर्मीकृत पेट्रीप्लेटों में रखे गये फिल्टर पत्र पर रखा जाता है । परागकोषों के स्वत: प्रस्फुटन द्वारा प्राप्त परागकणों को उद्देश्य एवं प्रायोगिक आवश्यकता अनुसार निर्जर्म अवस्थाओं में

संवर्धित स्त्रीकेशर के वर्त्तिकाग्र (वर्त्तिकाग्री परागण), अण्डाशय (अण्डाशयी परागण) एवं अण्डपों (बीजाण्डासनीय) पर स्थानान्तरित किया जाता हैं । यह प्रक्रिया पात्रे परागण कहलाती है जिसे चित्र 5.1 द्वारा समझाया गया है ।



चित्र 5.1 : (अ) वर्तिकाग्री (ब) अण्डाशयी तथा (स) बीजाण्डासनीय पात्रे परागण की क्रियाओं का चित्रीय निरूपण

5.2.2 पात्रे परागण के उपरांत बीज बनने की क्रिया को प्रभावित करने वाले कारक

पात्रे परागण की क्रिया के पश्चात होने वाली निषेचन की क्रिया एवं बीजों का बनना निम्न कारकों द्वारा प्रभावित होता है -

(i) पात्रे परागण में प्रयुक्त होने वाले कर्तोत्तकों की कार्यिकी अवस्था

अण्डाशयों अथवा अण्डपों के विच्छेदन के समय स्त्रीकेसर की कार्यिकी अवस्था पात्रे परागण के पश्चात् बीज बनने की क्रिया को प्रभावित करती है । अण्डपों अथवा वर्तिकाग्र की गीली सतह परागकणों के अंकुरण एवं परागनली की वृद्धि को मंदित करती है, जिससे सामान्य से कम बीज विकसित होते हैं । परागकणों के अंकुरण एवं परागनली की वृद्धि वर्त्तिका में प्रोटीन संश्लेषण को प्रभावित करती है, जो कभी-कभी परागनली को अण्डाशय में प्रवेश करने से रोकती है जिससे निषेचन नहीं हो पाता ।

(ii) संवर्धन माध्यम

अण्डाशय/स्त्रीकेशर एवं अण्डपों के संवर्धन में प्रयुक्त होने वाला संवर्धन माध्यम भी इन कर्तोत्तकों के संवर्धन से लेकर बीज बनने तक की प्रक्रिया में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है । अधिकांश पादप प्रजातियों

में निश (nitch) द्वारा प्रतिपादित संवर्धन माध्यम एवं इसके रूपान्तरणों का उपयोग किया जाता है । अण्डाशय संवर्धन की विधि भी निश द्वारा 1951 में विकसित की गयी थी ।

(iii) पात्रे संवर्धन अवस्थाएं

पादपों में परखनली निषेचन की क्रिया, पात्रे संवर्धन अवस्थाएं जैसे - तापमान, प्रकाश-तीव्रता एवम् दीप्तिकाल द्वारा भी प्रभावित होती है ।

(iv) स्रोत पादप का जीन प्रारुप

पात्रे अवस्थाओं में संवर्धित अण्डाशयों अथवा अण्डपों के पात्रे परागण द्वारा बीज बनने की प्रक्रिया की सफलता पादपों के जीन प्रारुप पर भी निर्भर करती है ।

पात्रे परागण के अनुप्रयोग

पादप प्रजनन के क्षेत्र में पात्रे परागण के प्रमुख अनुप्रयोग निम्न है -

(i) स्व एवम् परअसंगतता को प्रभावहीन करने में ।

(ii) अनिषेक जनन द्वारा अगुणित पादप विकसित करने में ।

(iii) प्रतिबल सहिष्णु (stress tolerent) पादप विकसित करने में ।

पात्रे निषेचन

यह जैव प्रौद्योगिकी के क्षेत्र में विकसित अत्याधुनिक तकनीक है, जिसमें उच्च वर्ग के पादपों से पृथक्कृत नर एवं मादा युग्मकों का संयुग्मन पात्रे अवस्थाओं में सम्पन्न किया जाता है । इस प्रकार के संयुग्मन से क्रमश: भ्रूण एवम् पूर्ण विकसित पादप का विकास होता है । इस प्रक्रिया में पृथक्कृत नर युग्मक (अंकुरित परागकण से) तथा भ्रूणकोष (जिसमें सहाय कोशिकाएं, केन्द्रीय कोशिकाएं व प्रतिव्यासांत कोशिकाएं हो) से भ्रूण की आवश्यकता होती है । सामान्य अवस्थाओं में उच्च वर्ग के पादपों में द्विनिषेचन होता है तथा युग्मज आवरण द्वारा आवरित होता है परन्तु इसके विपरीत पात्रे निषेचन में विलगित युग्मकों का संयुग्मन, युग्मज, भ्रूण एवं पादप का विका बिना आवरण के होता है । इस कारण विलगित युग्मकों के पात्रे निषेचन की प्रक्रिया का उपयोग भ्रूण जनन की प्रारम्भिक अवस्थाओं में होने वाले आण्विक परिवर्तनों के अध्ययन में किया जा सकता है जिसका उपयोग फसल सुधार हेतु आनुवांशिक अभियांत्रिकी में भी संभव है ।

5.3 भ्रूणपोष संवर्धन एवं इसके अनुप्रयोग (Endosperm Culture and Its Applications) :

अधिकांश आवृतबीजी पादपों में द्विनिषेचन की एक महत्त्वपूर्ण प्रक्रिया सम्पन्न होती है, जिसके परिणामस्वरूप दो उत्पाद बनते हैं - (i) युग्मज, जिसका निर्माण अण्ड कोशिका एवं एक नर युग्मक के संयुग्मन से होता है, तथा (ii) त्रिगुणित प्राथमिक भ्रूणपोष केन्द्रक; जिसका निर्माण दूसरे नर युग्मक व दो ध्रुवीय केन्द्रको से संयुग्मन के परिणामस्वरूप होता है । युग्मज के विकास से भ्रूण का निर्माण होता है तथा त्रिगुणित केन्द्रक से भ्रूणपोष का विकास होता है । भ्रूणपोष में किसी भी प्रकार का अंगीय (organogenic) अथवा संवहनी (vascular) विभेदन नहीं पाया जाता । यह केवल विकासशील भ्रूण की पोषण आवश्यकताओं की पूर्ति करता है । भ्रूणपोष की अनुपस्थिति में रुद्धवृद्धिक भ्रूणों का विकास होता है । विकासशील भ्रूण द्वारा भ्रूणपोष के उपयोग के आधार पर बनने वाले बीज दो प्रकार के होते हैं - (i) अभ्रूणपोषी बीज एवं (ii) भ्रूणपोषी बीज ।

पिछले कुछ दशकों से भ्रूणपोष संवर्धन की तकनीक का उपयोग त्रिगुणित पादप विकसित करने में किया जाने लगा है। फसल सुधार के क्षेत्र में इस तकनीक का महत्वपूर्ण योगदान है ।

सर्वप्रथम लेम्प एवं मिल्स (Lamp and Mills, 1933) ने मक्के के तरुण भ्रूणपोष को संवर्धित करने का प्रयास किया था । 1949 में ला रयू (La Rue) तथा सहयोगियों ने मक्के के संवर्धित भ्रूणपोष में जड़ विभेदन प्रेरित करवाने में सफलता प्राप्त की । भ्रूणपोष कोशिकाओं की कोशिकीय पूर्णशक्तता (totipotency) का प्रदर्शन दिल्ली विश्वविद्यालय के वनस्पति शास्त्र विभाग में कार्यरत प्रो. बी.एम. जोहरी एवं एस.एस. भोजवानी ने 1963 में किया ।

भ्रूणपोष संवर्धन तकनीक निम्न पदों में सम्पन्न की जाती है -

(i) कर्तोत्तक
   (क) कर्तोत्तक का स्रोत
   (ख) कर्तोत्तक का संवर्धन माध्यम पर स्थापन

(ii) संवर्धन माध्यम
   (क) कैलस आरंभन एवम् अगोद्भवन
   (ख) प्ररोहक कलिकाओं का विकास
   (ग) पूर्ण पादप का विकास

कर्तोत्तक का स्रोत

अधिकांश धान्य (cereal) पादपों में परिपक्व भ्रूणपोष पात्रे संवर्धन की अवस्थाओं के प्रति संवेदनशील नहीं होता है, अत: इस प्रकार के पादपों में भ्रूणपोष को विकास की निश्चित अवस्था में ही विच्छेदित कर संवर्धित किया जा सकता है । मक्के के भ्रूणपोष को संवर्धन के लिए परागण के 8-10 दिनों के बाद विच्छेदित किया जाता है जबकि गेहूं में यह प्रक्रिया परागण के 8 दिनों बाद की जाती है । भ्रूणपोष विच्छेदन कुछ द्विबीजपत्री पादपों की तरह ही संपन्न होता है जिनमें भ्रूणपोष को परागण की क्रिया के 7-10 दिनों बाद संवर्धन हेतु विच्छेदित किया जाता है ।

यूफोरविएसी एवम सेंटेलेसी आदि कुलों (families) के पादपों में संवर्धन के लिए प्रयुक्त भ्रूणपोष के साथ भ्रूणीय उत्तकों का होना आवश्यक होता है ।

कर्तोत्तक का संवर्धन माध्यम पर स्थापन

परिपक्व भ्रूणपोष युक्त बीजों का बीजावरण हटाकर पूर्व में बताई गई विधि के अनुसार सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है । जबकि अपरिपक्व भ्रूणपोषों के पात्रे संवर्धन हेतु संपूर्ण अपरिपक्व बीज अथवा बाली (ear) का सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है । तत्पश्चात् भ्रूणपोष उत्तकों को विच्छेदित कर उपयुक्त वृद्धि नियंत्रकों युक्त संवर्धन माध्यम पर स्थापित किया जाता है ।

संवर्धन माध्यम

भ्रूणपोष संवर्धन के लिए सामान्यत: **मुरासिगे एवम् स्कूग (Murashige and Skoog, 1962)** तथा **व्हाइट (White, 1943)** द्वारा प्रतिपादित संवर्धन माध्यमों का प्रयोग किया जाता है । भ्रूणपोष संवर्धन के लिए इन संवर्धन माध्यमों में टमाटर, अंगूर एवम् मक्के के दानों का रस तथा यीस्ट तत्व का प्रयोग किया जाता है । कुछ पादपों में एस्पाराजिन एवम् पादप वृद्धि नियंत्रक जैसे IAA एवम् 2,4-D आदि का उपयोग भी प्रभावशाली सिद्ध हुआ है । द्विबीजपत्री पादपों में भ्रूणपोष संवर्धन हेतु साइटोकाइनिन ऑक्सिन एवम् जैविक नाइट्रोजन स्त्रोत जैसे यीस्ट का सत्त एवम् कैसीन हाइड्रोलाइसेट आदि का प्रयोग

किया जाता है । संवर्धन माध्यम में कार्बोहाइड्रेट के स्रोत के रूप में 2-4% सुक्रोज का प्रयोग सबसे उपयुक्त होता है ।

कैलस आरंभन एवम् अंगोद्भवन

जौहरी एवम् भोजवानी (Johari and Bhojwani) ने 1965 में सर्वप्रथम एक्सोकार्पस क्यूप्रेसिफोरमिस (Exocarpus cupressiformis) पादप के परिपक्व भ्रूणपोष संवर्धन से पात्रे अंगोद्भवन के बारे में बताया । इनके अनुसार संवर्धन माध्यम पर एक बीज से आठ (8) त्रिगुणित प्ररोहों का विकास हुआ था । तत्पश्चात् कई पादप प्रजातियों जैसे नींबू सेब, चंदन आदि में त्रिगुणित पादप विकसित करने में सफलता प्राप्त की जा चुकी है । भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा विकसित कैलस से प्ररोह प्रेरण के लिए संवर्धन माध्यम में साइटोकाइनिन का होना आवश्यक होता है । कुछ पादपों में भ्रूणपोष द्वारा विकसित कैलस आधारी संवर्धन माध्यम (basal culture medium) पर स्थानान्तरित करने पर केवल जड़ों (जैसे - कपास) अथवा मूल एवम् प्ररोह दोनों (जैसे - पुत्रजीवा व रतनजोत) का विकास होता है ।

प्ररोह कलिकाओं का विकास

आरम्भ में भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा विकसित प्ररोह कलिकाओं की वृद्धि दर मंद होती है, अत: इन प्ररोह कलिकाओं को भ्रूणपोष ऊतक से विच्छेदित कर नये (fresh) माध्यम पर संवर्धित किया जाता है । भ्रूणपोष ऊतक से विकसित कैलस में प्ररोह जनन अथवा भ्रूण जनन को प्रेरित करने के लिए अनुकूलतम सवंर्धन अवस्थाओं के निर्धारण हेतु संवर्धन माध्यम के प्रमुख घटकों की सांद्रता, वृद्धि नियंत्रकों की सांद्रता एवम् सम्मिश्रण अनुपात में परिवर्तन किया जाता है ।

पूर्ण पादपकों का विकास

भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा विकसित प्ररोहों में जड़ जनन अथवा भ्रूणपोष द्वारा विकसित कैलस में भ्रूणोद्भवन द्वारा पूर्ण त्रिगुणित पादपको का विकास किया जाता है । त्रिगुणित पादप विकसित करने की यह प्रक्रिया संवर्धन माध्यम, संवर्धन माध्यम में प्रयुक्त वृद्धि नियंत्रकों की सांद्रता एवम् सम्मिश्रण अनुपात तथा भौतिक कारकों द्वारा नियंत्रित होती है ।

पादप सुधार में भ्रूणपोष संवर्धन के अनुप्रयोग

पादप प्रजनन एवं पादप नस्ल सुधार के क्षेत्र में भ्रूणपोष संवर्धन के कई अनुप्रयोग है जैसे -

(i) भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा पूर्ण रुप से त्रिगुणित पादप विकसित किये जा सकते हैं ।

(ii) भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा बीजरहित पादप प्राप्त किये जा सकते हैं । अत: सेब, केला, शहतुत, अंगूर, आम, तरबूज आदि फलों वाले पादपों के लिए यह महत्वपूर्ण तकनीक है ।

5.4 भ्रूण संवर्धन (Embryo Culture) :

भ्रूण संवर्धन की प्रक्रिया में नवोद्भिद् युग्मज प्राय: भ्रूणों को विकासशील बीजों में से विलगित कर कृत्रिम संवर्धन माध्यम पर संवर्धित किया जाता है, जहां यह नवोद्भिद् पादपों में विकसित हो जाते हैं अर्थात् परिवर्धित हो रहे बीजों में से तरुण भ्रूणों को निकाल कर पात्रे संवर्धन करके जीवनक्षम पौधे प्राप्त करने की प्रक्रिया भ्रूण संवर्धन कहलाती है । भ्रूण संवर्धन का प्रथम योजनाबद्ध प्रयास हैनिंग (Hanning,1904) ने किया था । हैनिंग ने क्रुसीफेरी (अब ब्रेसीकेसी) कुल के दो पादपों, कॉकलेरिया एवं रेफेनस के परिपक्व भ्रूणों के पात्रे संवर्धन में सफलता प्राप्त की थी ।

5.4.1 भ्रूण संवर्धन के प्रकार

संवर्धित किये जाने वाले भ्रूणों की प्रकृति के आधार पर पाइरिक (pierik, 1989) के अनुसार भ्रूण संवर्धन मुख्य रुप से दो प्रकार का होता है

(i) अपरिपक्व भ्रूणों का संवर्धन

इस प्रकार के भ्रूण संवर्धन का उपयोग मुख्य रुप से अपरिपक्व एवं संकर भ्रूणों के लिए किया जाता है । इस प्रकार के भ्रूणों का सामान्य अवस्थाओं में अंकुरण नहीं होता है । अत: इस प्रकार के भ्रूणों को विच्छेदित कर रासायनिक रुप से जटिल संवर्धन माध्यम पर संवर्धित कर इनसे पूर्ण विकसित पादप प्राप्त किये जाते है ।

(ii) परिपक्व भ्रूणों का संवर्धन

इस प्रकार के भ्रूणों का उपयोग पके हुए बीजों से विच्छेदित परिपक्व भ्रूणों के संवर्धन के लिए किया जाता है । इस प्रकार के भ्रूण संवर्धन हेतु रासायनिक रुप से सरल संवर्धन माध्यम का उपयोग किया जाता है ।

5.4.2 भ्रूण संवर्धन की तकनीक

पात्रे भ्रूण संवर्धन की प्रक्रिया निम्न चरणों में सम्पन्न होती है -

(i) सतही निर्जर्मीकरण

सामान्यत: बीजीय पादपों में भ्रूणों का विकास अण्डपों में होता है तथा अण्डप सदैव अण्डाशय में विद्यमान रहते हैं, अत: भ्रूण साधारणत: जर्म रहित वातावरण में स्थित रहते हैं अत: चोटिल होने अथवा सर्वांगी संक्रमण की अवस्था को छोड़कर इनके सतही निर्जर्मीकरण की आवश्यकता नहीं होती है । बीज आवरण के चोटिल होने अथवा इसके सर्वांगी संक्रमण से संक्रमित होने की अवस्था में बीजों का सतही निर्जर्मीकरण पूर्व में बताई विधि के अनुसार करते हैं । आर्किड पादपों में बीज अतिसूक्ष्म होते हैं तथा इनमें बीजावरण अत्यधिक ह्रासित एवं क्रियाशील भ्रूणपोष अनुपस्थिति रहता है, अत: इनके संपूर्ण संपुटक का ही सतही निर्जर्मीकरण किया जाता है ।

(ii) भ्रूणों का विच्छेदन

बीजों से भ्रूणों का विच्छेदन जर्मरहित अवस्थाओं में स्तरित वायु प्रवाह कक्ष (laminar air flow chember) में किया जाता है । सूक्ष्म भ्रूणों के विच्छेदन हेतु स्तरित वायु प्रवाह कक्ष में स्टीरियो सूक्ष्मदर्शी एवं फ्लोरेसेंट लैम्प की आवश्यकता होती है । भ्रूणों का विच्छेदन सामान्य रूप से प्रयुक्त होने वाले विच्छेदक उपकरणों द्वारा किया जाता है । सूक्ष्म एवं अपरिपक्व भ्रूणों का विच्छेदन सावधानीपूर्वक किया जाना चाहिए ।

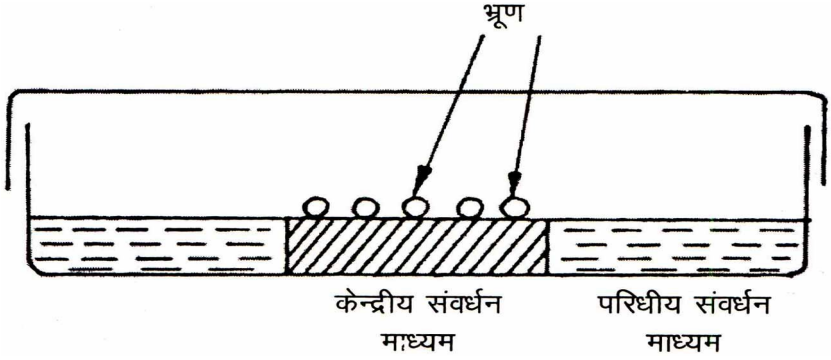
(iii) संवर्धन माध्यम का चयन

सामान्यत: विकास की गोलाकार अवस्था (globular stage) तक भ्रूण परपोषित होते हैं (जैसे कैप्सेला पादप में) तथा ये आंशिक रुप से अपना पोषण भ्रूणपोष से प्राप्त करते हैं । गोलाकार अवस्था के पश्चात् भ्रूण स्वपोषित हो जाते हैं, अर्थात् ये अपने विकास के लिए आवश्यक समस्त पोषक पदार्थों का संश्लेषण स्वयं करने में सक्षम होते हैं । पात्रे अवस्था में संवर्धित तरुण भ्रूण पोषक माध्यम में प्रयुक्त कुछ लवणों के प्रति अति संवेदनशील होते हैं । संवर्धित भ्रूणों की उत्तरजीविता पोषक माध्यम में प्रयुक्त होने वाले विभिन्न वृहद एवं सूक्ष्म पोषक तत्वों की सांद्रता पर निर्भर करती है। भ्रूण संवर्धन में एमिनो अम्लों

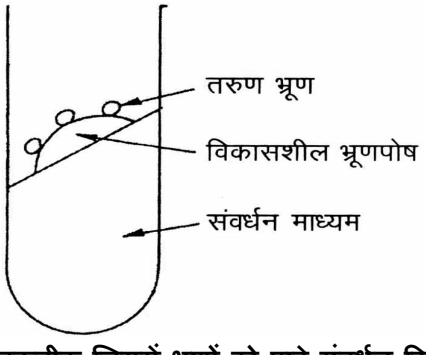
जैसे ग्लुटेमीन एवं एस्पराजीन का लाभकारी प्रभाव होता है । प्रारम्भ में भ्रूणों को 8-12 प्रतिशत सुक्रोज युक्त माध्यम पर संवर्धित किया जाता है परन्तु भ्रूणों की वृद्धि के साथ-साथ सुक्रोज की आवश्यकता में कमी आती है । अत: कुछ समय उपरांत विकासशील भ्रूणों को कम सुक्रोज सान्द्रता (2-4%) वाले संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है । तरुण भ्रूणों का बार-बार पुनसवंर्धन किये बिना द्विपोषपदार्थ संवर्धन विधि द्वारा संवर्धित किया जा सकता है (चित्र 5.2) ।

भ्रूण संवर्धन युक्तियां

सामान्यत: नवोद्भिद् भ्रूणों को सीधे ही पोषक माध्यम पर संवर्धित किया जाता है जो कि एकल अथवा द्विपोषपदार्थ संवर्धन तकनीक द्वारा किया जा सकता है । परन्तु कई प्रजातियों में भ्रूण सीधे पोषक माध्यम पर संवर्धित करने पर जीवित नहीं होते । ऐसे लगे को पात्रे संवर्धित भ्रूणपोष पर प्रतिरोपित किया जाता है तथा भ्रूण संवर्धन की यह तकनीक भ्रूण-नर्स भ्रूणपोष तकनीक (embryo nurse endosperm technique) कहलाती है (चित्र 5.3) । इस विधि द्वारा कई दुर्लभ संकरों की प्राप्ति की गई है जो पहले प्राप्त नहीं किये जा सके थे । जैसे - होर्डियम × सीकेल



चित्र 5.2 - तरुण भ्रूणों के लिए एक द्वि-पोषपदार्थ संवर्धन पद्धति । बीच के पोषपदार्थ में 180 ग्राम/लीटर सुक्रोस तथा उच्च कैल्सियम आयन, निम्न लवण (आयरन सहित) सांद्रताएं होती है, जबकि बाहरी पोषपदार्थ में उच्च सांद्रता में आयरन एवं अन्य लवण (सुक्रोज अथवा एमीनो अम्ल नहीं) होते हैं ।



चित्र 5.3 - भ्रूण-नर्स भ्रूणपोष तकनीक जिसमें भ्रूणों को पात्रे संवर्धन किए गए भ्रूणपोषों में प्रतिरोपित किया जाता है ।

कई पादप संकरणों में भ्रूणों के संवर्धन योग्य होने से पूर्व ही पुष्प झड़ जाते हैं, अत: इस प्रकार के संकरणों में संपूर्ण पुथांअण्डाशय अथवा बीजाण्डों को संवर्धित करने के पश्चात् इनमें से भ्रूणों को विच्छेदित कर भ्रूण संवर्धन किया जाता है । जैसे - गासीपियम आर्बोरियम × गा. हिर्सुटम।

5.5 व्यापक संकरण के उपरान्त भ्रूण संरक्षण एवं इसके अनुप्रयोग (Embryo Rescue after Wide Hybridization and its Applications) :

कई अन्तराप्रजातीय (intraspecies) एवम् अन्तरावंशीय (intrageneric) संकरणों में भ्रूणपोष का अपह्रासन हो जाने के कारण दुर्लभ संकर भ्रूण जीवित नहीं रह पाते हैं । ऐसे दुर्लभ संकर भ्रूणों को संरक्षित करने के लिए उन्हें तरुण अवस्था में ही विच्छेदित कर संवर्धन माध्यम पर संवर्धित किया जाता है । उदाहरणार्थ, ट्रिटिकेल की प्राप्ति ट्रिटिकम तथा सीकेल के मध्य संकरण कराने से होती है परन्तु अधिकतर ट्रिटिकम वंशक्रमों में Kr^1 व Kr^2 दो प्रभावी जीन उपस्थित होते हैं, जो सिकेल से संकरण करने पर बीजों के विकास में बाधक होते हैं । अत: ट्रिटिकम एवं सीकेल के संकरण से विकसित अधिकांश बीज अतिसूक्ष्म, सिकुड़े हुए एवं निम्न अंकुरण क्षमता वाले होते हैं तथा केवल 5-10% संकरित पुष्पों में ही बीजों का विकास होता है । यदि उपरोक्त संकरण में परागण के 10-14 दिनों तक के संकरित भ्रूणों को विच्छेदित कर पोषक माध्यम पर संवर्धित करने पर 50-70 प्रतिशत संकरित पुष्पों से संकर पौधे प्राप्त होते हैं । इसी प्रकार गेहूं एवं जौं के संकरणों से बने भ्रूणों का परागण के 9-12 दिनों के बाद पात्रे संवर्धन करने पर संकर पौधे तैयार किये जा सकते हैं ।

5.5.1 भ्रूण संरक्षण के अनुप्रयोग

भ्रूण संरक्षण के द्वारा कई प्रकार के अन्तराजातीय एवं अन्तरावंशीय संकरणों के द्वारा बनने वाले दुर्लभ भ्रूणों को संरक्षित किया जा सकता है ।

- भ्रूण संरक्षण द्वारा आर्किडो के भ्रूणों का संवर्धन कर उनसे बडी संख्या में पौधे तैयार किये जा सकते है ।
- अन्तराप्रजातीय संकरणों से दुर्लभ संकर पौधों की प्राप्ति के लिए भी इस तकनीक का उपयोग किया जाता है।

बोध प्रश्न

1. निम्नलिखित कथनों में सत्य/असत्य बताइये -
   - (क) पात्रे अवस्थाओं में नर एवम् मादा युग्मकों का संयोजन पात्रे निषेचन कहलाता है । (सत्य/असत्य)
   - (ख) पात्रे परागण में उपयोग में आने वाले पादप अंगों का निर्जर्म होना आवश्यक नहीं है । (सत्य/असत्य)
   - (ग) अधिकांश धान्य पादपों में परिपक्व भ्रूणपोष पात्रे संवर्धन की अवस्थाओं के प्रति संवेदनशील होते हैं । (सत्य/असत्य)
   - (घ) भ्रूणपोष संवर्धन में 2-4% सुक्रोज का उपयोग सबसे उपयुक्त है । (सत्य/असत्य)
   - (ड़) आरम्भ में भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा विकसित प्ररोहों की वृद्धि दर तीव्र होती है । (सत्य/असत्य)

(च) पात्रे परागण पश्चात् बीज बनने की क्रिया स्त्रीकेसर की कार्यिकी अवस्था द्वारा प्रभावित होती है । (सत्य/असत्य)

(छ) पात्रे परागण द्वारा प्रतिबल सहिष्णु पादप किस्में विकसित की जा सकती है । (सत्य/असत्य)

(ज) भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा त्रिगुणित पादप विकसित किये जा सकते हैं । (सत्य/असत्य)

(झ) बीजीय पादपों में अण्डप सदैव अण्डाश्य में विद्यमान होते हैं । (सत्य/असत्य)

2. पात्रे संवर्धित संपूर्ण स्त्रीकेसर के..... परागण द्वारा..... बनने की प्रक्रिया ..... कहलाती है ।
3. अण्डपों अथवा..... की गीली सतह..... के अंकुरण एवम् परागनली की..... को..... करती है ।
4. पात्रे परागण की क्रिया के दो अनुप्रयोग लिखिए ।
5. पादपों में परखनली निषेचन की क्रिया किन-किन कारकों द्वारा प्रभावित होती है ।
6. लेम्प एवम् मिलन ने सर्वप्रथम..... के पादप के..... को संवर्धित करने का प्रयास किया ।
7. भ्रूणपोष कोशिकाओं की पूर्णशक्तता का प्रदर्शन..... व..... ने किया ।
8. भ्रूणपोष संवर्धन हेतु सामान्यतः..... व..... द्वारा प्रतिपादित संवर्धन माध्यमों का उपयोग किया जाता है ।
9. ..... के अनुसार भ्रूण संवर्धन..... प्रकार का होता है ।
10. किस अवस्था तक भ्रूण सामान्यत: परपोषित होते हैं ?
11. अन्तराप्रजातीय एवम् अन्तरावंशीय संकरणों में..... के अपहासन के कारण दुर्लभ संकर जीवित नहीं रह पाते हैं ।

5.6 सारांश (Summary) :

- पात्रे अवस्थाओं में संवर्धित स्त्रीकेशर के वर्तिकाग्र, अण्डाशय अथवा सीधे ही बीजाण्डों पर परागकणों के पहचानने की क्रिया पात्रे परागण कहलाती है ।
- पात्रे अवस्थाओं में नर एवम् मादा युग्मकों का संयोजन पात्रे निषेचन कहलाता है ।
- पात्रे परागण में प्रयुक्त पादप भागों जैसे - स्त्रीकेसर एवम् परागकण संग्रहण की क्रिया निर्जर्म अवस्थाओं में सम्पन्न की जाती है ।
- पात्रे परागण के उपरान्त बीज बनने की प्रक्रिया निम्न कारकों द्वारा प्रभावित होती है -

  (क) पात्रे परागण में प्रयुक्त कर्तोत्तक की कार्यिकी अवस्था पर

  (ख) संवर्धन माध्यम

  (ग) पात्रे संवर्धन अवस्थाओं एवम्

(घ) स्रोत पादप के जीन प्रारुप पर

- पादप प्रजनन के क्षेत्र में पात्रे परागण तकनीक के निम्न अनुप्रयोग है
  (क) स्व एवम् पर असंगतता को प्रभावहीन करने में,
  (ख) अनिषेकजनन द्वारा अगुणित पादप विकसित करने में, तथा
  (ग) प्रतिबल सहिष्णु पादप किस्मों के विकास में ।
- पात्रे निषेचन तकनीक का उपयोग भ्रूण जनन की आरम्भिक अवस्थाओं में होने वाले आण्विक परिवर्तनों के अध्ययन एवम् फसल सुधार हेतु आनुवांशिक अभियांत्रिकी में किया जाता है ।
- प्राथमिक भ्रूणपोष केन्द्रक का निर्माण एक नर युग्मक व दो ध्रुवीय केन्द्रकों से संयुग्मन द्वारा होता है ।
- भ्रूणपोष ऊतक में किसी भी प्रकार का अंगीय अथवा संवहनी ऊतकों का विभेदन नहीं पाया जाता है ।
- विकासशील भ्रूण द्वारा भ्रूणपोष के उपयोग के आधार पर बनने वाले बीज दो प्रकार - (i) भ्रूणपोषी एवम् (ii) अभ्रूणपोषी प्रकार के होते है ।
- ला र्यू एवम् सहयोगियों ने मक्के के संवर्धित भ्रूणपोष में जड़ विभेदन प्रेरित करने में सफलता प्राप्त की ।
- भ्रूणपोष संवर्धन निम्न पदों में सम्पन्न होता है -
  (i) कर्तोत्तक का स्रोत एवम् कर्तोत्तक का संवर्धन माध्यम पर स्थापन
  (ii) संवर्धन माध्यम
  (iii) कैलस आरम्भन एवम् अंगोद्भवन तथा
  (iv) प्ररोह कलिकाओं का विकास एवम् पूर्ण पादप का विकास ।
- विकसित हो रहे बीजों में से तरुण भ्रूणों को विच्छेदित कर पात्रे संवर्धन द्वारा जीवनक्षम पादप प्राप्त करने की प्रक्रिया भ्रूण संवर्धन कहलाती है ।
- भ्रूण संवर्धन की प्रक्रिया के मुख्य पद निम्न है
  (i) स्त्रोत ऊतकों का सतही निर्जर्मीकरण
  (ii) भ्रूणों का विच्छेदन तथा
  (iii) संवर्धन माध्यम का चयन
- भ्रूणों को जब पात्रे संवर्धित भ्रूणपोष पर संवर्धित किया जाता है तो भ्रूण संवर्धन की यह तकनीक नर्स भ्रूणपोष तकनीक कहलाती है ।
- व्यापक संकरण (अन्तराप्रजातीय एवम् अन्तरावंशीय) द्वारा विकसित दुर्लभ भ्रूणों का संरक्षण पात्रे भ्रूण संवर्धन तकनीक द्वारा किया जाता है ।
- भ्रूण संवर्धन तकनीक का उपयोग आर्किड पादपों के भ्रूण संरक्षण एवम् बृहत् मात्रा में पौधे बनाने एवम् अन्तराप्रजातीय संकरण द्वारा दुर्लभ पादप विकसित करने में किया जाता है ।

5.7 बोध प्रश्नों के उत्तर

1. (क) सत्य (ख) असत्य
   (ग) असत्य (घ) सत्य

(ङ) असत्य (च) सत्य

(छ) सत्य (ज) सत्य

(झ) सत्य (ञ)

2. वर्तिकाग्री, बीज, पात्रे परागण
3. वर्तिकाग्र, परागकणों, वृद्धि, मंदित
4. (i) स्व अथवा पर असंगतता को प्रभावहीन करना

   (ii) प्रतिबल सहिष्णु पादप विकसित करना
5. कर्तोत्तक की कार्यिकी अवस्था, संवर्धन माध्यम, संवर्धन अवस्थाएं एवम् स्रोत पादप के जीन प्रारुप पर
6. मक्के, भ्रूणपोष
7. प्रो. बी.एम. जौहरी, एस.एस. भोजवानी
8. मुरासिगे एवम् स्कूग, व्हाइट
9. पाईरिक, दो
10. गोलाकार अवस्था तक
11. भ्रूणपोष

5.8 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions) :

1. भ्रूण संवर्धन से क्या अभिप्राय है? भ्रूण संवर्धन प्रक्रिया का वर्णन कीजिए ।
2. भ्रूण संवर्धन के अनुप्रयोगों की विवेचना कीजिए ।
3. पादपों में पात्रे परागण एवम् पात्रे निषेचन को परिभाषित करते हुए सचित्र वर्णन किजिए ।
4. पादपों में पात्रे परागण भ्रूणपोष संवर्धन एवम् आ संवर्धन के कोई दो-दो अनुप्रयोग बताइये।
5. भ्रूणपोष संवर्धन तकनीक को विस्तार से समझाइये ।
6. पात्रे परागण द्वारा बीज बनने की प्रक्रिया को प्रभावित करने वाले कारक कौन-कौनसे है? समझाइये ।
7. निम्नलिखित पर संक्षिप्त टिप्पणियां लिखिए -

   (क) पात्रे परागण

   (ख) पात्रे निषेचन

   (ग) व्यापक संकरण

   (घ) भ्रूण संवर्धन के प्रकार

   (ङ) भ्रूण संवर्धन युक्तियां

5.9 शब्दावली (Glossary) :

1.	पात्रे	in vitro
2.	परागण	Pollination
3.	भ्रूण संवर्धन	Embryo Culture

4.	भ्रूणपोष संवर्धन	Endosperm Culture
5.	भ्रूण संरक्षण	Embryo Rescue
6.	वृर्तिकाग्री परागण	Stigmatic Pollination
7.	बीजांडासनीय परागण	Placental Pollination
8.	निर्जर्म	Sterile
9.	धान्य	Cereal
10.	खुली	Exposed
11.	वर्तिकाग्री परागण	Stigmatic Pollination
12.	बीजाण्ड परागण	Ovular Pollination
13.	स्वअसंगतता	Self incompatibility
14.	प्रतिबल सहिष्णु	Stress Tolerent
15.	सहाय कोशिका	Synergid Cell
16.	प्रतिव्यासांत कोशिका	Antipodal Cell
17.	भ्रूणपोषी बीज	Endospermic Seed
18.	अभ्रूणपोषी बीज	Non Endospermic Seed
19.	बीजरहित	Seedless
20.	जीवनक्षम	Viable

5.10 संदर्भ (Reference Books) :

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टल्स एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी, लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन दू प्लान्ट टिश्यू कल्वर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
5. भोजवानी एण्ड राजदान, थ्योरी एण्ड प्रेक्टिसेज, एल्सवेयर इण्डिया प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 6

सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक

(MICROPROPAGATION TECHNIQUE)

इकाई की रुपरेखा

6.0 उद्देश्य

6.1 प्रस्तावना

6.2 पुष्पीय पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन

6.3 फलोत्पादक पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन

6.4 औषधीय पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन

6.5 खाद्यान्न पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन

6.6 वनीय पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन

6.7 वृक्षों के प्रवर्धन में समस्यायें

6.7.1 व्यापक संदूषण

6.7.2 फीनॉल निक्षालन

6.7.3 जीन प्रारूप दुरुहता

6.8 लवणता के प्रति अधिक प्रतिरोधकता वाले पादपों का प्रारुपण

6.9 सारांश

6.10 शब्दावली

6.11 बोध प्रश्नों के उत्तर

6.12 अभ्यासार्थ प्रश्न

6.13 संदर्भ ग्रन्थ

6.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई का उद्देश्य है ।

- विशेष आर्थिक महत्त्व के पादपों जैसे फल, पुष्प, औषधीय, खाद्यान्न आदि पादपों के सूक्ष्म प्रवर्धन की तकनीक को जानना।
- 'वृक्षों के प्रवर्धन में होने वाली समस्याओं को जानना एवं उनका निराकरण करना ।
- लवणता के प्रति अधिक प्रतिरोधकता वाले जीन प्रारूप युक्त पादपों का संवर्धन करना ।

6.1 प्रस्तावना (Introduction) :

पादप ऊतक संवर्धन की तकनीक आधुनिक समय में एक महत्वपूर्ण उपकरण के रुप में प्रयोग की जा रही है । इस तकनीक के विकास से आज तक अनेक विधियाँ व रीतियां (methods and protocols) विकसित की जा चुकी है जिनका सफलतापूर्वक उपयोग आर्थिक रुप से उपयोगी पादपों के कृत्रिम संवर्धन व इनकी गुणवत्ता में सुधार के लिये किया जा रहा है । ऐसी सैकड़ों पादप प्रजातियों के लिये विशेष संवर्धन रीतियां (culture protocols) प्रकाशित की जा चुकी है जो मानव जीवन में बहुत उपयोगी

स्थान रखती हैं । फसली पादपों जैसे दलहन, तिलहन, खाद्यान्न व उपयोगी वृक्ष प्रजातियों का संवर्धन प्राय: सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से किया जा रहा है ।

यद्यपि सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक अत्यधिक उपयोगी व सफल तकनीक है परन्तु इसकी कुछ सीमायें है । संदूषण (contamination) पादप ऊतक संवर्धन की एक गंभीरतम समस्या है जो प्रायोगिक कार्य व इसके परिणाम को प्रभावित करती है । जीवाणु तथा विषाणु प्रमुख संदूषक हैं जो पादप ऊतक संवर्धन तकनीक के परिणाम को प्रभावित करते हैं । इसके अतिरिक्त फीनोल निक्षालन भी कर्तोत्तकों की जीवन क्षमता तथा कोशिका शक्तता (totipotency) को नष्ट करते हैं । फीनोल निक्षालन की समस्या के समाधान के रूप में कम अंतराल पर कर्तोत्तकों का पुनर्संवंधन करना महत्त्वपूर्ण विधि है । इसके अतिरिक्त कुछ रसायनों जैसे - सक्रिय चारकोल तथा पी.वी.पी को पोषक माध्यम में मिलाकर प्रयोग करने से फीनोल निक्षालन की समस्या को दूर किया जा सकता है । पादप ऊतक संवर्धन के क्रमिक विकास में जीनीय रुपान्तरित पादपों का उत्पादन एक क्रांतिकारी कदम है । अनेक फसली प्रजातियो के लिये जीन रूपान्तरित पादपों का विकास किया जा चुका है । इन पादपों का बहु तायत में उत्पादन व उपयोग किया जा रहा है । जीन रूपान्तरित पादप अनेक विशिष्ट गुणों के लिये जाने जाते हैं जिनमें लवणता के प्रति प्रतिरोधकता प्रमुख है ।

इस इकाई के अन्तर्गत उपरोक्त बिन्दुओं पर गहन अध्ययन करने का प्रयास करेंगे । इसके अतिरिक्त उपयोगी पादपों के ऊतक संवर्धन की सुलभ विधियां भी विद्यार्थियों को सीखने की दृष्टि से प्रस्तुत की जा रही है जो सैद्धान्तिक ज्ञान के साथ-साथ प्रायोगिक कौशल को बढ़ाने में सहायक होगी ।

6.2 पुष्पीय पादपों का सूक्ष्मप्रवर्धन (Micropropagation of Ornamental Plants) :

विगत वर्षों में सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक के अनुप्रयोग महत्वपूर्ण पादपों के अलैंगिक प्रजनन के लिये बहु तायत में किये जा रहे है । अनेक वैज्ञानिकों ने इस दिशा में रुचि लेकर गहन शोध कार्य प्रारम्भ किये हैं जिनके उत्कृष्ट परिणाम प्राप्त हुये है । अनेक वृक्ष प्रजातियों में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से पादप पुनरुद्भवन प्राप्त किया जा चुका है जिससे विशेषकर पुष्पीय पादपों की व्यवसायिक उपयोगिता बढ़ी है । चूंकि अधिकांश सजावटी पादप विषमयुग्मजी (heterozygous) होते हैं अत: इनमें विभिन्नताये पाई जाती है । एकरूपीय पादप (true-to-type) आर्थिक रूप से महत्त्वपूर्ण होते हैं अत: इन्हें सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक से उत्पादित किया जा सकता है ।

6.2.1 प्रवर्धन तकनीक (Micropropagation Technique)

जरबेरा तथा पिटूनिया (Gerbera and Petunia) अत्यधिक आर्थिक महत्त्व के पुष्पीय पादप है । इन पादपों का ऊतक संवर्धन तकनीक से उत्पादन विश्व के अनेक देशों में किया जा रहा है । इन पादपों की ऊतक संवर्धन तकनीक को निम्नलिखित चरणों में समझा जा सकता है -

पादप सामग्री (Plant Material)

जरबेरा, पिटूनिया की तरुण पत्तियाँ

पोषक माध्यम (Nutrient Medium)

इन पादपों को सूक्ष्म प्रवर्धन हेतु सामान्यत: मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम (MSMedium) का प्रयोग किया जाता है । इस माध्यम में आवश्यकतानुसार पादप वृद्धि नियंत्रकों को मिलाया जाता है । पोषक माध्यम को विभिन्न वृद्धि अवस्थाओं के अनुसार तीन प्रकार से तैयार किया जा सकता है -

प्रेरण माध्यम (Induction medium)

यह पोषक माध्यम कर्तोत्तकों में अंतःपात्रे स्थितियों में संरचना विकास (morphogenesis) को प्रेरित कराने के लिये आवश्यक होता है । इसे प्राथमिक पोषक माध्यम (primary nutrient medium) भी कहते हैं । प्रेरक माध्यम का संघटन निम्नलिखित है

MS+6-benzyl amino purine (BAP) (0.5-2.0 मिली.ग्रा./ली.) + Indole butyric acid (IBA) अथवा α-naphthalene acetic acid (NAA) (0.1-0.5 मिली.ग्रा./ली.)

गुणन माध्यम (Proliferation Medium)

इस माध्यम की आवश्यकता तब होती है जब प्राथमिक संवर्धन से प्राप्त प्ररोह कलिकाओं की कायिक वृद्धि करवाई जाती है । दूसरे शब्दों में पादपों के पुनराद्भवन (regeneration) के लिये जो पोषक माध्यम आवश्यक होता है उसे गुणन माध्यम कहते हैं । इस माध्यम का संघटन निम्नलिखित है -

MS+Kinetin (Kn) (2.0, 5.0 मिली.ग्रा./ली.)

मूल प्रेरण माध्यम (Root induction medium)

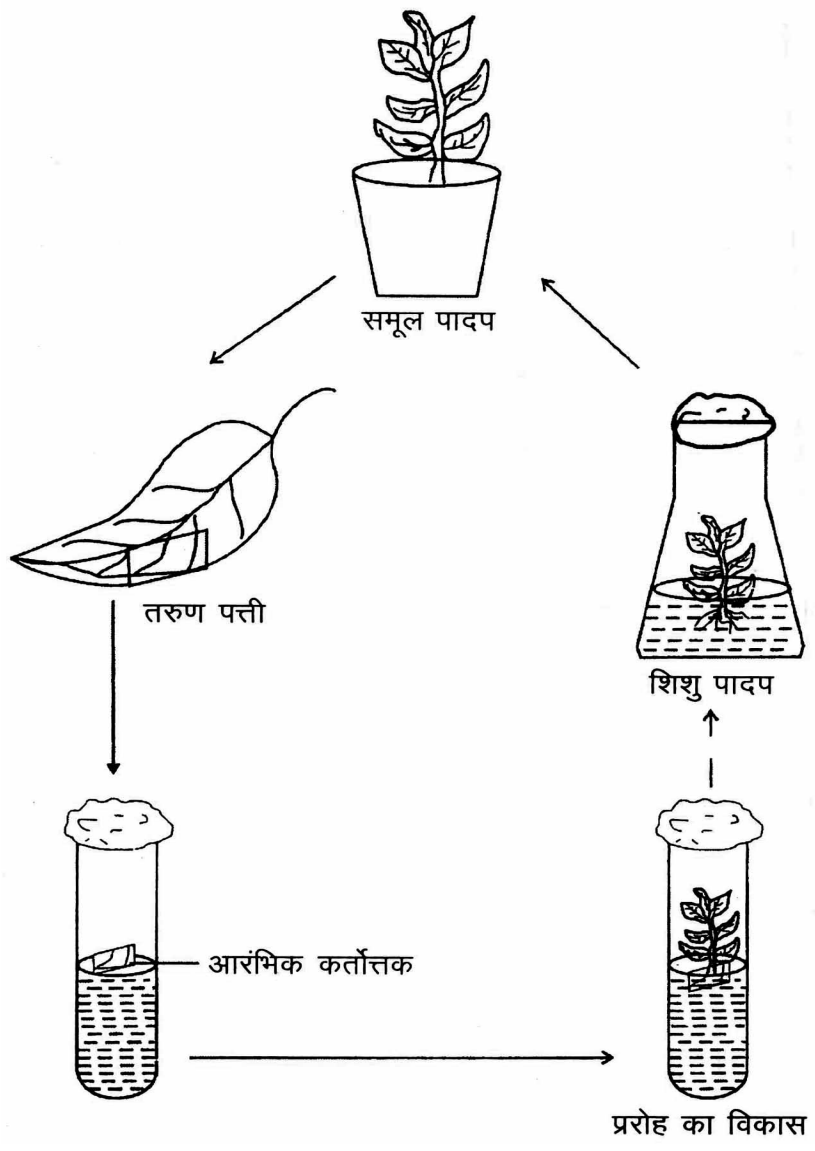
सूक्ष्म संवर्धन तकनीक से उत्पादित पादपों को वयस्क होने तक वृद्धि के लिये गमलों में अथवा मिट्टी में स्थापित किया जाता है । इससे पूर्व इनमें अपस्थानिक जड़ें प्रेरित करवाना आवश्यक होता है । अंतःपात्रे स्थिति में मूल प्रेरण हेतु जिस पोषक माध्यम का प्रयोग किया जाता है उसका संघटन निम्नलिखित है -

MS+IBA (0.5-1.0 मिली.ग्रा./ली.)

विधि (Method)

जरबेरा तथा पिटूनिया के सूक्ष्म संवर्धन की तकनीक चरणबद्ध तरीके रो निम्न प्रकार सम्पन्न की जा सकती है -

- सर्वप्रथम स्वस्थ पादपों से एकत्र की गयी तरुण पत्तियों (young leaves) को 70% इथाइल एल्कोहॉल (ethanol) से लगभग 1 मिनट तक उपचारित करें । इसके पश्चात् पत्तियों का सतही निर्जर्मीकरण सोडियम हाइपोक्लोराइट के 10-20% विलयन से 10 मिनट तक करें । इसके बाद पत्तियों को 4 बार विसंक्रमित आसुत जल (sterile distilled water) से साफ करें । पादप सामग्री का निर्जर्मीकरण 0.02% मरक्यूरीक क्लोराइड के विलयन से लगभग 3-4 मिनट तक उपचारित करके भी किया जा सकता है । अंत में पत्तियों को विसंक्रमित आसुत जल से अच्छी तरह धो लें ।
- एक विसंक्रमित पैट्रीडिश में पत्तियों को नमीरहित कर लें ।



चित्र 6.1 : जरबेरा में पर्ण खण्डों से सूक्ष्म प्रवर्धन का सचित्र निरुपण

- इसके पश्चात् पत्तियों से 1 cm × 1 cm के छोटे-छोटे खण्ड तैयार कर लें । अब इन पत्तियों के खण्डों को प्रेरण माध्यम MS+BAP (0.5-2.0 मिली.ग्रा./ली.) + IBA/NAA (0.1- 0.5 मिली.ग्राम./ली.) पर संवर्धन हेतु स्थानान्तरति करें । इन संवर्धनों को एक कक्ष मे 25^0 C तापमान पर 16 घंटे तक दीप्तकाल परिस्थितियों में संवर्धन हेतु रख दें ।
- लगभग 3-4 सप्ताह के पश्चात्, कर्तोत्तकों से अपस्थानिक कलिकायें निकलती हुई दिखाई देने लगेगी ।
- इन कलिकाओं को पुनःसंवर्धन हेतु गुणन माध्यम (proliferation medium) - MS + काइनेटिन (0.2, 0.5 मिली. ग्रा./ली.) पर स्थानान्तरित कर दें ।
- उक्त माध्यम पर विकसित होने वाले स्तम्भों (shoots) को, कलिकाओं सहित, पुन: इसी माध्यम पर संवर्धित किया जा सकता है । ऐसा करके स्तम्भों व कलिकाओं की संख्या में वृद्धि की जा

सकती है । लगभग 3-4 सप्ताह में नई कलिकायें बनने लग जाती है । इसके अतिरिक्त स्तम्भों को अलग-अलग करके मूल प्रेरण माध्यम - MS + IBA(0.5-1 मिली.ग्रा. /ली.) पर स्थानान्तरित कर दें । अक्षस्थ कलिकाओं का परिवर्धन रुक जायेगा परन्तु अत्यधिक सघन जडें तथा तरुण पादपों का निर्माण होने लग जाता है । लगभग 4-5 सप्ताह की अवधि में पूर्ण पादप बन जाते हैं जिन्हें वातावरण की परिस्थितियों में स्थापित किया जा सकता है ।

– अंतिम चरण में अच्छे व सुविकसित पादपों को मिट्टी में लगा दें । अनुकूल परिस्थितियों में पादपों की पूर्ण वृद्धि प्राप्त की जा सकती है ।

6.3 उद्यानिकीय पादपों का सूक्ष्मसंवर्धन (Micropropagation of Horticulture) :

भारत एक प्रमुख कृषि प्रधान देश है जहाँ विभिन्न प्रकार की फसलें बड़े पैमाने पर उगाई जाती है । एक प्रमुख खाद्यान्न उत्पादन देश होने के साथ ही साथ भारतवर्ष में फलोत्पादन भी प्रमुख स्थान रखता है । सेब, संतरा, केला, मौसमी, आम, अमरूद, नीबू नाशपाती, आलू बुखारा आदि प्रमुख फल पादप है जिनकी उन्नत प्रजातियों की खेती की जाती है । पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का प्रमुख योगदान अनेक फल प्रजातियों के उन्नतीकरण में हु आ है । केला एक प्रमुख फल है जिसका ऊतक संवर्धन तकनीक से उत्पादन कई स्थानों पर किया जा रहा हैं

भारतवर्ष में केले का उत्पादन लगभग 270,000 हैक्टेयर भूमि पर किया जा रहा है । अनेक उन्नत प्रजातियाँ प्रयोग में लाई जा रही हैं जिनका उत्पादन 26,000 से 57,000 किग्रा. प्रति हैक्टेयर तक प्राप्त किया जा रहा है । केले के उत्पादन के लिये प्रयोग की जा रही पारम्परिक प्रजनन विधि अत्यधिक धीमी है अत: अंतःपात्रे विधियों के उपयोग को बढ़ावा देने के प्रयास किये जा रहे हैं । अंतःपात्रे संवर्धन हेतु विभिन्न पादप अंगों जैसे - चूषक (suckers),प्रसुप्त कलिकाओं (dormant eyes)तथा छद्मस्तम्भ (pseudostem) का आधार आदि का कर्तोत्तकों के रूप में प्रयोग किया जा रहा है । मेरीस्टेम सर्वधन तकनीक का प्रमुख उपयोग केले के व्यवसायिक स्तर पर उत्पादन करने हेतु किया जा रहा है । इस तकनीक से एक वर्ष में लगभग 5000 तक पौधे एक स्तम्भ शीर्ष (shoot tip) से प्राप्त किये जा रहे हैं । इस तकनीक से केले के उत्पादन में बढ़ोत्तरी होने के साथ-साथ रोगमुक्त पौधों का उत्पादन भी संभव हो सका है ।

6.3.1 प्रवर्धन तकनीक (Culture Technique)

केले का ऊतक संवर्धन निम्न चरणों में सम्पन्न किया जा सकता है -

पादप व पादप सामग्री (Plant and Plant Material)

केला (banana) Musa paradisiacal, स्तम्भ शीर्ष (Shoot Tip)

पोषक माध्यम (Nutrient Medium)

प्राथमिक संवर्धन हेतु - MS + BAP (2.25 मिली.ग्रा.ली.)

गुणन/पुनर्सवंर्धन हेतु - MS + BAP (1-2 मिली.ग्रा./ली.)

मूल प्रेरण हेतु - MS माध्यम वृद्धि हारमोन रहित

विधि (Method)

- लगभग 40-100 सेमी. ऊँचाई वाले चूषकों (suckers) से 20 × 30 मिली.मी. माप के खण्ड काट लें । इन खण्डों में सामान्यत: एक शीर्ष प्ररोह (shoot tip) होना आवश्यक है ।
- इन खण्डों का सतही निर्जर्मीकरण सोडियम हाइपोक्लोराइट के 3.5 प्रतिशत विलयन, जिसमें ट्वीन-80 (Tween-80) की कुछ बूँदे मिलाई गयी हों, से लगभग 15 मिनट तक उपचारित करके करें ।
- आटोक्लेव किये हुये आसुत जलसे धोकर पुन: 1% सोडियम हाइपोक्लोराइट विलयन तथा ट्वीन-80 से निर्जर्मीकृत करें ।
- पादप सामग्री को आटोक्लेव किये हुये आसुत जल से अच्छी तरह धोकर लगभग 5 घन मिली.मी के आकार के टुकड़ों में काट लें । इन खण्डों में स्तम्भ शीर्ष होना आवश्यक है । प्राय: इन खण्डों में पर्ण आधार तथा 2-3 मिली.मी. तने का आधारीय भाग भी होता है ।
- कर्तोत्तकों को प्राथमिक संवर्धन हेतु तैयार किये गये पोषण माध्यम [MS + BAP(2.25 मिली.ग्रा./ली.)] सुक्रोज (2%) तथा अगार (8 ग्रा.ली.) पर संवर्धन हेतु स्थानान्तरित कर दें ।
- लगभग 4-6 सप्ताह के दौरान असंख्य प्ररोहों का निर्माण होने लगेगा । इन प्ररोहों की संख्या में वृद्धि करने हेतु इन्हें इसी पोषक माध्यम पर पुन: संवर्धित (subculture) कर दें । लगभग 4-6 सप्ताह के अंतराल पर पुन: संवर्धन करते रहने से असंख्य प्ररोह निर्मित हो जायेंगे जिन्हें आवश्यकतानुसार पूर्ण पादपों में विकसित कराया जा सकता है ।
- सूक्ष्म संवर्धन तकनीक से तैयार किये जाने वाले प्ररोहों में मूलतंत्र नहीं होता है । मूलतंत्र के प्रेरण के लिये इन प्ररोहों को हारमोन रहित मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम पर स्थानान्तरित कर देते हैं । लगभग 3-5 सप्ताह के दौरान स्वस्थ अपस्थानिक मूलतंत्र विकसित हो जाता हैं ।
- अच्छे, स्वस्थ व सुविकसित मूलतंत्र युक्त शिशु पादपों को पूर्व में बताई गई विधि के अनुसार मिट्टी में आरोपित कर दें ।

6.4 औषधीय पादपों का सूक्ष्मसंवर्धन (Micropropagation of Medicinal Plants) :

भातरवर्ष की वातावरण व भौगोलिक परिस्थितियाँ औषधीय पादपों की पैदावार के लिये सर्वाधिक अनुकूल है । यही कारण है कि यहाँ पर अनेक प्रकार के औषधीय पादप प्राकृतिक रूप से उगते हैं । आयुर्वेदिक औषधियों में इनकी उपयोगिता को देखते हुये, औषधीय पादपों की वृहद स्तर पर खेती भी भारत के लगभग समस्त क्षेत्रों में की जा रही है । जहाँ एक ओर पारम्परिक कृषि की विधियाँ तथा उन्नत खेती के तरीकों से औषधीय पादपों के उत्पादन में तीव्रता आई है । वहीं बढ़ते हुये शहरीकरण तथा दिनोंदिन घटती हुई कृषि भूमि के कारण इन पादपों के प्राकृतिक संवर्धन की गंभीर समस्या भी उत्पन्न हो गई है । इन पादपों के उन्नत पौधों के उत्पादन तथा इनके संरक्षण के लिये वर्तमान में ऊतक संवर्धन तकनीकों का प्रयोग किया जा रहा है । सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से अनेक औषधीय पादपों का वृहद स्तर पर उत्पादन करना संभव हो गया है । अश्वगंधा, आँवला, गूगल, तम्बाकू धतूरा, सदाबहार, तुलसी तथा वृद्दमी आदि प्रमुख पादप प्रजातियां हैं जिनका सूक्ष्म संवर्धन तकनीक से उत्पादन किया जा रहा है ।

6.4.1 प्रवर्धन तकनीक (Culture Method)

अश्वगंधा का सूक्ष्म प्रवर्धन निम्न चरणों में सम्पन्न किया जा सकता है -

पादप सामग्री - अश्वगंधा (Withania somnifera) की तरुण पत्तियाँ (young leaves) ।

पोषक माध्यम - प्राथमिक संवर्धन हेतु - MS + BAP(1-2 मिली.ग्रा/ली.) + NAA(0.1-0.2 मिली.ग्रा.ली.) ।

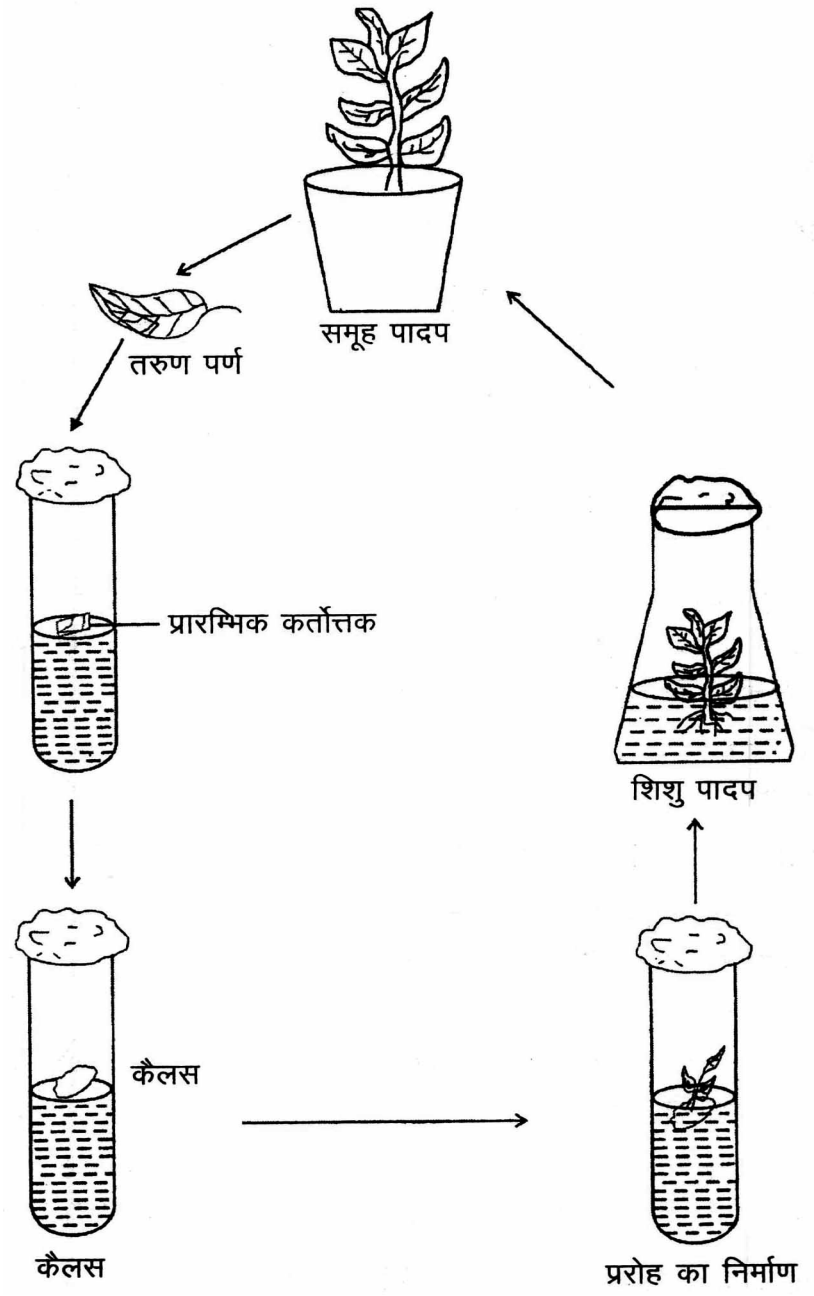
गुणन एवं दीर्घ अवधि स्थापन हेतु - MS + NAA (0.1 मिली.ग्रा./ली.) ।

मूल प्रेरण हेतु - MS + IBA (0.5 मिली.ग्रा./ली.) ।

विधि (Method)

अश्वगंधा के पादप की पत्तियों से सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक से पादपों का निर्माण अग्रलिखित चरणों में सम्पन्न किया जा सकता है -

- सर्वप्रथम अंतःपात्रे स्थितियों में प्राप्त किये गये पादपों से अथवा प्राकृतिक रूप से उगने वाले पादपों से छोटी-छोटी तरुण पत्तियाँ एकत्र करें । कर्तोत्तक एकत्र करने से पूर्व यह सुनिश्चित कर लें कि मातृ पादप (mother plant) पूर्णत: रोगमुक्त व स्वस्थ होना चाहिये ।
- यदि पत्तियों को जंगली पौधों से एकत्र किया गया है तो उन्हें सावधानीपूर्वक एक मृदु साबुन के 5% घोल (5% solution of mild detergent) से धो लें । इसके पश्चात् नल के स्वच्छ जल से कई बार धो लें ।
- अब प्रत्येक पत्ती को 70% इथायल अल्कोहॉल में लगभग 30 सेकिंड तक डुबोकर उपचारित करें।
- इसके पश्चात् पत्तियों का सतही निर्जर्मीकरण सोडियम हाइपोक्लोराइट के तुरंत तैयार किये गये 10% सांद्रता वाले विलयन से करें । यह उपचार लगभग 5-10 मिनट की अवधि तक देने से निर्जर्मीकृत किया जा सकता है ।
- सोडियम हाइपोक्लोराइट के विलयन से उपचारित करने के पश्चात् पत्तियों को निर्जर्म आसुत जल से 3-4 बार अच्छी तरह धो लें ।
- एक निर्जर्म पैट्री डिश लेकर इसमें कुछ पत्तियों को निकाल लें । विसंक्रमित चिमटी तथा चाकू का उपयोग करते हुये लगभग 1.0 वर्ग सेमी. आकार के छोटे-छोटे खण्ड तैयार कर लें ।
- पत्तियों के इन खण्डों को प्राथमिक संवर्धन माध्यम [(MD + BAP(1-2 मिली.ग्रा./ली.) + NAA(0.1-0.2मिली.ग्रा. /ली.)] पर स्थानांतरित कर दें ।
- संवर्धनों को विसंक्रमित वातावरण में सील करके एक संवर्धन कक्ष में रख दें । इस कक्ष का तापमान 25^0 C तथा दीप्तकाल 16 घंटों की अवधि का होना चाहिए ।
- लगभग तीन-चार सप्ताह में प्ररोह (shoot) बनने लगते हैं । नियमित अंतराल पर प्रेक्षण व आँकड़े एकत्र करते रहें।
- प्ररोहों की संख्यात्मक वृद्धि हेतु प्राथमिक संवर्धन से प्राप्त होने वाले ऊतक पिण्डों (Tissue masses) को छोटे-छोटे खण्डों में काट लें । यह ध्यान रहे कि प्रत्येक खण्ड में कम से कम एक प्ररोह अवश्य होना चाहिये । अब इन प्ररोह खण्डों को उचित पोषक माध्यम - MS + NAA(0.1 मिली.ग्रा./ली.) पर पुन: संवर्धित कर दें ।



चित्र 6.2 : अश्वगंधा में तरुण पर्ण खण्डों से सूक्ष्म प्रवर्धन का सचित्र निरुपण

- जिन प्ररोहों की लम्बाई पर्याप्त हो (लगभग 7-15 सेमी.), उन्हें मूल प्रेरण माध्यम (MS basal medium) पर स्थानान्तरित कर दें । इस पोषक माध्यम में अल्प मात्रा में IBA(0.5 मिली.ग्रा./ली.) मिला देने पर सुदृढ़ मूलतंत्र विकसित हो जाता है ।
- सुविकसित मूलतंत्र युक्त पादपों को पूर्व में बताई गयी विधि के अनुसार भूमि में स्थानान्तरित कर दें ।

6.5 खाद्यान्न पादपों का सूक्ष्म संवर्धन(Micropropagation of Cereal Crops) :

भारत एक प्रमुख कृषि प्रधान देश है । यहाँ अनेक खाद्यान्न फसलों का उत्पादन एवं निर्यात किया जाता है । वातावरण की अनुकूल परिस्थितियों तथा कृषि योग्य भूमि की प्रचुरता, अच्छी प्रजातियों की खाद्यान्न फसलों के उत्पादन के लिये सर्वाधिक अनुकूल है । यद्यपि वर्तमान में खाद्यान्न प्रजातियों की कृषि उन्नत तरीकों से की जा रही है, तथापि उत्तरोत्तर फसल सुधार तथा अच्छे गुणों का समावेश करने के लिये जैवप्रौद्योगिकी की तकनीकों का उपयोग आवश्यक है । पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से गेहूँ ज्वार, बाजरा, धान, मक्का तथा अन्य खाद्यान्न फसलों का उत्पादन अनेक वर्षों से किया जा रहा है । ऊतक संवर्धन से पादप उत्पादन की क्रियाविधि निम्नलिखित बिन्दुओं में स्पष्ट की जा रही है -

6.5.1 संवर्धन तकनीक (Culture Technique)

गेहूँ जौ, मक्का तथा धान के सूक्ष्म प्रवर्धन को निम्न विधि से सम्पन्न किया जा सकता है -

पादप सामग्री

गेहूँ जौ, मक्का, धान के अपरिपक्व भ्रूण (immature embryos of wheat, barley, maize, paddy

पोषक माध्यम -

कैलस उत्प्रेरण हेतु - MS + 2,4D (2.0 मिली.ग्रा./ली.)

प्ररोह विभेदन हेतु - MS + IBA(2.0 मिली.ग्रा/ली.) + NAA (0.2 मिली.ग्रा./ली.)

मूल प्रेरण हेतु - MS + IBA (1.0 मिली.ग्रा./ली.)

विधि (Method)

- प्रफुल्लन(anthesis) हो जाने के लगभग 14-15 दिनों पश्चात् गेहूँ अथवा जौं की बालियां (spikes) एकत्र कर लें । विकसित हो रहे प्रत्येक बीज को अलग-अलग कर लें । एक चिमटी की सहायता से ..... लेमा (lemma) तथा पेलिया या शल्लिका (palea) को हटा दें ।
- इन कच्चे बीजों को 20 प्रतिशत सोडियम हाइपोक्लोराइट विलयन, जिसमें 1-2 बूँदें ट्वीन-20 (Tween- 20) की मिलाई गई हों, से लगभग 10 मिनट तक निर्जर्म करें । इसके पश्चात् 3-5 बार निर्जर्म आसुत जल से घोलें ।
- निर्जर्मीकरण के पश्चात् अपरिपक्व भ्रूणों (लगभग 1-1.5 मिली.मी. व्यास) को विच्छेदित करके अलग कर लें । इस प्रक्रिया में विच्छेदन सूक्ष्मदर्शी की सहायता ली जा सकती है ।
- अब, कैलस प्रेरण हेतु विच्छेदित अपरिपक्व भ्रूणों को प्राथमिक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें ।
- कर्तोत्तको को अंधेरे में लगभग 25^0 C तापमान पर संवर्धन कक्ष में स्थानान्तरति कर दें । प्रारम्भ में भ्रूणों में कुछ वृद्धि दिखाई देने लगेगी तथा लगभग 2 सप्ताह के अंदर कैलस बनना प्रारम्भ हो जायेगा ।

- कैलस को छोटे-छोटे खण्डों में तोड़कर इसी माध्यम पर पुन: स्थानान्तरित करें । ऐसा करने से कैलस की मात्रा में वृद्धि हो जायेगी । लगभग 4-6 सप्ताह तक विधिवत् प्रेक्षण करते हुये आकड़े एकत्र करते रहें ।
- लगभग 100-200 मिली.ग्रा. भार के समतुल्य कैलस खण्डों को प्ररोह प्रेरण माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें । अब इन संवर्धनों को 25^0 C तापमान तथा 16 घण्टे दीप्तकाल परिस्थितियों में संवर्धन कक्ष में रख दें । लगभग 3-5 सप्ताह में प्ररोह निकल आयेंगे ।
- इन प्ररोहों में मूलतंत्र नहीं पाया जाता है । अत: इनमें अपस्थानिक मूल प्रेरण अंतपात्रे स्थितियों में करवाया जाता है जिससे ये पूर्ण पादप में विकसित हो सकें । इसके लिये प्ररोहों को ऐसे पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित किया जाता है जिसमें ऑक्सिन (उदा. IAA/IBA/NAA) कम सान्द्रता में (0.5-1.0 मिली.ग्रा/ली.) मिलाया गया हो । ऑक्सिन के प्रभाव में प्ररोहों से लगभग 15-20 दिनों में अपस्थानिक जड़ें निकल आती है ।
- सुविकसित मूलतंत्र युक्त पादपों को संवर्धन पात्र से निकाल लें । इसके पश्चात् सावधानीपूर्वक जड़ों से अगार धोकर मिट्टी में आरोपित कर दें । मिट्टी में स्थापन तथा पूर्ण वृद्धि होने तक आवश्यक अवयवों की आपूर्ति करते रहें ।

6.6 वनीय पादपों का सूक्ष्म संवर्धन (Micropropagation of Forest Trees) :

विश्व के अनेक देशों में वनीय वृक्षों की उत्पादकता बढ़ाने के लिये ऊतक संवर्धन तकनीक का बहुतायत में उपयोग किया जा रहा है । इन देशों में संयुक्त राष्ट्र, ब्राजील, भारत, जापान तथा कुछ पश्चिमी यूरोपीय देश प्रमुख हैं । भारतवर्ष में कुछ प्रमुख वृक्ष प्रजातियों के ऊतक संवर्धन के लिये उत्कृष्ट तकनीक विकसित की जा चुकी है । बाँस (Bamboo), शीशम (Dalbergia), यूकेलिप्टस (Eucalyplus), खेजड़ि (Prosois), चंदन (Santalum), टीक(Tectona) तथा सेस्बानिया (Sesbania) आदि मुख्य वृक्ष प्रजातियां है जिन्हें पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से वृहद स्तर पर सफलतापूर्वक उत्पादित किया जा रहा है । ईंधन, चारा, इमारती लकड़ी तथा कागज निर्माण हेतु लुग्दी (pulp) का बहुतायत में उत्पादन करने के लिए जैव प्रौद्योगिकी की नवीन तकनीकों जैसे ऊतक संवर्धन का प्रयोग करते हुये अनेक वृक्षों में सूक्ष्मप्रवर्धन को सफलतापूर्वक प्राप्त किया जा चुका है । अकेशिया नीलोटिका (Acacia nilolica) आल्नस नेपालेन्सिस (Alnus nepalensis), हार्डविकिया बाइनेटा (Hardwickia binata), मधूका लैटीफोलिया (प्रोसोपिस सिनेरेरिया (Prosopis cineraria), टैमेरिन्डस इण्डिका(Tamarindus indica), टैक्टोना ग्रान्डिस (Tectona grandis), शोरिया रोबस्टा (Shorea robusta), सैन्टेलम अल्बम् (Santalum album) इत्यादि प्रमुख वनीय पादप हैं जिन्हें सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से वृहद स्तर पर सफलतापूर्वक उत्पादित किया जा रहा है ।

6.6.1 प्रबर्धन तकनीक (Culture Method)

यूकेलिप्टस एक आदर्श वृक्ष है जिसकी लकड़ी बहुउपयोगी होती हैं । औद्योगिक आवश्यकताओं को ध्यान में रखते हुये इसके समान गुणों वाले पादपों का सतत् निर्माण एक कठिन चुनौती है क्योंकि यह एक पर-परागित वृक्ष प्रजाति है । अत: इसे कायिक प्रवर्धन विधियों से उत्पादित किया जाना आवश्यक है

। कुछ यूकेलिप्टस प्रजातियों जैसे - यूकेलिप्टस सिट्रीडोरा, यूकेलिप्टस मैकुलेटा यूकेलिप्टस ग्रान्डिस आदि के लिये ऊतक संवर्धन तकनीक उपयोग में लाई जा रही है ।

पादप सामग्री

यूकेलिप्टस टेरेटीकोर्निस (Eucalyplus tereticornis) (6-8 वर्ष आयु) के पर्वसंधि खण्ड (nodal segments).

पोषक माध्यम

प्राथमिक संवर्धन हेतु

* MS + BAP (0.5-1.0) मिली.ग्रा./ली. अथवा
* MS + BAP (1.0) + IBA (0.5) मिली.ग्रा./ली.
* ½ MS + Activated Charcoal (0.2 प्रतिशत)

मूल प्रेरण हेतु

* ½ MS + IBA (0.5) मिली.ग्रा/ली. अथवा
* ½ MS + IBA (0.5) + NAA (0.2) मिली.ग्रा./ली.

विधि (Method)

यूकेलिप्टस के सूक्ष्म प्रवर्धन को निम्न चरणों में सम्पन्न किया जा सकता है -

- फरवरी माह मे वृक्ष की शाखाओं की छँटाई करने के लगभग दो माह के अंदर नई कोंपलें व प्ररोह विकसित होने लगते हैं । इसी समय तने से निकली टहनियों (लगभग 10-15 सेमी. लंबी) को काट लें । इन टहनियों में लगभग 5-8 पर्व संधियाँ (nodes) होनी चाहिये ।
- अब पत्तियों को सावधानीपूर्वक हटा दें तथा टहनियों को अच्छी तरह आसुत जल से धो लें ताकि धूल के कण साफ हो जायें । इसके पश्चात् एक रुई के फाहे को अल्कोहल में डुबोकर इन टहनियों को निर्जर्मीकृत कर लें।
- अब इन टहनियों को छोटे-छोटे खण्डों में काट लें । इन खण्डों का माप लगभग 1.5 सेमी. होना चाहिये ।
- पर्वसंधि खण्डों का पुन: निर्जर्मीकरण करने के लिये इन्हें मरक्यूरिक क्लोराइड के 0.1 प्रतिशत जलीय विलयन से लगभग 8 मिनट तक उपचारित करें । इसके पश्चात् 3-4 बार आटोक्लेव किये हुये आसुत जल से धोने के पश्चात् पादप सामग्री को आसुत जल में ही रहने दें ।
- अब कर्तोत्तकों (पर्व सन्धि खण्डों) को ऊपर दिये गये संघटन वाले मुराशिगे तथा स्कूग प्राथमिक संवर्धन पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें ।
- कर्तोत्तकों को एक संवर्धन कक्ष में स्थानान्तरित कर दें । संवर्धन कक्ष का तापमान 26^0C तथा दीप्तकाल लगभग 16 घंटे के अनुपात में रखें ।
- लगभग 4-6 सप्ताह के पश्चात् प्रेक्षण करने पर यह देखा जा सकता है कि कर्तोत्तकों से प्ररोह कलिकायें बनने लगती है । इन प्ररोह कलिकाओं की संख्या मे वृद्धि करने के लिये इन्हें उच्च साइटोकाइनिन वाले पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित किया जा सकता है ।

- लघु प्ररोहों की लम्बाई में वृद्धि कराने के लिये इन्हें अलग-अलग करके ½ MS पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें । इस माध्यम में एक्टिवेटेड चारकोल (activated charcoal) को अल्पमात्रा (0.2 प्रतिशत) में मिलाने से लम्बाई में वृद्धि तीव्रतापूर्वक होती है ।
- जब प्ररोहों की लम्बाई लगभग 35 सेमी. हो जायें तो इन्हें मूलप्रेरण माध्यम ½ MS + IBA(0.5) मिली.ग्रा.ली. अथवा ½ MS + IBA(0.5) + NAA (0.2) मिली.ग्रा./ली. पर पुन: संवर्धित कर दें ।
- लगभग 10-15 दिनों में ठोस अथवा तरल दोनों माध्यमों पर जड़ों का विकास हो जाता है ।
- सुविकसित मूलतंत्र युक्त पादपों को पूर्व में बताई गयी विधि के अनुसार मिट्टी में आरोपित कर दें । पूर्ण विकसित होने तक पादपों को आवश्यकतानुसार पोषण आदि प्रदान करें ।

बोध प्रश्न

1. पुष्पीय पादपों के नाम बताइये जिन्हें सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से उत्पादित किया जा सकता है।

   .....

2. पुष्पीय पादपों के संवर्धन हेतु उपयोग किए जाने वाले पोषक माध्यम में कौन वृद्धि नियंत्रक मिलाये जाते है।

   .....

3. फलोत्पादक पादपों के संवर्धन हेतु उचित कर्तोत्तक कौन सा है ?

   .....

4. खाद्यान्न फसलों के संवर्धन हेतु किस तकनीक व किस कर्तोत्तक का उपयोग किया जाता है।

   .....

6.7 वृक्षों के प्रवर्धन में समस्यायें (Problems in Propagating Trees) :

सूक्ष्म प्रवर्धन पादप ऊतक संवर्धन की एक प्रमुख तकनीक है । इसे बहुतायत में काष्ठीय पादपों के ऊतक संवर्धन के लिये प्रयोग किया गया है । इस तकनीक की सहायता से आर्थिक रूप से महत्त्वपूर्ण पादपों को वृहद स्तर पर उत्पादित किया जा रहा है । वर्तमान समय में इस तकनीक का उपयोग पादपों के उत्पादन, संख्यात्मक गुणन, परिवहन तथा रोगकारक मुक्त (pathogen free) करने में किया जा रहा है । क्लोनीय परिवर्धन तकनीक आर्किड पादपों (orchid plants) के अन्तःपात्रे उत्पादन में विशेष रूप से उपयोगी सिद्ध हुई है । ऐरेन्थेरा (Aranthera), एस्कोफिनेटा (Ascofineta), सायम्बीडियम (Cymbidium), डेन्ड्रोबियम (Dendrobium),ऐपीडेन्ड्रम (Epidendrum), मिल्टोनिया (Miltonia), नियोशिया (Neottia), वैण्डा (Venda), वनीला (Vanilla) आदि प्रमुख आर्किड पादप है जिन्हें ऊतक संवर्धन तकनीक की सहायता से सफलतापूर्वक संवर्धित किया जा रहा है ।

पादपों का अंत:पात्रे संवर्धन एक व्यवसायिक तकनीक है जिसका उपयोग पूरे विश्वभर में पौधघर कर्मियों (nurserymen) के द्वारा अनेक शाकीय (herbaceous) तथा काष्ठीय (woody) प्रजातियों के लिये किया जा रहा है । परन्तु अनेक ऐसे काष्ठीय पादप जिनका पारम्परिक विधियों से उत्पादन कठिन है, के लिये संतोषजनक सूक्ष्मप्रवर्धन रीतियाँ (protocols) अभी तक विकसित नहीं की जा सकी है । सूक्ष्म प्रवर्धन के दौरान उत्पन्न होने वाले असामान्य प्रकार के पादप भी इस तकनीक के नकारात्मक पक्ष को प्रकट करते हैं । ऐसा सुझाव दिया गया है कि एक ही कर्तोत्तक से लगातार अनेक प्रजनन चक्र तथा पादप उत्पादन नहीं करना चाहिये । यदि ऐसा करते है तो असामान्य प्रकार के पादपों की संख्या बढ़ती रहती है तथा अनुपयोगी लक्षणों वाले पादप प्रकट होने की संभावना भी बढ़ती जाती है। निम्नलिखित बिन्दुओं में ऐसी ही कुछ समस्याओं का विवरण दिया गया है -

6.7.1 सर्वांगी संदूषक (Systemic Contaminants)

संदूषण (contaminants) व्यवसायिक सूक्ष्मप्रवर्धन की सर्वाधिक गंभीर समस्या है जिसके कारण व्यापक आर्थिक नुकसान होता है । संदूषण तब अधिक हानिप्रद हो जाता है जब यह प्रायोगिक कार्यक्रम के किसी महत्वपूर्ण चरण के दौरान संवर्धन को खराब कर देता है । यह एक आम धारणा है कि पादप ऊतक संवर्धन कभी भी संदूषकों से शत प्रतिशत मुक्त नहीं होते हैं । सुस्थापित संवर्धनों में संदूषकों के अनेक कारण है । कर्तोत्तक के साथ प्रवेश करने वाले जीवाणु प्रारम्भ में प्रसुप्त रहते हैं परन्तु संवर्धन की विकसित अवस्था में सक्रिय होकर संवर्धनों को संदूषित कर देते हैं । इसी प्रकार वायु में उपस्थित कवक के बीजाणु अनेक माध्यमों से प्रयोगशाला में प्रवेश कर जाते हैं । संदूषकों से प्रायोगिक हानि को बचाने के लिये उच्चस्तरीय स्वच्छता मानदण्डों को अपनाना अत्यधिक आवश्यक है । निर्जर्म क्षेत्र को पूर्णतया संदूषक मुक्त रखना प्रायोगिक कार्य की सफलता को सुनिश्चित करता है । फार्मेल्डिहाइड अथवा किसी कवकनाशी (fungicide) जैसे - थायोबेण्डाजोल (Thiobendazole) के नियमित वाष्पीकरण से प्रयोगशाला में बीजाणु की सान्द्रता को कम किया जा सकता है ।

6.7.2 फीनॉल निक्षालन (Phenolic leaching)

काष्ठीय पादपों (woody plants) तथा अन्य पादप प्रजातियों के वयस्क ऊतकों के संवर्धन के दौरान सामान्यत: एक समस्या उत्पन्न होती है जिसे ऑक्सीकारक धूसरता (oxidative browning) कहते है । इसमें पोषक माध्यम का रंग भूरा हो जाता है तथा कभी-कभी कर्तोत्तक भी काले हो जाते हैं । ऐसा इसलिये होता है क्योंकि कर्तात्तक एकत्र करने के दौरान कोशिकाओं को होने वाले आघात के फलस्वरूप वे फीनोल यौगिकों का तीव्र निक्षालन प्रारम्भ कर देती है । ये फीनोल यौगिक सुगमतापूर्वक आक्सीकृत होकर क्यूनोन (quinones) का निर्माण करते हैं जो संवर्धनों तथा कर्तोत्तकों के रंग को परिवर्तित (discoloration) कर देते है । फीनॉल यौगिकों के आक्सीकरण उत्पाद (जैसे क्यूनोन) पादपों के लिये विषकारक (toxic) होते हैं जिससे पादपों में ऊतकक्षय (necrosis) हो जाती है और अंत में कर्तोत्तक मृत हो जाता है । इस समस्या के समाधान के लिये वैज्ञानिकों द्वारा अनेक उपाय सुझाये गये हैं । इन उपायों में कर्तोत्तकों को शीघ्रतापूर्वक कम समयावधि पर पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित करते रहना सर्वाधिक प्रभावी व सरल है । इस अवधि में कर्तोत्तक का सिरा सील हो जाता है जिससे फीनोल निक्षालन रूक जाता है । आरम्भ में संवर्धनों को अंधेरे में रखकर वृद्धि करवाने से भी फीनॉल

निक्षालन पर नियंत्रण पाया जा सकता है । कुछ पादप प्रजातियों जैसे यूकेलिप्टस सिट्रीडोरा (Eucalyptus citriodora) के वृक्ष में सूक्ष्म प्रवर्धन करवाने के लिये कर्तोत्तक को प्रथम तीन दिनों तक तरल पोषक माध्यम पर संवर्धित करना आवश्यक होता है, तत्पश्चात् अर्द्धठोस माध्यम पर स्थानान्तरित करने पर संवर्धन उच्च गुणवत्ता के पादपों के निर्माण में सक्षम हो जाता है । तरल माध्यम पर आरम्भिक संवर्धन कराने से संभवत: फीनोल यौगिकों तथा अन्य वृद्धि अवरोधों का नाश हो जाता है ।

कुछ रासायनिक यौगिक भी फीनॉल निक्षालन को रोकने में सहायक होते हैं । सामान्यत: सक्रियकृत चारकोल (activated charcoal),पॉलीविनायल पायरोलिडोन (polyvinyl pyrrolidon) आदि यौगिक फीनॉल को अवशोषित कर लेते हैं ।

6.7.3 जीनप्रारुप दुरुहता (Genotype Recalcitrance)

गत बीस वर्षों में अनेक वृक्ष प्रजातियों के अंत:पात्रे क्लोनीय परिवर्धन हेतु सक्षम विधियाँ विकसित की गयी हैं । इन वृक्षों में सजावटी वृक्ष (ornamental),उद्यानिकीय वृक्ष (horticulture),वन वृक्ष प्रजातियाँ सम्मिलित है । अन्य अनेक वृक्ष प्रजातियों जैसे चन्दन, चीड़, बालनट, टीक आदि के लिये विश्वसनीय अन्तःपात्रे संवर्धन रीतियाँ (protocols) विकसित की जा चुकी हैं ।

यद्यपि अनेक काष्ठीय प्रजातियों के लिये कायिक प्रवर्धन सफलतापूर्वक प्राप्त किया जा चुका है परन्तु युग्मनजीयभ्रूणों (zygotic embryos) से तैयार किये जाने वाले पादपों में अपेक्षित सफलता प्राप्त नहीं हुई है । अनेक काष्ठीय प्रजातियों में स्तम्भ कलिका से किये जाने वाले प्रवर्धन में सफलता केवल शिशु उत्तकों (young tissues) से ही प्राप्त हुई है । ऐसा माना जाता है कि अन्तःपात्रे संवर्धन हेतु चयनित किये जाने वाले वृक्ष अपेक्षाकृत अधिक आयु के हो जाते हैं जिसके कारण ऊतक संवर्धन हेतु दुरुहता (recalcitrance) प्रदर्शित करते हैं । इस समस्या को दूर करने के लिये निम्न उपायों को अपनाया जा सकता है -

- वयस्क वृक्ष में से सर्वाधिक शिशु ऊतकों (young tissues) का चयन करें ।
- कर्तोत्तकों को चयनित करने से पूर्व अपेक्षित भाग को कुछ हार्मोन जैसे साइटोकाइनिन (BAP) से उपचारित करना । अनेक प्रजातियों में बार-बार स्तम्भशीर्ष को साइटोकाइनिन युक्त माध्यम में पुनर्संवर्धित करने से ऊतक पुन: सक्रिय हो जाता है । उदाहरणस्वरुप - प्रूनस, यूकेलिप्टस, पाइनस तथा सिकोया ।

बोध प्रश्न

रिक्त स्थानों की पूर्ति कीजिये -

5. व्यापक संदूषकों को नष्ट करने के लिए प्रयोगशाला में.....का वाष्पीकरण करना चाहिये।
6. .....निक्षालन काष्ठीय पादपों के प्रवर्धन की एक प्रमुख समस्या है।
7. फिनॉल यौगिकों के आक्सीकरण उत्पाद पादपों के लिये.....होते है।
8. .....तथा.....आदि यौगिक पोषक माध्यम में मिलाने से आक्सीकरण धूसरता को दूर किया जा सकता है।

9. अधिक आयु के वृक्षों का अंत:पात्रे संवर्धन कठिन होता है क्योंकि इनमें.....पाई जाती है।

6.8 लवणता के प्रति अधिक प्रतिरोधकता वाले पादपों का प्रारुपण (Developing Salinity Resistant Plant Genotypes) :

वातावरण की प्रतिकूल परिस्थितियों का सामना करने के लिये पादपों में अनेक संरचनात्मक व कार्यात्मक सुधार हुये है। सामान्यत: पौधों को वातावरण में अनेक दबावों (stresses) जैसे - तेज प्रकाश, खरपतवारनाशी, ओजोन, ऊष्मा, हिमीकरण, बाढ़, लवणता, सूखा तथा भारी धातुओं (heavy metals) आदि के प्रभाव में वृद्धि करनी होती है । वर्तमान में अनेक ऐसे जीन जो अजैवीय दबावों (abiotic stresses) के लिये उत्तरदायी होते हैं, खोज लिये गये है । अनेक अजैवीय दबाव पादपों में जल की कमी (water deficit) का कारण होते हैं । पादपों में लवण प्रतिरोध बढ़ाने के लिये कोशिकाद्रव्य में सोडियम आयनों का इकट्ठा होना हानिप्रद होता है । अत: कोशिकाद्रव्य से आयनों का रिक्तिका में स्थानान्तरण पादपों में लवण प्रतिरोधकता को बढ़ाता है । टमाटर तथा कनोला (Tomato and Canola) के पादपों में जीन रूपान्तरण के फलस्वरूप उच्च-लवणीय वातावरण के प्रति प्रतिरोधकता विकसित की जा चुकी है । इसके लिये वैज्ञानिकों ने एरैबीडॉप्सिस (Arabiodopsis)के AtNHX1 एन्टीपोर्ट प्रोटीन जीन को इन पादपों में स्थानान्तरित करके लवण प्रतिरोधकता विकसित की । इसके अतिरिक्त AVP1 जीन की बहुत अधिक सक्रियता (overexpression) भी इन पादपों में लवणीय प्रतिरोधकता तथा शुष्क प्रतिरोधकता (Salt resistance and drought resistance) बढ़ाने में सहायक होता है ।

बोध प्रश्न

10. वातावरण की प्रतिकूल परिस्थितियों में पादपों को किन दबावों का सामना करना पड़ता है?

    .....

11. पादपों में जल की कमी का एक प्रमुख कारण बताइये ।

    .....

12. लवणता के प्रति उच्च प्रतिरोधकता उत्पन्न करने के लिये प्रभावी तकनीक का नाम बताइये ।

    .....

6.9 सारांश (Summary) :

प्रस्तुत अध्याय में जिन विषयों के बारे में वर्णन किया गया है वे पादप ऊतक संवर्धन तकनीक की प्रक्रिया व इसके उपयोगी पक्ष को समझने की दृष्टि से अत्यधिक महत्त्वपूर्ण है । पादप ऊतक संवर्धन की सम्पूर्ण प्रक्रिया को कुछ विशिष्ट तकनीकों के नाम से जाना जाता है जैसे - कायिक भ्रूणोद्भवन, सूक्ष्म प्रवर्धन, विषाणु रहित पादपों का निर्माण, परागकोष संवर्धन, अंगोद्भवन, प्रोटोप्लास्ट संवर्धन आदि । इन सभी में सूक्ष्म प्रवर्धन (क्लोनीय प्रवर्धन) सर्वाधिक उपयोगी तकनीक है जो आर्थिक महत्त्व के

अनेक पादपों के अंत : पात्रे संवर्धन एवं गुणन करने में विशिष्ट स्थान रखती है । सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से पुष्पीय पादपों, फल सब्जी पादपों, खाद्यान्न फसलों, औषधीय पादपों व विशेषकर वनीय वृक्षों के उत्पादन में व्यवसायिक सफलता प्राप्त हुई है । इस अध्याय में ऊतक संवर्धन की जिन रीतियों का वर्णन किया गया है उनसे पोषक माध्यम की रचना, कर्तोत्तकों का निर्जर्मीकरण पादप वृद्धि नियंत्रकों की भूमिका तथा संवर्धन स्थितियों आदि को आसानी से समझा जा सकता है ।

सूक्ष्म प्रवर्धन की तकनीक अनेक कारकों से प्रभावित होती है । सर्वाधिक प्रभावी कारक संदूषण है जो सूक्ष्म प्रवर्धन के परिणामों को अपेक्षानुरूप आने से रोकता है । चूँकि पादप सामग्री सीधे ही मिट्टी में उगाये हुये पौधों से एकत्र की जाती है अत संदूषण की संभावना अधिक रहती है । जीवाणु कवक, विषाणु आदि प्रमुख संदूषक है जो पोषक माध्यम पर तीव्र वृद्धि करके इसे पूर्णत: खराब कर देते हैं । इसके अतिरिक्त फिनॉल निक्षालन काष्ठीय पादपों के ऊतक संवर्धन की एक प्रमुख समस्या है । कर्तोत्तक तैयार करने के दौरान कोशिकायें प्रतिक्रिया स्वरूप फीनॉल यौगिकों का स्त्रावण आरम्भ कर देती है जिससे पोषक माध्यम धूसर अथवा काला हो जाता है । सक्रियकृत चारकोल तथा पॉलीविनायल पायरोलिडोन आदि यौगिक इस समस्या के निदान के रुप में प्रयुक्त किये जाते हैं । जीन प्रारुप दुरुहता वृक्ष प्रजातियों के ऊतक संवर्धन में एक सामान्य बाधा है । अधिक आयु वाले वृक्षों में यदि ऊतक संवर्धन का प्रयास किया जाये तो जीन प्रारुप दुरुहता के कारण अपेक्षित परिणाम नहीं मिलते हैं । ऐसी स्थिति में कर्तोत्तकों को संवर्धन से पूर्व पादप वृद्धि हार्मोनों से उपचारित करने से इनमें संवर्धन का प्रेरण कराया जा सकता है ।

ऊतक संवर्धन तकनीक कुछ विशिष्ट गुणों वाले पादपों की उन्नत प्रजातियों को विकसित करने में सफलतापूर्वक प्रयुक्त की जा रही है । अनेक पादप प्रजातियां उच्च लवणीय सान्द्रता के प्रति संवेदनशील होने के कारण ऐसी वातावरणीय स्थितियों में वृद्धि नहीं कर पाती है । ऊतक संवर्धन तकनीक ऐसी अनेक पादप प्रजातियों को विकसित करने में सफल हुई है जिनमें लवणता के प्रति अधिक प्रतिरोधकता पाई जाती है ।

6.10 बोध प्रश्नों के उत्तर

1. डाहलिया, गुलदाऊदी, गेंदा, जरबेरा, पिटूनिया आदि
2. बैंजाइल अमीनोप्यूरीन व नैफ्थीलीन एसिटिक अम्ल
3. प्ररोह शीर्ष
4. कैलस प्रेरण व सूक्ष्म प्रवर्धन, अपरिपक्व भ्रूण
5. फार्मेल्डिहाइड अथवा थायोबेण्डाजोल
6. फीनॉल
7. विषैले
8. एक्टिवेटेड चारकोल व पॉलीविनाइल पायरोलिडोन
9. जीन प्रारूप दुरुहता
10. तेज प्रकाश, ओजोन, खरपतवारनाशी, ऊष्मा, लवणता, बाढ़ आदि
11. अजैवीय दबाव
12. जीन रुपान्तरण उदा. - AtNH X 1 जीन

6.11 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question) :

1. सूक्ष्म प्रवर्धन से आप क्या समझते है ? पुष्पीय पादपों व खाद्यान्न फसलों की सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक का सविस्तार वर्णन कीजये ।
2. सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक की वन प्रजातियों के उत्पादन में उपयोगिता बताइये । किसी एक वन वृक्ष के सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक का उल्लेख कीजिये ।
3. निम्न पर लघु टिप्पणी लिखिये -
   क. फलोत्पादन पादपों में सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक की भूमिका
   ख. लवण प्रतिरोधकता
   ग. व्यापक संदूषण
4. वृक्षों के सूक्ष्म प्रवर्धन की प्रमुख समस्यायें क्या है? किन्हीं तीन समस्याओं व उनके निदान का उल्लेख कीजिये।
5. संक्षेप में उत्तर दीजिये -
   क. जीन प्रारुप दुरुहता
   ख. केले में सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक ।

6.12 शब्दावली (Glossary) :

– संवर्धन रीतियां	– Culture Protocols
– रोगकारक मुक्त	– athogen Free
– शाकीय	– Herbaceous
– काष्ठीय	– Woody
– सर्वांगी संदूषण	– Systemic Contaminants
– निक्षालन	– Leaching
– जीन प्रारुप दुरुहता	– Genotype Recalcitrance
– लवण प्रतिरोधकता	– Salt Resistance
– क्लोनीय प्रवर्धन	– Clonal Propagation
– पादप वृद्धि नियंत्रक	– Plant Growth Regulator

6.13 सन्दर्भ ग्रन्थ (Reference Books)

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी, लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पक्ति. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन दू प्लान्ट टिश्यू कल्चर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 7

सूक्ष्म प्रवर्धन के अनुप्रयोग

(Applications of Micropropagation)

इकाई की रूपरेखा

7.0 उद्देश्य

7.1 प्रस्तावना

7.2 सूक्ष्म प्रवर्धन बीज बनाम काय

7.3 सूक्ष्म प्रवर्धन के विविध अनुप्रयोग

7.3.1 विशिष्ट जीन प्रारूप, दुर्लभ, उन्नत तथा संकटग्रस्त पादपों का सूक्ष्म प्रवर्धन

7.3.2 आर्किड सूक्ष्म प्रवर्धन विधि

7.4 सूक्ष्म प्रवर्धित पादपों का पर्यानुकूलन तथा उनका मृदा स्थानान्तरण

7.5 सारांश

7.6 बोध प्रश्नों के उत्तर

7.7 अभ्यासार्थ प्रश्न

7.8 शब्दावली

7.9 संदर्भ ग्रन्थ

7.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप निम्नलिखित तथ्यों से भली-भांति परिचित हो पायेंगे

(i) सूक्ष्म प्रवर्धन की दृष्टि से बीज तथा कायिक ऊतकों का क्या महत्व है?

(ii) बीज तथा कायिक ऊतकों के प्रवर्धन में क्या अन्तर है ?

(iii) विशिष्ट जीन प्रारूप, उन्नत, दुर्लभ व संकटग्रस्त पादपों के संवर्धन की विधियां ।

(iv) आर्किड के सूक्ष्मप्रवर्धन की विधि ।

(v) सूक्ष्म प्रवर्धित पादपों का अनुकूलन तथा मृदा स्थानान्तरण ।

7.1 प्रस्तावना (Introduction) :

सूक्ष्म प्रवर्धन की तकनीक अनेक मायनों में उपयोगी सिद्ध हुई है । इस इकाई के अध्ययन के पूर्व आप सूक्ष्मप्रवर्धन की तकनीक को कार्यान्वित करने व प्रयोग की जानकारी प्राप्त कर चुके है । वास्तव में सूक्ष्म प्रवर्धन एक अनुप्रयुक्त तकनीक है जो विशिष्ट पादप प्रजातियों के तीव्र व उच्च गुणवत्ता युक्त गुणन की क्षमता रखती है । सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक से सजावटी पादपों, औषधीय पादपों, दुर्लभ व संकटग्रस्त पादपों का प्रवर्धन करना सुगम हो गया है । इतना ही नहीं, ऐसी पादप प्रजातियों जिनमें बीज द्वारा प्रजनन संभव नहीं है, में भी सूक्ष्म प्रवर्धन अत्यधिक सहायक सिद्ध हुई है ।

सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से तैयार किये जाने वाले पादप आनुवंशिक समरुपता प्रदर्शित करते हैं जिसके कारण इनका बाजार मूल्य अत्यधिक होता है । तीव्र गति से कम समय में पादपों को अधिक संख्या में तैयार करने के लिये यह विधि सर्वोत्तम है । पादप ऊतक सवर्धन से तैयार पौधों का मृदा स्थानान्तरण से पूर्ण अनुकूलन आवश्यक होता है, इस हेतु प्राय: पादपों को हरित आवास अथवा काँचघर में कुछ समय रखने के पश्चात् इन्हें मिट्टी में स्थानान्तरित कर दिया जाता है जहाँ ये पूर्ण विकसित पादप बन जाते हैं ।

7.2 सूक्ष्म प्रवर्धन : बीज बनाम काय (Micropropagation : Seed Versus Soma) :

सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक पादप ऊतक संवर्धन की सर्वाधिक उपयोग में लाई जाने वाली विधि है । वास्तव में इस विधि की सहायता से कर्तोत्तकों का प्रयोग करते हुए अंतःपात्रे स्थितियों में समान लक्षणों वाले असंख्य पादप प्रारुपों का उत्पादन किया जाता है । इस तकनीक को क्लोनीय प्रवर्धन (Clonal propagation) के रूप में भी जाना जाता है ।

सूक्ष्म प्रवर्धन हेतु काम में लिये जाने वाले कर्तोत्तक अतिविशिष्ट होते हैं । प्राय: शीर्ष प्ररोह, मूल प्ररोह, अक्षस्थ कलिकाओं तथा पार्श्व कलिकाओं का उपयोग सूक्ष्म प्रवर्धन हेतु कर्तोत्तक के रूप में किया जाता है । इन सभी कर्तोत्तकों में असंख्य विभज्योतक कोशिकायें होती है जो तेजी से विभाजित होकर नये प्ररोह (shoot) अथवा प्ररोह कलिका (shoot bud) का निर्माण करती हैं ।

पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले उक्त कर्तोत्तक प्राय: पौधघर में उगाये गय' पौधों अथवा विकसित पादपों के तरुण भागों से एकत्र किये जाते हैं । पौधघर में इन पादपों को बीजों से तैयार किया जाता है । कर्तोत्तकों का चयन करने के लिये बीजों से पौधे स्वस्थ वातावरण में उगाये जाते हैं । अनुकूल समय आने पर तथा उचित वृद्धि होने पर इन पादपों से पादप अंगों का चयन करके कर्तोत्तक प्राप्त किये जाते हैं ।

उच्च पादपों (आवृतबीजियों) में बीज का निर्माण अण्डाशय में स्थित बीजाण्ड (ovule) से होता है । यदि बीज की संरचना का अध्ययन किया जाये तो हम पायेंगे कि इसमें तीन प्रमुख भाग होते हैं - बीज चोल (seed coat) अथवा बीज आवरण, भ्रूण (embryo) तथा भ्रूणपोष (endospem) । नये पादप का निर्माण करने के लिये उक्त तीनों में से भ्रूण का होना आवश्यक होता है । वास्तव में बीज अंकुरण के समय भ्रूण का अंकुरण होता है जो प्रांकुर (plumule) तथा मूलांकुर (radicle) को जन्म देता है । प्रांकुर स्तम्भ, शाखाओं, पर्णों तथा पादप शीर्ष का निर्माण करता है जबकि मूलांकुर मूलतंत्र को विकसित करता है । बीजों से तैयार किये जाने वाले पादप पूर्ण पादप होते हैं अर्थात् इनमें मूलतंत्र, स्तम्भ तथा पत्तियाँ होते है।

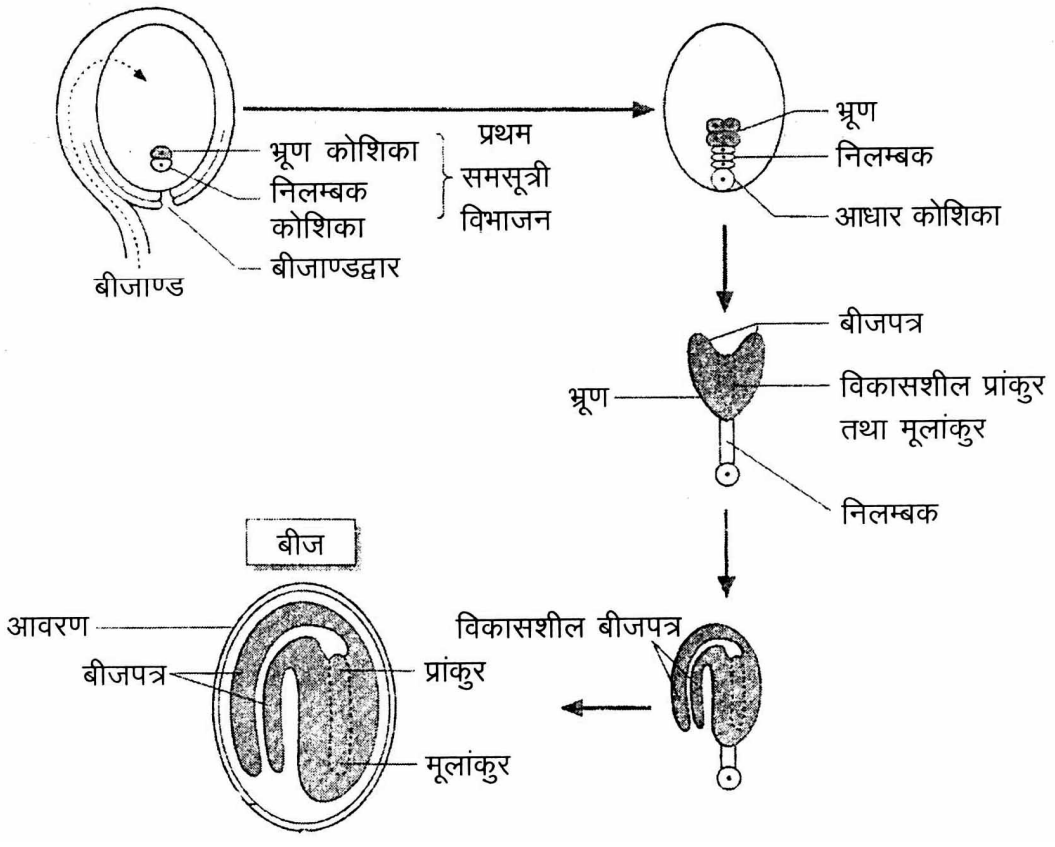
बीजों से तैयार किये जाने वाले पादपों का आनुवंशिक व्यवहार (hereditary behaviour) नर तथा मादा युग्मकों के संलयन से बनने वाले युग्मनज (zygote) पर आधारित होता है अर्थात् इनमें नर तथा मादा दोनों पितृको (parents) के आनुवंशिक लक्षणों का समावेश होता है । यह भी उल्लेखनीय है कि एक बीज केवल एक पादप का निर्माण करने में सक्षम होता है । अर्थात् बड़ी संख्या में पादपों को उगाने के लिये उतने ही बीजों की आवश्यकता होती है । प्राय: ऐसा देखा जाता है कि बीजों से उत्पन्न की जाने वाली फसलों में विभिन्नतायें होती हैं अर्थात् समस्त पादप समरूप नहीं होते हैं । इसके लिये

नर तथा मादा पितृको का आनुवंशिक समायोजन तथा जीनों की प्रभावी व अप्रभावी भूमिका उत्तरदायी होती है । पादप ऊतक संवर्धन की व्यवसायिक उपादेयता की दृष्टि से ऐसे पादप समूह अनुपयोगी होते हैं जिनमें विभिन्नतायें अधिक हों । वास्तव में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक की सफलता को इस बात से आँका जा सकता है कि इससे एकरूप अथवा क्लोनीय पादप बनते हैं अथवा नहीं । सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक एक ऐसी ही तकनीक है जिसके द्वारा असंख्य क्लोन (clones) तैयार किये जा सकते हैं । इन क्लोनों से एकरूप अर्थात् समान आनुवंशिक लक्षणों वाले पादपों की संतति तैयार की जा सकती है ।

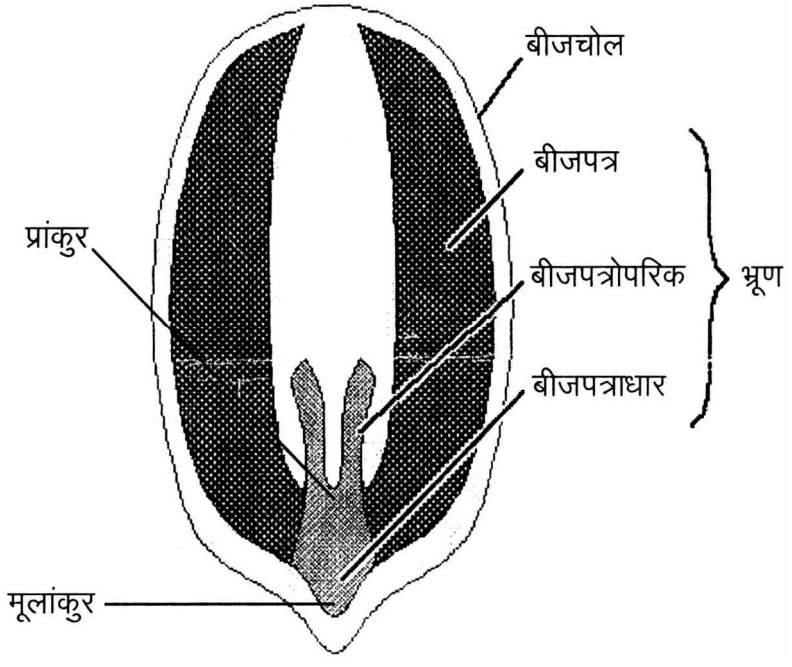
सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से प्राप्त पादपों की आर्थिक उपयोगिता बढ़ाने में इस हेतु प्रयोग किये गये कर्तोत्तकों की कोशिकाओं का महत्त्वपूर्ण योगदान है । प्राय: कर्तोत्तक की कोशिकायें कायिक कोशिकायें (somatic cells ; Gr. Soma = body, काया) होती हैं । चूँकि इन कायिक कोशिकाओं का संख्यात्मक गुणन समसूत्री विभाजन के फलस्वरूप होता है अत: इनका जीनीय संयोजन अनेक समसूत्री विभाजनों के पश्चात् भी पूर्ववत् रहता है । यहाँ यह बात ध्यान देने योग्य है कि पादप शरीर में युग्मको, युग्मनज तथा भ्रूणपोष (Gametes, Zygote, and Endosperm) को छोड़कर शेष सभी कोशिकाओं का आनुवंशिक संगठन एक समान होता है । इसके साथ ही, इन सभी कोशिकाओं तथा पादप अंगों का निर्माण करने वाली कोशिकाओं तथा ऊतकों की उत्पत्ति भ्रूणोद्भवन तथा इसके पश्चात् अंगोद्भवन से होती है । संरचनात्मक तथा कार्यात्मक विभेदन की इस प्रक्रिया में समसूत्री विभाजनों की महत्त्वपूर्ण भूमिका होती है ।

इस प्रकार जहाँ एक ओर बीजों से उगाये जाने वाले पादपों में विभिन्नतायें हो सकती है वहीं कायिक कोशिकाओं (ऊतकों) से उत्पन्न होने वाले पादप आनुवंशिक लक्षणों में समानता प्रदर्शित करते हैं । आइये सूक्ष्मप्रवर्धन की दृष्टि से बीज बनाम काय का तुलनात्मक आकलन करते हैं ।

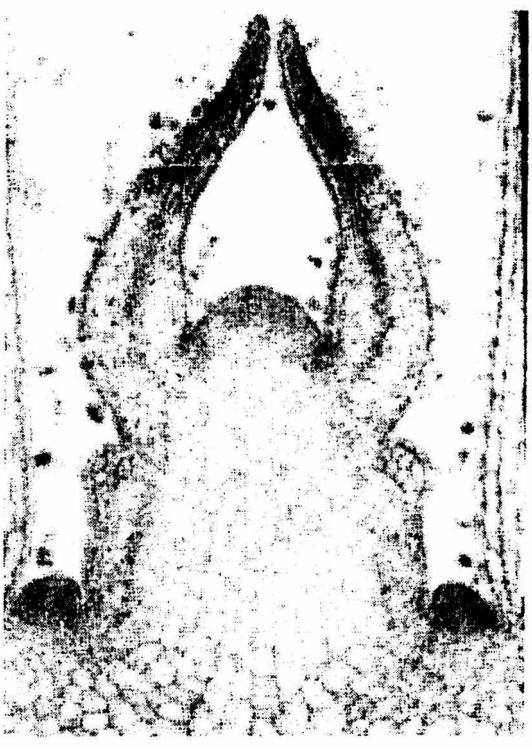
	बीज (Seed)	**काय (Soma)**
1.	बीज का विकास बीजाण्ड से होता है ।	कायिक कोशिकायें भ्रूण में विदलन के फलस्वरूप बनती हैं।
2.	बीज में स्थित भ्रूण का निर्माण युग्मनज से होता है ।	भ्रूण में स्थित प्ररोह तथा मूल शीर्ष पादपों के भाग-स्तम्भ तथा मूल तंत्र का निर्माण करते हैं ।
3.	युग्मनज में नर तथा मादा पितृको के आनुवंशिक लक्षणों का समावेश होता है।	चूँकि भ्रूण की कोशिकाओं में समसूत्री विभाजन होते हैं अत: कायिक कोशिकाओं का आनुवंशिक संगठन पूर्ववत् रहता है।
4.	एक बीज से एक ही पादप उगाया जा सकता है ।	पादप शरीर के अंगों (प्ररोह शीर्ष, कलिका) से असंख्य पादप बनाये जा सकते हैं ।
5.	किसी बीज समूह से उत्पादित अनेक पादप आपस में विभिन्नताये प्रदर्शित करते हैं ।	चूँकि कायिक ऊतकों से निर्मित पादपों का आनुवंशिक संगठन पूर्ववत् रहता है अत: इनमें विभिन्नताये नहीं होती हैं ।
6.	बीजों से उत्पन्न संतति को क्लोन नहीं कहा जा सकता हैं।	कायिक ऊतकों से निर्मित पादप आपस में क्लोन कहलाते हैं ।



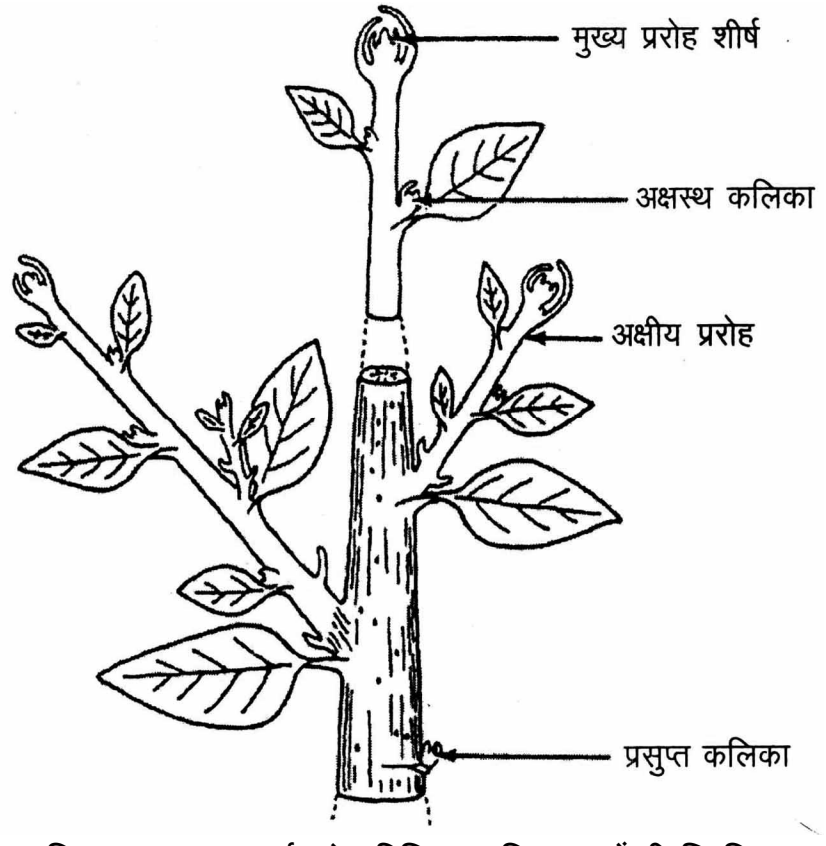
चित्र 7.1 भ्रूण कोशिका से भ्रूण तथा पूर्ण बीज बनने की विभिन्न प्रावस्थायें



चित्र 7.2 बीज के विभिन्न भाग



चित्र 7.3 : शीर्ष प्ररोह की अनुदैध्र्य काट का चित्र



चित्र 7.4 : सूक्ष्म प्रवर्धन हेतु विभिन्न कायिक ऊतकों की स्थिति ।

बोध प्रश्न

1. बीज तथा कायिक कोशिकाओं से बनने वाले पादपों में दो अन्तर बताइये ।

   .....

2. बीजों से उगने वाले पादपों का आनुवंशिक व्यवहार कैसा होता है?

   .....

3. बीज के प्रमुख अंगों के नाम बताइये ।

   .....

7.3 सूक्ष्म प्रवर्धन के विविध उपयोग (Various Applications of Micropropagation) :

अंतःपात्रे स्थितियों में पादप कोशिका व ऊतक संवर्धन तकनीकों के विकास के परिणामस्वरूप अनुप्रयुक्त पादप विज्ञान के क्षेत्र में उल्लेखनीय सफलता प्राप्त हुई है । अनेक पादपों की विशिष्ट प्रजातियों के लिये ऊतक संवर्धन रीतियां (protocols) विकसित की जा चुकी हैं जिन्हें सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से वृहद् स्तर पर प्रयोगशाला में उत्पादित किया जा रहा है ।

अनुप्रयुक्त सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीकों का सर्वाधिक उपयोग विशिष्ट, दुर्लभ तथा संकटग्रस्त प्रजातियों के संरक्षण व उत्पादन में किया जा रहा है । वास्तव में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक प्राकृतिक रूप से प्रजनन में अक्षम पादपों के संरक्षण व प्रवर्धन के सशक्त विकल्प के रूप में सामने आई है । अंतःपात्रे स्थितियों में पादप जननद्रव्य संरक्षण के लिये इस तकनीक का उपयोग किया जा रहा है । इसके अतिरिक्त दीर्घकालीन निम्न ताप संरक्षण विधि की सहायक तकनीक के रूप में भी ऊतक संवर्धन का उपयोग किया जा रहा है । आइये सूक्ष्म प्रवर्धन के इन विशिष्ट अनुप्रयोगों को विस्तार से जानने का प्रयास करते हैं ।

7.3.1 विशिष्ट जीन प्रारूप, दुर्लभ, उन्नत तथा संकटग्रस्त पादप प्रजातियों का सूक्ष्म प्रवर्धन (Micropropagation of Specific Genotypes, Rare, Improved and Endangered Plant Species)

भारत फसली पादपों की जैव विविधता तथा इनकी उत्पत्ति का प्रमुख केन्द्र है । वर्तमान में बहुमूल्य पादप सम्पदा का तेजी से ह्रास हो रहा है क्योंकि इनके प्राकृतिक आवासों पर अत्यधिक दबाव पड़ रहा है । ऐसी स्थितियों में इनके त्वरित संरक्षण की आवश्यकता है । भारतवर्ष में दुर्लभ व संकटग्रस्त पादप प्रजातियों के सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से संरक्षण का कार्य सन् 1980 के दशक में प्रारम्भ हुआ । इसके लिये अनेक शोध केन्द्रों की स्थापना की गई, जिनमें राष्ट्रीय वानस्पतिक शोध संस्थान, लखनऊ प्रमुख है । अतःपात्रे पादप संरक्षण के कार्य को और अधिक गति प्रदान करने के लिये पादप जीनीय श्रोतों के लिये राष्ट्रीय ब्यूरो (NBPGR) की स्थापना की गई जो विशेष रूप से पादप संरक्षण को समर्पित है । इस केन्द्र ने भारत सरकार के जैवप्रौद्योगिकी विभाग की सहायता से अनेक कार्यक्रम संचालित किये हैं जिनके परिणामस्वरूप अंतःपात्रे पादप संरक्षण में उल्लेखनीय उपलब्धियां प्राप्त हुई हैं ।

ऐसा अनुमान है कि पूरे विश्वभर में लगभग 2,70,000 से अधिक आवृतबीजी पादप प्रजातियां अस्तित्व में हैं जिनमें से लगभग 34,000 प्रजातियों को संकटग्रस्त (endangered) प्रजातियों की श्रेणी में रखा गया है । अनेक पादप प्रजातियों का अस्तित्व समाप्त होने के स्तर पर आ चुका है जिसके कारण पादप सम्पदा के विलुप्त हो जाने का खतरा भी आसन्न प्रतीत हो रहा है । इस हानि को रोकने के लिये अनेक विधियों का प्रयोग किया जा रहा है जिनमें अंतःपात्रे प्रवर्धन तकनीक एक महत्वपूर्ण रीति है ।

सूक्ष्म प्रवर्धन एक सामान्य शब्द है जो अंत: पात्रे तकनीकों का उपयोग करके चयनित जननद्रव्य के प्रवर्धन को स्पष्ट करता है । यद्यपि सूक्ष्मप्रवर्धन एक जटिल तथा बहु विधि तकनीक है इसके प्रमुख चरणों को निम्न बिन्दुओं के रूप में प्रकट किया जा सकता है ।

शून्य अवस्था ('0' Stage) – तैयारी अवस्था, उचित जननद्रव्य का चयन ।

प्रथम अवस्था (I Stage) – स्थापन अवस्था, शुद्ध व जीवित संवर्धनों का उत्पादन ।

द्वितीय अवस्था (II Stage) – गुणन अवस्था, प्रवर्धन पिंडों की संख्या में वृद्धि ।

तृतीय अवस्था (III Stage) – पादप उत्पादन, प्राकृतिक स्थितियों में स्थानान्तरण हेतु पर्याप्त माप व गुणवत्ता के जननद्रव्य का निर्माण करना।

चतुर्थ अवस्था (IV Stage) – प्राकृतिक स्थितियों (in vivo conditions) में पादपों का स्थापन, काँचघर (glass house) स्थितियों में पादप अनुकूलन

अंतःपात्रे प्रवर्धन तकनीक

अनेक संकटग्रस्त पादप प्रजातियों को सफलतापूर्वक बीज अथवा अन्य माध्यमों से प्रवर्धित कराया जा सकता है, परन्तु ऐसी अनेक पादप प्रजातियां हैं जिन्हें परम्परागत अथवा प्रचलित शस्य विधियों से प्रजनित नहीं कराया जा सकता है। दुर्लभ तथा संकटग्रस्त पादपों के अंतःपात्रे संवर्धन की दिशा में प्रथम प्रयास रीयल बोटेनिक गार्डन्स, केव (Kew), इंग्लैण्ड में सूक्ष्मप्रवर्धन इकाई की स्थापना के रूप में किये गये । यहाँ सन् 1974 में एक पादप ऊतक संवर्धन इकाई की स्थापना की गई । तब से आज तक असंख्य पादप प्रजातियों के सूक्ष्म प्रवर्धन की सफल विधियां विकसित की जा चुकी है ।

सारिणी 7.1 में कुछ विशिष्ट, दुर्लभ तथा संकटग्रस्त प्रजातियों के सूक्ष्मप्रवर्धन का विवरण दिया गया है ।

क्लोनीय प्रवर्धन पादप ऊतक संवर्धन को एक उन्नत तकनीक है जो संरक्षण हेतु पादप सामग्री के तीव्र गुणन के लिये उपयोग में ली जाती है । इस तकनीक का उपयोग करते हु ये अनेक मूल्यवान तथा दुर्लभ प्रजातियों का अंतःपात्रे प्रजनन (NBPGR) की प्रयोगशालाओं में सफलतापूर्वक कराया जा रहा है । सूक्ष्मप्रवर्धन तकनीक में पोषक माध्यम तथा वृद्धि नियंत्रकों की भूमिका प्रमुख होती है । इसके साथ ही सूक्ष्मप्रवर्धन रीति (micropropagation protocol) को एक ही प्रजाति के अन्य जीनप्रारूपों के साथ भी उत्कृष्ट परिणामदायक होना चाहिये । दुर्भाग्य से अभी तक विकसित की गयी अधिकांश सूक्ष्मप्रवर्धन रीतियाँ कुछेक जीन प्रारूपों पर ही लागू होती हैं । पोषक माध्यम का चयन इन उद्देश्यों को ध्यान में रखकर किया जाना चाहिये जिससे यह विधि अधिकाधिक जीन प्रारूपों पर प्रयोग की जा सकें । अध्ययनों से यह ज्ञात हु आ है कि अधिकांश पादपों के सूक्ष्म प्रवर्धन के लिये मुराशिगे तथा स्कूग

(Murashige and Skoog, 1962) पोषक माध्यम का प्रयोग किया गया है जिसमें कुछ वृद्धि हॉर्मोन जैसे-BAP, Kinetin, IAA, NAA आदि का प्रेरण दिया गया है।

बीज द्वारा अंतःपात्रे संवर्धन

यदि संकटग्रस्त प्रजातियों के पादपों के बीज उपलव्य हों तो सर्वाधिक जीनप्रारूपीय विविधता को बनाये रखने हेतु इनका उपयोग प्रवर्धन हेतु करना चाहिये । अधिकांश संकटग्रस्त प्रजातियों में बीज बनते हैं परन्तु कुछ मामलों में इनकी संख्या कम होती है अथवा इनका अंकुरण कठिन होता है । जब बीज कम संख्या में उपलब्ध होते हैं तो इन्हें विसंक्रमित स्थितियों में अंकुरित करवाकर निर्जर्म बीजांकुर तैयार कर लिये जाते हैं जिनसे प्ररोह शीर्ष तथा पर्वसंधि खण्ड (कर्तोत्तक) प्राप्त करके सूक्ष्मप्रवर्धन कराया जाता है । अनेक प्रजातियों में इस युक्ति का प्रयोग किया गया है जिनमें जेन्टियाना ल्यूटिया (Gentiana Lutea), लिमोनियम प्रजाति (Limonium spp.) तथा निपेन्थिस खासियाना (Nepenthus Khasiana) आदि प्रमुख है ।

सारणी 7.1 : कुछ विशिष्ट दुर्लभ व संकटग्रस्त प्रजातियों का सूक्ष्मप्रवर्धन

क्रमांक	प्रजाति	कुल	प्रवर्धन विधि/कर्तोत्तक
1.	ऐढेटोडा बेडोमाई	एकेन्थेसी	प्ररोह शीर्ष संवर्धन
2.	राओल्फिया माइक्रैन्था	एपोसायनेसी	प्ररोह शीर्ष, पर्वसंधि खण्ड
3.	राओल्फिया सर्पेन्टाइना	एपोसायनेसी	पर्वसंधि खण्ड
4.	राइटिया टोमेन्टोसा	एपोसायनेसी	पर्वसंधि खण्ड
5.	ऐरिस्टोलोकिया इण्डिका	एपोसायनेसी	प्ररोह शीर्ष तथा पर्वसंधि
6.	सॉसूरिया लप्पा	एस्टरेसी	प्ररोह शीर्ष प्रवर्धन
7.	बेदुला उबेर	बेटुलेसी	कलिकायें
8.	ऐनोजीसस रोटन्डिफोलिया	कॉम्ब्रिटेसी	सूक्ष्म प्रवर्धन
9.	ट्राइकोपस जीलानिकस	डायोस्कोरियेसी	सूक्ष्म प्रवर्धन
10.	टैरोकारपस मारसूपियम	फैबेसी	सूक्ष्म प्रवर्धन
11.	ट्राईफोलियम स्टोलनीफेरम	फैबेसी	प्ररोह शीर्ष
12.	जेन्टियाना कुरु	जेन्टियेनेसी	पर्वसंधि खण्ड
13.	कोलियस फोर्सकोहलाई	लैमियेसी	पर्वसंधि खण्ड
14.	एलियम ट्यूबरोसम	लिलियेसी	अपस्थानिक कलिकाये
15.	क्लोरोफायटम बोरीविलियम	लिलियेसी	प्ररोह आधार सूक्ष्म प्रवर्धन
16.	वुडफोर्डिया फ्रूटीकोसा	लायथरेसी	प्ररोह शीर्ष, पर्वसंधि
17.	निपेन्थिस खासियाना	निपेन्थेसी	सूक्ष्म प्रवर्धन
18.	डैन्ड्रोबियम लिन्डलेई	ऑर्किडेसी	बीज अंकुरण
19.	वैन्डा कोरुलिया	ऑर्किडेसी	पर्ण आधार, अपस्थानिक कलिकायें
20.	वनीला वाकेरियाई	ऑर्किडेसी	पर्वसंधि खण्ड

बिना बीज के अंतःपात्रे संवर्धन

कुछ संकटग्रस्त प्रजातियों में बीज द्वारा प्रवर्धन संभव नहीं हो पाता है । बीज अंकुरण क्षमता में कमी इसका एक प्रमुख कारण है । दूसरी ओर कुछ ऐसे पादप भी हैं जिनमें बहुत कम अथवा नगण्य बीजों का निर्माण होता है ऐसे अधिकांश मामलों में जहाँ बीज उपलब्ध नहीं होते है, प्रवर्धन हेतु अंतःपात्रे स्थितियाँ एक सशक्त विकल्प के रूप में प्रयोग की जा रही है । इनमें सर्वाधिक प्रचलित विधियाँ हैं प्ररोह शीर्ष तथा पर्वसंधि खण्ड संवर्धन तकनीक । इन तकनीकों के परिणामस्वरूप हरित आवास में उगाये गये पादपों से अक्षस्थ कलिकाओं का प्रेरण होता है जो नये पादपों के रूप में विकसित कराई जाती है । इस तकनीक को वरीयता इसलिये दी जाती है क्योंकि इन पादपों में जीनीय परिवर्तन अत्यल्प होते हैं अर्थात् एकरूप पादपों का निर्माण होता है । अनेक दुर्लभ प्रजातियों के सूक्ष्म प्रवर्धन में प्रायः पूर्वनिर्मित विभज्योतक का ही प्रयोग किया जाता है क्योंकि इनमें जीनीय स्थिरता पाई जाती है । परन्तु कुछ ऐसी भी पादप प्रजातियाँ होती हैं जिनमें कलिकायें उपलब्ध नहीं होती है अथवा इनका संवर्धन अत्यधिक कठिन होता है । ऐसी स्थितियों में भी अंगोद्भवन अथवा भ्रूणोद्भवन (organogenesis or embryogenesis) के द्वारा ऊतक संवर्धन कराकर पादप प्रजनन कराया जा सकता है।

बोध प्रश्न

4. सूक्ष्म प्रवर्धन के विभिन्न चरणों के नाम लिखिए ।

   .....

5. किन्हीं दो पादपों के नाम बताइये जिन्हें सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से तैयार किया जा रहा है ।

   .....

6. जननद्रव्य का संरक्षण किस विधि से किया जा सकता है ?

   .....

7. अंतःपात्रे पादप संरक्षण का प्रमुख केन्द्र कौन सा है?

   .....

7.3.2 आर्किड सूक्ष्मप्रवर्धन (Micropropagation of Orchids)

आर्किडस विशिष्ट तथा दुर्लभ प्रजाति के सजावटी पादप हैं । इनका प्राकृतिक प्रवर्धन अत्यधित) कठिन है क्योंकि इनमें बीज द्वारा प्रजनन बहुत कम होता है । वास्तव में इनके बीज आकार में बहुत छोटे होते हैं तथा इनमें अंकुरण क्षमता कम होती है । अंतःपात्रे स्थितियों में बीज अंकुरण के अनेक प्रयास किये गये हैं जिनमें उल्लेखनीय सफलता प्राप्त हुई है । आर्किडस के लिये अंतःपात्रे क्लोनीय प्रवर्धन इकलौती व्यवसायिक विधि है जिसकी सहायता से अनेक आर्किड प्रजातियों का सफल संवर्धन कराया जा रहा है ।

सर्वप्रथम **मोरल** (Moral, 1960) ने आर्किडस में क्लोनीय प्रवर्धन तकनीक की उपयोगिता को प्रायोगिक परीक्षणों की सहायता से प्रदर्शित किया । इसके बाद से ही इस तकनीक का कुछ विशिष्ट आर्किड प्रजातियों के व्यवसायिक स्तर पर संवर्धन व उत्पादन हेतु उपयोग किया जाता है । आइये ऊतक संवर्धन तकनीक से आर्किडस के सूक्ष्मप्रवर्धन को विस्तार से जानने का प्रयास करते हैं ।

कर्तोत्तक

कर्तोत्तक स्वस्थ पादप के कायिक प्ररोहों, तरुण पुष्पक्रम, पत्तियों तथा जड़ों से लिया जा सकता है । प्राय: शीर्षस्थ तथा अक्षस्थ कलिकाओं को वरीयता दी जाती है । शीर्ष कलिका कर्तोत्तक में प्राय: शीर्ष विभज्योतक तथा 3-4 पर्वसंधिया होती है जिन पर पर्ण लगे होते हैं । अक्षस्थ कलिका कर्तोत्तक में पर्वसंधि तथा इससे संलग्न अक्षस्थ कलिका सम्मिलित रहते है । मूल कर्तोत्तकों का माप लगभग 3-5 मिली.मी. होता है जिसमें मूलशीर्ष शामिल है ।

आर्किड्स में प्ररोह प्रेरण (Shoot induction) की विधि

यह निम्न विधि से प्रेरित कराया जा सकता है -

- एक नवोद्भिद प्ररोह शीर्ष का चयन करें जिसकी पत्तियां फैली हुई नहीं हों । इस प्ररोह को एक रेजर अथवा ब्लेड की सहायता से प्रोटोकॉर्म के पास से काट लें ।
- प्ररोहों से सभी शल्कपर्णों को हटाकर इन्हें जल से लगभग 30 मिनट तक धो लें ।
- अब समस्त शल्क पर्णों को चिमटी की सहायता से उखाड़ कर हटा दें । शल्क पर्णों को हटाने पर प्रथम अक्षस्थ कलिका दिखाई देने लगेगी । यह सुनिश्चित कर लें कि पर्वसंधि से प्रत्येक पत्ती को हटा लिया है ।
- घर में प्रयोग किये जाने वाले ब्लीच के 15% घोल (जिसमें ट्वीन-20 मिलाया हुआ हो) से लगभग 15 मिनट तक हिलाते हुये विसंक्रमित करें ।
- निर्जर्म आसुत जल से धो लें ।
- एक निर्जर्म चिमटी की सहायता से प्ररोह शीर्ष को ढकने वाली 2-3 पत्तियों को छोड़कर शेष पत्तियों को हटा दें ।
- घरेलू ब्लीच के 10% घोल से लगभग 10 मिनट तक पुन: विसंक्रमित करें ।
- निर्जर्म आसुत जल से धो लें ।
- शीर्षस्थ प्ररोह कर्तोत्तक हेतु प्ररोह शीर्ष से होते हुये एक अनुप्रस्थ काट लगाते हुये खण्ड अलग कर लें । इसमें शीर्ष विभज्योतक तथा 2-3 पर्वसंधि होने चाहिये ।
- इसी प्रकार सावधानीपूर्वक काटते हुये अक्षस्थ प्ररोह कर्तोत्तक अलग कर लें ।
- उपरोक्त दोनों कर्तोत्तको को निर्जर्म पोषक माध्यम - नुडसन (1946), जिसमें वृद्धि नियंत्रक तथा अन्य कार्बनिक पोषक तत्व मिले हुये हों, पर संवर्धित करें । इस माध्यम में 15% नारियल पानी भी मिलाया जा सकता है जिससे वृद्धि अच्छी होती है । प्राय: तरल माध्यम पर संवर्धन करना चाहिये ।
- संवर्धनों को वृद्धि हेतु एक संवर्धन कक्ष में घूर्णित शेकर (rotary shaker) पर रख दें ।
- यदि तरल अथवा ठोस माध्यम के रंग में कुछ परिवर्तन दिखाई दे तो कर्तोत्तकों को शीघ्र नये माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें ।
- लगभग 4-6 सप्ताह के पश्चात् वृद्धि दिखाई देने लगती है ।

गुणन तथा मूलप्रेरण

- तरल संवर्धनों के गुणन हेतु समान संघटन काले पोषक माध्यम पर, पुनर्संवर्धित कर दें । कुछ समय पश्चात् प्रोटोकॉर्म रूपी पिण्डों अथवा कलिकाओं का प्रस्फुटन प्रारम्भ हो जायेगा ।

- ठोस माध्यम पर गुणन हेतु संवर्धनों में से प्रोटोकॉर्म रूपी पिण्डों तथा कलिकाओं को अलग करके समान संघटन वाले पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें ।
- मूल प्रेरण हेतु प्ररोहों को शर्करायुक्त ठोस पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें । यदि पोषक माध्यम में पिसा हुआ कच्चा केला 50-100 ग्राम/ली. के अनुपात में मिला दिया जाये तो मूल प्रेरण अच्छा होता है ।

हरित आवास में स्थापन

- जब जड़ों की लम्बाई लगभग 1-2 cm. हो जाये तो इन्हें संवर्धन पात्र से बाहर निकाल लें । सावधानीपूर्वक धोकर अगार हटा दें तथा वृद्धि हेतु उचित कृत्रिम मिश्रण पर आरोपित कर दें ।
- गमलों को कम प्रकाश परन्तु उच्च आर्द्रता वाली स्थितियों में कुछ सप्ताह तक वृद्धि होने के लिये रखें ।
- जब तेजी से जड़ों की वृद्धि होने लगे तो गमलों को तीव्र प्रकाश में रख दें । पूर्ण विकसित होने तक प्रेक्षण करते रहें तथा समय-समय पर पोषण व जल आवश्यकताओं की पूर्ति करते रहें ।

7.4 सूक्ष्मप्रवर्धित पादपों में पर्यानुकूलन तथा उनका मृदा स्थानान्तरण (Hardening off of Micropropagated Plants and Transfer to Soil) :

पादप ऊतक संवर्धन एक जटिल प्रक्रिया है जो विभिन्न चरणों में सम्पन्न होती है । इस तकनीक से प्राप्त किये गये शिशु पादपों की वृद्धि वातावरण की परिस्थितियों में कराई जाती है जहाँ वे पूर्ण विकसित पादपों के रूप में अपना जीवन चक्र पूर्ण करते हैं । ऊतक संवर्धन द्वारा विकसित होने वाले पादप अत्यधिक संवेदनशील व नाजुक होते हैं । इन्हें विशेष रूप से भोजन संश्लेषण करने की आवश्यकता नहीं होती है क्योंकि पोषक माध्यम से इन्हें पूर्ण पोषण मिलता रहता है । दूसरी ओर नियंत्रित परिस्थितियों में वृद्धि करते रहने के कारण ये वातावरण की कठिन परिस्थितियों के अभ्यस्त नहीं होते हैं । ऐसी परिस्थितियों में यदि उचित देखभाल नहीं की जाये तो ऊतक संवर्धित पादप नष्ट हो जाते हैं अथवा उनकी मृत्युदर बहुत अधिक होती है । शिशु पादपों को हरित आवास में रखकर वृद्धि करवाना एक कठिन कार्य है । हरित आवास में नमी की स्थिति में गिरावट तथा उच्च प्रकाश तीव्रता पौधों के लिये घातक होती है ।

पर्यानुकूलन का प्रारम्भ उसी समय करना चाहिये जब पादप अंतःपात्रे स्थितियों में हों । पर्यानुकूलन में एक बड़ी बाधा जल हानि की होती है । जब एक ऊतक संवर्धित पादप मिट्टी में प्रत्यारोपित किया जाता है तो कम आर्द्रता के प्रति अनुकूल न होने तक रंध्र खुले रहते हैं । ऊतक संवर्धित पादपों में संरचनात्मक व वाष्पोत्सर्जन परिवर्तनों के अतिरिक्त इन पादपों में प्रकाश संश्लेषण की सम्पूर्ण प्रक्रिया भी भ्रमित होती है । पौधे प्रकाश संश्लेषण करने के बजाय पूरी तरह से पोषण के लिये माध्यम में मिलाई गई शर्करा (sucrose) पर निर्भर रहते हैं । अत: CO_2 का न्यूनतम उपयोग करते हैं । इन पादपों में प्रकाश संश्लेषण को प्रेरित करने के लिये संवर्धन पात्रों में CO_2 का प्रवेश कराया जा सकता है । यदि CO_2 की सांद्रता बढ़ाई जाती है तो इसका अधिकतम समायोजन करने के लिये प्रकाश तीव्रता को बढ़ाया जाना भी आवश्यक है । सामान्य पादपों की तुलना में ऊतक संवर्धित पादप अन्य अनेक

विषमताओं को प्रदर्शित करते हैं जैसे - क्षीण मूल तथा स्तम्भ, क्षीण पत्तियां, अल्पविकसित खम्म ऊतक स्तर, दृढ़ोत्तक की कम मात्रा, अविकसित संवहन ऊतक तथा कम पर्णहरिम ।

कुछ प्रजातियों में ऊतक संवर्धन से उत्पादित पौधों में जड़ों को प्रेरित करवाना आवश्यक होता है । वास्तव में सूक्ष्म प्रवर्धन (अंगोद्भवन/प्ररोह कलिका द्वारा) के फलस्वरूप बनने वाले पादपों में जड़ें नहीं होती है, इनमें अपस्थानिक जड़ों का प्रेरण कराया जाता है । कुछ परिस्थितियों में आर्द्रता में कमी लाने के लिये सिलिका जेल के छोटे-छोटे थैलों को संवर्धन पात्र में लटका दिया जाता है जिससे आर्द्रता में कमी आ जाती है । एक अन्य विकल्प के रूप में पात्र के ढक्कन को थोड़ा ढीला छोड़ा जा सकता है जिससे जल वाष्प अधिक मात्रा में बाहर निकाल कर आर्द्रता में कमी लाई जा सकती है । परन्तु अधिक समय तक ढक्कन ढीला रखने से संदूषण उत्पन्न होने का खतरा हो सकता है । फिल्टरयुक्त ढक्कन का प्रयोग भी एक अन्य प्रभावी विधि है जिसमें ऐच्छिक वायु आदान-प्रदान के द्वारा सापेक्ष आर्द्रता में कमी लाई जा सकती है । पादप वृद्धि हार्मोन्स जैसे - ऑक्सिन तथा साइटोकाइनिनस आदि मूल प्रेरण को तेजी से प्रेरित करते हैं ।

ऊतक संवर्धित पादपों का संवर्धन पात्र से हरित आवास में स्थानान्तरण एक रोचक प्रक्रिया है । सर्वप्रथम शिशु पादपों को संवर्धन पात्र से निकालकर सावधानीपूर्वक अगार साफ कर लेना चाहिये । इसके बाद पादपों को एक प्लान्टर ट्रे में कृत्रिम मिट्टी मिश्रण भरकर रोपित कर देना चाहिये । आरोपण के पश्चात् इन पादपों को आच्छादित स्थान पर उच्च आर्द्रता की स्थितियों में रख देना चाहिये । लगभग दो-से-चार सप्ताह पश्चात्, टैन्ट को थोड़ा खोल दें जिससे आर्द्रता में कुछ कमी आयेगी तथा पौधों में नई पत्तियां निकल आयेंगी । यदि कम स्थान पर हरित आवास स्थितियाँ उपलब्ध करनी हों तो आर्द्रकर (Humidifiers) सस्ते व अच्छे विकल्प हो सकते हैं । प्राय : ऊतक संवर्धित पादपों को मिट्टी में स्थानान्तरित करने के लिये गमलों का प्रयोग करना सुगम होता है क्योंकि इन्हें आवश्यकतानुसार अन्यत्र ले जाया जा सकता है ।

बोध प्रश्न

8. आर्किड के सूक्ष्म प्रवर्धन की शुरूआत किसने की ?

   .....

9. सूक्ष्म प्रवर्धन में पादपों का निर्माण किस परिपथ से होता हे ?

   .....

10. सूक्ष्म प्रवर्धित पादपों में मूलप्रेरण हेतु उत्तरदायी पादप वृद्धि नियंत्रकों के नाम बताइये।

    .....

7.5 सारांश (Summary) :

सूक्ष्म प्रवर्धन अनुप्रयुक्त प्रायोगिक विज्ञान की एक महत्वपूर्ण विधा है । यह तकनीक प्रायोगिक दृष्टि से जितनी रोचक है उतनी ही उपयोगी भी है । अनेक पादप प्रजातियाँ जैसे - ऐढेटोडा बेडोमाई, राओल्फिया सर्पेन्टाइना, जेन्टियाना कुरु, एलियम ट्यूबरोसम, वैण्डा कोरुलिया तथा वनीला आदि सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक से उगाई जा रही है । सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक आर्थिक महत्त्व के पौधों जैसे - आर्किड तथा वनीला एवं दुर्लभ व संकटग्रस्त प्रजातियों के गुणन में सफलतापूर्वक प्रयोग की जा रही है ।

पादप अनुकूलन हेतु पादपों को हरित आवास में कुछ समय तक रखकर इनको वातावरण के प्रति अभ्यस्त कराया जा सकता है । हरित आवास में उच्च आर्द्रता, कम तापमान तथा नियंत्रित पोषण आपूर्ति पादपों के शीघ्र अनुकूलन में सहायता करती है ।

7.6 बोध प्रश्नों के उत्तर

1. a. एक बीज से एक पादप ही उगाया जा सकता है जबकि एक शीर्ष प्ररोह से अनेक पादप बनाये जा सकते हैं।

   b. बीजों से उत्पन्न संतति को क्लोन नहीं कहा जा सकता है जबकि कायिक ऊतकों से निर्मित पादप आपस में क्लोन होते है
2. नर तथा मादा पितृको जैसा ।
3. बीजचोल, भ्रूण तथा भ्रूणपोष ।
4. 'O' अवस्था, I-अवस्था, II-अवस्था, III-अवस्था तथा IV-अवस्था
5. राओल्फिया तथा वैन्डा
6. निम्नताप संरक्षण विधि (Cryopreservation)
7. NBPGR
8. Moral(1960)
9. कायिक भ्रूणोद्भवन तथा अंगोद्भवन
10. काइनेटिन तथा नैफ्थालीन एसीटिक अम्ल

7.7 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions) :

1. सूक्ष्म प्रवर्धन में बीज तथा कायिक ऊतकों के महत्व को बताते हुये इनका तुलनात्मक विवरण दीजिये।
2. संकटग्रस्त तथा दुर्लभ पादपों के लिये सूक्ष्म प्रवर्धन तकनीक की उपयोगिता बताइये ।
3. निम्नलिखित पर संक्षिप्त टिप्पणी लिखिये -
   क. बिना बीज के अंतःपात्रे संवर्धन
   ख. आर्किड सूक्ष्म प्रवर्धन विधि
4. सूक्ष्म प्रवर्धित पादपों के मृदा स्थानान्तरण का विस्तारपूर्वक वर्णन कीजिये ।
5. सूक्ष्म प्रवर्धन हेतु प्रयोग किये जाने वाले पादप अंगों के निर्जर्मीकरण का संक्षिप्त वर्णन कीजिये।

7.8 शब्दावली (Glossary) :

कायिक कोशिकायें	Somatic Cells
प्रांकुर	Plumule
मूलांकुर	Radicle
संकटग्रस्त पादप	Endangered Plants
क्रमिक अनुकूलन	Hardening Off
हरित आवास	Green Home

7.9 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. पुरोहित, बायोटेक्नोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स, स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर ।
2. चावला, प्लान्ट बायोटेक्नोलॉजी लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली।
3. गेम्बर्ग तथा फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्चर, फण्डामेन्टल मेथड्स, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन टू प्लान्ट टिश्यू कल्चर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 8

पादप जैवप्रौद्योगिकी की विधियाँ

(Methods in Plant Biotechnology) -

इकाई की रूपरेखा

8.0 उद्देश्य

8.1 प्रस्तावना

8.2 जीनॉमिक्स

8.2.1 संरचनात्मक जीनॉमिक्स

8.2.2 क्रियात्मक जीनॉमिक्स

8.2.3 तुलनात्मक जीनॉमिक्स

8.3 पादपों में आनुवंशिक रूपान्तरण

8.3.1 सामान्य आनुवंशिक रुपान्तरण हेतु विधियाँ

8.3.2 पादप आनुवंशिक रुपान्तरण में उद्गमित आयाम

8.3.3 विविक्तिकरण विधियाँ

8.4 सारांश

8.5 बोध प्रश्नों के उत्तर

8.6 अभ्यासार्थ प्रश्न

8.7 शब्दावली

8.8 संदर्भ मन्थ

8.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप निम्न तथ्यों से भली-भाँति परिचित हो जाएगें ।

1. जीनॉमिक्स क्या है ? तथा प्रेरित जीन अभिव्यक्ति के माध्यम से जीनॉम विश्लेषण किस प्रकार संभव है ।
2. पादप आनुवंशिक रुपान्तरण की विधियाँ तथा उसके अनुप्रयोग ।

8.1 प्रस्तावना (Introduction)

जैव प्रौद्योगिकी के क्षेत्र में पादप आनुवंशिक रुपान्तरण तथा जीनॉमिक्स ऐसे क्षेत्र हैं जिनके माध्यम से किसी अज्ञात जीन के कार्यों, जीनों का अनुक्रमण तथा वांछित जीन का दूसरे पादपों में स्थानान्तरण संभव हुआ है । जीन स्थानान्तरण के द्वारा कितने ही ऐसे उत्पादों का वृहद् उत्पादन संभव हुआ है जिनका उत्पादन अभी तक सीमित मात्रा में ही संभव था । साथ ही पादपों में अनेकों प्राकृतिक तनावों के प्रति प्रतिरोधकता भी विकसित की जा सकी है ।

8.2 जीनॉमिक्स (Genomics) :

जीनॉमिक्स शब्द का प्रयोग पहली बार **थॉमस रॉड्रिक** (Thomas Rodrick- 1986) ने किया । उनके अनुसार जीनॉमिक्स विज्ञान की वह शाखा है जिसमें जीनॉम मानचित्रण, अनुक्रमण तथा उसका विश्लेषण किया जाता है । यद्यपि यह परिभाषा किसी सीमा तक अस्पष्ट है तथापि यह स्पष्ट हो जाता है कि यह विज्ञान की वह शाखा है जिसमें जीव विज्ञान की अनेकों समस्याओं के उत्तर ढूँढने के लिए जीनॉम की सूचनाओं का नियोजित विश्लेषण किया जाता है । यदि किसी जीव के जीनॉम के सम्बन्ध में जीनों की संख्या, स्थिति, आकार तथा संगठन के बारे में जानकारी उपलब्ध हो तो जीनॉमिक्स को निम्न प्रकार से परिभाषित किया जा सकता है -

"जीनॉमिक्स जीनॉम के आण्विक संगठन, उसकी सूचनाओ के घटकों तथा जीन उत्पादों, जिनके लिए आनुवंशिक कूट जीन पर उपस्थित है, का अध्ययन है ।"

अक्टूबर, 1990 में मानव जीनोम परियोजना की शुरुआत के बाद तो जीनॉमिक्स का महत्व वैज्ञानिक जगत में बहुत ज्यादा बढ़ गया । इस परियोजना की सम्पूर्णता और अनेकों अन्य जीनोम के सम्पूर्ण प्रकाशन के उपरांत जीनॉमिक्स के क्षेत्र में तीव्र वृद्धि हुई है । जीनोमिक्स को मोटे तौर पर तीन प्रमुख क्षेत्रों में विभाजित किया जा सकता है ।

8.2.1 संरचनात्मक जीनॉमिक्स (Structural Genomics)

डी.एन.ए. अनुक्रमण, अनुक्रमण व्यवस्था, अनुक्रमण संगठन तथा उसका प्रबन्धन, संरचनात्मक जीनॉमिक्स के अन्तर्गत आते हैं । मूलत: यह जीनॉम विश्लेषण का प्रारम्भन है जहाँ उच्च विभेदन क्षमता के आनुवंशिक, भौतिक तथा अनुक्रमण मानचित्रों का निर्माण ही प्रमुख है । किसी डी.एन.ए. का सम्पूर्ण अनुक्रमण ही किसी जीव के लिए अंतिम भौतिक मानचित्र है । इन दिनों इसमें आण्विक वर्गिकी तथा जीवित कोशिका में उपस्थित प्रोटीन के त्रिविमिय (three dimentional) संरचना का निर्धारण भी शामिल किया जाने लगा है ।

8.2.2 क्रियात्मक जीनॉमिक्स (Functional Genomics)

किसी जीव में सम्पूर्ण जीन अनुक्रमण के कार्यों तथा उनकी अभिव्यक्ति का अध्ययन, क्रियात्मक जीनॉमिक्स के अन्तर्गत आता है । किसी जीन की स्थिति जानने, उसका अनुक्रमण करने के उपरांत, सम्पूर्ण जीनॉम अनुक्रमण का पुर्ननिर्माण तथा उस जीन के कार्यो का पता लगाना, क्रियात्मक जीनॉमिक्स के अन्तर्गत अगला कदम होता है । इस हेतु बड़ी संख्या में सांख्यिकी तथा कम्प्यूटर विश्लेषणात्मक परिणामों की आवश्यकता होती है । इस प्रकार क्रियात्मक जीनॉमिक्स जीनॉम के बारे में नवीन सूचनाऐं प्रदान करता है ।

क्रियात्मक जीनॉमिक्स हेतु युक्तियाँ (Tools for Functional Genomics)

किसी जीन के कार्यों को पता लगाने के लिए विभिन्न युक्तियाँ काम में ली जाती है जिनमें से प्रमुख निम्न हैं -

(i) कम्प्यूटर विश्लेषण (Computer Analysis)

जीन -अनुक्रम में किसी जीन की स्थिति ज्ञात करने में कम्प्यूटर महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है । इसके लिए सबसे सक्षम युक्ति है ''समजातता की तलाश करना'' (homology searching) । सभी सम्बन्धित जीनों का अनुक्रम भी एक जैसा होता है । इस प्रकार जब एक नई जीन ढूंढी जाती है तो किसी अन्य जीव में उपस्थित ऐसी जीन जिसका अनुक्रमण पहले हो चुका हो, के साथ समानता ढूंढ कर, नई जीन के कार्यों का पता लगाया जा सकता है । ऐसी जीन आपस में समजात जीन कहलाती है । इस प्रकार दो जीनों के मध्य जैव विकासीय संबन्धों की स्थापना भी संभव है ।

(ii) प्रयोगात्मक विश्लेषण (Experimental Analysis)

जीन अभिव्यक्ति का दृश्य प्रभाव, लक्षण प्रारुप (phenotype) कहलाता है । पारम्परिक प्रयोगों में, जीन के कार्यों का पता उत्परिवर्तित जीव के अध्ययन से लगाते थे जहाँ विशिष्ट जीन का लक्षण प्रारुप उत्परिवर्तन के कारण परिवर्तित हो चुका हो । आनुवंशिक क्रॉस के माध्यम से जीन की स्थिति का पता लगाया जा सकता है । इस प्रकार जीन की पहचान के उपरांत आण्विक जैविकी की विधियों के माध्यम से जीन अनुक्रमण (sequencing) किया जाता है ।

(iii) **प्रेरित जीन अभिव्यक्ति (Inducible Gene expression**)

पादप या जन्तुओं में जीन स्थानान्तरण के समय यह सुनिश्चित किया जाता है कि वांछित जीन की अभिव्यक्ति किसी विशिष्ट ऊतक या अंग तक सीमित रहे, ताकि पुर्नसंयुक्त प्रोटीनों (recombinant proteins) की प्राप्ति में आसानी रहे । इस प्रकार किसी जीन की अभिव्यक्ति को वाह्य उद्दीपकों के माध्यम से सीमित कर देना ''प्रेरित जीन अभिव्यक्ति'' (inducible Gene expression) कहलाता है ।

इस 'प्रेरित जीन' अभिव्यक्ति के माध्यम से भी जीन की स्थिति का पता लगाकर उसका अनुक्रमण सभव है । इस हेतु माइक्रोऐरे (microarray) तकनीक अत्यधिक उपयोगी है । इस तकनीक का विस्तृत अध्ययन प्रस्तुत पुस्तक की सीमाओं से परे है । आगामी कक्षाओं में आप इसका अध्ययन करेंगे ।

8.2.3 तुलनात्मक जीनोमिक्स (comparative Genomics)

यह देखा गया है कि प्रत्येक जीनोम के कूटयुक्त (encoded) हिस्से के एक तिहाई भाग का कोई ज्ञात कार्य नहीं है । दूसरे शब्दों में कहें तो लगभग 30% जीनों का कार्य ज्ञात नहीं है । सूक्ष्मजीवों के द्वारा उत्पादित प्रोटीनों के लिए उत्तरदायी जीनों के अध्ययन में यह पाया गया कि लगभग 70% जीन उत्पाद, दूसरों जीवों के साथ समजातता प्रदर्शित करते हैं। इस प्रकार इन अज्ञात कार्यों वाली जीनों के कार्यों का अनुमान विभिन्न जीनोमों के तुलनात्मक अध्ययन से लगाया जा सकता है । इन दिनों इन्टरनेट पर कितने ही डेटाबेस (database) उपलब्ध हैं जो 'तुलनात्मक जीनॉमिक्स' हेतु सुविधा प्रदान करते हैं । जिनमें से PEDENT,COGs,KEGG आदि प्रमुख है ।

बोध प्रश्न

1. जीनॉमिक्स शब्द का प्रयोग पहली बार किसने किया?

   .....

2. प्रोटीन की त्रिविमीय सरंचना का निर्धारण सम्मिलित है-

.....

3. दो ऐसे जीन जिनके अनुक्रम में समानता हो कहलाते हैं?

.....

4. जीन अभिव्यक्ति को बाहय उद्दीपनों के माध्यम से सीमित कर देना कहलाता है

.....

5. इंटरनेट पर उपस्थित डेटाबेस PEDENT, COGs तथा KEGG किस हेतु सुविधा प्रदान करते हैं?

.....

8.3 पादपों में आनुवंशिक रुपान्तरण (Genetic Transformation in Plants) :

आनुवंशिक रुपान्तरण का तात्पर्य है एक जीव से डी.एन.ए. का दूसरे जीव में स्थानान्तरण । इसके परिणाम से जीव के जीन प्रारुप (genotype) या आनुवंशिक स्वरूप (genetic make up) में बदलाव । इस तकनीक द्वारा न सिर्फ प्रमुख खाद्य फसलों के उत्पादन में वृद्धि की गई है, बल्कि अनेक महत्वपूर्ण पादप द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन में भी आशातीत वृद्धि संभव हुई है ।

प्रकृति में जीवाणुओं के अनेकों प्रभेद (strains), संयुग्मन (conjugation) के दौरान आनुवंशिक पदार्थ का आदान-प्रदान करते हैं तथा इस प्रकार नई आनुवंशिक सूचना पीढ़ी दर पीढी संचारित होती रहती है । जीवाणु का एक कोशिकीय प्रोकेरियोटिक जीव होना इस तकनीक हेतु एक लाभदायक घटक है । आनुवंशिक सूचना के आदान-प्रदान का यह प्राकृतिक तरीका, जीवों की पर्यावरण के प्रति अनुकूलन क्षमता विकसित करने में सहायक है ।

एक बहुकोशिकीय जीव जैसे पादपों में, आनुवंशिक रुपान्तरण अपेक्षाकृत मुश्किल प्रक्रिया है । नवीन रुपान्तरण का समेकित रुप से प्रत्येक कोशिका में होना लगभग असंभव कार्य है, अत: बहुकोशिकीय पादपों के रुपान्तरण हेतु किसी एक कोशिका को रुपान्तरित करवाकर, मात्र उसी कोशिका से सम्पूर्ण पादप को पुनरुद्भावित (regenerate) किया जाता है । पादप कोशिका की पूर्णशक्तता (pluripotency) इसे संभव बनाती है ।

पादप तथा दूसरे जीवों में आनुवंशिक रुपान्तरण एक प्राकृतिक प्रक्रिया है । यह देखा गया है कि जीवाणु तथा विषाणु एक जीव से दूसरे जीव में आनुवंशिक सूचनाओं के आदान-प्रदान के लिए उत्तरदायी होते हैं तथा पादप कोशिका में आनुवंशिक संगठन में महत्वपूर्ण बदलाव हेतु उत्तरदायी होते हैं । मृदा जीवाणु जैसे कि एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स (Agrobacterium tumifacience) तथा एग्रोबैक्टीरियम राइजोजीन्स (Agrobacterium rhizogenes) । प्राकृतिक रुपान्तरण तंत्र के महत्वपूर्ण उदाहरण हैं जो क्रमश: 'क्राऊन गॉल रोग' तथा 'रोमिल मूल' के कारक होते हैं । एग्रोबैक्टीरियम स्वयं अपने DNA का खण्ड जिसे T-DNA या transfer DNA कहा जाता है, को पादप कहा जाता है, को पादप कोशिका में प्रविष्ट करवा देता है । एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स इस T-DNA के माध्यम से न सिर्फ 'गॉल'

उत्पन्न करता है बल्कि पादप कोशिका द्वारा अद्वितीय शर्करा 'ओपाइन्स (Opines)' के उत्पादन को भी प्रेरित करता है जो इस जीवाणु हेतु पोषक पदार्थ की भाँति कार्य करती है ।

8.3.1 सामान्य पादप रुपान्तरण तकनीक (Common Plant Transformtion Techniques)

पादप आनुवंशिक रुपान्तरण भौतिक, रासायनिक तथा जैविक कारकों द्वारा संभव है । पादप आनुवंशिक रुपान्तरण हेतु सामान्य विधियों का अध्ययन हम इस इकाई में करेंगे ।

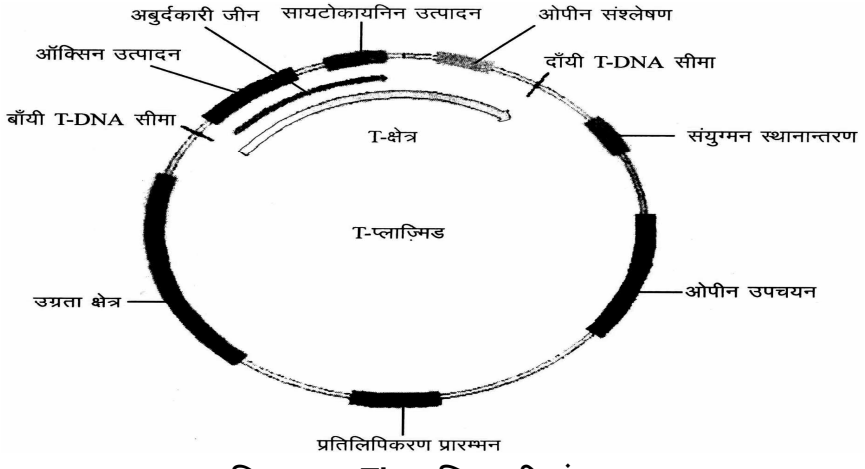
1. एग्रोबैक्टीरियम के माध्यम से जीन स्थानान्तरण (Agrobacterium Mediated Gene Transfer)

एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स के माध्यम से किसी पादप के आनुवंशिक रुपान्तरण की यह सबसे प्रचलित तकनीक है जिससे जीवाणु प्लाज्मिड को जीन स्थानान्तरण हेतु एक वाहक के रुप में प्रयुक्त किया जाता है । यह जीवाणु सामान्यत: द्विबीजपत्री पादपों को संक्रमित करता है । इस जीवाणु का प्लाज्यिड, किसी जीन के स्थानान्तरण हेतु उत्तम वाहक है । इस प्लाजिड के 'ट्यूमर प्रेरक जीन' के स्थान पर वांछित जीन को निवेशित कर पादप रुपान्तरण हेतु काम में लिया जाता है ।

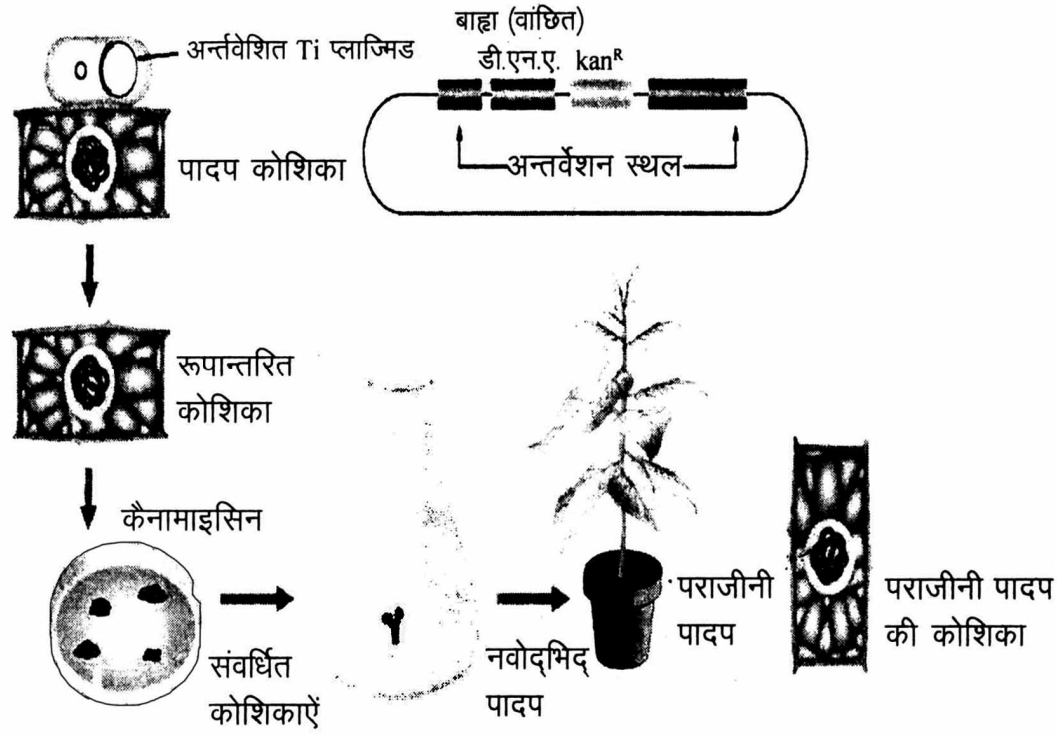
एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स सामान्यत: द्विबीजपत्री पादपों को घावों के माध्यम से संक्रमित करता है तथा पादप में 'क्राउन गॉल रोग' (Crown gall disease) पैदा करता है । इस जीवाणु प्लाज्मिड (Ti प्लाज्मिड, Tumour inducing plasmid) में उपस्थित T-DNA खण्ड, संक्रमित कोशिका के केन्द्रक में उपस्थित डी.एन.ए. के साथ अर्न्तवेशित होकर क्राउन गॉल रोग का कारण बनता है । T-DNA मे दो प्रकार की जीन्स उपस्थित होती हैं ।

(I) अबुर्दकारी जीन (Oncogene) जो कि ऑक्सिन तथा सायटोकायनिन संश्लेषण हेतु आवश्यक विकरों के लिए उत्तरदायी होती है तथा अबुर्द (tumour) उत्पन्न करती है तथा

(II) ऑपिन (opine) शर्करा के संश्लेषण हेतु उत्तरदायी जीन । यह शर्करा अमीनो अम्लों तथा दूसरी अन्य शर्कराओं के संघनन का परिणाम है । यह शर्करा क्राउन गॉल कोशिकाओं द्वारा उत्पन्न की जाती है तथा एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स इसका उपयोग कार्बन तथा नाइट्रोजन स्रोत के रुप में करता है ।



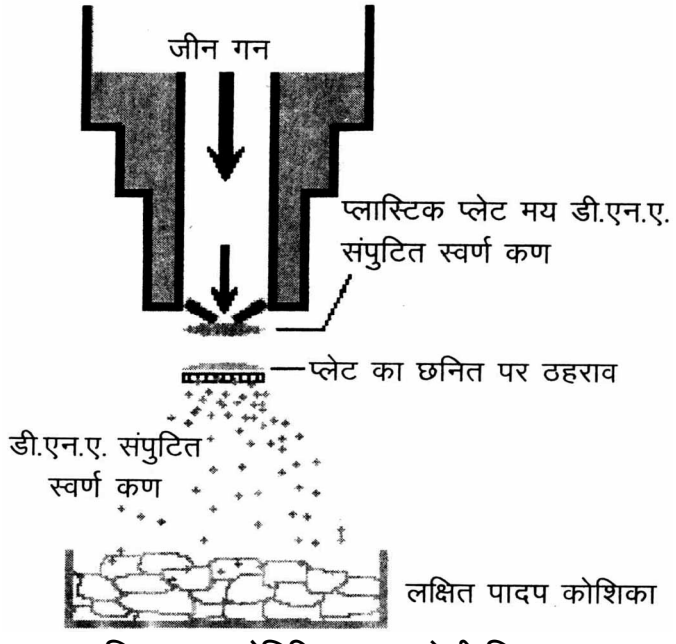
चित्र 8.1 : Ti प्लाज्मिड की संरचना



चित्र 8.2. सम्पूर्ण पादप आनुवंशिक रुपान्तरण का आरेखी निरुपण

बायोलिस्टिक्स (Biolistics)

कुछ कोशिकाऐं, ऊतक तथा अन्त : कोशिकीय अंग, बाहय DNA के प्रति अपरागम्य होते हैं । बायोलिस्टिक्स कण प्रक्षेपण (particle besbondment) भी शामिल है, पादपों में आनुवंशिक रुपान्तरण का सामान्य तरीका है |



चित्र 8.3 बायोलिटिक्स का आरेखी निरुपण

इस विधि को जीन गन विधि भी कहा जाता है । इस विधि में DNA/RNA को जैविक रुप से अक्रिय कणों जैसे कि स्वर्ण तथा टंगस्टन पर संलग्न करवाया जाता है । अब इस न्यूक्लिक अम्ल-कण संकुल को निवार्त में तीव्र गति से लक्षित ऊतक पर दागा जाता है । इस विधि द्वारा प्रभावकारी रुप से डी.एन.ए. लक्षित कोशिका में प्रविष्ट हो जाता है (चित्र 8.3) ।

इलेक्ट्रोपोरेशन (Electroporation)

इस विधि में डी.एन.ए. व कोशिका मिश्रण को कुछ समय के लिए उच्च वैद्युत विभव का झटका दिया जाता है । इस प्रकार वांछित कोशिकाओं की कोशिका झिल्ली बाह्य DNA के प्रति पारगम्य हो जाती है । इनमें से कुछ कोशिकाओं में वांछित जीन की अभिव्यक्ति संभव होती है ।

सूक्ष्म इंजेक्शन (Microinjection)

सूक्ष्म इंजेक्शन, सूक्ष्मदर्शी नियंत्रण में, बाह्य DNA का प्रत्यक्ष प्रवेश है । इस विधि में लक्षित कोशिका किसी भी बहु कोशिकीय संरचना जैसे भ्रूण (embryo) अण्डप (ovule) या विभज्योतक ऊतक की हो सकती है । सूक्ष्मदर्शी से निरीक्षण कर एक कोशिका को कुंद कोशिका (Blunt capillary) के माध्यम से चूषण बल द्वारा निश्चल कर उसमें सूक्ष्म इंजेक्शन द्वारा वांछित डी.एन.ए. प्रविष्ट करा दिया जाता है । यह तकनीक प्रोटोप्लास्ट में जीन स्थानान्तरण में बहुत ही उपयोगी है ।

लिपोसोम के माध्यम से रुपान्तरण (Liposome Mediated Transformation)

लिपोसोम सूक्ष्मदर्शी संरचना है जो संकेन्द्रिक फोस्फोलिपिड द्विकझिल्ली से आवरित होती है । पीली इथिलिन ग्लाइकोल (polyethylene glycol-PEG) के उपयोग से इन्हें प्रोटोप्लास्ट के साथ समायोजित कर जीन स्थानान्तरण में उपयोग में लाया जा सकता है । इस विधि से लिपोसोम के द्वारा प्रोटोलास्ट में डीएनए अन्तःपरासरण के माध्यम से स्थानान्तरित होता है ।

वायरस के माध्यम से रुपान्तरण (Liposome Mediated Transformation)

पादप कोशिका में वायरस द्वारा स्वयं का जीनोम स्थानान्तरित कर राकने की क्षमता ने वैज्ञानिकों का ध्यान पादप रुपान्तरण हेतु वायरस पर केन्द्रित किया । परन्तु पादप वायरस के संक्रामक होने, उसकी प्रतिलिपिकरण की क्षमता, परपोषी विशिष्टता आदि के कारण इस क्षेत्र में ज्यादा सफलता नहीं मिल सकी है ।

फिर भी अन्य वायरसों की तुलना में गोभी मोजेक वायरस (Cauliflower Mosaic Virus - CaMV), जो कि द्विरज्जुक डी.एन.ए. (double stranded DNA) वायरस है, को पादप आनुवंशिक रुपान्तरण में अच्छी सफलताओं के साथ प्रयुक्त किया गया है ।

8.3.2 पादप आनुवंशिक रुपान्तरण के उदगमित आयाम (Emerging Trends of Plant Genetic)

पादप जैव प्रौद्योगिकी का मुख्य उद्देश्य फसली पादपों की ऐसी नई किस्मों का उत्पादन करना है जो अधिकतम उत्पादकता (Yield) के साथ-साथ पोषण पदार्थों की उचित मात्रा युक्त हो ।

आनुवंशिक रुपान्तरण के माध्यम से पादपों को रोगकारकों तथा वातावरणी तनावों के प्रति प्रतिरोधक बनाया जा सकता है । आइये ऐसे ही कुछ उदगमित आयामों का अध्ययन करें ।

(i) कीट प्रतिरोधी पराजीनी पादप (Insect resistant transgenic Plants)

भारत एक कृषि प्रधान देश है यहाँ 70% लोग कृषि पर निर्भर है । अधिकतर फसल यहाँ कीट संक्रमण से नष्ट हो जाती है और एक बड़ी आर्थिक हानि का कारण बनती है । आनुवंशिक अभियांत्रिकी के माध्यम से पादपों को आंतरिक रुप से कीटों के प्रति प्रतिरोधी बनाया जा सकता है । इस प्रकार मँहगे और हानिकारक कीटनाशकों के प्रयोग से बचा जा सकता है इसके लिए दो तरीके अपनाए जाते हैं -

A. पहला तरीका जिसे हम आसानी से अपना सकते हैं, इसमें वांछित जीन (जिसका उत्पाद कीटनाशी प्रोटीन उत्पादक) को जीवाणु बैसीलस थ्रऐजेनेसिस (Bacillus thruengenesis) के माध्यम से लक्षित पादप में स्थानान्तरित करते हैं ।

B. दूसरे तरीके में ऐसे पादप प्रोटीन, जो एमाइलेज या प्रोटीएज प्रतिरोधी होते हैं, से सम्बन्धित जीन को स्थानान्तरित करते हैं ।

पराजीनी कपास (transgenic cotton) जिसे Bt-cotton के नाम से भी जाना जाता है, कीट प्रतिरोधकता का उत्कृष्ट उदाहरण है ।

(ii) वायरस प्रतिरोधी पराजनी पादप (Virus resistant transgenic plants)

वाइरस संक्रमण से अनेक फसलों को अत्यधिक आर्थिक नुकसान होता है । पराजीनी रुप से वाइरस प्रतिरोधी पादप तैयार करने के लिए जीन का स्थानान्तरण किया जाता है । इस प्रकार के प्रतिरोधण में वाइरस जीन एन्टीसेन्स अनुक्रम का प्रयोग किया जाता है । TMV के प्रति प्रतिरोधकता उत्पन्न करने के लिए, TMV सम्पुट प्रोटीन (TMV wat protein) के लिए उत्तरदायी जीन को ही स्थानान्तरित किया जाता है ।

iii) **कवक प्रतिरोधी पराजीनी पादप (Fungal resistant transgenic plants)**

पादपों में कवक प्रतिरोधकता उत्पन्न करने के लिए कवकरोधी प्रोटीन्स के लिए उत्तरदायी जीनों की अभिव्यक्ति को सुनिश्चित किया जाता है ।

iv) **कीटनाशी रोधक पराजीनी पादप (Transgenic plants for herbicide resistance)**

पादपों को ग्लाइकोफास्फेट जो कि एक संग्रन्थ अमीनो अम्ल है, के उत्पादन के माध्यम से शाकनाशी रोधी बनाया जाता है । इसके लिए दो तरीके अपनाये जा सकते हैं ।

A. पहली प्रक्रिया में वांछित प्रोटीन के अति उत्पादन (over production) के माध्यम से प्रतिरोधकता विकसित करते हैं।

B. दूसरे तरीके में मूल पादप का उत्परिवर्तित रुप विकसित कर प्रतिरोधकता बढ़ाई जाती है ।

v) **किसी विशिष्ट जीन के अति उत्पादन के माध्यम से तनाव प्रतिरोधकता उत्पन्न करना (Bulilding of stress tolerance by overproduction a particular gene)**

ट्रीहालोस (Trehalose) एक ऐसी दुर्लभ शर्करा है जो कुछ जीवाणु, कवकों एवम् उच्च पादपों में मिलती है । यह शर्करा जैव अणुओं को पर्यावरणीय तनावों से सुरक्षा प्रदान करती है । हाल ही में हुए अध्ययनों से पता चला है कि इस शर्करा के अति उत्पादन से पादपों में शुष्कता और लवणता के प्रति प्रतिरोधकता विकसित की जा सकती है । वहीं सुपरऑक्साइड डिसम्युटेस (superoxide dismutase) के उत्पादन से पादपों को मुक्त ऑक्सीजन मूलक के कारण होने वाली हानियों से बचाया जा सकता है । सुपर ऑक्साइड डिसम्यूटेस की अभिव्यक्ति परिवहन के दौरान पुष्पों की गुणवत्ता बनाये रखने में भी सहायता करती है ।

बीटेन जैव संश्लेषक विकर (betain biosynthetic enzyme) पादपों में उच्च लवणता एवम् जलीय तनाव के प्रति प्रतिरोधकता प्रदान करता है ।

i) **टीकों के उत्पादन के लिए पराजीनी पादप (Transgenic plants for vaccine production)**

शाकों एवं फलों में प्रतिजन (antigen) की अभिव्यक्ति ने मुख के द्वारा लिये जा सकने वाले टीकों के क्षत्र में नए आयामों को जन्म दिया है । पराजीनी तम्बाकू पादपों में स्तनी प्रकार के एन्टीबाडी (antibody) की अभिव्यक्ति संभव हुई है ।

ii) **फल परिपक्वन एवम् आनुवंशिक रुपान्तरण (food ripening and genetic transformation)**

पादपों में फलों के समय से पहले पकने एवम् मृदुता उत्पन्न होना एक बड़ी समस्या है । परिपक्वन के दौरान कुछ जीन सेलुलेस एवम् पोलीगैलेक्टोरुनेज (cellulose and polyglactorunase) का उत्पादन सुनिश्चित करती है । जो जीन एन्टीसेन्स आर.एन.ए. के लिए उत्तरदायी है, वह जीन इन विकरों के अति उत्पादन को रोकती है । इस प्रकार हम फलों के देरी से परिपक्वन को सुनिश्चित कर सकते हैं । एन्टीसेन्स आर.एन.ए. के प्रयोग से एथिलीन के उत्पादन को कम करके भी फलों के परिपक्वन को रोका जा सकता है तथा संग्रहण की समय सीमा बढ़ाई जा सकती है ।

इन सबके अलावा पादप उत्पादों के स्वाद एवं स्वरुप का रुपान्तरण तथा उनके पोषक घटकों में वृद्धि किए जाने की संभवनाएं भी प्रबल हुई है ।

8.3.3 विविक्तिकरण विधियाँ (Screening Procedures)

पादप आनुवंशिक रुपान्तरण तंत्र के लिए, रुपान्तरित कोशिकाओं का आनुवंशिक चयन एक महत्वपूर्ण कदम है । एक उपयुक्त विविक्तिकरण तंत्र की अनुपस्थिति में कोई भी रुपान्तरण प्रयोग सफल नहीं हो सकता ।

इसके लिए जीन वाहक के साथ एक चयनात्मक चिन्हक जीन तथा संवर्धन माध्यम में उपयुक्त चयन कारक डाला जाता है जो सिर्फ रुपान्तरित कोशिकाओं की वृद्धि ही होने देता है । चयनात्मक चिन्हक की तरह प्रयुक्त होने वाली जीन सामान्यत: प्रभावी तथा जीवाणु उत्पत्ति की होती है । सफल चयन के लिए लक्षित पादप कोशिकाओं को चयन कारक की अति निम्न सान्द्रता के प्रति भी संवदेनशील होना आवश्यक है । पादप रुपान्तरण में ऐसे चयन कारक को काम में लिया जाता है जो अरुपान्तरित कोशिकाओं की वृद्धि को अवरूद्ध तो करें परन्तु उन्हें नष्ट नहीं करे ।

सामान्यत: वाहक के साथ विविक्तिकरण जीन (screening gene also called as scorable gene or reporter gene) को भी निवेशित कर दिया जाता है जो रुपान्तरित कोशिकाओं के अन्वेषण में मदद करती है । इन दिनो जीवाणु उत्पत्ति की ऐसी जीन को इस हेतु उपयोग में लिया जाता है जो वर्णी, प्रदीप्त या फोटोन के उत्सर्जन से अन्वेषित हो सकने वाले विकर (enzyme) के उत्पादन के लिए उत्तरदायी है ।

बोध प्रश्न

6. .....जीवाणु 'क्राउन गोल' रोग पैदा करता है -

.....

7. एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स जीवाणु कार्बन स्रोत के रूप में उपयोग करता है -

.....

8. लिपोसोम के माध्यम से जीन रुपान्तरण में..... का उपयोग किया जाता है -

.....

9. CaMV वायरस द्विरज्जुक आर.एन.ए. वायरस है । सत्य/असत्य
10. Bt कपास एक कीट प्रतिरोध किस्म है । सत्य/असत्य
11. ट्रिहॉलोज शर्करा उच्च पादपों में नहीं मिलती । सत्य/असत्य
12. विविक्तिकरण जीन, रिर्पोटर जीन भी कहलाती है । सत्य/असत्य

8.4 सारांश (Summary) :

जीनॉमिक्स विज्ञान की वह शाखा है जिसमें जीनॉम के आण्विक संगठन तथा उनके उत्पादों का अध्ययन किया जाता है । जीनॉमिक्स के बढ़ते क्षेत्र के साथ इस शाखा को संरचनात्मक जीनॉमिक्स, क्रियात्मक जीनॉमिक्स तथा तुलनात्मक जीनॉमिक्स में विभाजित किया गया है । क्रियात्मक जीनॉमिकन के अध्ययन हेतु कम्प्यूटर विश्लेषण, प्रयोगात्मक विश्लेषण तथा प्रेरित जीन अभिव्यक्ति को युक्ति की तरह काम लिया जाता है ।

जैव प्रौद्योगिकीय रुप से पादपों में उत्पादन वृद्धि के लिए आनुवंशिक रुपान्तरण किया जाता है । इसमें वांछित जीन को लक्षित पादप में स्थानान्तरित करना ही मुख्य चरण है । एग्रोबैक्टीरियम या वायरस के माध्यम से जैविक रुप से जीन स्थानान्तरण संभव है, वहीं बायोलिस्ट्क्सि, सूक्ष्म इंजेक्शन, इलेक्ट्रोपोरेशन या लिपोसोम के माध्यम से भौतिक रुप से जीनों का स्थानान्तरण किया जा सकता है । पादप आनुवंशिक रुपान्तरण से पादपों में कीट प्रतिरोधकता, वायरस प्रतिरोधकता, तनाव प्रतिरोधकता उत्पन्न की जा सकती है, वहीं फलों के संरक्षण एवं टीकों के उत्पादन में भी यह तकनीक उपयोगी साबित हुई है ।

8.5 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. थामस रॉड्रिक ने
2. संरचनात्मक जीनॉमिक्स में
3. समजात जीन
4. प्रेरित जीन अभिव्यक्ति
5. तुलनात्मक जीनॉमिक्स हेतु
6. एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमिफेसिएन्स
7. ओपीन शर्करा का
8. PEG
9. असत्य
10. सत्य

11. असत्य

12. सत्य

8.6 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question):

1. जीनॉमिक्स को परिभाषित करें ।
2. जीनॉमिक्स के विभिन्न प्रकारों को विस्तार से समझाऐं ।
3. पादप आनुवंशिक रूपान्तरण क्या है ? विस्तार से समझाऐं ।
4. पादप आनुवंशिक रूपान्तरण के विभिन्न उद्‌गमित आयामों पर लेख लिखें ।

8.7 शब्दावली (Glossary) :

1. आनुवंशिक रुपान्तरण	Genetic Transformation
2. संरचनात्मक जीनोमिक्स	Structural Genomics
3. क्रियात्मक जीनोमिक्स	Functional Genomics
4. तुलनात्मक जीनोमिक्स	Comparative Genomics
5. प्रेरित जीन अभिव्यक्ति	Inducible Gene Expression
6. अबुर्दकारी जीन	Oncogene
7. अतिउत्पादन	Over Production

8.8 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Book):

1. दुबे, ए टेक्सट बुक ऑफ बॉयोटेक्नोलॉजी, एस. चाद एण्ड कम्पनी, नई दिल्ली ।
2. चेन्नारयप्पा, मोलीक्यूलर बॉयोटेक्नोलॉजी. प्रिंसिपल्स एण्ड प्रेक्टिस, यूनिवर्सिटी प्रेस, हैदराबाद ।
3. गुप्ता, मोलीक्यूलर बॉयोलोजी एण्ड जेनेटिक इंजीनियरिंग, रस्तोगी पब्लिकेशन्स, मेरठ ।

इकाई 9

पादप ऊतक संवर्धन के अनुप्रयोग

(APPLICATIONS OF PLANT TISSUE CULTURE)

इकाई की रूपरेखा

9.0 उद्देश्य

9.1 प्रस्तावना

9.2 पादप ऊतक संवर्धन की विभिन्न तकनीकों के अनुप्रयोग

- 9.2.1 बीज संवर्धन
- 9.2.2 भ्रूण संवर्धन
- 9.2.3 अंडाशय व बीजाण्ड संवर्धन
- 9.2.4 परागकोश तथा लघुबीजाणु संवर्धन
- 9.2.5 अंत: पात्रे निषेचन
- 9.2.6 अंग संवर्धन
- 9.2.7 प्ररोह शीर्ष विभज्योतक संवर्धन
- 9.2.8 कायिक भ्रूणोद्भवन
- 9.2.9 कैलस संवर्धन
- 9.2.10 द्वितीयक मेटाबोलाइटों का अंतःपात्रे उत्पादन
- 9.2.11 सोमाक्लोनीय विभिन्नताये
- 9.2.12 प्रोटोप्लास्ट विलगन, संवर्धन व संलयन
- 9.2.13 जीनीय रुपान्तरण
- 9.2.14 शीत संरक्षण अथवा निम्न ताप संग्रहण
- 9.2.15 प्रोटोप्लास्ट, कोशिकाओं, ऊतकों व अंगों का संवर्धन

9.3 हरितगृह एवं हरित आवास तकनीक

9.4 शुष्क तथा अर्द्धशुष्क पादप जैव प्रौद्योगिकी

9.5 सारांश

9.6 बोध प्रश्नों के उत्तर

9.7 अभ्यासार्थ प्रश्न

9.8 शब्दावली

9.9 संदर्भ ग्रन्थ

9.0 उद्देश्य (Objective):

इस इकाई के अध्ययन के पश्चात् आप पादप ऊतक संवर्धन से सम्बन्धित निम्नलिखित तथ्यों से परिचित हो पायेंगे-

1. पादप ऊतक संवर्धन की तकनीकों जैसे - सूक्ष्म प्रवर्धन, कायिक भ्रूणोद्भवन, अंगजनन आदि की विशिषताये।
2. प्रोटोप्लास्ट संवर्धन के अनुप्रयोग ।
3. अगुणित पादप संवर्धन तकनीक की उपयोगिता ।
4. हरित गृह तथा हरित आवास तकनीक तथा इसकी उपयोगिता ।
5. शुष्क तथा अर्ध शुष्क पादपों के उन्नतिकरण में पादप ऊतक संवर्धन तकनीक की उपयोगिता ।

9.1 प्रस्तावना (Introduction):

पादप ऊतक संवर्धन के द्वारा विभिन्न आर्थिक रुप से महत्त्वपूर्ण पादपों का उन्नतीकरण एवं सुधार किया जा रहा है। अनेक वैज्ञानिकों का ऐसा मानना है कि पादप ऊतक संवर्धन जैव प्रौद्योगिकी की ऐसी तकनीक है जो हरित क्रांति के बाद सर्वाधिक उपयोगी सिद्ध हुई है । इस तकनीक की सहायता से न केवल फसलों के उत्पादन में कई गुना वृद्धि प्राप्त की गई है बल्कि पोषकीय गुणवत्ता वाले पादपों का उत्पादन भी संभव हो सका है । वर्तमान समय में पादप ऊतक संवर्धन का सर्वाधिक उपयोग खाद्यान्नों तथा औषधीय पादपों के संवर्धन के लिये किया जा रहा है ।

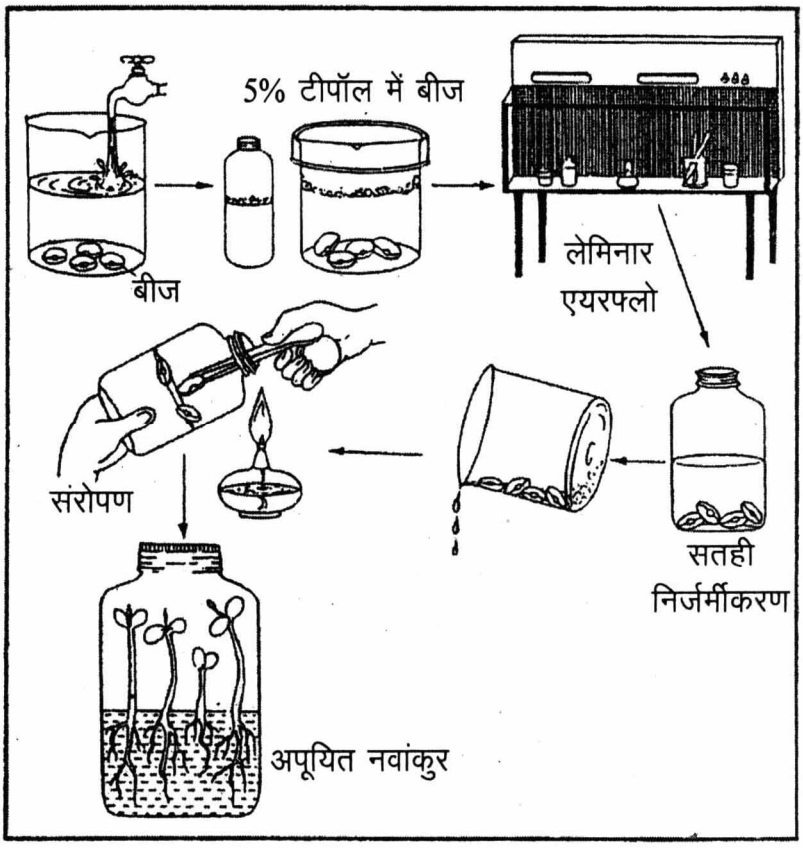
इरा अध्याय में पादप ऊतक संवर्धन की विभिन्न तकनीकों के अनुप्रयोग के विषय में बताया गया है । पादप ऊतक संवर्धन की विभिन्न तकनीकों को उनके उत्पादों के आधार पर अनेक श्रेणियों में विभाजित किया जा सकता है - कायिक भ्रूणोदभवन, अगुणित उत्पादन, त्रिगुणित उत्पादन, कायिक संकरण, जीनीय रुपान्तरण, सूक्ष्म प्रवर्धन, कृत्तक गुणन (clonal multiplication), रोगरहित पादपों का निर्माण आदि । पादप ऊतक संवर्धन तकनीक के माध्यम से अनेक प्रकार के पादपों जैसे खाद्यान्न, दलहन, वसा, पुष्पीय पादप, तन्तु एवं रेशायुक्त पादप तथा विशेष रुप से औषधीय पादपों की अनेक प्रजातियों का उन्नतीकरण एवं सुधार किया जा चुका है । पादप ऊतक संवर्धन से उन्नत गुणवत्ता वाले पादपों का निर्माण वृहद स्तर पर कम लागत व कम समय में किया जा सकता है । पादप ऊतक संवर्धन की तकनीक प्रमुख रुप से जीनीय रुपान्तरित पादपों के संवर्धन में प्रयोग की जा रही है । अनेक पादपों में पादप प्रजनन(plant breeding) विधियों से फसल सुधार संभव नहीं होता है, पादप ऊतक संवर्धन तकनीक से ऐसे पादपों में भी उन्नत गुणों का समावेश किया जा सकता है । आइये पादप ऊतक संवर्धन के विभिन्न अनुप्रयोगों को विस्तार से समझने का प्रयास करते हैं ।

9.2 पादप ऊतक संवर्धन की विभिन्न तकनीकों के अनुप्रयोग (Application of Different techniques of Plant Tissue Culture)

पादप ऊतक संवर्धन के द्वारा वर्तमान समय में अनेक प्रकार के पादपों का कृत्रिम प्रजनन कराया जा रहा है । इस तकनीक में प्रमुख रुप से पादपों के कर्तोत्तकों को पोषक माध्यम पर संवर्धित करके उन्हें पूर्ण पादप के रुप में प्राप्त किया जाता है । यह तकनीक प्रयोगशाला में सम्पन्न की जाने वाली विभिन्न विधियों का समावेश है । वास्तव में कृत्रिम परिस्थितियों में सम्पन्न की जाने वाली यह सम्पूर्ण प्रक्रिया अनेक तकनीकों की सहायता से संचालित की जाती है । इन समस्त तकनीकों के अनुप्रयोगों को निम्नलिखित बिन्दुओं में वर्णित किया गया है -

9.2.1 बीज संवर्धन (Seed Culture)

- बीजों की अंकुरण क्षमता में वृद्धि तथा बीजों के वंशक्रम का उत्पादन । ऐसे सभी बीजों में जिनका अंकुरण प्रतिशत कम होता है, इस विधि से यह बढ़ाया जा सकता है ।
- पादप वृद्धि नियंत्रकों का उपयोग करके समयपूर्व अंकुरण (precocious germination) को प्रेरित करना ।
- पादप वृद्धि नियंत्रकों का उपयोग करते हुये असंख्य पादपों का उत्पादन करना तथा अंग जनन को प्रेरित कारना।
- बीज विषाणुओं के वाहक नहीं होते है अत: इनसे विषाणु रहित पादपों का निर्माण करना ।



चित्र 9.1 : बीज संवर्धन का सचित्र निरुपण

9.2.2 भ्रूण संवर्धन (Embryo Culture')

- बन्ध्यता अवरोधों के कारण होने वाले आपात (embryo abortion) का निदान करना ।
- बीजों की स्वत: बन्ध्यता (self-sterility) तथा बीज प्रसुप्तता (seed dormancy) का निदान करना।
- अंतर्जातीय संकरण से उत्पन्न होने वाले पादपों में भ्रूण का बचाव करना । इसके अतिरिक्त भ्रूणपोष (endosperm) के विकसित न होने पर भी भ्रूणका बचाव करना ।
- एकगुणित (monoploids) पादपों का निर्माण करना ।

- प्रजनन चक्र (breeding cycle) को छोटा करना ।
- कैलस संवर्धन (callus culture) का विकास करना ।

9.2.3 अंडाशय व बीजाण्ड संवर्धन (Ovary and Ovule Culture)

- अगुणित पादपों का उत्पादन ।
- बन्ध्यता अवरोधों के कारण युग्मनज (zygote) के विकास की आरंभिक अवस्था में भ्रूणपात का निदान करना।
- अंतःपात्रे निषेचन (in vitro fertilization) को प्राप्त करना ।

9.2.4 परागकोष तथा लघु बीजाणु संवर्धन (Anther and microspore Culture)

- अगुणित पादपों का निर्माण ।
- गुणसूत्र द्विगुणन (chromosome doubling) के द्वारा समजात द्विगुणित वंशक्रम (homozygous diploid) का निर्माण करना ।
- लघुबीजाणुओं (microspores) का उपयोग करके जीनीय रूपान्तरण (genetic transformation) करना ।
- बहु उपयोगी गैमीटोक्लोनल विभिन्नताओं (gametoclonal variations) को प्रेरित करना ।
- गुणसूत्रों का एक ही समूह (set) होने के कारण उत्परिवर्तनों (mutations) को सुगमतापूर्वक पहचाना जा सकता है ।

9.2.5 अंत: पात्रे निषेचन (in vitro fertilization)

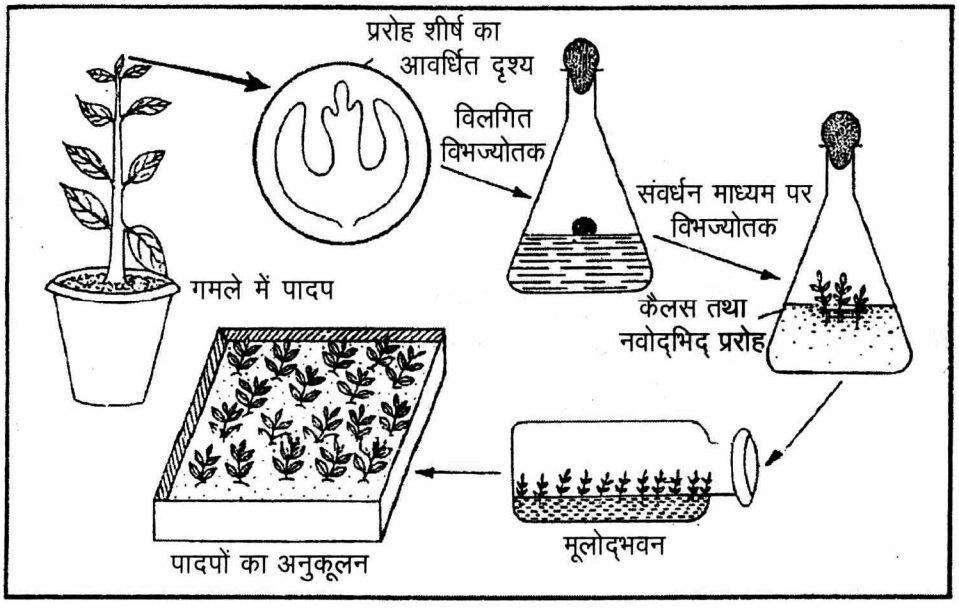
- कृत्रिम परिस्थितियों में परागकण का अंकुरण तथा परागनलिका की वृद्धि करवाना । इस तकनीक से दूरस्थ संकर पादपों (distant hybrid plants) को सफलतापूर्वक तैयार किया जा सकता है।
- युग्मजों तथा युग्मनजों (gametes and zygotes) के केन्द्रकों में सीधे ही बाह्यजनित डी.एन.ए. (exogenous DNA) को प्रवेश कराके पराजीनीय पादपों (transgenic plants) का निर्माण करना ।

9.2.6 अंग संवर्धन (Organ Culture)

- उत्कृष्ट तथा दुर्लभ (elite and rare) जननद्रव्य का वृहद स्तर पर उत्पादन करना ।
- द्वितीयक चयापचयों (secondary metabolites) के उत्पादन के लिये कैलस, मूल तथा स्तम्भों (callus, roots and shoots) को तैयार करना ।
- दुर्लभ तथा संकटग्रस्त (endangered) पादपों के लिये जननद्रव्य (germplasm) बैंकों की स्थापना करना ।

9.2.7 प्ररोह शीर्ष विभज्योतक संवर्धन (Shoot apical meristem Culture) :

- अधिक मांग वाले आर्थिक रुप से महत्त्वपूर्ण पादपों का तीव्र उत्पादन इस विधि से किया जा सकता है ।पादप ऊतक संवर्धन से पादपों का उत्पादन प्रचलित विधियों की तुलना में तीव्र गति से किया जा सकता है ।
- पादप ऊतक संवर्धन से विभाजन क्षेत्रों (meristematic areas) का संवर्धन करके नये पादप तैयार किये जा सकते हैं । ये पादप विषाणु व रोगमुक्त होते हैं । ऐसा माना जाता है कि पादपों के स्तम्भ शीर्ष पर विषाणु जीवाणु तथा अन्य रोगकारकों का संक्रमण नहीं होता है । इसके अतिरिक्त यह विधि विषाणु रहित जननद्रव्य उत्पन्न करने में भी सक्षम है ।
- ऐच्छिक जीन प्रारूपों का वृहद उत्पादन ।
- अंतर्राष्ट्रीय आदान-प्रदान की सुविधा प्रदान करना ।
- जननद्रव्य का अंतःपात्रे संरक्षण (in vitro conservation) तथा शीत संरक्षण (cryopreservation) करना ।



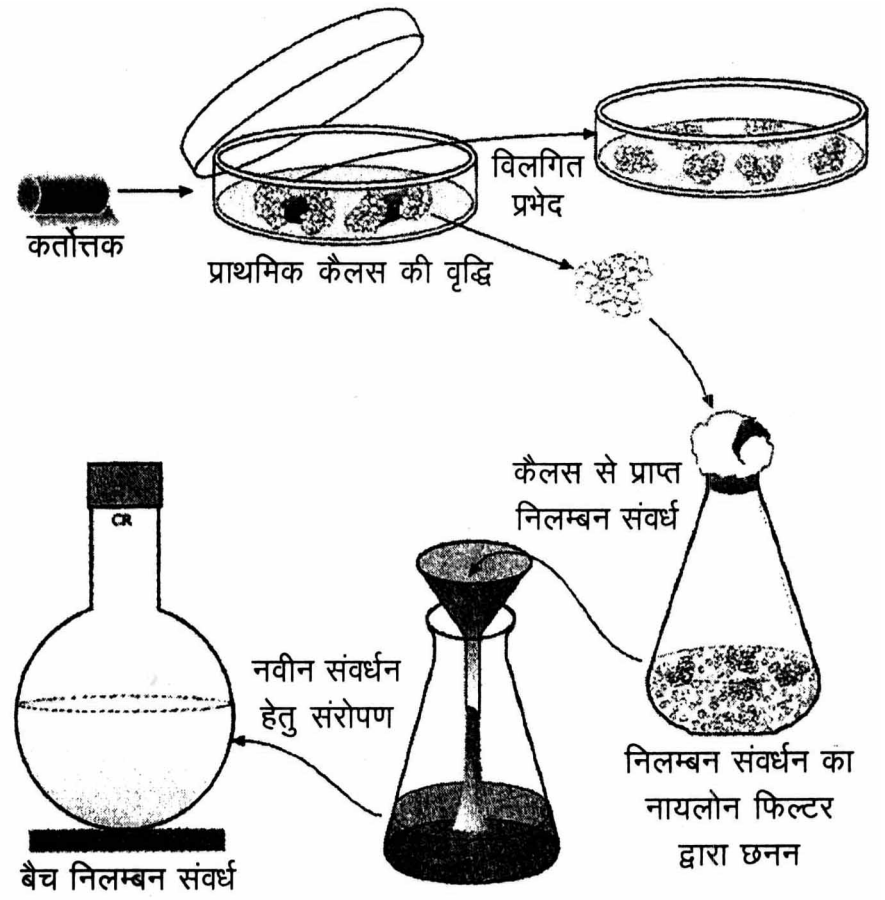
चित्र 9.2 : प्ररोह शीर्ष संवर्धन का सचित्र निरुपण

9.2.8 कायिक भ्रूणोद्भवन (Somatic embryogenesis)

- विशिष्ट जननद्रव्य (elite germplasm) का वृहद गुणन ।
- कृत्रिम बीजों (artificial seeds) का निर्माण करना ।
- भ्रूणजनित प्रोटोप्लास्ट (embryogenic protoplats) के लिये आवश्यक स्त्रोत के रुप में प्रयोग किया जा सकता है।
- इस तकनीक का उपयोग जीनीय रूपान्तरित पादपों के निर्माण के लिए किया जा सकता है ।
- बीजों में उपस्थित प्राथमिक मेटाबोलाइटो (primary metabolites) का निर्माण करना । उदाहरणस्वरूप, बीजों से तेल व वसा प्राप्त करना ।

9.2.9 कैलस संवर्धन (Callus culture)

- कायिक भ्रूणोद्भवन तथा अंगोदभवन (somatic embryogenesis and organogenesis) के द्वारा पादपों का निर्माण करना ।
- विषाणु रहित पादपों (virus free plants) का निर्माण करना ।
- उपयोगी सोमाक्लोनीय (somaclonal) व युग्मकक्लोनीय (gametoclonal) विभिन्नताओं को प्रेरित करवाना ।
- प्रोटोप्लास्ट तथा निलम्बित संवर्धन तैयार करना ।
- उपयोगी द्वितीयक मेटाबोलाइटों (secondary metabolites) का निर्माण करना ।
- मूल्यवान गुणों जैसे रोग प्रतिरोधन, खरपतवारनाशी के प्रति प्रतिरोधक क्षमता तथा द्वितीयक चयापचयों का अति उत्पादन आदि गुण युक्त कोशिका वंशक्रमों (cell lines) का चयन करना।
- उत्परिवर्तन का अध्ययन करना ।



चित्र 9.3 : कैलस प्रेरण तथा संवर्धन

9.2.10 द्वितीयक मेटाबोलाइटों का अंतःपात्रे उत्पादन (in vitro production of secondary metabolites)

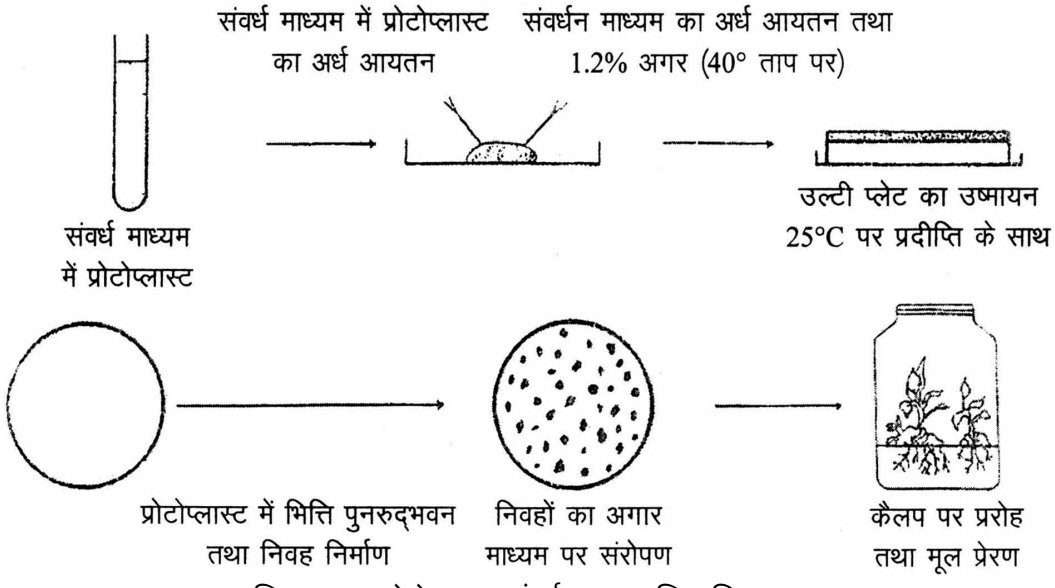
- मातृ पादपों को नष्ट किये बिना उपयोगी यौगिकों जैसे औषधियों, सुग्रन्थ पदार्थों, वर्णकों, स्वादकों आदि का उत्पादन करना।
- ऐसे नये चयापचयों का निर्माण करना जो सामान्यत: पादपों द्वारा स्त्रावित नहीं किये जाते हैं ।
- जैव रुपान्तरण तथा एलिसिटर का अध्ययन ।

9.2.11 सोमाक्लोनीय विभिन्नतायें (somaclonal variations)

- सुस्थापित तथा उच्च उत्पादन क्षमता वाले जीन प्रारूपों का चयन ।
- अधिक मात्रा में द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उत्पादन करने वाले जीन प्रारूपों का चयन ।
- उत्कृष्ट रोग प्रतिरोधक तथा शुष्क प्रतिरोधक क्षमता युक्त जीन प्रारूपों का चयन ।
- उपयोगी जीन प्रारूपों में संकरण के बिना अतिरिक्त जीनीय विभिन्नताओं को प्रेरित करना ।

9.2.12 प्रोटोप्लास्ट विलगन, संवर्धन व संलयन (Protoplast isolation, culture and fusion)

- साइब्रिड्स, हाइब्रिड्स तथा कायिक संकरों को तैयार करने के लिये दूरस्थ जीन पूलों को इकट्ठा करना।
- अंगक पुनर्संयोजकों (organelle recombinants) का निर्माण करना ।
- विशिष्ट वंशक्रमों में कोशिकाद्रव्यीय नर बंध्यता (cytoplasmic male sterility) का स्थानान्तरण करना ।
- जीनीय रुपान्तरण के लिये सामग्री के रुप में ।
- जीनीय विभेदकों को प्रेरित करना ।



चित्र 9.4 : प्रोटोप्लास्ट संवर्धन का सचित्र निरुपण

9.2.13 जीनीय रुपान्तरण (Genetic Transformation):

- नवीन जीनीय संयोजनों (novel genetic combinations) को उत्पन्न करने के लिये बाह्य डी.एन.ए. (foreign DNA) को प्रवेश कराना ।
- उच्च उत्पादन क्षमता वाली संवेदनशील प्रजातियों में रोग तथा कीट प्रतिरोधन उत्पन्न करने हेतु सम्बन्धी तथा असम्बन्धी पादप प्रजातियों से ऐच्छिक जीनों का स्थानान्तरण ।
- जीनों की संरचना व कार्यों का अध्ययन करना ।
- द्वित्तीयक मेटाबोलाइटों के अति-उत्पादन हेतु मूल संवर्धन (root culture) को प्रेरित करना ।

9.2.14 शीत संरक्षण अथवा निम्न ताप संग्रहण (Cryopreservation or low temperature storage)

- उपयोगी जननद्रव्य का दीर्घकालीन संरक्षण ।
- प्राकृतिक जीनीय विभिन्नताओं का संरक्षण ।

9.2.15 प्रोटोप्लास्ट, कोशिकाओं, ऊतकों व अंगों का संवर्धन ()

- विषाणुओं का प्रतिरूपण (replication of viruses)
- पूर्ण परजीवियों का संवर्धन ।
- निमेटोड का संवर्धन ।
- पादप विषों (phytotoxins) का परीक्षण ।
- कोशिक चक्र का अध्ययन ।
- उपापचयी क्रियाओं का अध्ययन ।
- पोषण संबंधी क्रियाओं का अध्ययन ।
- आकारिकीय व विकासीय अध्ययन ।

बोध प्रश्न

1. बीजों की अंकुरण क्षमता तथा अंकुरण प्रतिशतता में वृद्धि किस तकनीक से की जा सकती है?

   .....

2. बीजों की स्वत: बन्ध्यता तथा बीज प्रसुप्तता का निदान किस तकनीक से किया जा सकता है?

   .....

3. अंत: पात्रे निषेचन किस तकनीक से संभव है ?

   .....

4. परागकोश संवर्धन का प्रमुख उपयोग क्या है ?

   .....

5. जननद्रव्य का अंत: पात्रे संरक्षण तथा शीत संरक्षण करने के लिये कौन सी तकनीक उपयुक्त है?

.....

6. कायिक भ्रूण का क्या तात्पर्य है?

.....

7. द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उत्पादन पादप ऊतक संवर्धन की किस तकनीक से किया जा सकता है?

.....

9.3 हरितगृह एवं हरित आवास तकनीक (Green House and Green Home Technology) :

पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का एक ऐसे विकल्प के रूप में प्रयोग किया जा रहा है जिसमें दुर्लभ तथा संकटग्रस्त पादपों के साथ-साथ कठिनाई से उगाये जाने वाले पौधों का प्रजनन संभव हो गया है । वास्तव में पादप उत्पादन नियंत्रित परिस्थितियों में किया जाता है । पादपों को प्रयोगशाला में तैयार करने के पश्चात् उन्हें वृद्धि करने के लिये वातावरण की प्राकृतिक स्थितियों में आरोपित कर दिया जाता है ।

प्राकृतिक परिस्थितियों में परंपरागत विधियों से उगाये जाने वाले पौधों को अनेक वातावरणीय विषमताओं अथवा अवरोधों का सामना करना पड़ता है । वातावरण में उगने वाले पादपों को कोहरा, वायु वेग, वर्षा, सूखा तथा अन्य पर्यावरण प्रभावों का सामना करना पड़ता है । इन स्थितियों में पादपों की जीवन क्षमता कम होती जाती है अथवा वातावरण संघर्ष होने के कारण वे जीवित नहीं रहते हैं । हरितगृह ऐसी व्यवस्था है जिसमें बागवानी गतिविधियों को अधिक सुगमतापूर्वक तथा रोचक तरीके से संचालित किया जा सकता है । इस तकनीक में ऐसे पादपों को भी उगाया जा सकता है जिनका उत्पादन परम्परागत विधियों से अत्यधिक कठिन है अथवा असंभव है । हरित ग्रह का उपयोग निम्न उद्देश्यों के लिये किया जा सकता है -

- बहुवर्षी पादपों को उगाने के लिये ।
- बीजों से बीजांकुर तैयार करने के लिये ।
- शीत ऋतु में कोमल पादपों की सुरक्षा के लिये ।
- सजावटी पौधों जैसे गुलदाउदी तथा आर्किड्स को उगाने के लिये ।
- गमले में उगाये जाने वाले पादपों को तैयार करना ।
- व्यवसायिक उद्देश्यों के लिये पौधघर अथवा नर्सरी तैयार करने हेतु ।

हरितगृह कृषि एक ऐसा शस्य तंत्र है जो खुली वायु में (खेतों में) फसलों को उगाने से होने वाले अनेक नुकसानों से बचाता है । एक हरित गृह फसलों को अत्यधिक तेज वायु, भारी वर्षा, विनाशकारी तूफानों तथा कीटों व व्याधियों से बचाता है ।

हरित गृहों का संचालन एक खर्चीला उपक्रम है क्योंकि इन राहों में जल, प्रकाश, तापमान, आर्द्रता आदि की सुचारु व्यवस्था के लिये सतत् विद्युत व जल आपूर्ति आवश्यक है । इसीलिये इसमें अतिरिक्त व्यय होता है । हरित ग्रहों के निर्माण में लगने वाली सामग्री बहुत महंगी होती है तथा ऊर्जा व्यय भी बहुत अधिक होता है । इन सभी बातों को ध्यान में रखते हुये अब वैज्ञानिकों ने हरितग्रहों के स्थान पर हरित आवासों का निर्माण तथा उपयोग करने के सुझाव दिये हैं । सौर ऊर्जा संचालित हरित आवास

अत्याधुनिक है तथा इनमें ऐसी निर्माण सामग्री का प्रयोग किया जाता है जो सौर प्रकाश को अधिक से अधिक उपलब्ध करा सकें तथा तापमान को मौसम के अनुसार नियंत्रित कर सके ।

9.4 शुष्क तथा अर्द्धशुष्क पादप जैव प्रौद्योगिकी (Arid and Semi-Arid Plant Biotechnology) :

भारतवर्ष का अधिकांश भाग, दक्षिण-पूर्व एशिया, सहारा-अफ्रीका, पूर्वी अफ्रीका का अधिकांश भाग तथा लैटिन अमेरिका के कुछ स्थान अर्द्धशुष्क क्षेत्र के रूप में जाने जाते हैं । इन स्थानों की विशेषता यहाँ लंबी शुष्क ऋतुयें, अनियमित वर्षा, अननुमन्य मौसम तथा पोषक तत्वों से रहित भूमि आदि है । अर्द्धशु स्थानों पर रहने वाले व्यक्तियों की भोजन आवश्यकता यहाँ उगाई जाने वाली प्रमुख फसलों जैसे - ज्वार, बाजरा तथा मूंगफली आदि से पूरी होती है । ये फसलें अनेक जैवीय व अजैवीय (biotic and abiotic) दाबों (stresses) से प्रभावित होती है जिसके कारण व्यापक आर्थिक नुकसान होता है । लवणता तथा सूखा भी प्रमुख अजैवीय दाब है जो विश्व के अनेक हिस्सों में कृषि उत्पादन के लिये खतरा साबित हो रहे हैं ।

9.4.1 अर्द्धशुष्क क्षेत्रों में फसलों के लिये जीनीय उन्नयन (Genetic Enhancement for Crops of the Semi-Arid Areas)

अर्द्धशुष्क क्षेत्रों में उगायी जाने वाली फसलों के जीन स्रोतों ने उनके उत्थान के लिये जीनों की उपलब्धता सुनिश्चित की है । जंगली प्रजातियों के अनेक जीन शश्य फसलों के जीन पूल में स्थानान्तरित भ्रूण संवर्धन तकनीक (interspecific hybridization and embryo culture technique) से सम्पन्न किया गया है । कुछ अंतरप्रजातीय अक्षम संकरों (interspecific incompatible crosses) में, निषेचन तो होता है परन्तु कुछ समय बाद ही भ्रूण का पतन हो जाता है । इस प्रकार के संकरों में 'भ्रूण मुक्ति' (embryo rescue) तकनीक से सफल पादप प्राप्त किये जा सकते हैं ।

अर्द्धशुष्क क्षेत्रों में उगाई जाने वाली फसलें अनेक विपत्तियों (constraints) उदा. रोग (जीवाणु कवक, विषाणु, कीट'-श्रृंगी, खर-पतवार (e.g. Striga) तथा शुष्कता आदि से पीड़ित रहती है । इन क्षेत्रों में उच्च उत्पादन तथा उत्पादन में निरन्तरता प्राप्त करने के लिये तनाव-प्रतिरोधी अथवा सहिष्णु (stress resistant or tolerant) फसलों का विकास करना एक अत्यधिक उपयोगी युक्ति सिद्ध हुई है । परम्परागत पादप प्रजनन के साथ जैव प्रौद्योगिकी फसली प्रजातियों की सहायता से इन क्षेत्रों में फसल उत्पादन में न सिर्फ बढ़ोत्तरी हुई बल्कि पादप प्रजातियाँ इन दबावों का अधिक दृढ़ व प्रतिरोधम बनकर सामना करती है । जीनीय रूपान्तरण फसलों की पोषक गुणवत्ता में सुधार करने में सफल हुई है साथ ही साथ मानव स्वास्थ्य तथा ग्रामीण स्तर पर घरेलू खाद्य सुरक्षा के स्तर पर आशातीत सुधार हुआ है ।

9.4.2 फसल सुधार में जैव प्रौद्योगिकी की भूमिका (Role of Biotechnology in Crop Improvement)

फसलों को हानि पहुंचाने वाले कीटों तथा रोगों का प्रबंधन अनेक प्रकार से किया जा सकता है । इसमें जैवप्रौद्योगिकी का प्रमुख योगदान है । फसल पादप प्रतिरोधकता, जैविक नियंत्रण अथवा उन्नत फसल

अनुपालन के द्वारा फसल सुधार किया जा सकता है । जीन प्रारुपीय उन्नयन एक सर्वोत्तम विकल्प है क्योंकि यह तकनीक एक आसान, सस्ता व दीर्घकालीन प्रबन्धन उपलब्ध कराती है जो किसानों के लिये एक वरदान है । इस तकनीक के परिणामस्वरूप अनेक फसलों की उन्नत प्रजातियां विकसित की जा चुकी है । जीनीय रूपान्तरण अनेक फसलों में ऐसे अनेक गुणों का जीनीय समावेश करने में सक्षम है जो पादपों में दुर्लभ हैं अथवा प्रारम्भिक जीन पूल में नहीं पाये जाते हैं । गत वर्षों में कुछ शिंब (Legume) पादपों के लिये जीनीय रूपान्तरण विधियां विकसित की जा चुकी हैं । इन विधियों का बहुतायत में उपयोग अर्द्धशुष्क क्षेत्रों में शिम्ब फसलों के उन्नत उत्पादन में किया जा रहा है ।

9.4.3 खाद्यान्न पादपों में ऊतक संवर्धन (Tissue Culture in Cereals)

बाजरे में एक ही पीढ़ी में समयुग्मजी (homozygous) पादपों का निर्माण करने की तकनीक अभी कुछ ही वर्षो में विकसित की गई है । इस तकनीक से बनने वाले पौधे द्विअगुणित (dihaploids) कहलाते हैं । इस तकनीक में संवर्धन माध्यम पर रखे गये स्पाइकिकायें (spikelets) मादा युग्मकों से दोहरे अगुणित (double haploids) पादपों का निर्माण करते हैं । इस विधि से विकसित किये गये पादपों में सामान्य बीज निर्माण होता है तथा ये प्रयोगशाला के बाहर प्रजनन करने में सक्षम होते हैं ।

अभी हाल ही के वर्षों में, ज्वार के मीजोफिल आधारित प्रोटोप्लास्ट तथा जंगली ज्वार के भ्रूणीय कोशिका निलंबन (embryonic cell suspension) से पादप पुनरुद्भवन में सफलता प्राप्त हुई है । इन परिणामों से, भविष्य में जीन स्थानांतरण हेतु ज्वार के प्रोटोप्लास्ट का उपयोग किये जाने की संभावना प्रबल हो गई है ।

9.4.4 समेकित कीट प्रबंधन व पराजीनीय फसलें (Integrated Pest Management and Transgenic Crops)

फसली पादपों में प्रतिरोधक क्षमता में उल्लेखनीय वृद्धि करने की दिशा में समेकित कीट प्रबन्धन एक अत्यन्त उपयोगी विधि के रूप में अनेक वर्षों से प्रयोग में लाई जा रही है । परम्परागत विधि से पादपों में प्रतिरोधक क्षमता विकसित करने की प्रक्रिया धीमी तथा कठिन है क्योंकि इसमें अनेक जीन शामिल रहते हैं जो अलग-अलग गुणसूत्रों पर स्थित होते हैं । जीन रूपान्तरण तकनीक के विकास के साथ ही अब कीट-प्रतिरोधक जीनों को पादप संजीन (plant genome) में प्रविष्ट कराना सुगम हो गया है । व्यवसायिक स्तर पर कीट नियंत्रण (pest control) करते हुए जैवीय कीटनाशकों (biological pesticides) में कुछ जीवाणु जैसे - बेसिलस थूरिन्जियेन्सिस (Bacillus thuringiensis) (Bt) तथा बेसिलस स्फीरिकस(B. sphearicus) सर्वाधिक सफल सूक्ष्म जीवों के रूप में पहचान लिये गये है । निकट भविष्य में कीटनाशी जीनधारक पराजीनीय पादप कीट प्रबन्धन में प्रमुख भूमिका का निर्वाह करेंगे । कपास (cotton), सोयाबीन (soybean), मक्का (maize), आलू (potato), चावल (rice), गोभी (broccoli), वालनट (walnut), सेब (apple),तथा अल्फाल्फा (alfalfa) आदि फसलों में बीटी. (Bt) जीन समायोजित किये जा चुके हैं ।

बोध प्रश्न

8. विश्व के किन्हीं दो शुष्क व अर्द्धशुष्क क्षेत्रों के नाम लिखिये ।

.....

9. किन्हीं दो जैवीय कारकों के नाम बताइये जो अर्द्धशुष्क पादपों को प्रभावित करते हैं?

.....

10. समेकित कीट प्रबंधन द्वारा तैयार की गयी किन्हीं चार पराजीनीय फसलों के नाम बताइये।

.....

11. एक जैवीय कीटनाशक का नाम बताइये ।

.....

12. कृत्रिम बीज तैयार करने के लिये कौन सा संवर्धन उपयोगी है?

.....

9.5 सारांश (Summary) :

सूक्ष्मप्रवर्धन की तकनीक के अनेक उपयोगी पक्षों को समझने के पश्चात् यह ज्ञात होता है कि इस तकनीक के प्रयोग से पादप उत्पादन, उन्नत बीजों के उत्पादन तथा फसल सुधार जैसे कार्यक्रमों में क्रांतिकारी गति लाई जा सकती है । सूक्ष्मप्रवर्धन की अनेक विधियों जैसे - बीज संवर्धन, भ्रूण संवर्धन, अंडाशय संवर्धन, परागकोष संवर्धन, अंत: पात्रे निषेचन, प्ररोह शीर्ष संवर्धन आदि पादप प्रजातियों में गुणात्मक व मात्रात्मक सुधार करने में अत्यधिक सहायक है ।

यद्यपि पादप ऊतक संवर्धन तकनीक पादप उत्पादन का एक सुदृढ़ विकल्प है परन्तु प्राकृतिक स्थितियों में पादपों का प्रजनन व उन्नतीकरण अभी भी एक चुनौतीपूर्ण कार्य है । विशेषकर वातावरण की विषम परिस्थितियों जैसे उच्च ताप, न्यूनतम आर्द्रता पोषणरहित भूमि आदि में पौधों की मृत्युदर अधिक हो जाती है । इसके साथ ही साथ उपयोगी फसलों जैसे सब्जी, फल, सजावटी पौधे व औषधीय पौधों का गुणवत्ता युक्त उत्पादन करने के लिये निरन्तर तकनीक सुधार के प्रयास किये जा रहे हैं । इसी दिशा में किये गये प्रयासों का परिणाम है हरित गृह व हरित आवास । इन तकनीक रूप से उन्नत आवासों में वातावरण की विपरीत परिस्थितियों के हानिकारक प्रभावों को कम करके पौधों का विकास कराया जाता है । वर्तमान में अनेक उन्नत प्रजाति के पादपों का उत्पादन हरित आवास व हरित ग्रहों में किया जा रहा है । हरित आवास में परिस्थितियों को नियंत्रित अथवा अनुकूल करने के लिये विद्युत ऊर्जा व जल आपूर्ति का विशेष प्रबन्ध करना आवश्यक होता है । यद्यपि हरित गृह तकनीकी रूप से अत्यधिक उपयोगी होते हैं परन्तु इनकी व्यवस्था व संचालन अत्यन्त खर्चीली होती है । वैकल्पिक ऊर्जा के रूप में अब सौर ऊर्जा संचालित हरित आवास प्रयोग में लाये जा रहे है । इनकी गुणवत्ता व उपयोगिता बहुत अधिक होने के साथ ही साथ ये पर्यावरणीमित्र, कम खर्चीले व ऊर्जा के अक्षय स्त्रोतों पर निर्भर रहते हैं ।

9.6 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. बीज संवर्धन तकनीक से

2. भ्रूण संवर्धन तकनीक से
3. अण्डाशय व बीजाण्ड संवर्धन
4. अगुणित पादपों का निर्माण
5. प्ररोह शीर्ष संवर्धन तकनीक
6. ऊतक संवर्धन तकनीक से निर्मित भ्रूण जिनकी उत्पत्ति कायिक कोशिकाओं से हुई हो
7. कैलस संवर्धन तकनीक से
8. दक्षिणपूर्वी एशिया तथा पूर्वी अफ्रीका
9. खरपतवार तथा रोगकारक जीवाणु विषाणु कवक तथा कीट
10. कपास, सोयाबीन, मक्का, आलू चावल, गोभी आदि
11. बेसिलस थूरिजिंइयेंसिस
12. कायिक भ्रूणोद्भवन

9.7 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions):

1. पादप ऊतक संवर्धन तकनीकों के विभिन्न अनुप्रयोगों का विस्तारपूर्वक वर्णन कीजिये ।
2. निम्न पर संक्षिप्त टिप्पणी लिखिये
   क. **हरित आवास** व हरित गृह तकनीक
   ख. कैलस संवर्धन
   ग. समेकित कीट प्रबन्धन
3. शुष्क तथा अर्द्धशुष्क पादप जैवप्रौद्योगिकी के प्रमुख अवयवों को स्पष्ट कीजिये ।
4. फसल सुधार में जैवप्रौद्योगिकी के महत्त्व पर एक लघु टिप्पणी लिखिये ।
5. अर्द्धशुष्क क्षेत्रों में फसलों के जीनीय उन्नयन को स्पष्ट कीजिये ।

9.8 शब्दावली (Glossary) :

जीनीय रूपान्तरण	Genetic Transformation
समेकित कीट प्रबन्धन	Intergrated Pest Management
तनाव प्रतिरोधी	Stres Resistant
अर्द्धशुष्क क्षेत्र	Semi-Arid Areas
जैवीय तथा अजैवीय कारक	Biotic and Abiotic Factors
हरित गृह व हरित आवास	Green House and Green Home
शीत संरक्षण	Cryopreservation

9.9 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. दुबे, ए टेक्सट बुक ऑफ बॉयोटेक्नोलॉजी, एस. चाद एण्ड कम्पनी, नई दिल्ली ।
2. चेन्नारयप्पा, मोलीक्यूलर बॉयोटेक्नोलॉजी : प्रिंसिपल्स एण्ड प्रेक्टिस, यूनिवर्सिटी प्रेस, हैदराबाद।
3. गुप्ता, मोलीक्यूलर बॉयोलोजी एण्ड जेनेटिक इंजीनियरिंग, रस्तोगी पब्लिकेशन्स, मेरठ ।
4. राजदान, इन्ट्रोडक्शन दू प्लान्ट टिश्यू कल्चर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं., नई दिल्

इकाई 10

द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-I : एक परिचय

(Secondary Plant Metabolites-I: An Introduction)

इकाई की रूपरेखा

10.0 उद्देश्य
10.1 प्रस्तावना
10.2 एल्केलॉइड्स
10.3 टर्पिनॉइड्स
10.4 फीनॉलिक्स
10.5 विलगन तथा पृथक्करण की तकनीक
10.5.1 सूक्ष्मदर्शिकी
10.5.2 सूक्ष्ममिति
10.5.3 कोशिका प्रभाजन
10.5.4 क्रोमेटोग्राफी
10.6 सारांश
10.7 बोध प्रश्नों के उत्तर
10.8 अभ्यासार्थ प्रश्न
10.9 शब्दावली
10.10 संदर्भ ग्रन्थ

10.0 उद्देश्य (Objective)

पादपों को मनुष्य द्वारा सदियों से उपयोग में लिया जा रहा है । इनका उपयोग भोजन (फल व सब्जियों) के अतिरिक्त कई प्रकार से होता है । पादप अपनी वृद्धि और विकास के लिए कई चीजों का उत्पादन करता है जो प्राथमिक मेटाबोलिसम के द्वारा निर्मित होते हैं

इस अध्याय का उद्देश्य द्वितीयक मेटाबोलाइट के बारे में सम्पूर्ण जानकारी प्रदान करता है । इस अध्याय से हमें ज्ञात होगा कि किस प्रकार प्राथमिक मेटाबोलिसम के द्वारा निर्मित प्राथमिक मेटाबोलाइट (वसा, प्रोटीन और कार्बोहाइड्रेट्स) के अतिरिक्त पादप द्वारा कुछ अन्य मेटाबोलाइट उत्पन्न किये जाते हैं जो पादप के पर परागण व रक्षा (defence) में प्रयुक्त होते हैं इन्हें द्वितीयक मेटाबोलाइट कहते हैं । इनके मुख्य प्रकार एल्केलाइड्स, टर्पिनोइड्स और फिनाइल प्रोपनाइड्स होते हैं । इनका उत्पादन किस प्रकार अमीनो अम्लों से होता है । संरचना में किस प्रकार वलयरुपता (aromaticity) आती है तथा इनके क्या-क्या उपयोग होते हैं । इनका मानव के विभिन्न रुपों में किस प्रकार उपयोग किया जाता है । अत: इस अध्याय से हमें एक रुपरेखा मिलेगी कि मानव की भोजन को स्वादिष्ट बनाने व विभिन्न रोगों में ये द्वितीयक मेटाबोलाइट्स अहम् भूमिका निभाते हैं ।

10.1 प्रस्तावना (Introduction) :

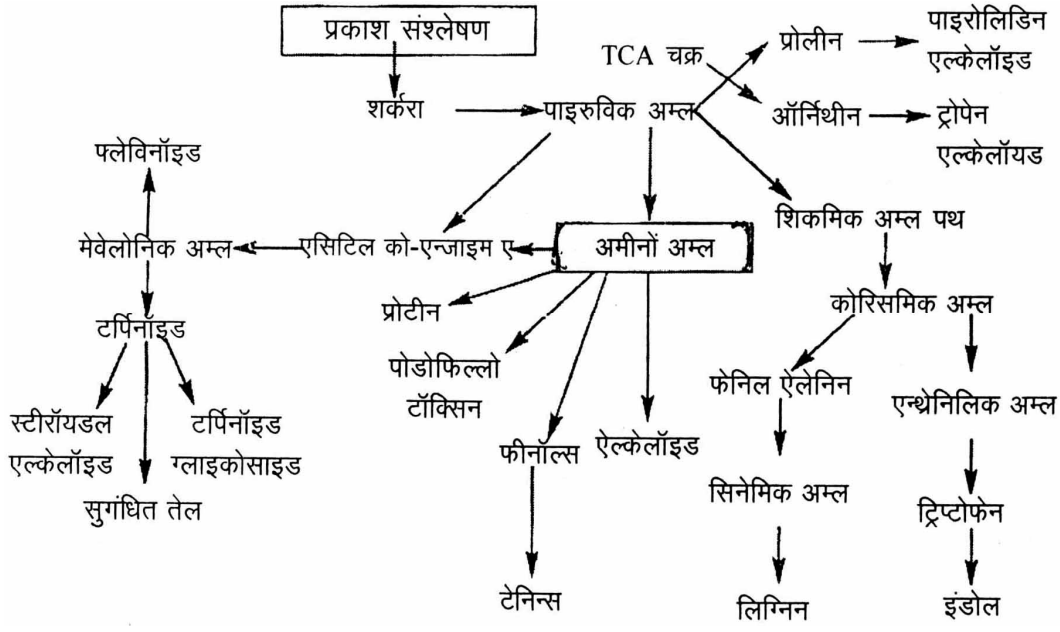
किसी भी कोशिका में होने वाली सभी रासायनिक अभिक्रियाऐं उपापचय (metabolism) के अन्तर्गत आती हैं । इसमें प्राथमिक मेटाबोलिज का लक्ष्य प्रकाश संश्लेषण (photosynthesis) तथा श्वसन (respiration) होता है । इनके परिणामस्वरूप बने उत्पादों में प्राय: वसा (lipid), प्रोटीन (protein) तथा कार्बोहाइड्रेट (carbohydrate) होते हैं, जिन्हें प्राथमिक मेटाबोलाइट्स कहते हैं । प्राथमिक मेटाबोलाइट्स जीवन की अनवरतता (continuity) के लिए आवश्यक है ।

इसके अतिरिक्त पादप कोशिका में कार्बन तथा ऊर्जा मिलकर कुछ अन्य उत्पाद बनाते हैं जिनका पादप की वृद्धि और विकास पर प्रत्यक्ष प्रभाव तो नहीं होता है किन्तु ये उत्पाद विशिष्ट कार्यों हेतु संश्लेषित होते हैं । इन्हें **द्वितीयक मेटाबोलाइट** (secondary metabolites) कहते हैं । ये पादप में बहुत कम मात्रा में पाये जाते हैं तथा इनकी उपस्थिति भी विशिष्ट कुलों, वंशों, जातियों या पादप अंगों तक सीमित होती है । आजकल द्वितीयक मेटाबोलाइटों को प्राकृतिक उत्पाद (natural product) भी कहते है । ये प्राकृतिक उत्पाद अद्भुत पादप रसायन है जो पादप में जैविक महत्त्व से अधिक, आर्थिक और औषधीय महत्त्व के होते हैं, इन दिनों प्राकृतिक उत्पादों पर शोध रसायन विदों की प्राथमिकता है । ये प्राकृतिक उत्पाद अनेक तरह से उपयोग में आ सकते हैं जो आदिवासी/लोकजीवन की घरेलू चिकित्सा से शुरु होकर संगध उत्पादों तक फैली है । इनमें औषधीय उत्पाद, रंगने वाले उत्पाद, गोंद, रेसिन व रबर आदि आते हैं जो रासायनिक उद्योगों में उपयोगी है । कुछ द्वितीयक मेटाबोलाइट खाद्य एवम् पेय पदार्थों को सुस्वाद एवम् सुवासित बनाते हैं ।

प्राकृतिक उत्पाद पादप में भी विभिन्न प्रकार की जैविक भूमिकाएँ (vital role) अदा करते हैं जैसे सूक्ष्मजीवी संक्रमण से सुरक्षा, परागण एवम् प्रकीर्णन में सहायता तथा अन्योन्य ऊत्प्रेरण आदि । प्राथमिक तथा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के मध्य सीधे-सीधे अंतर कर पाना बहुत मुश्किल काम है । द्वितीयक मेटाबोलाइटों को हम मुख्य रुप से तीन समूहों में विभाजित कर सकते हैं -

1. एल्केलॉयड्स (Alkaloids)
2. टर्पिनोइड्स (Terpenoids)
3. फेनिल प्रोपेनॉइड्स (Phenyl propanoids)

द्वितीयक पादप मेटाबोलाइटो की अधिकता ही पादपों को औषधीय महत्त्व प्रदान करती है । ये पादप उत्पाद मानव शरीर क्रिया पर अत्यधिक प्रभाव डालते हैं । इनका उपयोग संक्रामक रोगों को दूर करने में किया जाता है । इनका उपयोग पुरातन काल से आर्युवेद में होता आया है । उच्च पादपों में मिलने वाले प्राथमिक मेटाबोलाइट्स का व्यवसायिक उत्पादन कम खर्चीला होता है । इसी कारण ये उद्योगों में कच्चे माल की तरह प्रयुक्त होते हैं । जैसे वनस्पति तेल (साबुन व डिटरजेन्ट बनाने के लिए) तथा कार्बोहाइड्रेट्स (सुक्रोस, स्टार्च, पेक्टिन व सेलुलोस बनाने के लिए) । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स प्राथमिक मेटाबोलाइटो के व्युत्पन्न होते हैं किन्तु इनकी उपस्थिति पादप जगत में काफी सीमित होती है । किसी भी यौगिक के रासायनिक गुणों के निर्धारण के लिए इनका शुद्ध रुप में पृथ्थकरण आवश्यक है । शुद्ध द्वितीयक मेटाबोलाइटो का उपयोग आधुनिक चिकित्सा पद्धति में भी किया जाता है । स्मरण रहे कि द्वितीयक मेटाबोलाइटो का उद्गम प्राथमिक मेटाबोलाइटो से ही होता है और समस्त कार्बनिक संरचनाएं प्रकाश संश्लेषण से ही प्राप्त होती हैं (चित्र 10.1)।



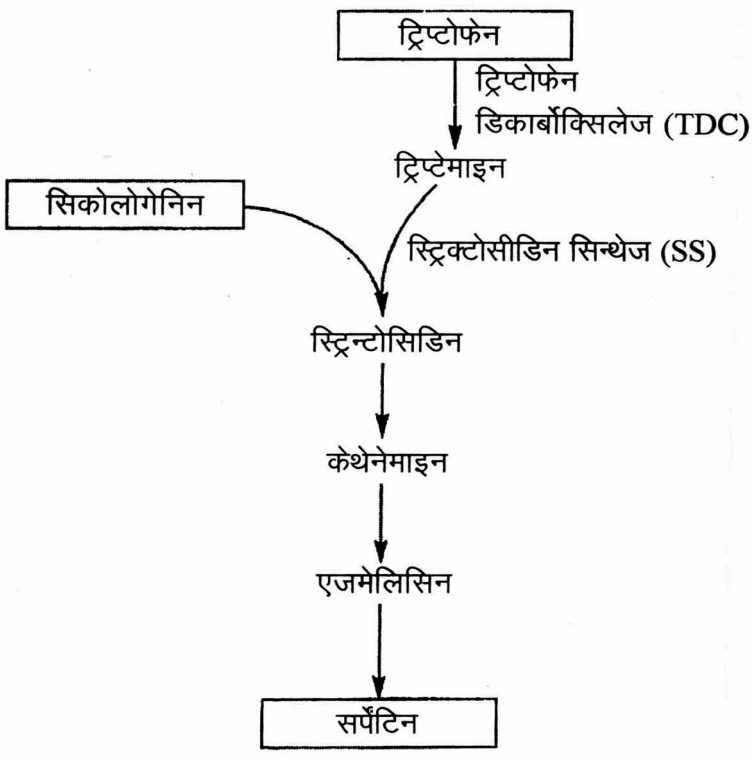
चित्र 10.1 अमीनों अम्लों से द्वितीयक मेटाबोलाइटों का जैव संश्लेषण

10.2 एल्केलाइड्स (Alkaloids) :

एल्केलाइड्स शताब्दियों से मानव उपयोग में आये हैं । मोर्फीन (Morphine) को सर्वप्रथम **सेरटर्नर** (Serturner) ने व 1806 में पोपी (Poppy) से पृथक किया था । इसके पश्चात् दूसरे यौगिक विलगित किये गये । प्रथम एल्केलाइड कुनैन (Quinine) का संश्लेषण **लीडरबर्ग** (Ladenburg) द्वारा 1886 में किया गया जिसे 1827 में ही पृथक किया जा चुका था । एल्केलाइड्स को ऐसे प्राकृतिक उत्पाद के रुप में परिभाषित किया जाता है जो क्षारक होते हैं तथा इनके विषम चक्रीय वलय में नाइट्रोजन उपस्थित होता है । ये प्राकृतिक रुप से सक्रिय होते हैं ।

पेल्टीयर (Pelletier) के अनुसार "एल्केलाइड्स ऋणात्मक ऑक्सीकरण अवस्था वाले नाइट्रोजन युक्त वे चक्रीय कार्बनिक यौगिक हैं जिनका वितरण सजीवों में बहुत ही सीमित है । साधारण क्षारक जैसे कि मिथाइल अमीन, ट्राई मिथाइल अमीन तथा अन्य सीधी मृंखला युक्त एल्किल अमीन, एल्केलाइड्स में शामिल नहीं किये जाते हैं । कुछ विशेषज्ञ दूसरे यौगिकों जैसे बीटेन्स कोलिन तथा मसकेरिन को भी एल्केलाइड नहीं मानते । ये यौगिक अमीनो अम्लों से संश्लेषित होते हैं तथा जैविक अमीन या प्रोटोएल्केलाइड्स की श्रेणी में रखे जाते हैं । कुछ विद्वानों ने फेनिल एल्किल अमीनों को भी वास्तविक एल्केलाइड नहीं माना है क्योंकि इनमें भी नाइट्रोजन चक्र के बाहर स्थित होती है ।

ठीक इसी प्रकार प्रकृति में अत्यधिक मिलने वाले विटामिन बी (विटामिन बी 1 = थाइमिन) को भी एल्केलाइड की श्रेणी में नहीं रखा जाता है, क्योंकि इनमें नाइट्रोजन चक्र में नहीं होता है । इसी प्रकार प्यूरिन आधारित यौगिक (कैफीन, थीयोफिलिन एवम् थीयोब्रोमीन) भी वास्तविक एल्केलाइड नहीं माने जाते क्योंकि ये अमीनों अम्लों से संश्लेषित नहीं होते हैं । इसी प्रकार कई ऐसे कार्बोनिक यौगिक हैं जिनमें नाइट्रोजन अमाइड के रुप में उपस्थित होता है किन्तु इनके औषधीय गुणों के कारण इन्हें एल्केलाइड्स कहा जाता है । जैसे कि कोलचीसिन (Colchicine), पाइपरीन (Piperine) आदि ।



चित्र 10.2 एल्केलाइड का जैव संश्लेषण

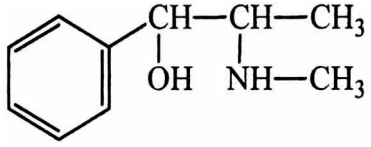
वास्तविक एल्केलाइड्स में कुनेन (quinine) तथा रेसरपाइन (reserpine)आते हैं । एल्केलाइड्स का वर्गीकरण बहुत ही जटिल है क्योंकि नित्य नवीन शोधों के चलते नये रासायनिक संचरना वाले एल्केलाइड खोजे जा रहे है । प्रारम्भ में इन एल्केलाइड्स को इनके वानस्पतिक कुलों के आधार पर वर्गीकृत किया गया । जैसे सोलेनेसी कुल में मिलने वाले एल्केलाइड्स सोलेनेशियस कहलाये । इस तरह के वर्गीकरण को वर्गीकीय वर्गीकरण (Taxonomic classification) कहते हैं । इस तरह के वर्गीकरण से विभिन्न रासायनिक संरचना वाले एल्केलाइड्स एक ही समूह में रखे गये । बाद में भेषजिक वर्गीकरण(Pharmacological classification) किया जाने लगा जिसमें एल्केलाइड्स को उनकी भेषजिक क्रिया (pharmacological action) के आधार पर वर्गीकृत किया गया है । इस प्रकार दर्द निवारक (analgestic) तथा हृदय सक्रिय (cardioactive) जैसे शब्द प्रचलन में आये ।

इस तरह के वर्गीकरण से एक नई समस्या यह उत्पन्न हुई कि जिन एल्केलाइड्स में एक से अधिक भेषजिक गुण(pharmacological properties) होते हैं उन्हें किस समूह में रखा जाए । जैसे पाइपरीन न केवल प्रतिशोधन (antiinflammattory)बल्कि जैव उपलब्धता उद्दीपक (bioavalibility enhancer) की भांति भी कार्य करता है । इन सभी समस्याओं को दूर करने के लिए एल्केलाइड्स को उनकी रासायनिक संरचना के आधार पर वर्गीकृत किया गया है । इन्हें निम्न समूहों में वर्गीकृत किया गया हैं जो सार्वभौमिक रुप से स्वीकार्य हैं ।

i) **फिनाईल एल्किल अमीन समूह (Phenyl Alkyl Amine Group)**

इस समूह **में वे** एल्केलाइड्स आते हैं जो फेनिलएलेनीन अमीनो अम्ल से संश्लेषित होते हैं । उदाहरण - एफीड्रीन (Ephedrine), स्थूडोएफीड्रीन (Pseudeophedrine) एवम टेक्सीन (Taxiene) । इनमें

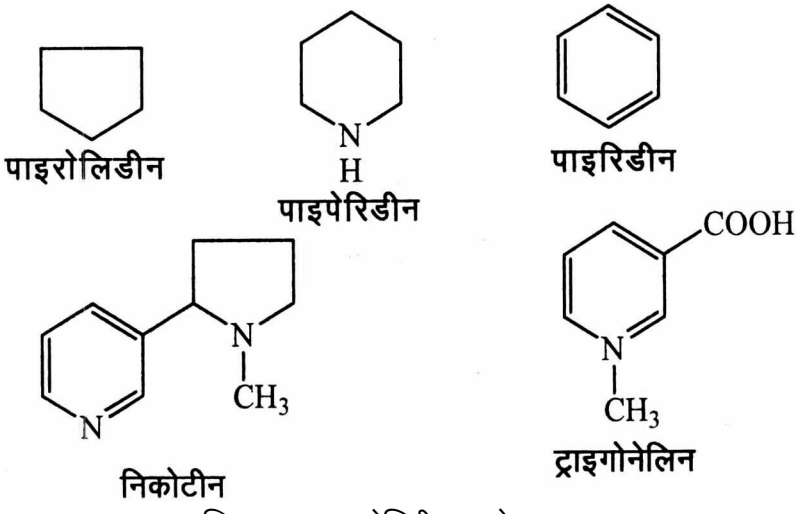
माँसपेशियों में जकड़न दूर करने की (antispasmodic) औषधीय प्रवृत्ति होती है । इसे बुखार (Hay fever), एलर्जी (Allergy) तथा **दमा** (Asthma) में भी दिया जाता है ।



चित्र 10.3 एफिड्रीन

ii) **पाइरोलिडीन, पाइपेरीडिन एवम् पाइरिडीन (Pyrrolidine, Piperridine and Pyridine)**

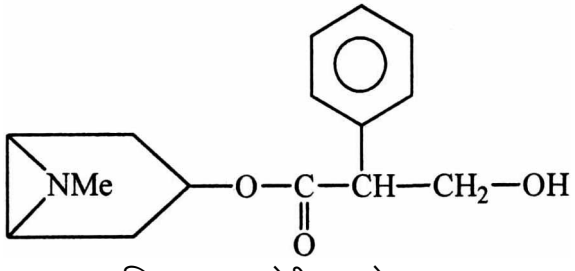
ये वास्तविक एल्केलाइड्स होते हैं । इनमें पाइपेरीडिन का उदाहरण कोनीसीन (conisine) है । पाइरिडीन एल्केलाइड्स में मुख्यत: तम्बाकू के एल्केलाइड आते हैं जो निकोटिनिक अम्ल तथा उसके व्यूत्पन्न होते हैं । इसका प्रचलित उदाहरण ट्राइगोनेलिन (Trigonelline) है ।



चित्र 10.4 पाइरोलिडीन एल्केलाइड्स

iii) **ट्रोपेन एल्केलाइड्स (Tropane Alkaloids)**

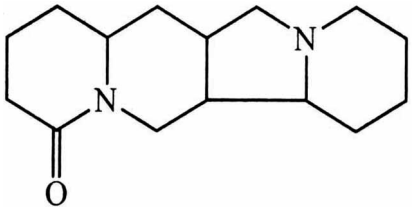
सोलेनेसी कुल में पाये जाने वाले एल्केलाइड्स [हायोसायमीन (Hyoscyamine) एट्रोपीन (Atropine) तथा हायोसिन (Hyoscine) इस श्रेणी के उदाहरण है । इस तरह के एल्केलाइड्स में धतूरे के एल्केलाइड्स भी सम्मिलित हैं । इरिथ्रोगायलोन कोका (Erythroxylon coca) से मिलने वाला कोकीन (cocaine) इसी समूह का पहला स्थानीय निश्चेतक (localanasthesia) है ।



चित्र 10.5 एट्रोपीन एल्केलाइड

iv) **क्विनोलिजिडीन (Quinolizidine) और पाइरोलिजिडीन (pyrolizidine) एल्केलाइड**

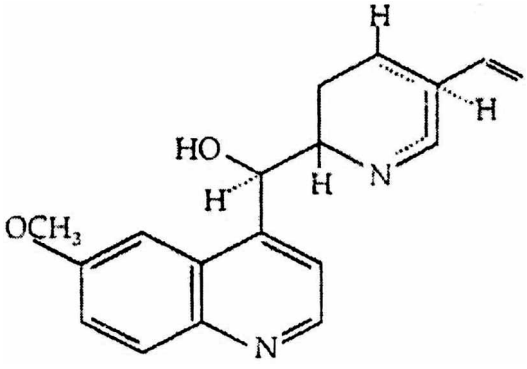
क्विनोलिजिडीन एल्केलाइड्स को लयुपिन (Lupin) एल्केलाइड्स भी कहते हैं क्योंकि ये फेबेसी कुल के ल्यूपिनस वंश में पाये जाते हैं । पाइरोलिजिडीन एल्केलाइड्स एस्टरेसी (Asteraceae) तथा बोराजिनेसी (Boraginaceae) कुल में पाये जाते हैं ।



चित्र 10.6 लयुपिन एल्केलाइड

v) **क्युनोलीन (Quinoline)**

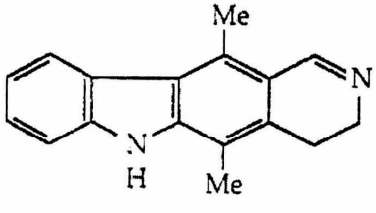
ये सिनकोना वृक्ष की छाल से पृथक किये जाते हैं और काफी समय से मलेरिया की चिकित्सा में प्रयोग किये जा रहे हैं (चित्र 10.7)



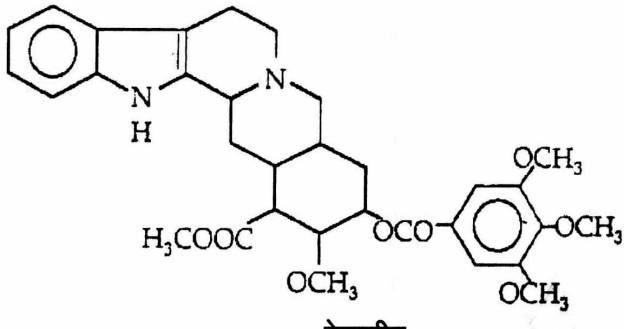
चित्र 10.7 : कुनैन

vi) **इन्डोल एल्केलाइड (Indole alkaloids)**

ये एपोसाइनेसी (Apocynaceae) और रुबीऐसी (Rubiaceae) कुल में पाये जाते हैं । ये ट्रिपटेमीन (Tryptamine) के व्यूत्पन्न है । इस समूह का एल्केलाइड रेसरपीन (Recerpine) है जो सर्पगन्धा (Rawolfia serpentina) से पृथक किया जाता है । इस समूह में अनेक अर्बुदरोधी औषधियाँ (Anticancerous drugs) भी आती है (चित्र 10.8) ।



इलिपटीन

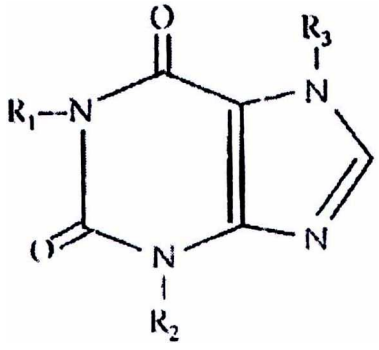


रेसरपीन

चित्र 10.8 : इण्डोल एल्केलाइड्स के उदाहरण

vii) **प्यूरीन एल्केलाइड्स**

ये पादप जगत में विस्तृत रुप से फैले हैं तथा चाय व काफी में अधिक मात्रा में पाये जाते हैं (चित्र 10.9) । इन्हें चाय (Comellia sinensis), कॉफी (Coffea arabica) और कोका (Theobroma cacao) से विलगित किया जाता है ।



1 $R_1=R_2=R_3=Me$ Caffeine

2 $R_1=H,=R_3=Me$ Theobromine

3 $R_1=R_2=Me,R_3=H$ Theobromine

4 $R_2=H,R_1=R_3=Me,$ Paraxanthine

चित्र 10.9. कुछ प्रमुख प्यूरीन एल्केलाइड्स के उदाहरण

बोध प्रश्न

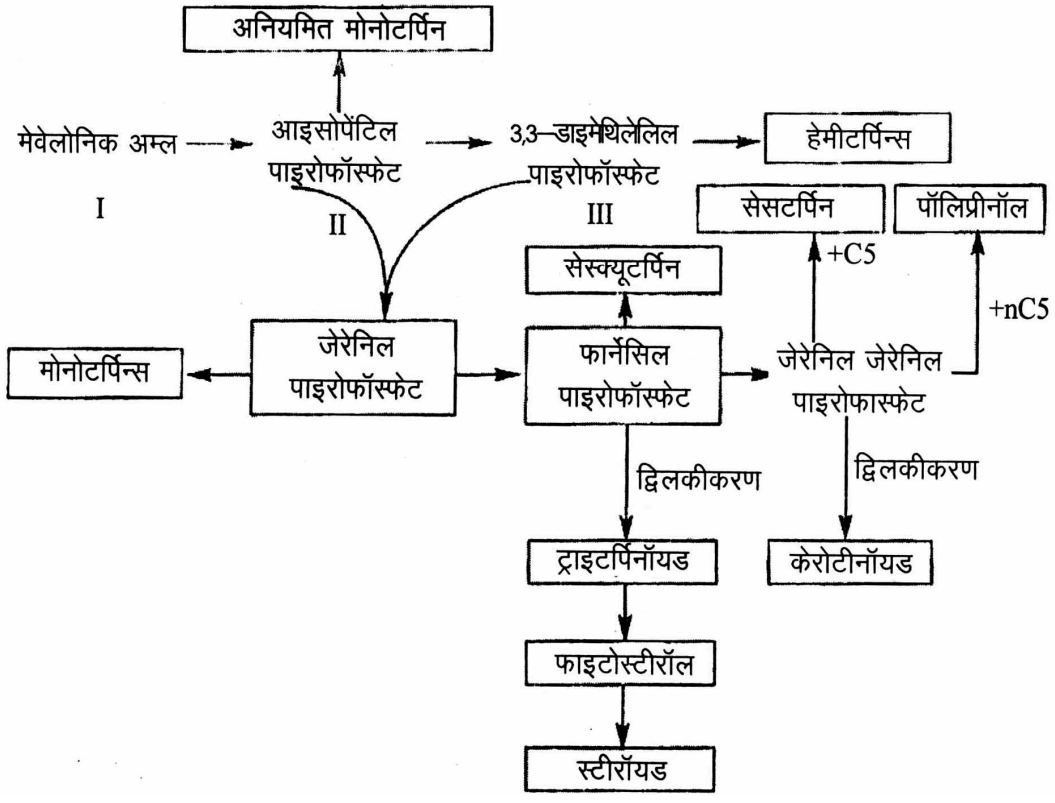
1. द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उद्गम होता है -
   अ) तृतीयक मेटाबोलाइट से ब) प्राथमिक मेटाबोलाइट से
   स) अ व ब दोनों द) उपरोक्त कोई नहीं ।
2. द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का पादप की वृद्धि एवं विकास पर प्रत्यक्ष प्रभाव पड़ता है- सत्य/असत्य
3. निम्नलिखित में कौनसा उत्पाद द्वितीयक मेटाबोलाइट है -
   अ) केवल एल्केलाइड ब) केवल फीनोल
   स) केवल टरपीनाइड द) उपरोक्त सभी
4. कुछ मेटाबोलाइट्स (जैसे -carotene) की संरचना प्राथमिक मेटाबोलाइट की तरह होती है किन्तु ये द्वितीयक मेटाबोलाइट्स होते हैं । ये जिस क्षेत्र में आते हैं उसे ..... कहते हैं ।
   अ) श्वेत क्षेत्र ब) रक्त क्षेत्र
   स) ग्रे क्षेत्र द) कुछ नहीं
5. द्वितीयक मेटाबोलाइटो को प्राकृतिक उत्पाद (natural product) भी कहते हैं । सत्य/असत्य
6. एल्केलाइड के विषम चक्रीय विलय में..... उपस्थित होती है -
   अ) ऑक्सीजन ब) सल्फर
   स) नाइट्रोजन द) कोई नहीं ।

7. एल्केलाइड्स के वर्गीकरण का आधार है -
   अ) वर्गीकीय वर्गीकरण ब) रासायनिक संरचना
   स) भेषजिक सक्रियता द) उपरोक्त सभी
8. फेनिल एल्किल अमीन (phenyl alkyl amine) एक.....है-
   अ) सत्य एल्केलाइड ब) आभासी एल्केलाइड
   स) असत्य एल्केलाइड द) उपरोक्त कोई नहीं
9. पाइरिडिन एल्केलाइड का उदाहरण है -
   अ) ट्राइगोनिलिन ब) कोलचीसिन
   स) पाइपीरीन द) उपरोक्त कोई नहीं
10. इण्डोल एल्केलाइड का उदाहरण जो अबुर्दरोधी यौगिक है -
   अ) कैथेरेन्थीन ब) एट्रोपीन
   स) कोकीन द) ल्युपिन

10.3 टरपीनाइड्स (Terpenoids):

यह द्वितीयक मेटाबोलाइट्स की एक वृहद् श्रेणी है । इसमें विविधता पूर्ण यौगिक आते हैं जो जल में अघुलनशील होते हैं । ये एसीटिल कोएन्जाइम ए (Acetyl CoA) की इकाईयों के मिलने से बनते हैं । Acetyl CoA के तीन अणु संघनित होकर मेवोलोनिक अम्ल (Mevolonic Acid) का निर्माण करते हैं । यह सक्रिय मेवोलेनिक अम्ल, एसीटिल कोएन्जाइम से जुड़कर आइसोपेन्टिनिल डाई फास्फेट (Isophentynyl diphosphate) का निर्माण करता है । यह टरपीनाइड्स की इकाई है । टरपीनाइड्स का पादप वृद्धि में काफी योगदान होता है । अत: कार्यों के आधार पर इन्हें प्राथमिक मेटाबोलाइट समझना चाहिए ।

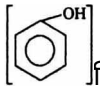
उदाहरणत: जिब्बरलीन्स जो डाईटरपीन्स होते हैं तथा पादप हार्मोन्स की तरह कार्य करते हैं । केरोटीनाइड्स (carotenoids) टेट्राटरपीन्स होते हैं तथा इनका मुख्य कार्य प्रकाश संश्लेषण एवं उससे सम्बन्धित ऊतकों की रक्षा करना है । कुछ पादपों में टरपीन्स विषाक्त होते हैं अत: कीटों से रक्षा भी करते हैं । उदाहरण के लिए पाइरीथोइड्स (pyrethroids) जो गुलदाऊदी (erysanthamum) वंश से प्राप्त होते हैं । कई पादपों में वाष्पशील मोनोटरपीन्स (volatile monoterpenes) और सेस्क्युटरपीन्स (sesquiterpenses)का मिश्रण मिलता है जो पादप को अभिलाक्षणिक ग्रन्थ प्रदान करता है । जैसे पिपरमिन्ट (pipermint) तथा नींबू (Lemon) (चित्र 10.10)।



चित्र 10.10 टरपीनॉइड्स के संश्लेषण का आरेखीय निरुपरण

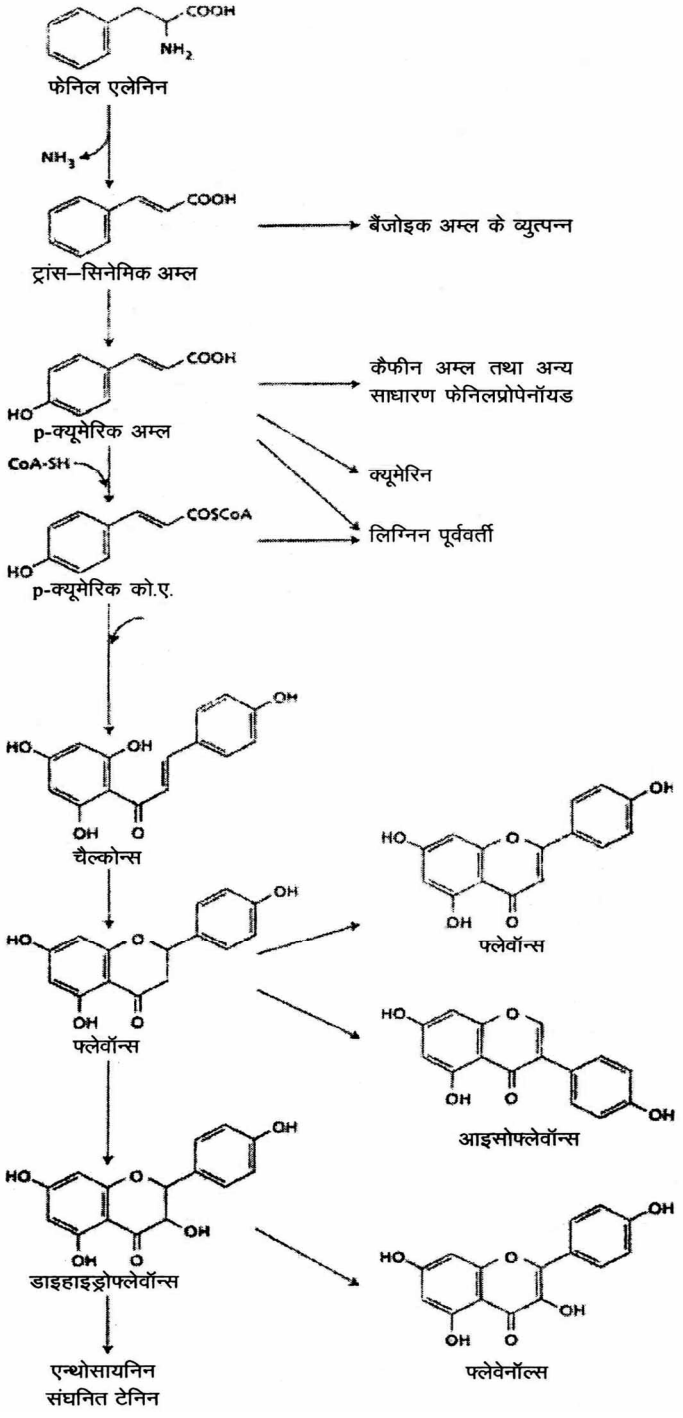
आधुनिक युग में पराजीनी पादपों (transgenic plants) के माध्यम से टरपीन्स का उत्पादन बढ़ाया जा सकता है । टरपीन्स की उत्पादन वृद्धि से पादपों की कीटों से भी रक्षा हो जाती है । कुछ टरपीनोइड्स में तो शाकाहारी कशेरुकी (herbivorous vertebrates) के प्रति भी सक्रियता होती है । कार्डीनोलाइड्स (cardenolides) ऐसे शर्करा युक्त यौगिक हैं जो मवेशियों के प्रति विषाक्त होते हैं किन्तु मानव में हृदय रोगों के उपचार में उपयोगी है । स्टीराइड्स एवं टरपीनाइड्स के साथ यदि शर्करा भी जुड़ी हो तो त्युत्पन्न ग्लाइकोसाइडिक यौगिक सेपोनिन कहलाते हैं । ये जल में घुलनशील होते हैं तथा इनमें डिटर्जन्ट गुण होता है ।

10.4 फीनोलिक्स (Phenolics) :

यह द्वितीयक मेटाबोलाइटों का वह समूह है, जिसमें रंगीन यौगिक आते हैं । इन यौगिकों में एरोमेटिक वलय पर हाइड्रोक्सिल क्रियात्मक समूह  मिलता है । कुछ फीनोल्स कार्बनिक विलायकों में घुलनशील होते हैं जबकि अन्य जल में । फीनोल्किस के द्वारा पादपों को यांत्रिक सहारा मिलता है तथा रंगीन होने के कारण पुष्पों में इनकी उपस्थिति परागण में सहायक होती है । साथ ही साथ ये हानिकारक पराबैंगनी किरणों को भी अवशोषित करते है ।

इनके जैव संश्लेषण के लिए फेनिलएलेनाइन (phenyl alanine) एक मध्यवर्ती की तरह कार्य करता है । शिकिमिक अम्ल मार्ग (shikimic acid pathway) द्वारा कार्बोहाइड्रेट्स को ऐरोमैटिक अमीनो अम्लों में बदला जा सकता है । यह क्रिया पादपों में ही संभव है । तीन अमीनों अम्लों-फेनिलएलेनाइन,

टाइरोसीन तथा ट्रिप्टोफेन का उत्पादन प्राणियों में संभव नहीं है । मृदा में फीनोल्स की उपस्थिति अन्य पादपों की वृद्धि पर नकारात्मक प्रभाव डालती हे । किसी पादप द्वारा अन्य पादप की वृद्धि पर यह नकारात्मक प्रभाव एलीलोपेथी कहलाता है (चित्र 10.11) । इस वृहद् कक्षा को कई उपकक्षाओं में विभाजित किया गया है जो निम्नलिखित है ।



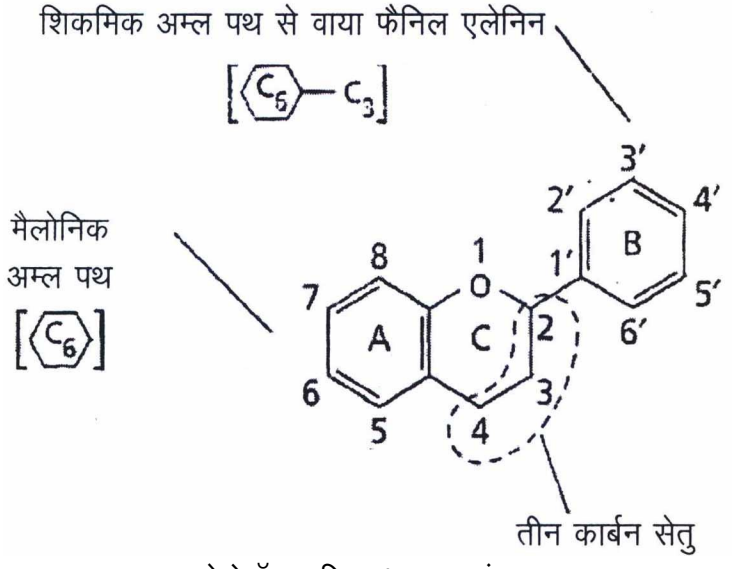
चित्र 10.11 विभिन्न प्रकार के फिनोलिक यौगिकों का संश्लेषण तथा उदाहरण

लिग्निन (Lignin)

ये जटिल फीनोल्स के वृहद् अणु होते हैं । ये फेनिल प्रोपेनाइड्स के शाखित बहु लक होते हैं । इस प्रकार के बहु लको में विभिन्न इकाईयों C-C या C-O-C बन्ध द्वारा जुड़कर जटिल त्रिविमीय संरचना बनाते हैं । यह कोशिका भित्ति में पाये जाते हैं तथा कोशिका को सहारा तथा संचालन में सहायता प्रदान करते हैं । लेकिन इनकी यांत्रिक दृढ़ता के कारण ये पादप को मजबूती तथा संवहन ऊतकों को आधार प्रदान करते हैं । लिग्निन की उपस्थिति घावों पर कीटों के आक्रमण से भी रक्षा करती है ।

फ्लेवोनॉइड्स (Flavonoids)

यह फीनोलिक्स का एक वृहद समूह है । इसकी रासायनिक संरचना दो ऐरोमैटिक वलयों की तीन कार्बन सेतु से जुडकर बनी होती है (चित्र 10.12) । यह संरचना हमें दो अलग-अलग पथ द्वारा मिलती है । शिकिमिक अम्ल द्वारा पहली ऐरोमैटिक वलय प्राप्त होती है तथा दूसरी ऐरोमैटिक वलय मेवालोनिक अम्ल पथ (mevalonic acid pathway) द्वारा प्राप्त होती है । इनमें फ्लेवोन्स (Flavones) तथा आइसोफ्लेवोन्स (isoflavones) आते हैं ।



फ्लेवोनॉयड की आधारभूत संरचना

चित्र 10.12 फ्लेवोनॉइड की आधारिक संरचना का निरुपण

इनकी मूल संरचना समान होती है परन्तु चार, पांच तथा सात कार्बन पर हाइड्राक्सिल समूह की स्थिति बदलती रहती है । इनके साथ शर्करा भी संयुक्त हो सकती है । हाइड्राक्सिल तथा शर्करा समूह दोनों ही जल में इनकी घुलनशीलता बढ़ाते हैं ।

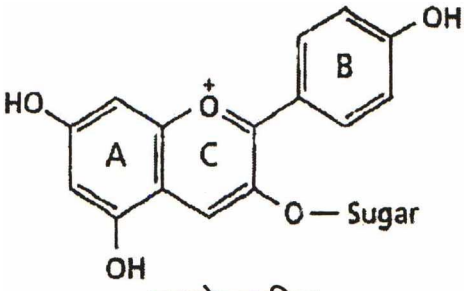
फ्लेवोनॉइड्स (Flavonoids) पराबैंगनी किरणों से भी पौधों की सुरक्षा प्रदान करते हैं । ये लघु तरंगदैर्ध्य की विकिरणों को अवशोषित करते हैं । फ़्लोवोन्स तथा फ्लेवेनोल्स फ्लेवेनाइड्स के उप समूह है । ये पुष्प तक ही सीमित नहीं होते बल्कि पादप के हरे भागों में भी मिलते हैं । कुछ पादपों की जड़ों से फ्लेवोन्स का स्रावण होता है जो नाइट्रोजन स्थारक सह जीवन में मदद करता है ।

आइसोफ्लेविनॉयड्स में ऐरोमैटिक वलय की स्थिति आइसो पर होती है तथा इसमें प्रतिसूक्ष्म जीवी गुणधर्म Antimicrobial poperties) होती है । ये सामान्यत: शिम्बधारी पादपों (Leguminous plants) में मिलते हैं । रोटेनाइड्स भी इसी समूह के मेटाबोलाइट्स है जो कीटनाशी प्रवृति के होते

है । कुछ आइसोफ्लेवेनाइड्स में फाइटोअलेक्सिन के गुण भी होते हैं जो किसी भी फसल को रोगकारकों के आक्रमण से बचाते हैं ।

ऐन्थोसाइनिन्स (Anthoeyanins)

ये रंगीन फ्लेवेनाइड्स होते हैं जो अधिकतर पुष्पों में पाये जाते है तथा परागण हेतु कीटों को आकर्षित करते हैं । ये (ऐन्थोसाइनिन ग्लाइकोसाइड्स होते हैं, जिनकी तृतीय कार्बन (C-3) स्थिति पर शर्करा जुड़ी होती है (चित्र 10.13) ।



एन्थोसाइनिन

चित्र 10.13 : ऐन्थोसाइनिन की रासायनिक संरचना

टेनिन (Tanins)

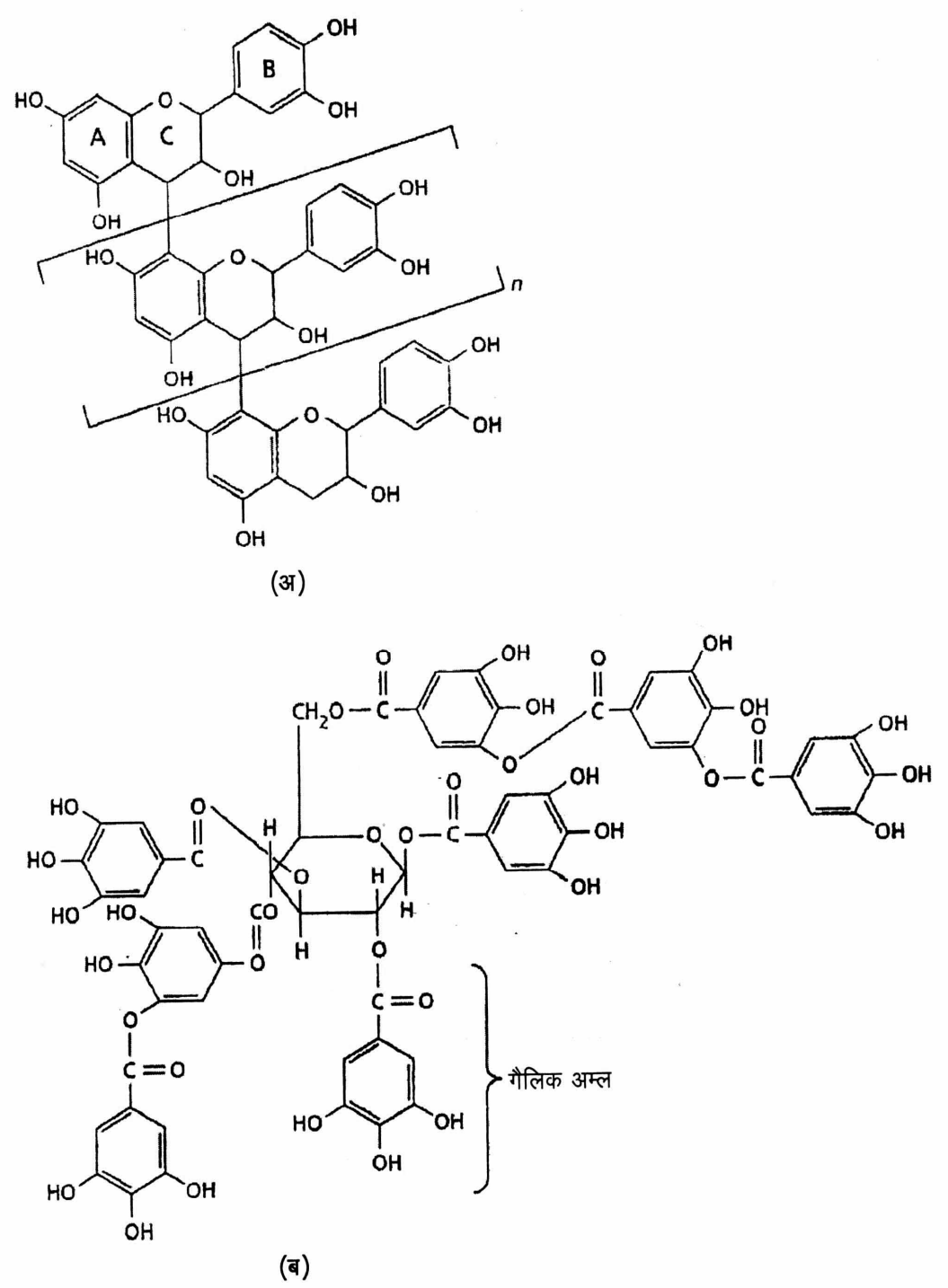
ये वो गहरे रंग के यौगिक होते हैं जो चर्म शोधन (Tanning) के काम आते हैं इसी कारण इन्हें टेनिन कहते हैं । इनकी दो श्रेणियां होती है i) संघनित टेनिन (condensed tanins) तथा जल अपघटनीय टेनिन (hydrolysable tannis) ।

जब फ्लेवेनाइड इकाईयों का बहुलकीकरण होता है तो संघनित टेनिन का निर्माण होता है । ये काष्ठीय पादपों में मिलते हैं । जलअपघटनीय टेनिन वे असमांगी बहुलक हैं जिनमें गैलिकअम्ल (gallice acid) एवम सरल शर्करा उपस्थित होती है । ये विषैले होते हैं तथा सूक्ष्मजीवियों की वृद्धि को सार्थक रुप से कम कर देते हैं । ये कषैले होते हैं (चित्र 10.14) ।

जो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स प्रकृति ने पादप को आत्मरक्षा के लिये प्रदान किये हैं उनका उपयोग हम न केवल रोगों के उपचार में बल्कि खाद्य योजकों के रुप में भी कर सकते हैं । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का पादप से विलगन, उनकी पहचान तथा अभिलक्षणन आवश्यक है जिससे इनका विस्तृत अध्ययन कर अधिकाधिक उपयोग कर सकें साथ ही इनके विलगन एवम् अन्तः पात्रेय उत्पादन हेतु नवीन तकनीक विकसित की जा सके ।

बोध प्रश्न

11. टरपीनाइड किन इकाईयों से मिलकर बना है -
    अ) वासोप्रीन ब) आइसोप्रीन
    स) डाईप्रीन द) उपरोक्त कोई नहीं ।
12. जिबरलीन उदाहरण है -
    अ) डाईटरपीन ब) टेट्राटरपीन
    स) ट्राईटरपीन द) उपरोक्त कोई नहीं



चित्र 10.14 : विभिन्न प्रकार के टेनिन अ) संघनित टेनिन और ब) जल अपघटनीय टेनिन

13. द्वितीयक मेटाबोलाइट का वह समूह जिसमें रंगीन यौगिक आते हैं
    अ) फीनोल्स ब) टरपीनाइड्स
    स) सेपोनिन द) उपरोक्त सभी
14. पहली ऐरोमेटिक वलय का निर्माण..... मे होता है।
    अ) शिकिमिक एसिड परिपथ ब) ग्लाइकोटिस
    स) यूरिया चक्र द) उपरोक्त कोई नहीं
15. पलैविनॉइड किस वर्ग में आते है
    अ) ए-थोसाइनिन ब) फ्लेवोन
    स) फ्लेवेनोल द) उपरोक्त सभी
16. फूलों में रंग का कारण है -
    अ) टरपीनाइड ब) एन्थोसाइनिन
    स) एल्केलाइड द) उपरोक्त सभी
17. टेनिन होते हैं -
    अ) जलअपघटनीय ब) केवल संघनित
    स) (अ) और (ब) द) उपरोक्त कोई नहीं

विलगन तथा पृथक्करण हेतु तकनीक (Technique for isolation & Separation)

पादपों से द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स के विलगन तथा पृथक्करण के लिए अनेक प्राचीन तथा नवीन तकनीकों का प्रयोग किया जाता है । इनमें से कुछ सामान्य तथा महत्वपूर्ण तकनीकों का अध्ययन इस अध्याय में करेंगे।

10.5.1 सूक्ष्मदर्शिकी (Microscopy)

सूक्ष्मदर्शी (microscope) जीव वैज्ञानिकों का "प्राथमिक यंत्र" कहलाता है । यह यंत्र कोशिका की सामान्य संरचना, कोशिका विभेदन तथा वर्णकों के अध्ययन के लिए आवश्यक है । प्रतिदीप्तिशील सूक्ष्मदर्शी (fluorescent microscope) एक ऐसा ही यंत्र है जिसका उपयोग द्वितीयक मेटाबोलाइटों के पृथक्करण में किया जाता है । द्वितीयक मेटाबोलाइट ऐसे जैव अणु है जो प्रदीप्त क्षेत्र में विभिन्न रंगों की दीप्ति उत्पन्न करते हैं । कुछ द्वितीयक मेटाबोलाइट्स को जब पराबैंगनी किरणों से उदभासित किया जाता है तो ये लघु तरंग दैर्ध्य प्रकाश को अवशोषित कर लेते हैं परन्तु दृश्य प्रकाश को परावर्तित करते हैं । इन्हें दीप्त पदार्थ कहते हैं । उदाहरणत: पाइपीरीन (piperine) ऐसा एल्केलाइड है जो पीतहरित प्रदीप्ति उत्पन्न करता है । इस तकनीक से कोशिका में ही नहीं बल्कि थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी (TLC) तथा कॉलम क्रोमेटोग्राफी (CC) में भी द्वितीयक मेटाबोलाइटो को देखा जा सकता है । प्रावस्था विपर्यासी सूक्ष्मदर्शी (phase contrast microscope) में आवादन और विभेदन क्षमता तो चमकीले क्षेत्र वाले सूक्ष्मदर्शी के समान होती है परन्तु इसमें अभिरंजन की आवश्यकता नहीं होती है । इस प्रकार के सूक्ष्मदर्शी में दो छनित्र तंत्र (filter systems) आवश्यक हैं । प्राथमिक छनित्र प्रकाश स्रोत तथा बिम्ब के मध्य

नीले रंग में तथा द्वितीयक छनित्र नेत्रिका (eye piece) तथा बिम्ब (object) के बीच में रखा जाता है ।

10.5.2 सूक्ष्ममिति (micrometry)

इस तकनीक से सूक्ष्मदर्शी के माध्यम से कोशिका की मापन इकाई 0.001 कम या 1 माइक्रोमीटर (μ m) होती है । इसके लिए दो उपकरण काम में आते हैं i) ओकुलर सूक्ष्ममापी तथा ii) स्टेज सूक्ष्ममापी । स्टेज सूक्ष्ममापी एक स्लाइड होती है जिसके मध्य में एक पैमाना होता है जिसमें एक मिलीमीटर के सौ भाग बने होते हैं । मापन के लिए सबसे पहले ओकुलर सूक्ष्ममापी को अशांकित किया जाता है । अशांकन के पश्चात् इस ओकुलर के माध्यम से कोशिका का मापन किया जाता है । इस प्रकार हम कोशिकाओं का मापन कर उनमें से द्वितीयक मेटाबोलाइटों का अधिक उत्पादन करने वाली बड़े आकार की कोशिकाओं का चयन कर सकते हैं ।

10.5.3 कोशिक प्रभाजन (Cell fractionation)

चूंकि द्वितीयक मेटाबोलाइट सामान्यत: रिक्तिका में संग्रहित होते हैं, इनके पृथक्करण के लिए यह विधि प्रयुक्त होती है । इस विधि में विभिन्न कोशिकीय घटको जैसे केन्द्रक, माइट्रोकोन्ड्रिया, प्लास्टिड राइबोसोम आदि को पृथक किया जाता है । कोशिकाओं को तोड़ने के लिए अलग-अलग तकनीकों का उपयोग किया जाता है जो कोशिका और उसकी यांत्रिकक्षमता पर निर्भर करता है । सामान्यत: निम्न विधियां काम में ली जाती है ।

अ) ऊतक समांगीकरण (tissue homogenisation)

ब) अपकेन्द्रीकरण (Centrifugation)

स) धावपृथक्कन (Elutriation)

अ) ऊतक समागीकरण (Tissue homogenisation)

इस प्रक्रिया में कोशिका झिल्ली को रासायनिक या यांत्रिक विधि द्वारा तोड़ा जाता है जिससे कोशिकीय घटक पृथक हो जाते हैं । सामान्यत: इसके लिए तरल माध्यम का उपयोग किया जाता है । इसके लिए प्रयुक्त सामान्य विधियाँ निम्न है ।

i) **पीसाई (Grinding)**

यह सबसे पुरानी विधि है । इसमें खरल तथा मूसली (Mortar & Pestle) का उपयोग कर ऊतक को पीसा जाता है ।

ii) **सर्वमिश्रक (Ominixture)**

इस विधि में ऊतक को स्टील की पत्तियों के मध्य तीव्रता से घुमाकर प्रभाजन किया जाता है ।

iii) **डाऊन्स समांगीकरण (Dounce Homogenizer)**

इसमें कांच की एक मूसली होती है जिसका आखरी भाग गोलाकार होता है । यह काँच के नलिकानुमा खरल (tuberous mortar) में कार्य करता है । इस प्रक्रिया का उपयोग केन्द्रक के पृथ्थकरण के लिए किया जाता है ।

iv) **टेफलोन पलेन्जिर (Teflon Plunger)**

इसमें एक स्टील का बेलन होता है जिसमें द्रवचालित जैक (Hydrolic Jack) के द्वारा स्टील पिस्टन गति करता है । ध्वनि तरंगों द्वारा (By Sonar Waves)

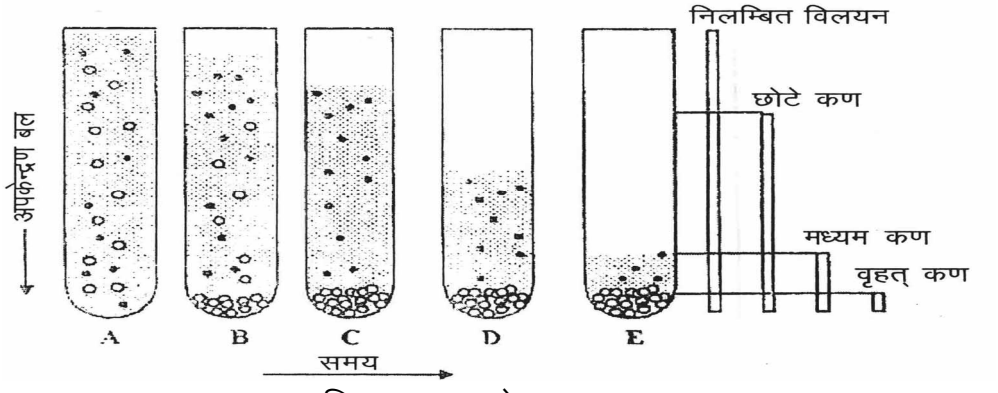
इसमें अत्यन्त तीव्र पराध्वनिक कम्पनों (ultrasonic vibrations) के द्वारा कोशिकाओं को तोड़ा जाता है ।

v) **रासायनिक विधि द्वारा (By Chemical Methods)**

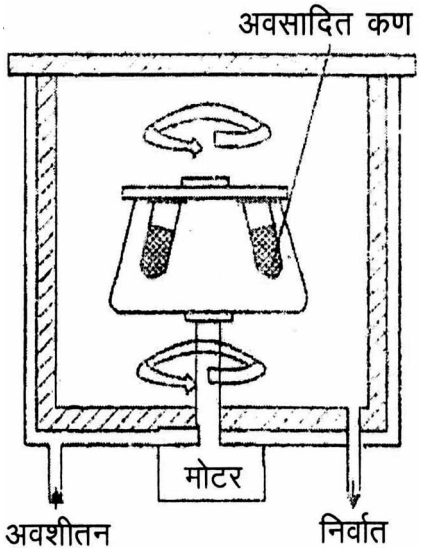
इसमें विभिन्न प्रोटीयोलाइटिक तथा लिपोलाइटिक विकरों द्वारा कोशिका को तोड़ा जाता है ।

ब) अपकेन्द्रण (Centrifugation)

इस प्रक्रिया में उपकोशिकीय घटकों का पृथक्करण उनके आकार, आकृति एवं घनत्व के अनुसार किया जाता है इस यंत्र को अपकेन्द्रण यन्त्र कहते हैं (चित्र 10.5) तथा यह आपेक्षिक अपकेन्द्रीय बल (relative centrifugal force)का मान घूर्णक की त्रिज्या व गुरुत्व बल पर निर्भर करता है । जब किसी समागित द्रव को अपकेन्द्रण यंत्र (centrifuge) में घुमाया जाता है तो कोशिकीय घटक अपने अवसादन गुणांक के अनुराप अपकेन्द्रणनली के पेदें में एकत्रित हो जाते हैं (चित्र 10.16) ।



चित्र 10.15 अपकेन्द्रण उपकरण



चित्र 10.16 : अपकेन्द्रण विधि द्वारा पृथक्करण

इस प्रकार अधिक घनत्व एवं छोटे आकार वाले कोशिकीय घटकों का अवसादन पहले होता है । तीव्र वेग अपकेन्द्रण में छोटे आकार के कोशिकांग पृथक किये जाते हैं । इसके विपरीत समघनत्व अपकेन्द्रण (isodensity centrifugation) में अवसादन उपकोशिकीय घनत्व पर निर्भर करता है । अपकेन्द्रण नलिका में घनत्व प्रवणता पहले से निर्मित होती है तथा नलिका में ऊपर से नमूना डाला जाता है । इस प्रकार विभिन्न घनत्व वाले कणों को पृथक किया जाता है । पराअपकेन्द्रण में अपकेन्द्रण अत्यधिक गति (75000 rpm) पर किया जाता है । विश्लेषणात्मक पराअपकेन्द्रण एक नवीनतम प्रकार का यन्त्र है जिसके सेम्पल पात्रों में एक क्वार्ट्ज विन्दो होती है तथा घूर्णक में ओपटिकल सिस्टम होता है ।

स) धावपृथकन (Eluriation)

इस तकनीक की खोज लिण्डाल (Lindal 1940) ने की थी । इस प्रक्रिया में कणों को एक निलम्बन माध्यम में डालकर संकरे प्रवेश द्वार से गुजारा जाता है । इस प्रकार अपकेन्द्रित होते पार्टिकल्स व निलम्बन माध्यम के बीच एक अन्तःक्रिया होती है । रोटर अक्ष में जैसे-जैसे दूरी बढती है वैसे-वैसे अपकेन्द्रण बल का मान बढ़ता है । जबकि अभिकेन्द्रित तरल प्रवाह की दर चेम्बर के क्रोस क्षेत्र के अनुसार बदलती रहती है । पार्टिकल्स में अपनी प्रारम्भिक स्थिति तथा अवसादन नियंताक के अनुसार प्रत्येक कोशिका या तो आशिक रुप से अवसादित होती है या अभिकेन्द्रीय रुप से तरल के साथ प्रवाहित होती है । इससे उपकरण के जिस सथान पर दोनों बल बराबर होते हैं और एक दूसरे के प्रभाव को खत्म करते हैं कोशिका वहीं प्रवास कर जाती है ।

10.5.4 वर्णलेखिकी (Chromatography)

क्रोमेटोग्राफी का शाब्दिक अर्थ है "रंगीन लिखाई" इस प्रक्रिया में विभिन्न अणुओं को उनके आकार, आकृति, द्रव्यमान, आवेश एवं अवशोषण गुणों के आधार पर पृथक किया जाता है । इस तकनीक की खोज सर्वप्रथम **माइकल स्वेट (Michael Tswett, 1906)** ने पादप वर्णकों को पृथक करने के लिये की । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के पृथक्करण के लिए विभिन्न प्रकार की क्रोमेटोग्राफी जैसे कॉलम क्रोमेटोग्राफी, पार्टीशन क्रोमेटोग्राफी, पेपर क्रोमेटोग्राफी, थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी, आयन एक्सचेंज क्रोमेटोग्राफी, जेल फिल्टरेशन क्रोमेटोग्राफी, एफिनिटी क्रोमेटोग्राफी आदि का उपयोग किया जाता है । अत्याधुनिक सुविधाओं युक्त प्रयोगशालाओं में हाई प्रेशर लिक्विड क्रोमेटोग्राफी (HPLC) का उपयोग कर परिणाम को कम्प्यूटर के माध्यम से प्राप्त किया जाता है । जैव सक्रिय यौगिकों के पृथक्करण के लिए कॉलम क्रोमेटोग्राफी का उपयोग किया जाता है । यदि पादप सत्व में केवल प्रभाजन ही देखना हो तो थिन लेयर या पेपर क्रोमेटोग्राफी का उपयोग किया जाता है ।

10.7 सारांश (Summary):

इस अध्याय के अध्ययन से हमें ज्ञात हुआ कि द्वितीयक मेटाबोलाइट्स मानव जीवन में अत्यन्त उपयोगी हैं । इनकी रासायनिक प्रकृति के आधार पर इन्हें एल्केलाइड्स, सेपोनिन स्टीरॉइड्स, टरपीनॉइड्स, फीनोल्स आदि समूहों में विभाजित किया जा सकता है । इनका पृथक्करण एक जटिल प्रक्रिया है । इस हेतु सूक्ष्मदर्शी, सूक्ष्ममिति अपकेन्द्रण तथा क्रोमेटोग्राफी आदि उपयोगी विधियां है । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के विशुद्ध रुप में विलगन तथा अभिलक्षणन के लिए अभी और शोध की आवश्यकता है ।

बोध प्रश्न

18. द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के पृथक्करण द्वारा इन्हें .....रुप मे प्राप्त किया जाता है।
    अ) शुद्ध ब) अशुद्ध
    स) मिश्रित द) उपरोक्त कोई नहीं ।
19. ..... जीव वैज्ञानिकों का ''प्राथमिक यन्त्र कहलाता है ।
    अ) दूरदर्शी ब) सूक्ष्मदर्शी
    स) HPLC द) TLC
20. माइक्रोमीटरी में प्रयुक्त होते हैं -
    अ) केवल ओक्युलर माइक्रोमीटर ब) केवल स्टेज
    स) अ) व (ब) दोनों द) उपरोक्त कोई नहीं ।
21. अपकेन्द्रण के प्रकार होते हैं -
    अ) वेलोसिटी अपकेन्द्रण ब) पराअपकेन्द्रण
    स) आइसोडेन्सिटी द) उपरोक्त सभी ।
22. सर्वप्रथम क्रोमेटोग्राफी द्वारा पादपों के वर्णकों को पृथक करने वाले वैज्ञानिक का नाम है-
    अ) मेन्डल ब) माइकल स्वेट
    स) लुईस पास्चर द) लुवेनहॉक
23. क्रोमेटोग्राफी का प्रकार है -
    अ) गैस क्रोमेटोग्राफी ब) थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी
    स) पेपर क्रोमेटोग्राफी द) उपरोक्त सभी ।
24. आयन एक्सचेंज क्रोमेटोग्राफी में.....आवेश वाले अणुओं का आपस में आकर्षण होता है ।
    अ) समान ब) विपरीत
    स) असमान द) उपरोक्त कोई नहीं ।

10.8 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1.	ब	10.	अ	19.	ब
2.	असत्य	11.	ब	20.	स
3.	द	12.	अ	21.	द
4.	स	13.	अ	22.	ब
5.	सत्य	14.	अ	23.	द
6.	स	15.	ब	24.	ब
7.	द	16.	स		

8.	ब	17.	स
9.	अ	18.	अ

10.9 अभ्यासार्थ प्रश्न (Excercise Questions) :

1. द्वितीयक मेटाबोलाइट्स क्या हैं ? ये कितने तरह के होते हैं । मानव कल्याण में इनके योगदान का वर्णन कीजिये ।
2. एल्केलाइड्स की परिभाषा दीजिए? ये रासायनिक संरचना के आधार पर कितने प्रकार के होते हैं ? इनका औषधीय उपयोग उदाहरण सहित समझाओ ।
3. टरपीनाइड किन इकाईयों से मिलकर बने हैं । इनका उपयोग लिखिए ।
4. फीनोल्स की परिभाषा व विस्तृत लेख लिख इनकी उपयोगिता को समझाईये ।
5. द्वितीयक मेटाबोलाइट के पृथक्करण की तकनीकों का विस्तृत वर्णन करिए ।
6. क्रोमेटोग्राफी कितने प्रकार की होती हैं ? थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी का विस्तृत वर्णन कीजिए ।

10.10 शब्दावली (Glossary) :

1.	द्वितीयक मेटाबोलाइट्स	Secondary metabolities
2.	प्राथमिक मेटाबोलाइट्स	Primary metabolites
3.	ग्रे क्षेत्र	Grey Area
4.	सूक्ष्ममिति	Micrometery
5.	अपकेन्द्रण	Centrifugation
6.	धावपृथक्करन	Elutriation

10.1 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. बेल तथा चार्ल बुड, सेकेण्डरी प्लान्ट प्रोडक्ट्स, स्टिंगर - वरलाग बर्लिन ।
2. हारबोर्न तथा मेब्री, द फ्लेवनॉइड्स. एडवान्सेज इन रिसर्च, चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
3. हरबर्ट, द बायोसिन्थेसिस ऑफ सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
4. टचस्टान, प्रेक्टिस ऑफ थिनलेयर क्रोमेटोग्राफी, जॉनविले एण्ड सन्स, न्यूयॉर्क ।
5. रामावत एण्ड मेरीलोन बायोटेक्मोलॉजी सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स ऑक्सफोर्ड आई.बी.एच. पब्लि कम्पनी, नई दिल्ली।

इकाई 11

द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-II : उत्पादन

(Secondary Plant Metabolites-II : Production)

इकाई की रूपरेखा

11.0 उद्देश्य

11.1 प्रस्तवाना

11.2 पात्र में इष्टतम्

11.3 चयन विधि से इष्टतम् उत्पादन

11.4 अभावावस्था में इष्टतम् उत्पादन

11.5 एल्केलाइड्स का उत्पादन

11.6 स्टीराइड तथा सेपोनिन का उत्पादन

11.7 सारांश

11.8 बोध प्रश्नों के उत्तर

11.9 अभ्यासार्थ प्रश्न

11.10 शब्दावली

11.11 संदर्भ ग्रन्थ

11.0 उद्देश्य (Objectives) :

पादप जगत के विभिन्न पादप अंगों में असीमित द्वितीयक मेटाबोलाइट्स है, जो बहुत कम मात्रा में होने के कारण प्राय: अपने शुद्ध रुप में विलगित (isolaed) नहीं हो पाते । इन्हीं द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के ऊतक संवर्धन (tissue culture) तकनीक द्वारा अत्याधिक मात्रा में उत्पादन करने के अनुसंधान चल रहे हैं, जिनका विस्तृत विवरण हम इस अध्याय में करेंगे । इस पाठ के द्वारा हम जान सकेंगे कि -

- पात्र में (In vitro) इष्टतम उत्पादन कैसे होता है ?
- किस चयन विधि से सर्वाधिक उत्पादन होता है ?
- अभावावस्था में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन ।
- पात्र में एल्केलाइड्स, स्टीराइड्स तथा सेपोनिन का उत्पादन ।

11.1 प्रस्तावना (Introduction)

पादपों का उपयोग मानव अपने खानपान में आदिकाल से कर रहा है तथा इनके औषधीय गुण भी मनुष्य को ज्ञात है जिनका पूरा लाभ मानव लेता आ रहा है । वैज्ञानिक शोधों से, यह ज्ञात हुआ है कि इन पादपों में जो औषधीय गुण हैं वो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स की वजह से है और इन औषधीय पादपों

की ओर संसार का ध्यान आकर्षित हुआ । इनमें से कुछ पादप आधुनिक युग में लुप्त होते जा रहे है जो एक जटिल समस्या है । इन पादपों को संरक्षित करने के लिए ऊतक संवर्धन तकनीक (tissue culture technique) वरदान साबित हुई है । इस पात्र प्रक्रिया द्वारा हम पौधों को प्रयोगशाला परिस्थितियों (laboratory conditions) में भी जीवित रख सकते हैं । ऐसे प्रयोग किये गये हैं जिनमें कर्तोत्तक (explant) को कोनिकल फ्लास्क में बाहरी वातावरण जैसा पोषण दिया गया तो वे जीवित रहे । इस पोषण माध्यम को उसके शोधकर्त्ता के नाम पर मुराशिगे तथा स्कूग (Murashige and Skoog, 1962) माध्यम कहा गया ।

यह संवर्धन माध्यम चमत्कारिक साबित हुआ और इस तरह एक नई शाखा ऊतक संवर्धन (tissue culture) का जन्म हुआ । इस प्रक्रिया की द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन में महती भूमिका है । पिछले अध्याय में हमने पढ़ा कि कितने तरह के द्वितीयक मेटोबोलाइटस होते हैं और विभिन्न पादप अंगों में प्राकृतिक रुप से उत्पादित होते हैं । इनकी रासायनिक संरचना अलग-अलग होती है जिसके आधार पर हम इन्हें पहचान सकते हैं, ये द्वितीयक मेटाबोलाइट प्रयोगशाला परिस्थितियों (laboratory conditions) में उत्पन्न करना आज भी चुनौती है । इस अध्याय में हम विस्तार से पढ़ेंगे कि कैसे इनका अधिकतम उत्पादन हो, अभावावस्था क्या है तथा उसके निवारण के क्या तरीके हो सकते हैं।

11.2 पात्र में इष्टतम उत्पादन (in vitro Optimum Production) :

किसी भी पादप में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन उसकी कोशिका में उपस्थित जीन्स से नियन्त्रित होता है अर्थात् जीन्स इनके उत्पादन की क्रिया का संचालन करते हैं । दूसरी विशेष बात यह है कि हर पादप अंग, द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन की क्षमता नहीं रखता है, यह कुछ विशेष परिस्थिति में विशेष अंगों में ही उत्पादित होते हैं जैसे : लाल रंग का एश्वोसाइनिन जो गुलाब की लाल पंखुडियों में होता है, पीला बीटासाइनिन सूरजमुखी में उपस्थित होता है । प्रकृति में इनका उपयोग परपरागण (cross pollination) में होता है, पर इसका पृथक्करण करके इसे विभिन्न खाद्य एवं पेय पदार्थों (food and beverages) में वर्णक (colouring agent) की तरह काम में लिया जाता है । इस एश्वोसाइनिन को हम अगर पुष्पों से पृथक करते हैं तो अत्यधिक मात्रा में पुथ चाहिए जो कुछ मिलीग्राम द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादित करेंगे किन्तु अगर हम पात्रे (in vitro) तकनीक इस्तेमाल करें तो हमें पुष्प लगने के समय का इंतजार भी नहीं करना पडेगा एवं प्राकृतिक संतुलन भी बना रहेगा ।

इस प्रक्रिया में आगे बढ़ने के लिए हमें दो चीजें ध्यान में रखनी पड़ेगी (1) उस मेटाबोलाइट का संश्लेषण और (2) अधिकतम उत्पादन । अर्थात् जो भी प्रक्रिया हम करेंगे उसमें हमे जो द्वितीयक मेटाबोलाइट चाहिए उसका अधिकतम संश्लेषण हो तभी हम उस प्रक्रिया को औद्योगिक स्तर पर ले जा सकते हैं । जैसा कि हमें ज्ञात है कि पात्रे तकनीक महंगी है, अगर इसमें दुर्लभ (rare) और औषधीय गुण वाले द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन हो तो ही इसका सही उपयोग है ।

अब हम यह जानना चाहेंगे कि ऐसा क्या करें कि अधिकतम उत्पादन हो, इसके लिए हमें दो मुख्य प्रक्रिया करनी है ।

पहली प्रक्रिया में हमें बाहरी कारकों (physical factors) को ध्यान में रखना है ।

सामान्यत: जो भी संवर्धन रखे जाते हैं उन्हें एक ऐसे कमरे में सुरक्षित किया जाता है जहां का तापमान तथा प्रकाश पौधे की वृद्धि के लिए अनुकूल हों । उदाहरण के तौर पर एक पौधा अगर अच्छे से अच्छा वातावरण मिलने पर अधिक फल देता है तो उसी प्रकार अगर हम इस वातावरण को उस कर्तोत्तक के अनुरुप करेंगे तो वह अच्छी वृद्धि करेगा ।

प्रकाश (Light)

यह उत्पादन में अहम् भूमिका निभाता है, कैसे - सोच कर देखें । अगर किसी पौधे को अधेरे कमरे में रखें तो उसकी पत्तियाँ प्रकाश संश्लेषण के अभाव में मुरझा जाएगी इसके विपरीत यदि पौधे को 12 घण्टे दीप्तिकाल व 12 घण्टे अंधेरा मिले जो वह पौधा अच्छे से वृद्धि करेगा । ठीक इसी प्रकार प्रयोगशाला परिस्थितियों में भी प्रकाश का ध्यान रखना आवश्यक है । रोशनी के लिए हमें स्फुरदीप्त लैम्पस (CFL) का ही इस्तेमाल करना चाहिए । यह कृत्रिम प्रकाश द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन पर खासा प्रभाव डालता है तथा इसे बल की रोशनी से विस्थापित नहीं किया जा सकता है । उदाहरणत: Chenopodium rubrum के कोशिका निलम्बन संवर्धन में अधिक मात्रा में लिपिड का संश्लेषण होता है । इसी प्रकार गाजर (daucus carota) के दून्थोसाइनिन का उत्पादन भी प्रकाश में अधिक मात्रा मैं होता है ।

तापमान (Tempreture)

तापमान पादप वृद्धि में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाता है । ये तो हम जानते हैं कि मरु प्रदेशों में अधिक गर्मी में कुछ ही पादप जीवित रह पाते हैं इसके विपरित पहाड़ी इलाकों में पादपों की संख्या अधिक होती है । ठीक यही नियम पात्रे (in vitro) उत्पादन में भी काम आता है कि यदि हम उस कर्तोत्तक (explants) को 27˚C तापमान में रखें तो उनकी वृद्धि अच्छी होगी । परिणामस्वरूप द्वितीयक मेटाबोलाइटस का अधिक उत्पादन होगा । इस पर ज्यादा अध्ययन नहीं हुआ है किन्तु यह निश्चित है कि अधिक तापमान कैलस की मृत्यु का कारण बन सकता है तथा अत्यधिक कम तापमान पर उत्पादन की दर कम हो जाएगी ।

pH

किसी भी पादप को जब संवर्धन माध्यम (culture media) पर संवर्धित कराते हैं तो इसकी pH 5 से 6 होती है जो अम्लीय माध्यम है । यह pH सार्वभौमिक (universal) होती है किन्तु एन्थोसाइनिन उत्पादन के लिए हम 5.5 व ट्रिप्टोफेन (अमीनो अम्ल) से ट्रिप्टोफोल (tryptophol) बनाने के लिए pH 6.5 तक बढ़ानी पड़ती है । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन में pH की भी एक विशेष भूमिका है जिस पर विस्तृत अनुसंधान कार्य प्रगति पर है । आने वाला युग एन्जाइम तकनीक का होगा और हर एन्जाइम की क्रिया एक निश्चित pH पर सम्पन्न होती है ।

वातन (Aeration)

कर्तोत्तक संवर्धन (explant culture) को संवर्धन कक्ष (culture chamber) में निश्चित प्रकाश तथा तापमान देने के बाद अहम् कार्य होता है, इन फ्लास्कों को शेकर पर रखा जाना है जिसमें धीरे-धीरे गति होती है और ये फ्लास्क अपनी जगह पर हल्के से हिलते रहते हैं । ऐसा माना जाता है कि संवर्धन माध्यम को अगर बिना हिले रखें और उसमें हलचल न हो तो उसमें उत्पन्न आविष (toxins) वहीं

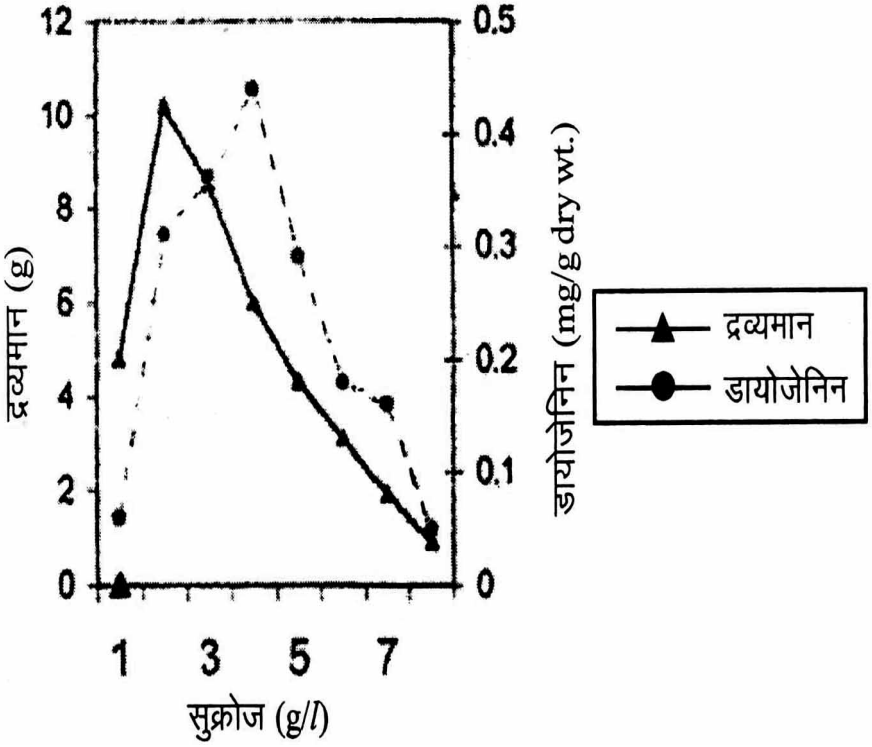
रहेंगे और कुछ समय में कोशिकायें मृत हो जाएँगी । यह वातन तरल माध्यम (liquid medium) में आवश्यक है ।

पोषक तत्त्व (Nturient Content)

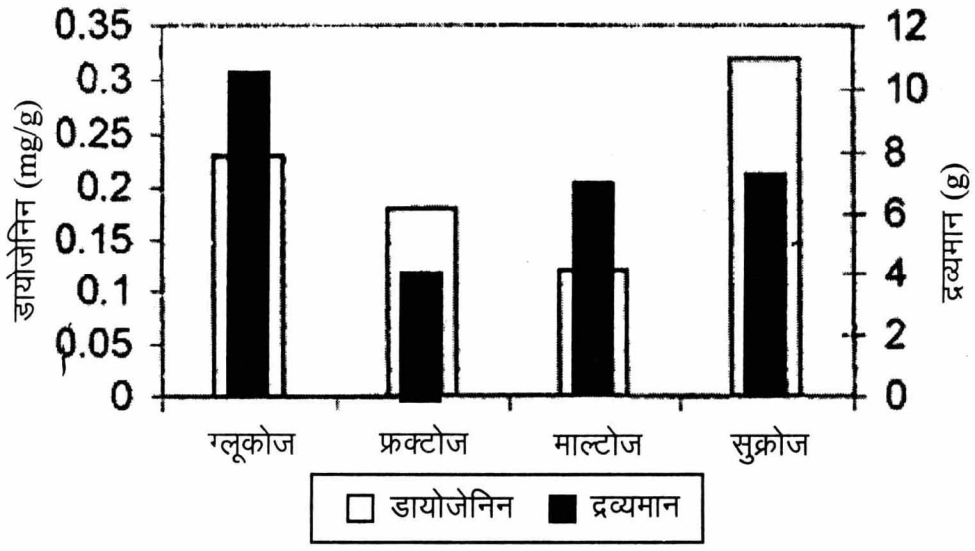
दूसरा मुख्य कारक वो सामग्री है जो हमने संवर्धन माध्यम (medium) में डाली है । सामान्य भाषा में वह पोषण सामग्री जिसमें हम फेरबदल करके किसी भी पादप की पुनराद्भवन क्षमता बढ़ाते हैं । उदाहरणस्वरूप, किसान खेत में फसल बढ़ाना चाहता है तो मिट्टी को उपजाऊ करने के लिए नाइट्रोजन, फास्फोरस और कार्बन युक्त खाद व पानी का इस्तेमाल करेगा । ठीक इसी प्रकार पात्र में उत्पादन बढ़ाने के लिए हम मूल MS संवर्धन माध्यम (Basic MS Medium) या इसके विभिन्न संघटकों में फेरबदल करेंगे और परिणामस्वरूप देखेंगे कि कौनसा संयोजन अधिकतम उत्पादन प्रदान करता है । इसके लिए निम्न कारकों में बदलाव करते हैं ।

अ) कार्बन स्रोत (Carbon Source)

MS माध्यम में कार्बन स्रोत के लिए विभिन्न कार्बोहाइड्रेटस का उपयोग किया जाता है । इसमें भी मुख्यत: सुक्रोस का उपयोग होता है जो एल्केलाइड्स उत्पादन में मदद करता है (चित्र 11.1) । अगर हम उत्पादन की दृष्टि से उपयोगिता देखें तो सुक्रोस, ग्लुकोस, माल्टोस, फ्रक्टोस शर्कराएं क्रम में उपयोगी है (चित्र 11.2) । ये पादप के पात्र में उत्पादन के समय ऊर्जा चक्र (energy cycle) के लिए उपयोगी होते हैं जो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के पूर्ववर्ती (precursors) बनाते हैं तथा ऊर्जा भी इसी स्रोत से मिलती है ।



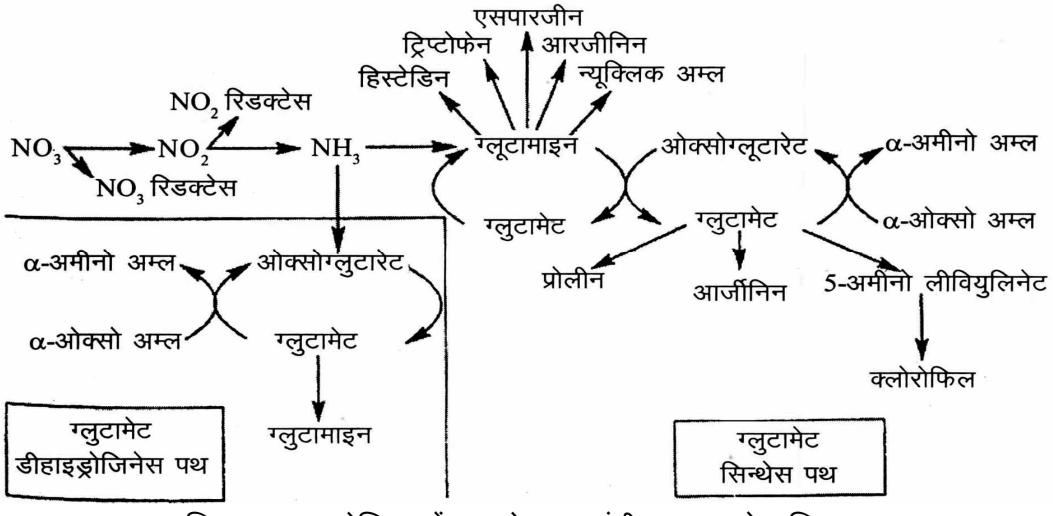
चित्र 11.1 : सुकोस की मात्रा का पात्र में डायोजेनिन उत्पादन पर प्रभाव।



चित्र 11.2 : विभिन्न कार्बन स्रोतों का पात्र में डायोजेनिन उत्पादन पर प्रभाव।

नाइट्रोजन स्रोत (Nitrogen Source)

नाइट्रेट व अमोनियम की एक निश्चित मात्रा को माध्यम में प्रयुक्त करते हैं । इसकी अधिक मात्रा पादप के लिए विषाक्त होती है । नाइट्रेटस के उपयोग से नाइट्रोजन कोशिका चक्रों में प्रवेश करती है और फिर अमीनों अम्लों का उत्पादन होता है । यह तो सर्वविदित है कि अमीनों अम्ल ही द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के प्रारम्भक (precursors) है (चित्र 11.3) ।



चित्र 11.3 : कोशिका में नाइट्रोजन स्वांगीकरण का रेखाचित्र ।

फॉस्फेट (Phosphate)

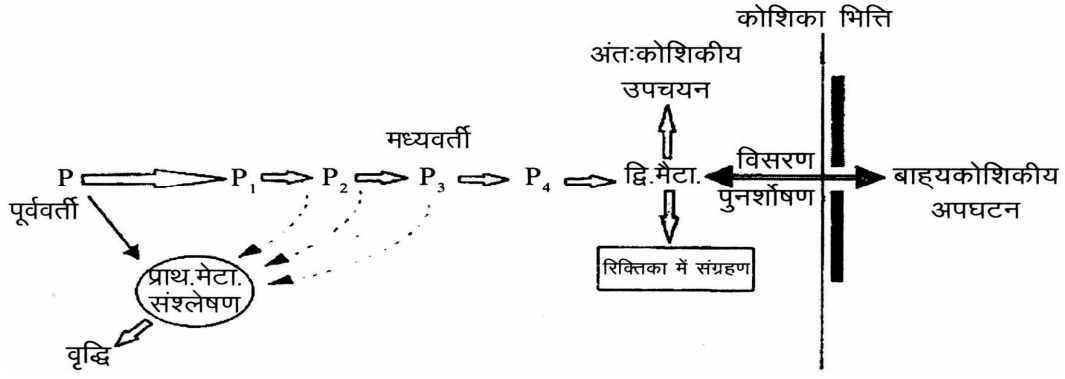
फॉस्फेट की उपयोगिता तो सर्वज्ञात है । ATP जो ऊर्जा स्रोत हैं, के डाइफास्फोराइलेशन व फास्फोराइलेशन प्रक्रिया से ही ऊर्जा का एक रुप से दूसरे रुप में रुपान्तरण होता है । ऊर्जा का स्थानान्तरण भी इन्हीं सक्रिय फॉस्फेट समूहों के द्वारा होता है अत: पोषण माध्यम में फॉस्फेट की निश्चित मात्रा होने से उसके जल्दी समाप्त होने की सम्भावनाएं नहीं होती है । अत: यह बहुत ही महत्वपूर्ण कारक है ।

पादप वृद्धि नियामक (Plant Growth Regulators)

जैसे मनुष्य को वृद्धि के लिए दूध, फल जैसे वृद्धि प्रेरित करने वाले पदार्थों की आवश्यकता होती है, ठीक उसी प्रकार एक पात्र में पादप को भी उन वृद्धि कारकों की आवश्यकता होती है जो उसे प्रकृति से दूर प्रयोगशाला में वृद्धि करने की शक्ति प्रदान करते हैं । वृद्धि कारकों में मुख्यत: ऑक्सिन, साइटोकाइनिन (2,4-D, zeatin), जिबरेलीन (GAZ) आते हैं । इन वृद्धि नियामकों (growth regulators) पर अत्यधिक अनुसंधान हुए हैं तथा अभी भी हो रहे हैं जिनसे यह तय किया जा रहा है कि पादप के पात्रे स्थिति में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने में कौन-कौन से कारक कितनी मात्रा में आवश्यक होते हैं । जैसे - Ephedra sps. में 2,4-D डालने पर द्वितीयक मेटाबोलाइट्स कम हो जाते हैं और यदि इसे किसी अन्य वृद्धि नियामक जैसे ऑक्सिन से बदलें तो उत्पादन बढ़ जाता है ।

पूर्ववर्ती (Precursors)

आधुनिक शोध से यह ज्ञात हुआ है कि किसी एक रासायनिक प्रक्रिया के फलस्वरूप द्वितीयक मेटाबोलाइट्स नहीं बनते बल्कि प्राथमिक मेटाबोलाइट्स में कुछ रासायनिक क्रियाऐं होती हैं, जिनके परिणामस्वरूप जटिल द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन होता है । उदाहरणार्थ L-टायरोसीन अमीनो अम्ल से L-डाईहाइड्रोक्सी फिनाइल एलेनीन [L-DOPA (3,4- dihydroxyphenyl alanine)] बनता है जो विभिन्न क्रियाओं के बाद दिन ब्लास्टीन (Vinblastine) बनाता है यह Catharanthus roseus से बनने वाली कैंसररोधी औषधि (anticancer drugs) है जो मानव के लिए अत्यधिक उपयोगी है । पात्र में इसके उत्पादन के लिए यदि हम MS माध्यम (MS medium) के साथ पूर्ववर्ती (precursor) भी डाल दें तो वह प्रक्रिया आसान हो जाती है (चित्र 11.4) । इस तरह यदि ये रासायनिक क्रियाएं जो प्रकृति में एन्जाइम की उपस्थिति में होती है जैव संश्लेषण (biosynthesis) कहलाती है । इन संश्लेषणों के अध्ययन से हम द्वितीयक मेटाबोलाइट्स को प्रयोगशाला में जैव रूपान्तरण (bio conversions) के द्वारा बना सकते हैं अत: यह तकनीक सर्वाधिक उपयोगी है ।



चित्र 11.4 : पूर्ववर्ती की उपस्थिति में पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन ।

अत: अत्यधिक उत्पादन के लिए हर पादप के माध्यम (media) को मानकीकृत (standardized) करना होगा जिसमें-

i) तापमान, प्रकाश, pH तथा वातन को व्यवरिथत करना ।'

ii) कार्बन स्रोत, सुक्रोस, नाइट्रेटस, फास्फेट्स, वृद्धि कारक तथा पूर्ववर्ती की उपयुक्त मात्रा सुनिश्चित करने पर हम कम संसाधनों में अधिकतम उत्पादन कर सकते हैं । आज के आधुनिक युग में रोज नए अनुसंधान हो रहे हैं और मानव कल्याण के लिए कार्य कर रहे हैं ।

बोध प्रश्न

1. पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन में सहयोग करने वाले कारक हैं -
   अ) केवल तापमान ब) केवल प्रकाश
   स) केवल वातन द) उपरोक्त सभी
2. Cenopodium rubrum कोशिका निलम्बन संवर्ध में प्रकाश की उपस्थिति में लिपिड उत्पादन होता है -
   अ) अधिक ब) कम
   स) कोई असर नहीं द) इनमें से कोई नहीं ।
3. पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन पर तापमान का प्रभाव पड़ता है - सत्य/असत्य
4. पात्र में अधिकतम उत्पादन के लिए उपयुक्त तापमान है -
   अ) 38°C ब) 42°C
   स) 27°C द) इनमें से कोई नहीं।
5. आदर्श एम.एस. माध्यम की pH क्या होनी चाहिए -
   अ) 5 से 6 b) 7 से 8
   स) 10 से 12 द) 4-5
6. वातन से द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन -
   अ) बढता है । ब) घटता है।
   स) कोई असर नहीं । द) इनमें से कोई नहीं।
7. विभिन्न कार्बोहाइड्रेट में से माध्यम में मुख्य रूप से .....का उपयोग होता है -
   अ) ग्लूकोस ब) सुक्रोस
   स) माल्टोस द) फ्रक्टोस
8. पादप वृद्धि कारकों के उदाहरण हैं -
   अ) केवल आक्सिन ब) केवल साइटोकाइनिन
   स) केवल 2,4-D द) उपरोक्त सभी
9. पूर्ववर्ती (precursor) पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन को
   अ) बढ़ाता है ब) घटाता है
   स) कोई असर नहीं द) इनमें से कोई नहीं
10. पूर्ववर्ती (precursor) को पात्र में डालने के लिए हमें जानकारी होनी चाहिए -
    अ) रासायनिक संरचना की ब) MS माध्यम की
    स) जैव संश्लेषण पथ की द) उपापचय की

11. द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन बढ़ाने के लिए चयन विधि ..... है -

अ) अनुपयोगी ब) हानिकारक

स) प्रभावहीन द) अत्यधिक उपयोगी

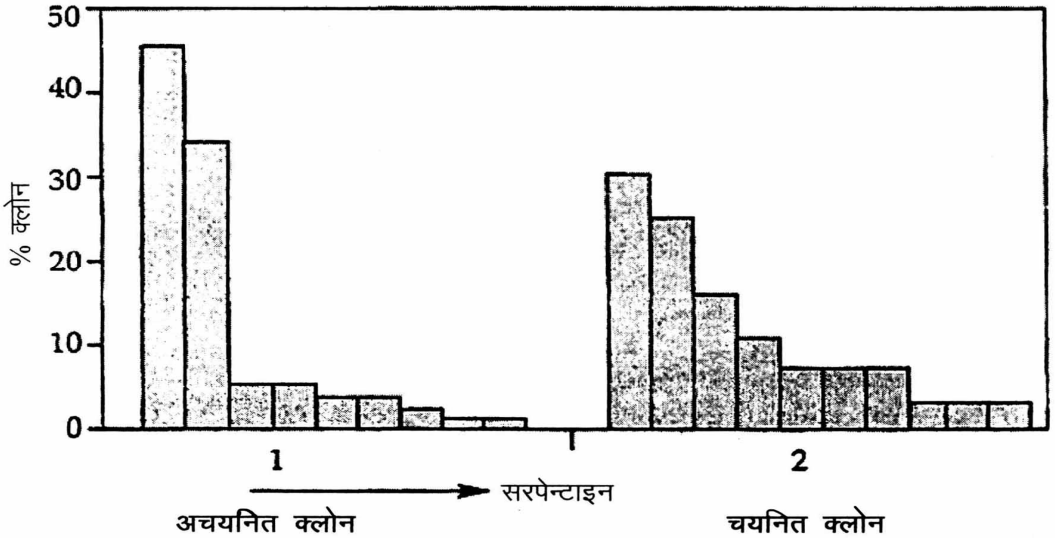
11.3 चयन विधि से इष्टतम उत्पादन (Optimum Production by Selection Method):

पात्र परिस्थितियों में वृद्धि करते हुए कर्तोत्तक के पास दो घटक होते हैं i) कोशिका और ii) वातावरण । अब तक हमने पढ़ा कि किस तरह वातावरण में फेरबदल करके उत्पादन बढ़ाया जा सकता है । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन एक आनुवंशिक नियंत्रित (genetically controlled) प्रक्रिया है अत: हमें एक चयन प्रक्रिया अपनानी पड़ेगी ताकि हम कर्तोत्तक (explant) से अधिकाधिक मात्रा में उत्पादन प्राप्त कर सकें ।

i) **प्राकृतिक स्थितियों में उगने वाले पादपों में विभिन्नताऐं (Variability in Field Grown Plants)**

सर्वविदित है कि परपंरागित (cross pollinated) फसलों में उत्पादन स्वपरागित फसलों (self pollinated) से ज्यादा होता है क्योंकि उनमें विषम युग्मजों (heterozygous) के मिलने से बने लक्षण प्रारुप (phenotype) व उनके शारीरिक लक्षण (physiological characteristic) भिन्न होते हैं ।

इसका उदाहरण हम कैथेरेन्थस रोसियस (Catharanthus roseus) के एल्केलाइड्स से ले सकते हैं । यह एक परपरागित फसल है तथा इसमें एल्केलॉएड की मात्रा अधिक है इसके विपरीत ल्यूपिनस पोलीफिल्लस(Lupinus polyphllus) स्वपरागित फसल है तथा इसमें एल्केलॉइड्स की मात्रा कम है (चित्र 11.5) ।



चित्र 11.5 कैथेरेन्थस रोसियस के पात्र में चयनित क्लोन का सर्पेन्टीन उत्पादन पर प्रभाव

विभेदन प्रावस्था (Stage of Differenatiation)

जैसा कि पूर्व में बताया गया है कि द्वितीयक मेटाबोलाइट्स पादप के हर भाग में उत्पन्न नहीं होते हैं बल्कि पादप के विशेष अंग में ही इनका उत्पादन होता है जैसे सिट्रस प्रजातियों में सुगन्धित तेल का उत्पादन तेल ग्रंथियों में होता है किन्तु यदि वह ग्रंथि ही उस कर्तोत्तक (explant) में नहीं हो तो वह द्वितीयक मेटाबोलाइट कैसे उत्पन्न होगा ? यह विचारणीय है । इसी प्रकार कुछ द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का निर्माण मूल में होता है यदि हम इसके लिए तना लेकर पात्रे उत्पादन करें तो कम होगा । यदि मूल लेकर उत्पादन करें तो वह अत्यधिक होता है । कुछ महत्वपूर्ण पादपों के विभिन्न भागों में निर्मित विभिन्न द्वितीयक मेटाबोलाइटों को सारणी 11.1 में दर्शाया गया है ।

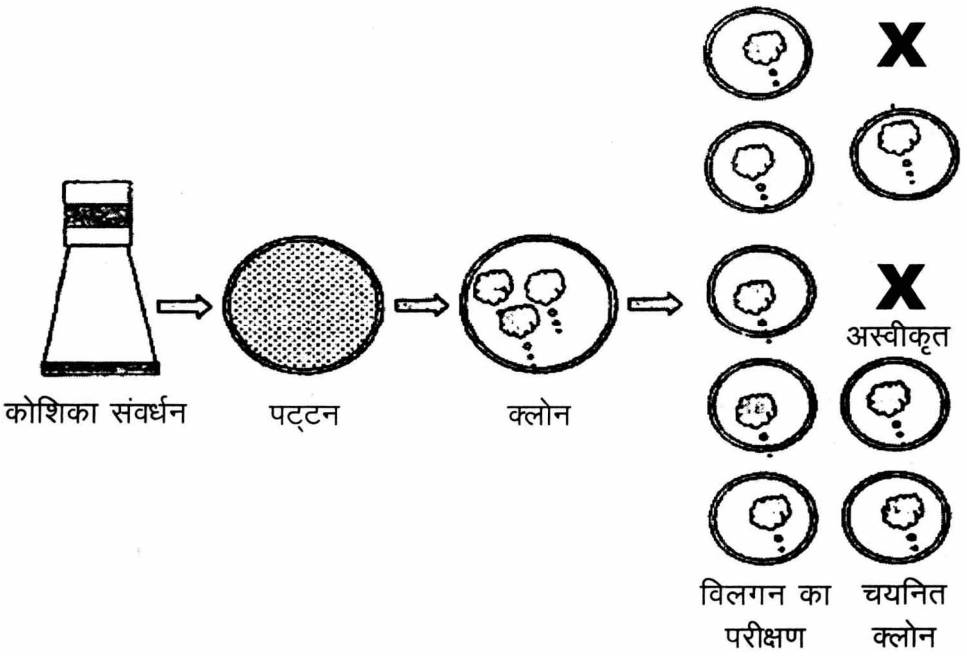
सारणी 11.1

Tissue	Organ	Compound	Plant Species
Epidermis	Stems	Tropane alkaloid,	Alropa, Datura
	Leaves	Cocaine	Erythroxyton
		Acontine	Aconitum
		Streoid alkaloid	Solamum
		Nicotine	Nicotiana
		Morphinan	Papaver
Laticifers	Shoots	Coniine	Conium
	Fruits	Morphinan aolkaloids	Papaver
Ducts	Shoots	Vindolinine	Catharanthus
		Phenolics + terpenes	Pinus
Idioblasts	Roots	Essential oil +	Rutaceae, Leguminosae
	Rhizomes	gums	+ others
	Roots	Corydaline	Corydalis
	Leaves	Sangumnarine	Sanguinaria
Phenolic cells	Leaves	Rutacrdones	Ruta
Epidermis	Stems	Indole alkaloids	Catharanthus
	Stems	Protopine	Macleaya
	Leaves	Tannis	Juniperus

प्लेटिंग तथा चयन (Planting and Selection)

पात्र में उत्पादन कों बढ़ाने के लिए निलम्बन संवर्धन (suspension cultures) का उपयोग किया जाता है । इस तरह के संवर्धन से हम उपयुक्त कोशिकाओं का चयन करते हैं जिनमें उत्पादन हो रहा

है । ऐसी कोशिकाओं को पृथक कर हम उत्पादन बढ़ा सकते हैं । उदाहरणत: एन्थोसाइनिन उत्पादन करती हुई कोशिका को सूक्ष्मदर्शी में देखने से वह रंगीन दिखेगी तथा जो कोशिका उत्पादन नहीं कर रही वह रंगहीन होगी । इस तरह हम उन सभी रंगीन कोशिकाओं का चयन करके अलग कर सकते हैं तथा उन्हें पृथक पात्र में रखकर इष्टतम उत्पादन प्राप्त कर सकते है। (चित्र 11.6)।



चित्र 11.6 : कोशिका निलम्बन का पट्टन विधि द्वारा चयन व अधिक उत्पादन करने वाली कोशिका चयन

बोध प्रश्न

12. चयन विधि द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइटस का उत्पादन बढ़ाया जा सकता है - सत्य /असत्य

13. Catharanthus roseus में एल्केलाइड का उत्पादन अधिक मात्रा में होता है क्योंकि यह एक.....है -
    अ) परपरागित पादप ब) स्वपरागित पादप
    स) कायिक प्रवर्धित पादप द) उपरोक्त में कोई नहीं

14. विभिन्न पादप अंगों में भिन्न-भिन्न द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन होता है - सत्य/ असत्य

15. किसी भी द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन को पात्र में बढ़ाने के लिए प्लेटिंग तथा चयन विधि -
    अ) उपयोगी है ब) हानिकारक है
    स) अनुपयोगी द) इनमें से कोई नहीं ।

16. एन्थोसाइनिन का कोशिका में उत्पादन प्लेटिंग तथा चयन द्वारा बढ़ाया जा सकता है - सत्य/असत्य

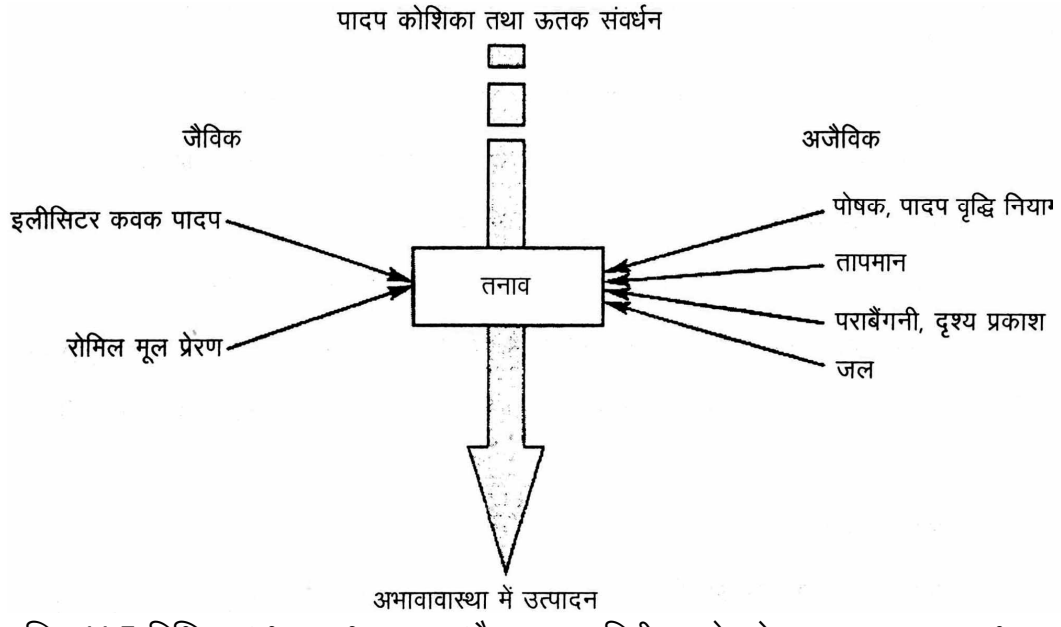
11.4 अभावावस्था में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन(Production of Secondary Metabolites in Stress Conditions) :

पादप अपने आप को प्रकृति के वातावरण के अनुरुप ढालने का प्रयास करते हैं तथा ऐसे जैविक और अजैविक अभावों को सहन करते है जो इनकी शरीर क्रिया को परिवर्तित कर सकते हैं । शरीर क्रियात्मक परिवर्तन के कारण ही द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न होते हैं । जब कोई कीट संक्रमण, चोट या तापाघात होता है तो पादपों में अनेक रासायनिक परिवर्तन होते हैं तथा इनसे सम्बन्धित सभी प्रक्रियाएं आनुवंशिक रुप से नियंत्रित होती है ।

फाइटोएलेक्सिन, फीनोलिक यौगिक हैं, जिन्हें रासायनिक हथियार (chemical weapon) भी कहा जाता है । जैसे ही किसी रोगकारक का पादप के घाव वाले स्थान पर आक्रमण होता है, उस के चारों तरफ का ऊतक संवेदनशील हो जाता है और फाइटोएलेक्सिन स्त्रावित करता है, जिससे वह सूक्ष्मजीव वहीं तक सीमित रहे और पूरा पादप संक्रमित न होने पाये । यह प्रतिक्रिया पादपों में स्वत: ही होती है, यदि इनका कुछ लाभ पात्रे संवर्धन में उठाया जाए तो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन बढाया जा सकता है (चित्र 11.7) ।

डिकोस्मो और टावर्स (1984) के अनुसार तनाव एक बाह्य दबाव है जो संवर्धित कोशिकाओं को द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न करने में मदद करता है । यह तनाव कई प्रकार का हो सकता है किन्तु इसके परिणामस्वरूप हम द्वितीयक मेटाबोलाइट का अधिकतम उत्पादन कर सकते हैं ।

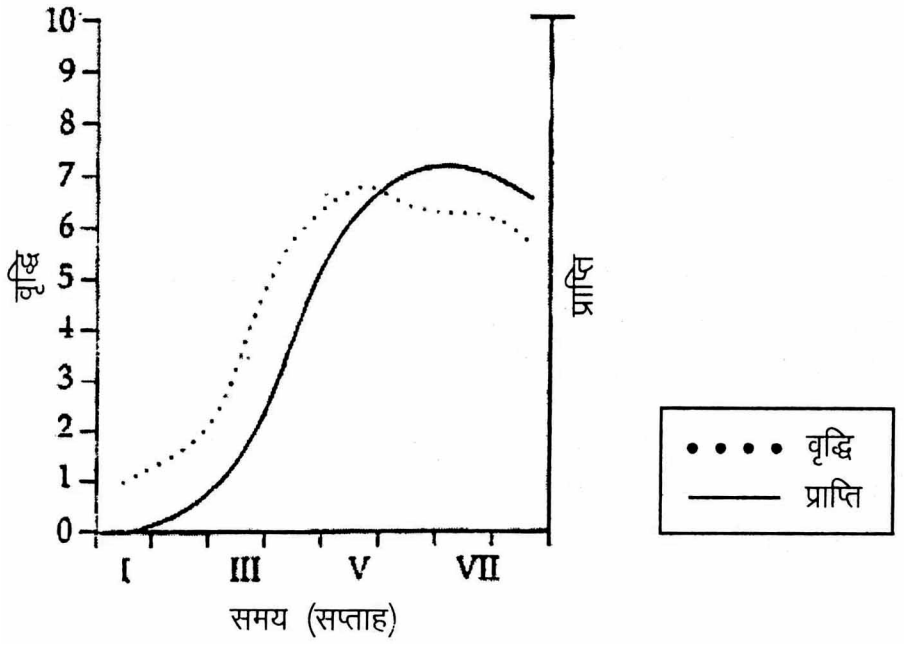
पादप कोशिका और ऊतक संवर्धनों पर तनाव दो प्रकार का होता है जैविक और अजैविक । जैविक तनाव में जो जैविक सामग्री है उसमें परिवर्तन करके तनाव उत्पन्न किया जाता है किन्तु यही तनाव यदि अजैविक सामग्री के परिवर्तन से हो तो उसे अजैविक तनाव कहते हैं ।



चित्र 11.7 विभिन्न अभावावस्था कारक और उनका द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन पर प्रभाव

जैविक घटकों में कुछ कर्तोत्तक कवक प्रभेद, रोमिल मूल संवर्धन, जैविक तनाव आदि आते हैं तथा अजैविक घटकों में पोषक, पादप वृद्धि नियामक, तापमान, पराबैंगनी विकिरण और दृष्य प्रकाश तथा जल आते है ।

जैसा कि हमें पात्रे संवर्धन के वृद्धि आरेख के बारे में विदित है कि इसमें तीन अवस्थाएं होती है अ) लेग अवस्था (Lag phase), इसमें कोई वृद्धि नहीं होती है, ब) चर घातांकी अवस्था (Exponential phase) में वृद्धि होती है जो प्राथमिक मेटाबोलाइट्स बढ़ते हैं और ऊतक परिवर्धित होते हैं, स) स्थगन अवस्था - ये वो स्थिति है जब द्वितीय मेटाबोलाइट्स बनने शुरु होते हैं (चित्र 11.8) । अत: उपरोक्त स्थिति को हम तनाव की स्थिति भी कह सकते जिसमें पोषण के कम होने से पात्रे अवस्था में एक अभावावस्था की स्थिति उत्पन्न हुई जिसके परिणामस्वरूप कोशिकओं ने द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन किया ।



चित्र 11.8 द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन व वृद्धि का वृद्धि चक्र

पात्रे स्थितियों में अभावावस्था अनेक तरीकों से उत्पन्न होती है और हमारा उद्देश्य उन कारणों को जानकर ऐसी स्थिति उत्पन्न करना है जो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का अधिकतम उत्पादन कर दें । तनाव के लिए निम्नलिखित कारक उत्तरदायी हो सकते हैं -

i) **कर्तोत्तक स्रोत (Explant Source)**

जैसा कि पहले भी बताया गया है कि अगर पादप को चोट लगती है या घाव बनता है तो उस परिधि में पॉलीफीनॉल ऑकरीडेज की रासायनिक क्रिया शुरु हो जाती है । यही स्थिति जब हम किसी पादप से कर्तोत्तक लेकर पात्र में उगाते हैं तो उस कटे भाग में भी पॉलीफीनॉल ऑक्सीडेज सक्रिय हो जाता है जो उस ऊतक को भूरा कर देता है तथा इस स्थिति में कर्तोत्तक मर जाता है । इससे द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन नहीं होता है । विभिन्न शोधों से यह ज्ञात हुआ कि प्रतिऑक्सीकारक (antioxidant) यौगिक यदि संवर्धन माध्यम में डाल दिये जाएँ तो वो भूरेपन (browning) को कम या खत्म कर देते हैं । प्रतिऑक्सीकारक यौगिक (antioxidant compounds) में एस्कॉर्बिक अम्ल

(ascorbic acid) का बहुतायत से प्रयोग होता है । कुछ शोध कार्यों से यह ज्ञात हुआ है कि माध्यम में अधिशोषक (adsorbent) सक्रियकृत चारकोल व पॉलीविनाइलपायरोलिडोन (activated charcoal and polyvinyl pyrrolidine PVP) भी भूरेपन (browning) को कम करने में सहायक है ।

ii) **पोषक पदार्थ (Nuterients)**

जैसा कि नाम से ही स्पष्ट है यदि पोषक पदार्थ जैसे सुक्रोज आदि का अभाव उत्पन्न कर दें तो उस ऊतक पर तनाव उत्पन्न हो जायेगा क्योंकि सुक्रोज कोशिका वृद्धि के लिये आवश्यक है । एक बार वृद्धि चरम पर हो जाने के पश्चात् ही द्वितीयक मेटाबोलाइटो का उत्पादन प्रारम्भ होता है । यदि सुक्रोज की मात्रा कम कर दी जाए 2,4-D को बढाया दिया जाए तो ऊतक तनाव में आ जाते हैं और द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन शुरु हो जाता है अर्थात् पोषक पदार्थों के अभाव में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का बनना शुरु हो जाता है ।

भौतिक कारक (physical Factors)

इसी प्रकार यदि भौतिक कारकों को बदल दिया जाए तो पौधा तनाव में आ जाता है जिसके परिणामस्वरूप वह उत्पादन अवस्था में चला जाता है । ये भौतिक कारक पात्र में कैलस की शरीर क्रिया (physiology) को परिवर्तित कर देते हैं जिसके परिणामस्वरूप द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन होने लगता है।

i) **दृश्य प्रकाश (visible Light)**

द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन में प्रकाश भी अहम् भूमिका निभाता है । प्रकाश में इनका उत्पादन ज्यादा होता है । विभिन्न द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने वाले एन्जाइम प्रकाश में ही सक्रिय होते हैं तथा उत्पादन क्षमता बढाते है ।

ii) **पराबैंगनी प्रकाश (Ultraviolet Light)**

पादप पराबैंगनी प्रकाश को अवशोषित कर हानिकारक प्रभाव को कम (minimize) करते हैं । यह भी द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के पलैविनॉयड वर्णक (flavonoids pigments) द्वारा होता है । अतः पराबैंगनी प्रकाश का भी कुछ स्थितियों में उत्पादन पर प्रभाव पड़ता है ।

iii) **जल (Water):**

जल की कमी यदि पात्रे स्थिति में उत्पन्न हो तो जैल कारक या उच्च अणु भार वाले पॉलिथिलीन ग्लाइकोल polyethylene glucol) का उपयोग किया जा सकता है ।

पानी की अभावावस्था से प्राथमिक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन पर सीधे प्रभाव पड़ता है । इसका उदाहरण Parthenium argentatum द्वारा पानी व तापमान की आभावावस्था में रबर के जैव संश्लेषण rubber biosynthesis) को बढ़ाना है ।

तापमान (Temperature)

तापमान अभावावस्था से जीन अभिव्यक्ति परिवर्तित हो जाती है । किसी भी पादप में तापमान का सीधा असर कोशिका भित्ति (cel lwall) व कोशिका झिल्ली पर पड़ता है जिससे उसके वसा अनुपात में परिवर्तन हो जाता है । इस प्रकार तापमान का सीधा असर उस पादप की शरीर क्रिया (physiology) पर पड़ता है जो उसकी विभिन्न क्रियाओं को रोक या कम कर देता है । अतः तापमान भी तनाव (stress) का मुख्य कारण होता है । उदाहरणतः अगर किसी कैलस (callus) में वृद्धि अवस्था होकर प्राथमिक

मेटाबोलाइट्स बन चुके हैं तो कुछ तापमान बढ़ाकर उसमें तनाव स्थिति उत्पन्न कर द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादित करवाये जा सकते हैं । इस प्रकार का शोध कार्य प्रगति पर है ।

पादप वृद्धि नियामक (Plant Growth Regulators) (PGR)

जैसा कि हम जानते है कि पादप की पात्रे वृद्धि में नियामकों (plant growth regulators) की अहम् भूमिका है अत: इनके अनुपात को विचलित कर देने से पात्रे कर्तोत्तक (in vitro explant) तनाव स्थिति में आ जाता है । ये वृद्धि नियामक पादप कैलस के विभेदन में मुख्य भूमिका निभाते हैं । अब तक के प्रयोगों से यह स्थापित हो चुका है कि ऑक्सिन (Auxin : 2,4D) अविभेदन (de-differentiation) ओर प्राथमिक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन को बढ़ाते हैं तथा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन को कम (suppress) कर देते हैं ।

इसके विपरीत साइटोकाइनिन (cytokinins) कोशिका विभाजन को बढ़ाते है, प्ररोह विभेदन (shoot differentiation) और द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न करने में सहायक हैं ।

इस प्रकार पादप वृद्धि नियामक की कुछ मात्रा ही वृद्धि और द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन में सहायक है तथा इसमें कुछ परिवर्तन करके पादप वृद्धि में बदलाव लाये जा सकते हैं ।

इलिसिटर्स द्वारा अभावावस्था

सबसे पहले हमें जानना आवश्यक है कि elicitors क्या हैं? और इनकी द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन करने में क्या भूमिका है ।

वे जैविक यौगिक जो पादप और सूक्ष्मजीवों के अर्न्तसम्बन्धों से उत्पन्न होते हैं elicitors कहलाते हैं । इस प्रक्रिया को हम साधारण भाषा में इस प्रकार समझ सकते हैं कि एक पादप प्रकृति में उगता है और उस पर घाव वाले स्थानों पर कवक आक्रमण से आसपास की कोशिकाएँ सक्रिय हो जाती है और उन्हें आत्मरक्षा के रुप में फाइटोएलेक्सिन (phytoalexin) स्त्रावित करने होते हैं, यह पादप का प्राकृतिक आत्मरक्षा तंत्र (self defense system) है । इसे अगर पात्र स्थितियों में इसोमाल करें तो संवर्धन में कुछ रसायन (arachidonic acid sodium salt, nigeran और actinomycin D) और कवक (Alternaria और Fusarium spp.) डालने से संवर्धन में तनाव की स्थिति उत्पन्न हो जाएगी । यह तनाव द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाता है । यह elicitor उस कर्तोत्तक (explant) को प्राकृतिक आक्रमण की स्थिति का वातावरण देता है और द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का अत्यधिक उत्पादन करने में मदद करता है । उदाहरणत: कई एल्केलायड्स (alkaloids) व द्वितीयक मेटाबोलाइट्स इसी प्रकार आजकल पात्र में उत्पन्न किये जा रहे है (सारणी 11.2) । आगे कोशिका स्तर पर अध्ययन किये गये कि वास्तव में elicitor ऐसा क्या परिवर्तन करते हैं कि एक ऊतक प्राथमिक मेटाबोलाइट्स निर्माण छोड़ कर द्वितीयक मेटाबोलाइट्स बनाने में जुट जाते हैं । जब ऊतक वृद्धि करता है और बाहर से कवक elicitor (आक्रमणकारी) डालने पर हर कोशिका को सूचना मिलेगी जो उस कोशिका के प्राथमिक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन को रोक कर वहां mRNA से उस प्रोटीन एन्जाइम का निर्माण शुरू करेगी जो द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के जैव सश्लेषण के एन्जाइम है । इस प्रकार Aatheranthus roseus और Phaseolous vulgaris में एल्केलायड का उत्पादन होने लगता है ।

सारणी 11.2 : विभिन्न पादप जातियों में कवक इलिसिटर की उपस्थिति में द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन

Plant species	Fungus	Preparation	Secondary metabolite	Effect
Apium graveolens	Fusarium sp.	-	Furanocoumarins	Increase
Catharanthus roseus	Pythium Aphanidermatum	Homogenate	Indole alkaloid and related Enzymes	Increase
Catharanthus roseus	P. aphandiermatum	Homogenate	Indolealkaloid and phenolics (TDC, PAL)	-
Daucus carota	P. aphanidermatum	Elicitor	Anthocynins andenzymes	Increase
Gycine max	Phytophthoro Megasperma	Elicitor Chitosan	Phytoalexin Isoflavonoids	Producton Production
Papaver somniferum	Botrytis sp.	Mycelium	Sanguinarine	26 times Increase
		Actinocyin	Codeine	Producton
Petroselinum hortense	Allternaria sp.	Cell wall	Bergapten	Lowering Cytoplasmic Phosphate
Petroselinum hortense	Alternia sp.	Cell wall	PAL, mRNA	Inhibition of uptake of phosphate and amino acid
Phaseolus ovlgaris	Alternia sp.	Poly-L-lysine	Phaseolin	Production
		RNAse	Phaseollin	Production
Sanginaria Canadenisis	Penicillium Expansum	CGlucan	BEnzophennan-thridine alkaloids	Role of calcium In single Transduction
Solanu tuberosum	Phytophthora Infestans	Elicitor	Phenolic and PAL activity	Increase in enzyme activity

रोमिल मूल संवर्धन (Hariy Root Culture)

रोमिल मूल संवर्धन के लिए कर्तोत्तक (बीज, पर्ण या प्ररोह शीर्ष भाग) को काट कर उसे यीस्ट माल्टोज बोथ माध्यम (yeast maltose broth medium), जिसमें Agrobacterium rhizogenes पहले से निवेशित है, में स्थानान्तरित करते हैं और इससे उस कर्तोत्तक में मूलों का बनना प्रारम्भ हो जाता है । यहाँ यह विचारणीय है कि जब उस पादप की जड़ होती है तो भी हम तना या बीज लेकर इतनी

लम्बी प्रक्रिया क्यों करते हैं ? इसका उत्तर यह है कि यदि एक पौधे से जड़ कर्तोत्तक लेगें तो आप उसे उखाड़ कर नष्ट कर देंगे और आपके कुछ ही प्रयोगों में कई पौधे समाप्त हो जाएंगे जो प्रकृति के नियम के विरूद्ध है । इसके विपरीत यदि आप तना या बीज लेते हैं तो मात्र एक ही पौधे से आप पूरा शोध कर सकते है इसे पर्यावरणीय मित्र शोध (ecofriendly research) कहते हैं । उदाहरणत: आक्सिन, यदि माध्यम में डालें तो अमीनों अम्ल चपापचय इस तरह परिवर्तित होता है कि विशेष रोमिल मूल संवर्धन बनते हैं । इस प्रकार हमने देखा कि उचित कर्तोत्तक का चयन करके तथा कुछ रसायनों की सहायता से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का अधिकतम उत्पादन कर सकते हैं ।

बोध प्रश्न

17. अभावावस्था द्वारा उत्पादन ..... है -
    अ) बढ़ता है ब) घटता है
    स) अप्रभावित रहता है द) उपरोक्त में कोई नहीं ।
18. वृद्धि आरेख में अवस्थाएँ होती है -
    अ) लेग प्रावस्था ब) चर घातांकी (exponential) प्रावस्था
    स) स्थिर प्रावस्था द) उपरोक्त सभी ।
19. किसी भी पादप में क्षतिग्रस्त होने पर ऊतक में स्त्रावित होते हैं -
    अ) एल्केलाइड्स ब) फीनोल्स
    स) अ एवं ब दोनों द) इनमें से कोई नहीं ।
20. उत्पादन बढ़ाने के लिए बहुत उपयोगी है -
    अ) विषाक्त यौगिक ब) प्रति ऑक्सीकारक यौगिक
    स) अ एवं ब दोनों द) इनमें से कोई नहीं ।
21. अभाव उत्पन्न करने से पात्र में ऊतक में स्वप्रतिरोधकता आती है और वह प्राथमिक मेटाबोलिसम से विस्थापित होकर द्वितीयक मेटाबोलाइट बनाना आरम्भ कर देता है - सत्य/असत्य
22. ऑक्सिन के प्रभाव से होता है -
    अ) मूलोद्भवन ब) भ्रूणाभ निर्माण
    स) अविभेदन द) इनमें से कोई नहीं ।
23. साइटोकाइनिन (cytokinins) द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन बढ़ाने में सहायक है -सत्य/असत्य
24. कवक इलिसिटर (fungal elicitors) का कार्य प्रकृति में पादप की आत्मरक्षा से सम्बन्धित है -सत्य/असत्य
25. रोमिल मूल संवर्धन बनाने के लिए पात्र में.....का संक्रमण किया जाता है -
    अ) Agrobacterium tumefaciens ब) Agrobacterium rhizogeneses
    स) एवं ब दोनों द) इनमें से कोई नहीं ।

26. पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन के लिए अनिवार्य शर्त है -
अ) उत्पादन अधिक व लागत कम ब) उत्पादन कम व लागत अधिक
स) अ एवं ब दोनों द) इनमें से कोई नहीं ।

27. एट्रॉफिन, Atropa bellodona से स्त्रावित एल्केलॉयड है जिसमें प्रतिकॉलीनर्जिक (anticholinergic) गुण होते हैं - सत्य/असत्य

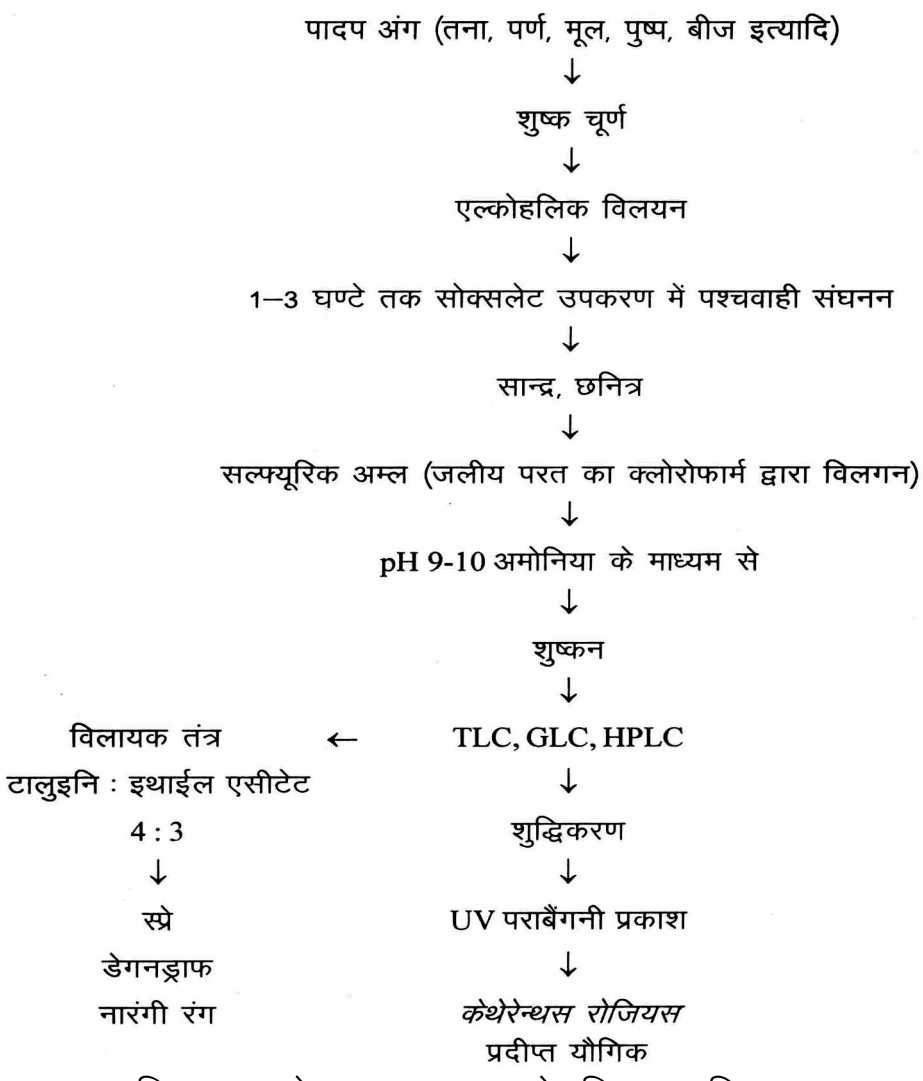
11.5 एल्केलाइड्स का उत्पादन (Production of Alkaloids) :

सदियों से एल्केलाइड्स युक्त पादपों का उपयोग मानव कल्याण में हो रहा है । जितने भी ज्ञात प्राकृतिक उत्पाद उनमें 20% एल्केलाइड्स है । इनका काफी विस्तृत अध्ययन हुआ है । लगभग 30 से ज्यादा एल्केलाइड्स को वाणिज्यिक रुप से उत्पादित किया जा रहा है । एल्केलाइड्स का सफर कुनेन (मलेरिया बुखार में काम आने वाली ड्रग्स) से शुरू होकर विनबिलास्टीन और विनक्रिस्टीन (केंसररोधी औषधि) तक पहुँचा है और यह प्रगति पर है ।

कुछ एल्केलाइड्स संश्लेषित भी किये जा चुके हैं किन्तु अधिकतर पादप से प्राप्त होते हैं । इनमें से कुछ महत्त्वपूर्ण एल्केलायडों के उदाहरण नीचे सारणी में दिये गये है (सारणी 11.3) । इन एल्केलाइड्स की माँग इतनी ज्यादा कि पौधों से इनका निष्कर्षण करने के लिए जैवभार ही पर्याप्त नहीं है अत: पात्र में उत्पादन एक ऐसी प्रक्रिया जो हमें ये उत्पाद प्राप्त करने में मदद करती है ।

सारणी 11.3 पादप द्वारा उत्पादित महत्वपूर्ण एल्केलाइड और उनकी औषधीय क्रियाशीलता

एल्केलाइड	स्रोत	औषधीय गुण
Atropine	Atropa belladonna	Anticholinergic
Berbenine	Berberis aristata	Antispasmodic
Caffeine	Caffea Arabica	Sitmulant
Ephedrine	Ephedra gerardiana	Spasmolytic
Reserpine	Rauwolfia serpentine	Hypotensive
Vinblastine, vincristine	Catharantus roseus	Anticancerous



चित्र 11.9 एल्केलाइड पृथ्थकरण का रेखाचित्र द्वारा निरुपण

उत्पादन के लिए कार्य योजना (Strategies for Production)

एल्केलाइड्स के पात्र में उत्पादन के लिए हमें उस पादप की शारीरिकी, एल्केलाइड की रासायनिक प्रकृति तथा उपयोग (pharmacological value) ज्ञात होने चाहिए । साथ ही में अब तक की शोध के बारे में एक विस्तृत इतिहास भी पता हो ताकि उत्पादन के लिए पहले असफल हो चुके प्रयोग न दोहराये जाए । अब हमारी कोशिश होनि चाहिए कि न्यूनतम संसाधनों से हम अधिकतम उत्पादन करें, इसके लिए हमेशा यीस्ट युक्त कोशिका निलम्बन संवर्ध प्रयुक्त किये जाते हैं, क्योंकि यही वो अवस्था है जो औद्योगिक स्तर पर जैव किण्वक (bioreactor) में अधिक मात्रा में द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन करने में सक्षम है । इसके लिए हम माध्यम में परिवर्तन करके उत्पादन बढा सकते हैं । एल्केलाइड्स के उत्पादन में ईष्टतमीकरण (optimization) करने के लिए भौतिक कारक (प्रकाश, तापमान, पात्र प्रकार), पोषक माध्यम (कार्बन स्रोत, नाइट्रोजन स्रोत, नाइट्रेट, पूर्ववर्ती, फॉस्फेट), पादप

वृद्धि नियामक (ऑक्सिन तथा साइटोकायनिन) एवं कार्बनिक प्रतिस्थापकों (केसीन हाइड्रोलाइलेट, नारियल पानी, यीस्ट सत आदि) का उपयोग किया जाता है ।

उपरोक्त सभी कारकों में परिवर्तन से निश्चित ही पात्र में ऐल्केलाइड्स का उत्पादन अधिकतम मात्रा में किया जा सकता है । यह वो अवस्था है जब माध्यम संतृप्त हो जाता है तथा प्राथमिक मेटाबोलाइट्स उत्पादन चरम सीमा पर होता है और फिर द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन शुरु हो जाता है ।

पात्रे एल्केलायड्स के उत्पादन में पूर्ववर्ती की अहम् भूमिका होती है । जैसा कि जैव संश्लेषण मार्ग से ज्ञात है कि अमीनो अम्ल एल्केलाइड्स के पूर्ववर्ती हैं । माध्यम में इनकी सान्द्रता बढा देने से कोशिका की शरीर क्रिया (physiology) में परिवर्तन के कारण इन अमीनों अम्लों का अवशोषण होगा जो विभिन्न रासायनिक क्रियाओं के उपरान्त एल्केलाइड्स का निर्माण करेंगे । फिर ये एल्केलाइड्स रिक्तिका या बाहरी माध्यम में एकत्रित होने लगेंगे । रासायनिक जाँच के द्वारा निश्चित किया जाता है अर्थात् इन्हें पराबैंगनी प्रकाश में देखकर कहा जा सकता है कि पात्र में एल्केलाइड्स का उत्पादन हो रहा है कि नहीं और फिर इन्हें एकत्रित कर उपयोग में लाया जाता है ।

कुछ उदाहरणों से हम यह जानेंगे कि किस तरह शोध से विभिन्न एल्केलाइड्स के पृथ्थकरण की प्रक्रिया सम्पन्न की जाती है, जैसे -

i) इफिड्रा की प्रजातियाँ (Ephedra sps.) से इफिड्रिन (Ephedrine) एल्केलाइड का उत्पादन करने के लिए MS माध्यम में IBA (10 mg/1) तथा फेनिल एलेनिन (phenylalanine) (0.1 g/1) उपयोग करने से अधिक मात्रा में इफ्रेड्रिन का उत्पादन किया जा रहा है ।

ii) पाइरोलिडिन, पाइपेरिडिन तथा पाइरिडीन (Pyrrolidine, Piperidine and Pyridine) एल्केलाइड्स का जैव संश्लेषण देखें तो यह विदित होता है कि निकोटिनिक एसिड इनका पूर्ववर्ती है । अत: ऐसे एल्केलाइड्स के उत्पादन के लिए तम्बाकू के संवर्धन माध्यम में निकोटिनिक एसिड डालने पर अच्छे परिणाम आएगें । कुछ प्रयोगों से यह भी ज्ञात हुआ कि रोमिल मूल संवर्धन का भी काफी महत्व है पर इसके लिए उन्हीं एल्केलाइड्स को उत्पन्न करना चाहिए जो प्रकृति में जड़ों से मिलते हैं क्योंकि शरीर क्रियात्मक परिवर्तन (physiological changes), रोमिल मूल संवर्ध में एल्केलाइड्स उत्पन्न करने में सक्षम होते हैं ।

इसी प्रकार माध्यम में परिवर्तन कर व पूर्ववर्ती को डालकर विभिन्न प्रकार के एल्केलाइड्स पात्र में उत्पादित किये जा रहे हैं ।

11.6 स्टीराइड्स तथा सेपोनिन का उत्पादन (Production of Steriods and Saponins):

द्वितीयक मेटाबोलाइट्स में स्टीराइड्स महत्त्वपूर्ण है क्योंकि इनका औषधीय उपयोग बहुत ही अधिक है । इनमें स्टीरोल सेपोनिन कार्डियक ग्लाइकोसाइड्स, स्टीराइडल एल्केलाइड्स आदि आते हैं । इन्हें जीवनरक्षी दवाईयाँ भी कहते है । इनकी उपयोगिता को देखते हुए इनके उत्पादन की बहुत अहम्भूमिका है । आज अधिक शोध इस स्तर पर हो रही है कि किस तरह जैव संश्लेषण मार्ग (biosynthetic pathway) का इगन कर इनके उत्पादन में वृद्धि की जाए ।

1. Digitails purpurea Digoxin Cardiac glycosides

2. Dioscorea deltoidea	Diosgenin	Antiinflammatory
3. Agave amanuensis	Lecogenin	Anabolic, Contraceptic

सेपोनिन (Saponin)

सेपोनिन हाइड्रोलाइसिस पर शर्करा और सैपोजिनीन (sapogenin) देते हैं । इसमें सैपोजिनिन वलय स्टीराइड स्केलेटन होता है जिसमें 27 कार्बन परमाणु होते हैं जो 6 रिंग से बने होते हैं और इसे स्पाइरोस्टेन कहते हैं इसमें तीसरे कार्बन पर हाइड्राक्सिल समूह होता है । ये पादपों में बहुतायत से पाये जाते हैं । सेपोनिन में जल में फोम बनाने की विशेषता होती है जो इनसे स्टीरायडीयल औषधि बनाने में काम आती है ।

सेपोनिनस से पादप को सूक्ष्मजैविक अक्रमण से सुरक्षा प्रदान होती है कुछ सेपोनिन वाइरस के विरूद्ध भी सक्रिय होते हैं । कुछ सेपोनिन ड्रग्स में शोथरोधी (anti- inflammatory) गुण होते हैं तथा इनका पारम्परिक रूप से कफोत्सारक (expectorant) की तरह उपयोग होता है ।

निष्कर्षण तथा प्रमाणीकरण (Extraction and Quantification)

सेपोनिन पानी में घुलनशील होते हैं तथा इन्हें एल्कोहल में निष्कर्षित किया जा सकता है ।

पादप अंग (तना, पुष्प, मूल, पर्ण इत्यादि)

↓

शुष्क चूर्ण

↓

70% इथनाल में 10 मिनट के लिए पश्चवाही संघनन

↓

TLC, HPLC, CC, GLC

↓

विलायक तन्त्र ब्यूटेनॉल : एसीटिक एसिड : जल

4 : 1 : 3

↓

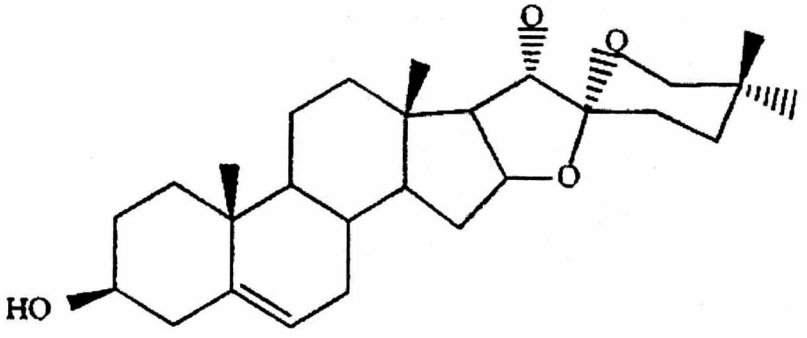
पराबैंगनी किरणों में Detection

चित्र 11.11 : सेपोनिन पृथ्थकरण का रेखाचित्रीय निरुपण

कुछ बहुत अधिक उपयोगी सेपोनिन ड्रग्स के पात्रे (in vitro) उत्पादन के बारे में संक्षेप में विवरण इस प्रकार है -

(1) **डायोजेनिन (Diosgenin)**

यह एक स्टीराइडल सेपोजेनिन है जो कॉर्टिकोस्टीरॉयड (corticosteroids) व लिंग हारमोन (sex hormone) के संश्लेषण में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है । इसको पादप Dioscorea sps. जो एकबीजपत्री पादप है से प्राप्त किया जाता है । यह सेपोनिन जड़ों व कंदों में बहुतायत से मिलता है । इसकी अत्यधिक खपत से इसके ऊतक संवर्धन शोध तीव्र गति से चल रहा है । इसमें चयनित क्लोन (जिनसे अधिक उत्पादन हो सके) को कोशिका संवर्धन द्वारा पात्र में संवर्धित करते हैं । इसमें MS माध्यम में ऐडेनिन सल्फेट (15 mg /1) व NAA (0.1 mg/1) को प्रयुक्त उत्पादन बढ़ाया जा सकता है ।

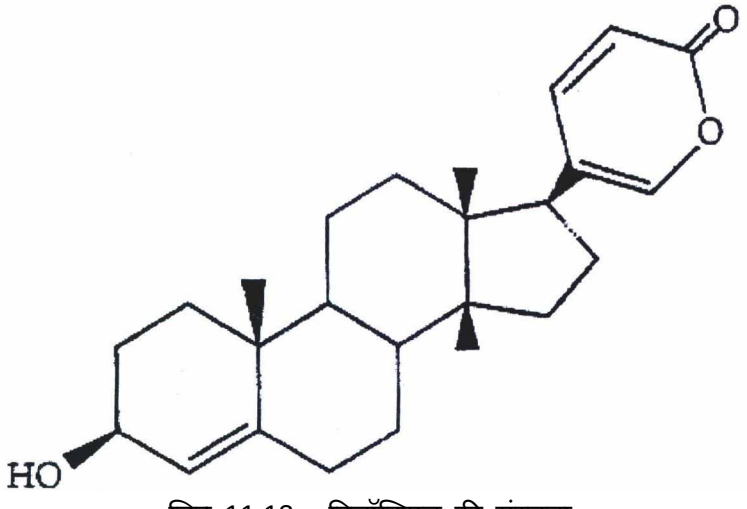


11.12 डायोजेनिन की संरचना

(2) **हृद ग्लाइकोसाइड्स (Cardiac glycosides)**

स्टीराइड्ल ग्लाइकोसाइड्स हृदय संबंधी विसंगतियों में बहुत उपयोगी होते हैं । Digitalis sps. में उच्चतम स्तर पत्तियों में हृद ग्लाइकोसाइड्स (Cardiac glycosides) जैसे डिजॉक्सिन (Digoxin) पाये जाते हैं ।

इन्हे रासायनिक संरचना के आधार पर देखें तो cardenolide - C_{23} type व bufadienolide C-24 प्रकार (C-24 type) के होते हैं और इनसे जुड़ी शर्करा एक ऑलिगो सेकेराइड होती है (चित्र 11.13)।



चित्र 11.13 : डिजॉक्सिन की संरचना

11.7 सारांश (Summary) :

द्वितीयक मेटाबोलाइट्स पादपों से प्राप्त होने वाले बहु उपयोगी उत्पाद होते हैं । इनका उपयोग अनेक रुपों में किया जा रहा है । यहाँ तक कि कुछ द्वितीयक मेटाबोलाइट्स औषधियों के रुप में भी प्रयोग किये जा रहे हैं । प्राकृतिक रुप से उत्पन्न होने वाले द्वितीयक मेटाबोलाइट्स अल्प मात्रा में प्राप्त होते हैं । वर्तमान में आवश्यकतानुसार व्यवसायिक स्तर पर इनके उत्पादन हेतु अनेक विधियां विकसित की गयी हैं । प्रयोगशाला की अंत:पात्रे स्थितियों में इष्टतम उत्पादन एक प्रमुख तकनीक है । इस तकनीक से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पादन अनेक कारकों द्वारा नियंत्रित किया जाता है जिनमें प्रकाश, तापमान, pH, वातन, पोषक तत्व आदि प्रमुख है । पूर्ववर्ती के उपयोग से भी द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के उत्पादन में वृद्धि की जा सकती है । विभिन्न अभावावस्थायें भी द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के वृहद् उत्पादन में सहायक सिद्ध होती हैं । रोमिल मूल संवर्धन तकनीक का विकास पादप मूलों से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के वृहद् उत्पादन के लिये किया जाता है ।

11.8 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1.	द	15.	अ
2.	अ	16.	सत्य
3.	सत्य	17.	अ
4.	स	18.	द
5.	अ	19.	ब
6.	अ	20.	ब
7.	ब	21.	सत्य
8.	द	22.	स
9.	अ	23.	सत्य
10.	स	24.	स
11.	द	25.	ब
12.	सत्य	26.	अ
13.	अ	27.	सत्य
14.	सत्य		

11.9 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Questions):

1. पात्र में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स के इष्टतम उत्पादन पर निबन्ध लिखें ।
2. उपापचय में चयन का द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट उत्पादन पर प्रभाव के कारणों का विस्तृत विवेचन करो ।
3. अभावावस्था में द्वितीयक मेटाबोलाइटो का उत्पादन किन कारकों पर निर्भर करता है, विस्तारपूर्वक वर्णन करें।
4. एल्केलाइड्स, स्टीराइड्स और सेपोनिन के उत्पादन पर संक्षिप्त टिप्पणी लिखें ।

11.10 शब्दावली (Glossary) :

1. पादप वृद्धि नियामक	Plant growth regulator
2. पात्रे उत्पादन	In vitro production
3. ईष्टतमीकरण	Optimization
4. कवक एलिसिटर्स	Fungal elicitors
5. पूर्ववर्ती	Precursors
6. जैव संश्लेषण	Biosynthesis
7. शर्करा	Surcrose
8. वृद्धि आरेख	Growth curve

11.11 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books):

1. बेल तथा चार्ल वुड, सेकेण्डरी प्लान्ट प्रोडक्ट्स, रिग्रंगर - वरलाग, बर्लिन ।
2. हरबर्ट, द बायोसिन्थोसिस ऑफ सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स, चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
3. रामावत एण्ड मेरीलोन बायोटेक्मोलॉजी सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स, ऑकनफोर्ड आई. बी. एच. पब्लि कम्पनी नई दिल्ली ।
4. मिसवा प्लान्ट टिश्यू कल्चर : एन अल्टरनेटिव फॉर प्रोडक्शन ऑफ यूजफूल मेटाबोलाइट्स एफ. ए.ओ. बुल, नं. 108, रोम ।

इकाई 12

द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-III : बृहत् उत्पादन
(Secondary Plant Metabolites - II: Mass Production)

इकाई की रूपरेखा

12.0 उद्देश्य

12.1 प्रस्तावना

12.2 जैव परिवर्तन से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन

12.3 निश्चलीकृत पादप कोशिका से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन

12.4 आनुवंशिक रुपान्तरण द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन

12.5 आनुवंशिक रुपान्तरण की सीमाऐं

12.6 सारांश

12.7 बोध प्रश्नों के उत्तर

12.8 अभ्यासार्थ प्रश्न

12.9 शब्दावली

12.10 संदर्भ ग्रन्थ

12.0 उद्देश्य (Objectives) :

पादप द्वारा उत्पादित द्वितीय मेटाबोलाइट अनेक प्रकार के होते हैं । इन मेटाबोलाइट्स का उपयोग दिनों दिन बढ़ रहा है । इसलिए इनकी पूर्ति करने के लिए इनका वृहत् उत्पादन आवश्यक है । जनसंख्या वृद्धि एवं औद्योगीकरण के कारण इनकी इनकी खपत बढ़ रही है किन्तु संसाधन सीमित है और उनमें भी वनोन्मूलन (deforestation) के कारण काफी कमी आ रही है । अत: इन द्वितीयक मेटाबोलाइटस की आवश्यकता पूर्ति हेतु नई तकनीक काम में ली जा रही हैं ताकि इनका वृहत् उत्पादन सीमित संसाधनों से हो सके । इस अध्याय में हम पढ़ेंगे कि किस प्रकार जैव परिवर्तन तथा जीन रूपान्तरण द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने में सक्षम है ? किस प्रकार जैव रिएक्टर में वृहत् उत्पादन सक्षम है ? किस प्रकार कोशिका संवर्धन के माध्यम से अधिकतम द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न किये जा सकते हैं? साथ ही साथ जैव रिएक्टर के उपयोग, निश्चलीकृत कोशिकाओं के द्वारा उत्पादन, जैव रूपान्तरण के अनुप्रयोग तथा सीमाओं का अध्ययन भी करेंगे।

इसी संदर्भ में सर्वप्रथम हम पढ़ेंगे कि जैव परिवर्तन तथा जीन रूपान्तरण क्या है? और द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने में कैसे सक्षम है?

12.1 प्रस्तावना (Introduction) :

जैव परिवर्तन पात्र में हुई वह क्रिया है जिससे पूर्ववर्ती (precursor) द्वारा उत्पाद (product) बनाने के लिए किसी जैव उत्प्रेरक (biocatalyst) का उपयोग किया जाता है ये जैव उत्प्रेरक (biocatalyst) सूक्ष्मजीव, पादप या जन्तु कोशिका हो सकते हैं जो अपने शुद्ध रुप (pure form) में मुक्त या निश्चलीकृत (immobilized) हो सकता है । इस जैव उत्प्रेरक की उपस्थिति में पात्र में एक वातावरण बनाया जाता है जो पूर्ववर्ती को उत्पाद बनने के लिए प्रेरित करता है । इसके द्वारा हम जो उत्पाद चाहते हैं उसके जैव संश्लेषण (biosynthesis) की जानकारी हमें होनी चाहिए । क्योंकि जैव संश्लेषण द्वितीयक मेटाबोलाइट्स की एक जटिल प्रक्रिया है जिसमें पूर्ववर्ती बहुत सारे मध्यवर्ती यौगिक (intermediate compouds) बनाता है और अंतिम उत्पाद द्वितीयक मेटाबोलाइट होता है जिसकी हमें आवश्यकता है । अत: जैव परिवर्तन में हम उस श्रृंखला (series) की अंतिम प्रक्रिया को लेते हैं तथा उसे सम्पन्न करते हैं । उदाहरणतः $a \xrightarrow{x} b \xrightarrow{y} c \xrightarrow{z} d$ एक उत्पाद
d बनाने के लिए पूर्ववर्ती a का उपयोग होता है और उसमें विभिन्न मध्यवर्ती बनते हैं किन्तु यदि हम जैव उत्प्रेरक का उपयोग व c की सान्द्रता बढ़ा दें तो जैव रुपान्तरण (biotransformation) द्वारा हमें d प्राप्त होगा ।

12.2 जैव रुपान्तरण से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन (Production of Secondary Metabolites by Bioconversion) :

यह तो हमें ज्ञात है कि प्रत्येक कोशिका के केन्द्रक (nucleus) में आनुवंशिक सूचनाऐं (genetic information) सक्रिय होती है और इसी कारणवश कोशिका को सर्वशक्त ([omnipotent (omni-all; potens = powerful)] कहते हैं । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स पादप के बहुत सीमित (restricted) भाग में ही बनते हैं तथा इनका अंत:पात्रे (in vitro) उत्पादन और भी कम होता है तथा पात्र में उत्पादन बढ़ाने के लिए जैव परिवर्तन की प्रक्रिया का उपयोग करना लाभदायक रहता है । आज औद्योगिक स्तर (industrial level) पर बहुत कम उत्पाद बनते हैं अत इस तकनीक पर खोज तीव्र गति से चल रही है कि किस प्रकार द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन बढ़ाया जा सकता है । उदाहरणत: Podophyllum के कोशिका संवर्धन (cell cultures) से उत्पन्न पोडोफिल्लोटॉक्सिन (podophyllotoxin) जो एक भेषजिक रुप से सक्रिय औषधि का उत्पादन बहुत कम होता है अर्थात् उत्पादन लागत अधिक व उत्पादन कम होता है, इसलिए अंतःपात्रे (in vitro) यदि नये परिपथ विकसित किये जायें तो औद्योगिक स्तर (industrial scale) पर उत्पादन संभव होगा । इस प्रक्रिया में मध्यवर्ती व पूर्ववती को माध्यम में डालने से उत्पादन बढ़ सकता है । साधारण भाषा में हम जैव परिवर्तन को ऐसी प्रक्रिया भी कह सकते हैं जिसमें पादप कोशिका में एन्जाइम उत्प्रेरित रुपान्तरण करती है जिसमें पूर्ववर्ती से बहुमूल्य उत्पादन बनते हैं ।

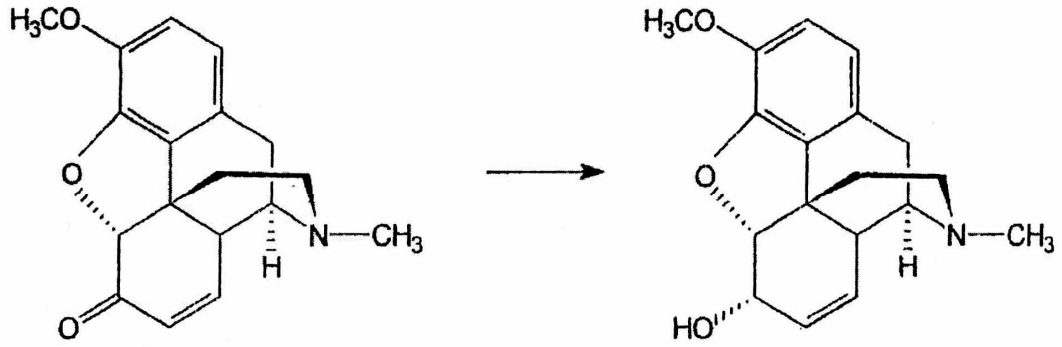
जैव उत्प्रेरक

जैव परिवर्तन ⟶ उत्पाद

(पुर्ववर्ती) सुक्ष्मजीव/पादप/जन्तु कोशिका

प्रत्येक पादप कोशिका में बहुत से एन्जाइम होते हैं जो जैव रासायनिक क्रिया की गति को बढ़ा कर स्वयं अपरिवर्तित रह जाते हैं, अर्थात् यह क्रिया की गति को बढ़ाते हैं तथा स्वयं काम में नहीं आते । इससे एन्जाइम को पुनर्चक्रित (recycle) किया जा सकता है । इस प्रक्रिया में एन्जाइम पूर्ववर्ती या मध्यवर्ती से अस्थाई रुप से संयोजित होकर उसे उत्पाद में परिवर्तित कर देता है ।

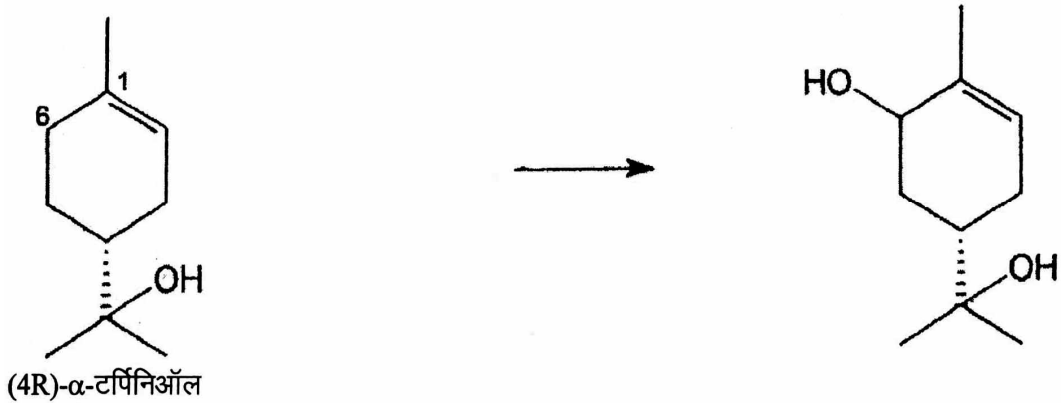
पादप एन्जाइम बहुत ही सक्रिय होते है तथा इनमें कुछ विशिष्ट लक्षण होते हैं जो रासायनिक ऊत्प्रेरकों में नहीं होते हैं । ये हैं, अ) त्रिविम विशिष्टता (stereo specificity), ब) प्रक्षेत्र विशिष्टता (Regio specificity) । त्रिविम वैशिष्ट्य से तात्पर्य है कि वह रासायनिक संरचना, विभिन्न त्रिविम समावयव (stereo isomers) के रुप में संभव है किन्तु सक्रिय कुछ ही रुप होते हैं । जो त्रिविम विशिष्ट समावयवी सक्रिय होता है उसे ही जैव परिवर्तन में इस्तेमाल किया जाता है । इस प्रकार इन एन्जाइमों का उपयोग करके अंतःपात्रे जैव परिवर्तन (in vitro bioconversion) द्वारा उन उत्पादों को बनाया जा सकता है जो सैद्धान्तिक रूप से संभव है (चित्र 12.1) ।



कोडीनोन कोडीन

चित्र 12.1 : अफीम (Papaver sominferum की कोशिका द्वारा कोडिनोन (Codeinone) का कोडीन (Codeine) में अपचयन ।

दूसरा मुख्य गुण regiospecificity है जिसमें पादप एन्जाइम एक क्रियात्मक समूह (functional group) को दूसरे क्रियात्मक समूह में रुपान्तरित करता है और अक्रिय पूर्ववर्ती (non- active precursor) को सक्रिय पूर्ववर्ती (active substance) बनाता है । इस प्रकार की अभिक्रिया में ऑक्सीकारक (oxidation), अपचयन (reduction), हाइड्रोक्सीकरण (hydroxylation), मैथिलीकरण (methylation), demethylation इत्यादि । Regiospecificity का गुण औद्योगिक स्तर पर जैव परिवर्तन में बहुत लाभदायक है जिसमें हाइड्रोक्सीकरण और ग्लाइकोसिलेशन बहुत गुणकारी होता है इसके द्वारा बहुत उपयोगी भैषजिक महत्व की औषधियों का निर्माण हो सकता है (चित्र 12.2)।



(4R)-α-टर्पिनिऑल

चित्र 12.2 : निकोटिना टेबेकम (Nicotiana tabacum) की कोशिका द्वारा C_6 पर टरपीनिओल का हाइड्रोक्सीकरण

जैव परिवर्तन विधि (Bioconversion)

यह कई प्रकार से हो सकता है । इसमें सबसे सरल तरीका मुक्त निलम्बित कोशिकाओं freely suspended cells) का है क्योंकि इसमें तंत्र (system) में प्रत्यक्षत: पूर्ववर्ती (directly precursor) डाल कर भैषजिकीय महत्वपूर्ण उत्पाद (pharmaceutically useful product) प्राप्त करते हैं । इस प्रक्रिया में कोशिका भित्ति (cell wall) और कोशिका झिल्ली (cell membrane) ही अवरोधी (barrier) होते हैं जिन्हें पार करके महत्त्वपूर्ण उत्पाद (valuable product) प्राप्त कर सकते हैं । इस प्रकार की क्रियाओं में प्रयास किया जाता है कि जैव रूपान्तरण एक चरण में पूरा हो जिसमें जैव संश्लेषण (biosynthesis) अंतिम अभिक्रिया (last reaction) हो, किन्तु वास्तविकता में ऐसा नहीं होता है । एक पूर्ववर्ती क्रिया करके कई उत्पाद बना देता है, क्योंकि कोशिका तंत्र में हर तरह के एन्जाइम होते हैं और ये सक्रिय होते हैं तो जैसे ही किसी कोशिका निलम्बन (cell suspension) में पूर्ववर्ती प्रविष्ट होता है इस कोशिका तंत्र के सभी एन्जाइम सक्रिय हो जाते हैं और क्रिया शुरु कर देते हैं। अंतःपात्रे शोध में ऐसे कई उदाहरण है जिसमें जैव रुपान्तरण द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न किये जा रहे हैं । यद्यपि इनकी मात्रा कम है । यह mg/litre/day के अनुपात में आंकी जाती है । इस प्रकार उत्पन्न उत्पाद की मात्रा निश्चलीकृत कोशिकाओं (immobilised cells) द्वारा उत्पादित मात्रा से तुलनीय होती है । उदाहरणत: गाजर (Daucus Carota) के कोशिका संवर्ध में जिटॉक्सिजेनिन (Gitoxigenin) डालकर हाइड्रोक्सिकरण द्वारा 5 β - हाइड्रॉक्सीजिटॉक्सिजेनिन (5 β - hydroxygitoxigenin) उत्पाद बनाया जाता है (सारणी 12.1) । इसी प्रकार कॉफी (Coffea arabica) में वेनिलिन का ग्लूकोसाइलेशन (शर्करा का युग्मन) करके वेनिलिन (Vanillin) β-D- का उत्पादन किया जाता है । इस प्रकार का जैव रूपान्तरण % बहुत उच्च होती है । इस प्रकार हमने देखा कि मुख्यत: हाइड्रॉक्सीकरण (जल अणु का युग्मन) और ग्लूकोसाइलेशन क्रियाएं जैव रुपान्तरण के लिये प्रयोग की जाती है ।

सारणी 12.1 : मुक्त निलम्बित कोशिकाओं में एक चरणी जैव रुपान्तरण ।

Cell culture species	Reeaction type	Precursor	Product	Remarks
Glyeyrrhiza glabra	Hydroxylation	Papaverine	Papaverionl	Long period of bioconversion (21 d)
Daucus carota	Hydroxylation	Gitoxigenin	5 β - Hydroxy-gitoxigenin	Precursor added after 72 of cultivation
Mentha species	Reduction	(-) - Menthone	(+) - Neomenthol	Stereospecific biocon-version
Rauwolfia serpantina	Glucoylation	Hydroquinons	Arbutin	Precursor added continuously
Coffea Arabica	Glucosylation	Vanillin	Vanillin- β -D- Glucoside	High bioconversion percentage (85%)

ग्लूकोसाइलेशन जिसमें ग्लूकोज युग्मन (glucose coupling) होता है, सामान्यत: पादप कोशिका में सम्पन्न होती है । यह क्रिया बहुत सीमित सूक्ष्मजीवों और पादप कोशिकाओं में सम्पन्न होती है । उदाहरणत: सदाबहार (Catharanthus roseus)और कॉफी (coffea arabica) के कोशिका निलम्बन द्वारा जैव रुपान्तरण । इसी प्रकार पोडोफिल्लम (Podophyllum) द्वारा पोडोफिल्लोटॉक्सिन (podophyllotoxin) को विलगित करते हैं तथा इसका उपयोग कैंसर कोशिका वंशक्रम (cell lines) में किया जाता है । अत्यधिक विषाक्त (toxic) होने के कारण इनका सीमित उपयोग होता है ।

यदि इस सम्पूर्ण प्रक्रिया को देखें तो हमें ज्ञात होगा कि आकारिकी विभेदन (morphological differentiation) ही रासायनिक विभेदन (chemical differentiation) का आधार है अर्थात् द्वितीयक मेटाबोलाइट्स बनने की कड़ी उस पादप कोशिका की अंत: पात्रे वृद्धि (in vitro growth) से जुड़ी है । यदि बिभेदित कोशिका वंशक्रम (differentiated cell lines) का उपयोग किया जाए तो उत्पादन को बढ़ाया जा सकता है । इस प्रकार का उत्पादन पूर्ववर्ती की जल में घुलनशीलता, अंत: कोशिका एन्जाइम (intracellular enzymes) की सान्द्रता व क्रियाशीलता पर निर्भर करती है । इन अभिक्रियाओं में उत्पादन बढ़ाने के लिए तनाव (stress), अत्यधिक pH और परासरण आघात (osmotic shock) का उपयोग भी किया जा सकता है । कई बार एन्जाइम्स की क्रियाशीलता बढ़ाने के लिए कार्बनिक एल्कोहॉल (e.g. isopropanol) या DMSO (Dimethyl sulfoxide) का उपयोग किया जाता है ।

अत: यह कहा जा सकता है कि मुक्त निलम्बित (freely suspended) पादप कोशिका में पूर्ववर्ती डालकर वांछित यौगिक बनाने की अपनी सीमाऐं है ।

बोध प्रश्न

1. कोशिका के किस अंग में सारी आनुवंशिक सूचना निहित होती है -
   - अ) केन्द्रक
   - ब) लाइसोसोम
   - स) ER
   - द) प्लाज्मा झिल्ली
2. उत्प्रेरक किसी रासायनिक क्रिया की गति को ..... है ।
   - अ) बढ़ाता
   - ब) घटाता
   - स) रोकता
   - द) उपरोक्त में कोई नहीं
3. त्रिविम विशिष्ट रो तात्पर्य उस रासायनिक संरचना से है जो अनेक त्रिविम समावयवों (stereo isomers) के रुप में पायी जाता है । सत्य/असत्य
4. प्रक्षेत्र विशिष्टता (regiospecificity) में.....होता है ।
   - अ) केवल ऑक्सीकरण
   - ब) केवल अपचयन
   - स) केवल डीमिथाइलेश्न
   - द) उपरोक्त सभी
5. निश्चलीकृत कोशिका का उपयोग अनुकूल परिस्थिति में भी किया जा सकता है - सत्य/असत्य

12.3 निश्चलीकृत पादप कोशिका से द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन(Production of Secondary Metabolites from Immobilized Cells):

सामान्य भाषा में निश्चलीकरण (immobilization) से तात्पर्य है कि किसी वांछित पादप कोशिका / सूक्ष्मजीव एन्जाइम को विभिन्न रसायनों द्वारा विपाशित (entrapped) कर दिया जाए तथा उसका उपयोग द्वितीयक मेटाबोलाइट्स उत्पन्न करने के लिए किया जाए । इस प्रकार की प्रक्रिया द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन में अत्यधिक उपयोगी है । निश्चलीकरण की प्रक्रिया के बारे में पढने से पहले हमें यह जानकारी होनी चाहिए कि निश्चलीकृत (immobilized) और विपाशित कोशिकाओं में क्या अन्तर है । निश्चलीकृत से तात्पर्य किसी कोशिका को निश्चल या अचल कर देना अर्थात् उनकी गति स्थगित कर देना है । इस प्रकार की प्रक्रिया में उसे विपाशित (entrapped) भी किया जा सकता है और किसी सहायक पदार्थ (support material) पर अधिशोषित (absorb) भी किया जा सकता है । इस प्रकार के विपाशन (entrapment) से कोशिका को आघात (shock) से बचाया जा सकता है । इस प्रकार कोशिका को लम्बे समय तक इस्तेमाल किया जा सकता है तथा वाणिज्यिक रुप से (commercialy) उपलब्ध कराया जा सकता है । इस प्रक्रिया का मुख्य उद्देश्य अधिकाधिक संख्या

में पूर्ववर्ती का जैव रूपान्तरण बिल्कुल साधारण विधि से महत्वपूर्ण वांछित उत्पाद का उत्पादन करना है । उत्पाद बनकर माध्यम में विमुक्त हो जाता है, जिसे विलगित किया जा सकता है तथा एन्जाइम को पुन: जैव रुपान्तरण में उपयोग किया जा सकता है । यदि हम बाहर से पूर्ववर्ती (precursor) को न डालकर और उत्पाद का संश्लेषण करें तो इस प्रक्रिया को नव संश्लेषण (de novo synthesis) कहते हैं । यह प्रक्रिया सरलता से संचालित की जा सकती है और उत्पाद को लम्बे समय तक उपयोग में लाया जा सकता है । निश्चलीकृत कोशिकाओं का उत्पादन वृहद स्तर (large scale) पर करने से यह कम कीमत (low cost) की होती है । इस प्रकार के कई उदाहरण है जहां निश्चलीकृत कोशिकाओं के द्वारा पूर्ववर्ती से उत्पाद बनाया जाता है (सारणी 12.2) ।

सारणी 12.2 निश्चलीकृत कोशिका द्वारा जैव रुपान्तरण

Cell culture species	Reeaction type	Precursor	Product	Matrix and remarks
Papaver sonmniferum	Reduction	Codeinone	Codeine	Alginate and PUR; in both Cases sterospecific bioconversion, product release
Digilalis lanata	Hydroxylation	β -Methyldigitoxin	β -Methyldigoxin	Alginate; very long bioconversion period (160 d)
Mentha species	Reduction	(-)- Menthone	(+) - Neomenthol	PA AH; stereospecific reduction, product release
Daucus carota	Hydroxylation	Digitixigenin	Periplogenin	alginate; five times reus possible
Mucuna pruriens	Hydroxylation	L-tyrosine	L-DOPA	Alginate, ectinate, agrarose, gelatine; product release

निश्चलीकरण की विधियाँ (Methods of Immobilization)

कोशिका या सूक्ष्मजीवों का विपाशन हम कई प्रकार से कर सकते हैं जैसे आयनिक जाल द्वारा विपाशन (entrapment by ionic network), जेल विपाशन (gel entrapment), बहुलीकीकरण (polymerization) इत्यादि । इस प्रकार के सरल प्रयोग हम प्रयोगशाला में भी संचालित कर सकते हैं । आयनिक जाल (ionic network) बनाने के लिए एल्लीनेट मणिका(alginate beads) की विधि

सबसे अधिक प्रचलित है । एल्लीनेट एक पॉलीसैकेराइड (polysaccharide) है जो Ca^{+2} आयन की उपस्थिति में स्थायी जेल का निर्माण करता है ।

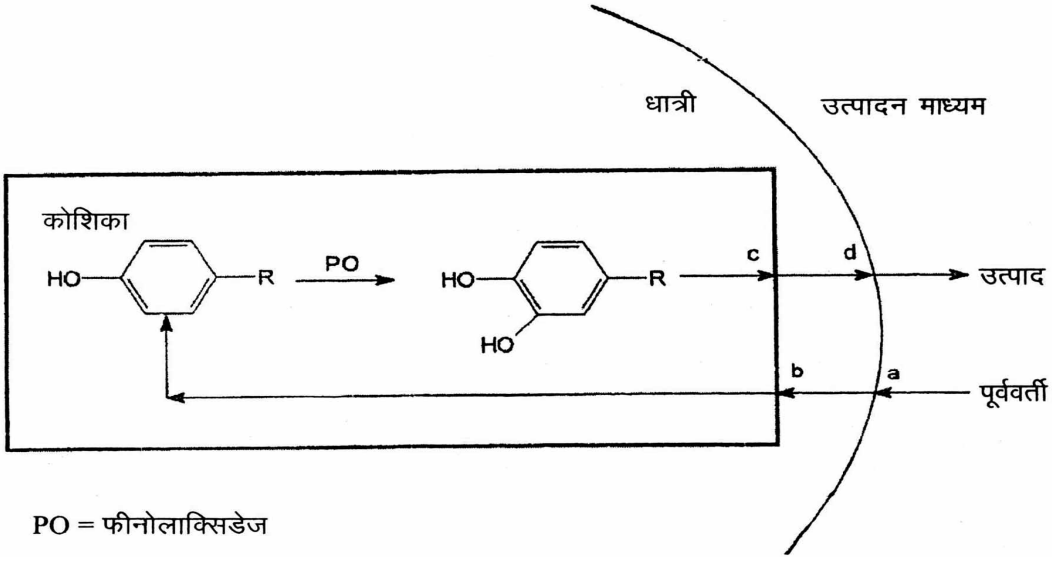
एल्जीनेट मणिका बनाने के लिए सोडियम एल्जीनेट (sodium alginate) के विलयन को कैल्शियम क्लोराइड के साथ मिलाया जाता है उसके बाद हिमशीत जल (ice cold water) में एल्जीनेट मणिका को डाल दिया जाता है । जैल बनाने के लिए गर्म पॉलीसैकेराइड जलीय विलयन (polysaccharide aqueous solution) को ठंडा किया जाता है । इस प्रक्रिया में पॉलीएक्रिलेमाइड (polyacrylamide) का भी उपयोग किया जाता था किन्तु यह पाया गया कि इससे कोशिका की जीवन क्षमता (viability) कम हो जाती है, अत: इसका उपयोग सीमित हो गया है ।

कोशिका विपाशन के लिए आजकल रेशे जैसे कि पॉलीयूरेथेन फोम [polyurethane (PUF)] का भी उपयोग किया जा रहा है । इस प्रकार के रेशों के जाल में कोशिकाओं को विपाशित किया जा सकता है तथा जरूरत पड़ने पर इनका उपयोग किया जा सकता है ।

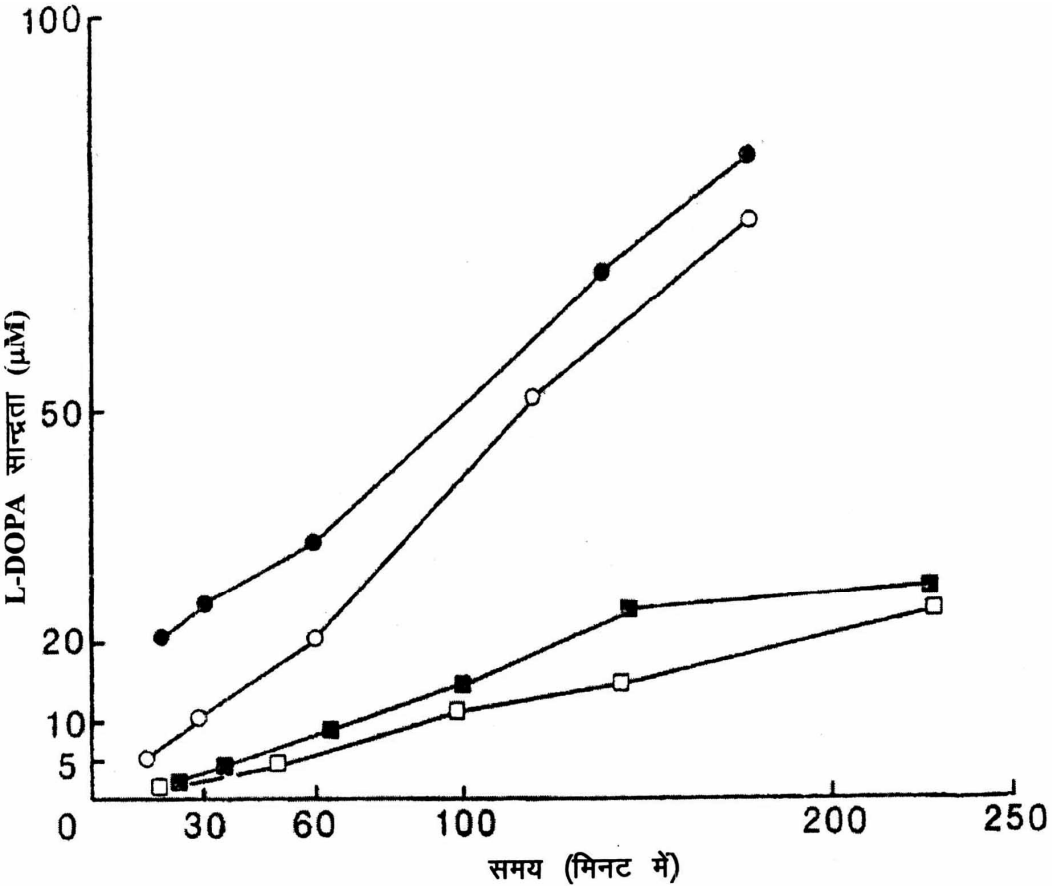
निश्चलीकृत पादप कोशिका द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन

यदि जैव रूपान्तरण स्थिति समान रखें तो मुक्त निलम्बित कोशिकाओं की तुलना में निश्चलीकृत पादप कोशिका में उत्पादन अधिक मात्रा में होता है । विपाशन कोशिका को एक सूक्ष्म वातावरण प्रदान करता है जो विलगित पादप के ऊतक की तरह होता है । निश्चलीकरण प्रक्रिया में प्रयुक्त होने वाले बहुलक के आवेशित समूह उपयुक्त पोषक विभव बनाते है जो द्वितीयक मेटाबोलाइट बनाने के लिए उपयोगी होता है । दूसरा मुख्य कारण यह भी है कि मुक्त निलम्बित कोशिका में द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन स्थिरावस्था में होता है उस अवस्था में वृद्धि रुक चुकी होती है किन्तु विपाशन के द्वारा वृद्धिहीन अवस्था उत्पन्न की जाती है जो द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन को बढ़ा सकें । इसके लिए संकेत अणु (signallary molecules) का भी उपयोग किया जा सकता है जो अंतरकोशिकीय संचार को बढ़ाते हैं । इसके द्वारा उत्पादन की गणना भी (mg/litre/day) में की जाती है । उदाहरणत: Mucuna pruriens की कोशिका को एल्जीनेट विपाशित कर L-tyrosine को L- DOPA में परिवर्तित किया जा सकता है और इस प्रक्रिया से अमीनो अम्ल L-DOPA जो पूर्ववर्ती हैं, का उत्पादन किया जा सकता है (चित्र 12.3) । यह प्रक्रिया मुक्त निलम्बित कोशिका के द्वारा सम्पन्न नहीं की जा सकती । बहुत से पूर्ववर्त्तियो को इस प्रक्रिया द्वारा उत्पादित किया जा रहा है (चित्र 12.4) ।

द्वितीयक मेटाबोलाइटों के वृहद् स्तर पर उत्पादन हेतु उपयोग में लाई जाने वाली जैव रियेक्टर विधियाँ अत्यधिक उत्कृष्ट परिणाम दे रही है । जैव रियेक्टर की सामान्य कार्यप्रणाली तथा इनसे द्वितीयक मेटाबोलाइटों के उत्पादन की संक्षिप्त विधि उक्त परिशिष्ट में दी गई है । जैव रियेक्टर वास्तव में सूक्ष्म जैवप्रौद्योगिकी की परिसीमा में आने वाला विषय है, इसके विस्तृत उपयोगों के विषय में आप अन्य इकाइयों में अध्ययन कर चुके है ।



12.3 Mucuna prurients की कोशिका एलजीनेट धात्री में पूर्ववर्ती को उत्पाद में बदलती हुई ।



चित्र 12.4 : विभिन्न निश्चलीकरण माध्यमों (• एल्जीनेट, ❍ पेक्टीनेट, ▪ एगेरोज एवं □ जिलेटिन) में Mucuna prurients कोशिकाओं द्वारा L- DOPA का उत्पादन

कई प्रकार की विपाशन प्रक्रियाओं के द्वारा जैव संश्लेषण क्षमता बढ़ाने का प्रयास किया गया है जिसमें सफलता भी मिली है । किन्तु कई रसायन जो पारगामी कारक की तरह प्रयुक्त होते हैं, विषाक्त होते हैं तथा निश्चलीकृत कोशिका की जीवन क्षमता को कम व एन्जाइम क्रियाशीलता को अवरुद्ध कर देते हैं । वैसे यह प्रक्रिया जैव रुपान्तरण के द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट बनाने के लिए उपयोगी है जिसे लम्बे समय तक उपयोग में लिया जा सकता है । किन्तु निश्चलीकरण का पादप कोशिका पर प्रभाव अनिश्चित होता है । इस प्रक्रिया की अपनी सीमाएं हैं जैसे पूर्ववर्ती उत्पाद और आवश्यक घटकों का स्थानान्तरण । इस प्रक्रिया की गतिकी का अध्ययन बहुत आवश्यक है । विभिन्न माध्यम जैसे एल्जीनेट, पेक्टीनेट, एगेरोज औरा जिलेटिन के द्वारा विपाशन और जैव रुपान्तरण दर अलग-अलग होती है । इन्हीं प्रक्रियाओं में हम अग्रसर हों तो अगला चरण एन्जाइम विरचन आता है । अब तक हमने पढ़ा कि किस प्रकार पूर्ववर्ती डाल कर उत्पादन संभव है । इसके आगे हमने उस कोशिका को विपाशित किया और उत्पादन थोड़ा और बढ़ाया । इसी श्रृंखला में हम आखिरी उत्पाद बनाने में प्रयुक्त एन्जाइम को विलगित कर उसे स्थिर करके पूर्ववर्ती डालते हैं और इच्छानुसार द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न करते हैं । इस प्रक्रिया को उत्पादन बढ़ाने के लिए उपयोग में लाया जा सकता है ।

एन्जाइम विरचन (Enzyme Preparation)

अब तक की प्रक्रियाओं के द्वारा उत्पादन एक आकस्मिक क्रिया है । इसमें समस्त सम्भावित उत्पादों का एक जटिल मिश्रण बनता है । इसलिए एन्जाइम विरचन एक ऐसी प्रक्रिया है जो जैव रुपान्तरण की क्रिया को पूर्ण करने में सक्षम है ।

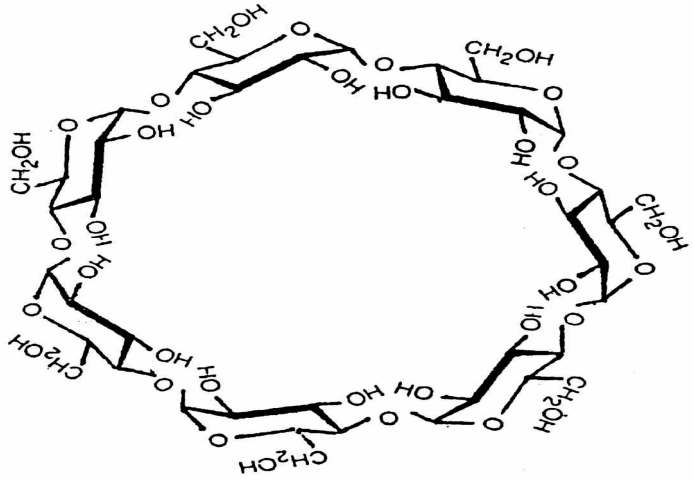
एन्जाइम विरचन के लिए पादप कोशिका का समांगीकरण किया जाता है । यह क्रिया शीत अवस्था में की जाती है ताकि एन्जाइम नष्ट न हों और न ही उनका विघटन हो । इसको और अधिक शुद्ध करने के लिए अमोनियम सल्फेट [$(NH_4)SO_4$] में अवक्षेपित किया जाता है । इसके उपरान्त इनका कॉलम क्रोमेटोग्राफी (column chromatography) द्वारा शुद्धिकरण किया जाता है और अंत में अभिलक्षणन (characterization) कर उस एन्जाइम को विलगित किया जाता है जो उत्पादन के लिए आवश्यक है । इन विलगित एन्जाइमों को फिर अधिशोषित या विपाशित किया जाता है । विरचित एन्जाइम को हम द्वितीयक मेटाबोलाइट बनाने के लिए उपयोग में ला सकते हैं । इस प्रक्रिया में सहसंयोजक बंधों (covalent bods) का निर्माण होता है । ये सहसंयोजक बंध एन्जाइम अणु तथा आधार पदार्थ, सीफाडेक्स (sephadex) के बीच बनते हैं । यह आधार पदार्थ जल में अघुलनशील होता है । यह एन्जाइम जैल में विपाशित किये जा सकते हैं । इससे भी सरल तरीके से यदि हम एन्जाइम को विपाशित या निश्चलीकृत करना चाहते हैं तो उसका सूक्ष्म संपुटन (micro encapsulation) करना चाहिए । इसके लिए एन्जाइम के विलयन को एक बहुलक आवरण चढ़ाकर सूक्ष्म गोलक (microspheres) का निर्माण किया जाता है जैसे - सेलूलोज नाइट्रेट या जिलेटिन बहुलक ।

विलगित पादप एन्जाइम द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन

इस प्रकार के विलगित पादप एन्जाइम (isolated plant enzyme) अभी कम हैं, इन पर शोध कार्य हो रहा है । इनके लिए उत्प्रेरक एकल चरण अभिक्रिया होती है । उदाहरणत: सदाबहार (Catharanthus roseus) के निलंबित संवर्ध विलगित एन्जाइम स्टक्टोसाइडिन सिन्थेज (stuctosidine synthase), इण्डोल क्षारक के बनने में अहम् भूमिका निभाता है । यह एन्जाइम बहुत महत्वपूर्ण है अत: इसका

निर्माण ट्राइटेमिक (trytamic) नामक अमीनोअम्ल व सेकेलोजेनिन (secologanin) के त्रिविम विशिष्ट संघनन के द्वारा किया जाता है जिसे सिफाडेक्स (sephadex) पर अधिशोषित किया जाता है । यह प्रक्रिया निश्चलीकरण तो है किन्तु इसे विपाशन नहीं कहेंगे । इस प्रकार इस एन्जाइम से mkat/kg के रुप में दर्शाया गया है जिसका अर्थ 1mmol/kg होता है । इस प्रकार राह निष्कर्ष निकाला जा सकता है कि एन्जाइम विरचन एक बहुत अच्छे जैव उत्प्रेरक तंत्र (biocatalytic system) की तरह कार्य कर उच्च शुद्धता (high purity) का महत्वपूर्ण यौगिक उत्पादित कर सकते हैं । इसमें सबसे बड़ी बाधा उस एन्जाइम के शुद्ध विलगन में आती है तथा एक बार विलगित होने के बाद उसको स्थायित्व में भी कुछ जटिलता उत्पन्न होती है । किन्तु इन सब के बावजूद यह प्रक्रिया बहुत अच्छी है तथा इससे उत्पादन बढ़ाया जा सकता है ।

इस प्रकार हमने विभिन्न तरीके पढ़े जिससे कोशिका को निश्चलीकृत किया जा सकता है जिनकी अपनी उपलब्धियां व सीमाएं है । यह सब करके हमे यह भी ज्ञात होना चाहिए कि एक निश्चलीकृत तंत्र की गतिकी क्या होनी चाहिए । यदि सीधे शब्दों में समझना चाहें तो तात्पर्य है कि उस क्रिया की गति कैसी होगी । यह क्रिया किन परिस्थितियों पर निर्भर करेगी तथा अधिकतम उत्पादन को सहयोग करने वाले कारक कौन से होंगे । इसके लिए हम उदाहरण के रुप में Mucuna pruriens की विपाशित कोशिका को लेंगे । इस प्रक्रिया में हम विभिन्न कोशिकाओं को विभिन्न रुप से विपाशित करके और प्रयोग द्वारा देखेंगे कि किसमें अधिकतम उत्पाद बनता है वहीं प्रक्रिया सबसे उत्तम गतिकी लिए होगी। उपरोक्त निश्चलीकरण प्रक्रिया में हमने मुख्यत: उन्हीं उत्पादों के बारे में पढ़ा जिनके जल में घुलनशील पूर्ववर्ती थे किन्तु कुछ ऐसे भी पूर्ववर्ती होते हैं जो जल में अघुलनशील है, ऐसे उत्पादों को कार्बनिक विलायकों (organic solvents) में घोलकर प्रक्रिया को बढाया जा सकता है । इन सब से हम जैव रुपान्तरण की गति तो बढ़ा सकते हैं किन्तु इस प्रकार से प्रयुक्त कार्बनिक विलायक विषाक्त (toxic) होते हैं जो इनकी उपयोगिता को सीमित कर देते हैं । क्योंकि ये विषाक्त विलायक कोशिका के विभिन्न अंगकों को मार देंगे, परिणामस्वरूप क्रिया रुक जायेगी ।



चित्र 12.6 : $\beta - cyclodexrin$ की रासायनिक संरचना

आजकल साइक्लोडेक्स्ट्रिक (cyclodextric) नामक यौगिक का उपयोग किया जा रहा है जो चक्रीय आलीगोसेक्राइड (oligosaccharide) है । इसमें विभिन्न ग्लूकोज इकाइयाँ आपस में α -1,4

ग्लाइकोसाइडिक बंध का निर्माण करती हैं । यह एक ऐसा चक्र बनाते हैं जिसमें हाइड्रॉक्सिल समूह C_6 पर बाहर की तरफ होते हैं तथा इसे जलस्नेही बनाते हैं और केन्द्रीय गुहा जलविरागी होती है । इस प्रकार ये मधुकारकों, पादप सत्, तेल आदि (sweetners, plant extracts, oils) के साथ भी बंध बनाता है ।

पादप कोशिका द्वारा बहुत कम मात्रा में एन्जाइम बनते हैं अत: उनकी जैव रूपान्तरण दर ओर कम हो जाती है । निश्चलीकरण की प्रक्रिया में कोई भी कोशिका जैसे पादप कोशिका या जीवाणु कोशिका, जो कि वाणज्यिक उत्पाद को उत्पादित करने के लिए उपयोग में लायी जाती है, को विभिन्न रसायनों के द्वारा विपाषित करते है ।

यह क्रिया इन कोशिकाओं के परिरक्षण में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाती है ।

बोध प्रश्न

6. निश्चलीकृत विधि द्वारा कोशिका को ..... किया जाता है ।
   - अ) विपाशित
   - ब) गतिमान
   - स) अ और ब
   - द) कोई नहीं

7. विपाशन के लिए रसायन.....काम में लेते है ।
   - अ) एल्जीनेट
   - ब) अगरोस
   - स) पेक्टिन
   - द) उपरोक्त सभी

8. निश्चलीकरण द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन.....है ।
   - अ) बढ़ता है
   - ब) घटता है
   - स) कोई असर नहीं
   - द) उपरोक्त में कोई नहीं

9. साइक्लोडेस्ट्रिन (cyclodextrin)..... है -
   - अ) चक्रीय टरपीनाइट
   - ब) चक्रीय एल्केलाइड
   - स) चक्रीय ओलिगोसेकेराइड
   - द) कोई भी नहीं

10. वाहक सम्बन्धित है -
   - (अ) पुनर्संयुक्त डी.एन.ए. तकनीक से
   - ब) एच.पी.एल.सी.
   - स) एगेरोज जेल इलैक्ट्रोफोरेसिस
   - द) टी.एल.सी

पुनर्संयुक्त डी.एन.ए. तकनीक (Recombinant DNA Technology) में वाहक का उपयोग कर जननद्रव्य (genetic material) का स्थानान्तरण करते हैं । यह वाहक या प्लाज्मिड वृत्ताकार डी.एन.ए. होता है । आजकल विभिन्न प्रकार के वाहक बाजार में उपलब्ध है । लाइगेज एन्जाइम के द्वारा चयनित वाहक को क्लोन किया जाता है । इस प्रक्रिया को जीवाणु प्रमोटर में सम्पन्न किया जाता है ।

पुनर्संयुक्त डी.एन.ए. तकनीक (recombinant DNA) के द्वारा एक वाहक में वांछित जीन के साथ मार्कर जीन (किसी प्रतिजैविक के लिए) को भी निवेशित किया जाता है जिस की सहायता से उस निवह (colony) को विलगित किया जा सकता है । इस प्रकार वांछित निवह (desired colony) को अंतःपात्रे माध्यम में डालकर उत्पाद की अधिकेतम मात्रा प्राप्त की जा सकती है (सारणी 12.3) । इस प्रकार वांछित जीन की अनेक प्रतिलिपि प्राप्त होती है जो वांछित एन्जाइम का उत्पादन बढ़ाने में सक्षम होती हैं । यीस्ट (yeast) बहुत सस्ते सूक्ष्मजीव होते हैं जिन्हें सरलता से वृहद स्तर पर उत्पादित कर सकते हैं । यीस्ट की प्रजाति saccharomyees cerevisiae को अधिकतम उपयोग में लिया जाता है । यीस्ट में जीवाणु की तुलना में अधिक उत्पादन क्षमता होती है तथा उत्पन्न ग्लाइकोसाइलेट एन्जाइम सक्रिय अवस्था में होते हैं । उदाहरणतः 2 Tyrosine/DOPA ।

सारणी 12.3 : पादप एन्जाइम के कुछ उदाहरण जिनमें सूक्ष्मजीवों के द्वारा जैव रुपान्तरण होता है।

Enzyme	Host cell	Remaks
Strictosidine synthase	E. coli bacterium	Enzyme production proven by immunodetction
	S. frugiperda insect cells	Highly active enzyme released into the mediu, easily isolated
Berbenine bridge enzyme	S. cerevise yeast cells	Active enzyme released into the medium
	S. cerevisiae yeast cells	Highly active enzyme released into the medium, easily isolated
Tyrosine/ DOPA decarboxylases	S. frugiperda insect cells	Two decarboxylases with comparable specificity
Pheylalanne ammonia lyase	E. coli bacterium	Two encoding genes in the plant, one expressed
	S. cerevisiae yeast cells	Two encoding enes in the plant, one expressed
	S. frugiperda insect cells	Actieve enzyme produced
Hyoscyamine 6 β -hydroxylse	E. coli bacterium	Enzyme isolaton very difficult, bioconversion by the transgenic bacterium

12.4 आनुवंशिक रुपान्तरण से द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन (Production of Seondary Metabolite by Genetic Transformation):

पिछले कुछ वर्षों में जैव संश्लेषण पथ (biosynthetic pathway) में अत्यधिक शोध हुआ जिससे आण्विक जीव विज्ञों और जैव रसायनविज्ञों ने पादप के विभिन्न जटिल द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन आनुवंशिक रुपान्तरण के द्वारा संभव किया । प्राकृतिक यौगिकों के प्रमुख समूह फेनिल प्रोपेनॉयड्स आइसोप्रिनॉयड्स और एल्केलॉयड्स आदि के विभिन्न जटिल संश्लेषण पथ का अध्ययन किया जा रहा है । इस प्रकार के विभिन्न द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का उत्पादन इस तकनीक द्वारा किया जा रहा है ।

द्वितीयक मेटाबोलाइट का आनुवंशिक रुपान्तरण

आनुवंशिक रुपान्तरण के लिए मुख्य दो आवश्यकताऐ होती है -

a) वांछित जीन को प्राप्त करना ।

b) और ऐसा संतोषजनक तंत्र जो जीन का स्थानान्तरण लक्षित पादप प्रजाति में सफलता से कर सकें। इस प्रकार यदि वांछित जीन की पहचान करना चाहें तो हमें सर्वप्रथम उस पथ का ज्ञान होना आवश्यक है जिससे यह ज्ञात हो कि किस रासायनिक यौगिक के द्वारा इस द्वितीयक मेटाबोलाइट का निर्माण होता है और इसमें कौन-कौन से एन्जाइम शामिल है । एक बार यदि हमें ज्ञात हो गया कि अमुक एन्जाइम द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न कर रहा है तो उसके उत्पादन के लिए mRNA द्वारा उस DNA अनुक्रम या जीन का अनुमान लगाया जाता है जो यह क्रिया नियमित कर रहा है । उस वांछित जीन को वाहक की सहायता से मार्कर जीन के साथ समाहित किया जाता है तथा माध्यम में बने एन्जाइम को देखा जाता है कि यह वहीं एन्जाइम है जो उस पथ में वांछित था ।

कुछ प्रयोगों में इस तरह वांछित जीन स्थानान्तरित किए गये है जिन पर शोध तीव्र ग्रति से चल रहा है, जैसे Nicotiana rustica रूपान्तरित पूल संवर्ध में Saccharomyces ceevisiae कूट द्वारा ornithine decarboxylase को समाहित किया गया है जिससे अंतःपात्रे pulrescine का उत्पादन संभव हुआ जो इससे उत्पादित nicotine alaloids का निर्माण करते हैं ।

एग्रोबैक्टीरियम के द्वारा आनुवंशिक रुपान्तरण (Agrobacterium Medicated Genetic Transformation)

इस प्रकार की प्रक्रिया में एग्रोबैक्टीरियम को उपयोग मे लेकर वांछित जीन को विभिन्न अंतःपात्रे संवर्ध में स्थानान्तरित किया जाता है जिससे द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन बढ़ाया जाता है ।

12.5 आनुवंशिक रुपान्तरण की सीमाऐं (Limitation of Genetic Transformation) :

जैसा कि हमें ज्ञात है द्वितीयक मेटाबोलाइट पूर्ण पादप में उत्पन्न न होकर एक सीमित भाग में संश्लेषित होते हैं । इनका उत्पादन विशिष्ट कोशिका में होता है । द्वितीयक मेटाबोलाइट का जैव संश्लेषण करने वाली कोशिका बिल्कुल अलग होती है । अनेक प्रयोगों द्वारा ज्ञात हुआ है कि अविभेदित कोशिका संवर्ध में द्वितीयक मेटाबोलाइट के उत्पादन की क्षमता नगण्य या नहीं के समान होती है किन्तु इन संवर्धों

में कोशिका विभेदन जैसे अंगोद्भवन या कायिक भ्रूणोद्भवन (somatic embryogenesis) के माध्यम से उत्पादन को बढ़ाया जा सकता है । इसका अभिप्राय है कि यदि प्रकृति में किसी द्वितीयक मेटाबोलाइट का निर्माण जड़ में हो रहा है तो कैलस में अंग विभेदन द्वारा मूल संवर्ध बनाकर उस वांछित द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन किया जा सकता है । इस प्रकार के अंग संवर्ध की निरन्तरता रखना कठिन होता है क्योंकि ये काफी कोमल व संवेदनशील होते हैं इसलिए इस प्रक्रिया द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन काफी सीमित है ।

इस से तात्पर्य है कि आनुवंशिक रुपान्तरण कर किस संवर्ध को बाह्य किया जाए कि उससे अंगोत्पत्ति हो । Agrobacterium rhizogenes से रोमिल मूलों (hairy roots) का निर्माण इसका सुगम उदाहरण है । इस प्रक्रिया द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का अधिकतम उत्पादन संभव है । क्योंकि हमें ज्ञात है कि कई द्वितीयक मेटाबोलाइटसू प्रकृति में जडों में उत्पन्न होते हैं और यदि in vitro यदि मूल कआ निर्माण क्या जाए तो उसमें अधिकतम द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादित होगा। इस प्रकार के संवर्ध लम्बे समय तक रखे जा सकते है (सारणी 124) ।

सारणी 12.4 : रोमिल संवर्ध द्वारा द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन

Plant Species	Agrobacterium strain / Ri plasmid	Type of Culture	Specific Metabolites	References
Artensisia Absinthium	LBA 9402	Hairy root	Volatile oils	Kennedy et al, 1993 Nin et al., 1995
Artenisia Annua	LBA 9402	Hairy root	Artemisinin	Jaziri el at 1997 Paniego and Giuletti, 1996 Smit et al., 1997 Chen et al., 1998
Atropa belladonna	15834, A4, 8196	Hairy root	Tropane alkaloids, Hyoscyamine	Kamada et al., 1986
Amsonia elliplica	A4	Hairy root	Indole alkaloid	Sauerwein et al.,1991
Azuga replans	A. rhizongenues MaFF 03-01724	Hairy root/Regenerants	20- hydroxyec-dysone	Tanaka and Matsumoto, 1993
Beta vulgaris	LBA 9402	Hairy root	Betalin pigmens	Hamill et al., 1986
Catharanthus Roseus	LBA 9402	Hairy root	Indole alkaloids	Parr et at., 1988
Cinchona Ledgeriana	LBA 9402	Hairy root	Quinoline alkaloids	Hamil et al., 1989
Colues forskohlii	MaFF 03-01724	Hairy root	Forskolin	Sasaki el at., 1998

Datura sp.	15834, A4 8196 LBA 9402	Hairy root	Tropane alkaloid	Christen et atl., 1989 Payne et al., 1992
Digitnlis purpuren	A4, 15834	Hairy root	Cardenolides	Saito et al 1992
Duboisia Myporoides	HRI	Hairy root	Tropane alkaloid	Deno et al., 1987
Hyoscyamus sp.	A4, LBA 9402	Hairy root	7- β - hydroxy-hyoscyamine	Jaziri et at., 1988
Lippia dulics	A4	Hairy root	Hernanduclin	Payne et al.,1987 Sauerwein etal., 1991
Nicotiana tobacum	A4, LBA 9402, 15834, 8196	Hairy root	Nicotine alkaloids	Hail et al., 1986; Saito et at., 1989
Pana ginseng	A4,16834	Hairy root	Ginsenoside Saponins, saponins	Inomata etal., 1993 Yoshikawa and Furuya, 1987
Rubia tinctorum	15834	Hairy root	Anthraquinones	Saito etal., 1991
Solanum aviculare	15834,LBA 9402	Hairy roots	Sterodial alkaloids	Subroto and Doran, 1994
Solanum tubersum	15834	Hairy root	Steroidal alkaloids	Saito et al., 1989
Vinca minor	15834,A4	Multiple shoot Derived from Hairy root	Vincamine	Tanak et al., 1995
Withania sonmiffera A4		Hairy root	Withanolides	Ray et al., 1996

अंग संवर्धन का महत्त्व कोशिका निलम्बन से अधिक है क्योंकि इस प्रकार जीन का रुपान्तरण कर द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पन्न किए जा सकते हैं तथा लम्बे समय तक संवर्ध की आनुवंशिक और जैव रासायनिक स्थिरता को बनाये रखा जा सकता है । इस प्रकार के मूल संवर्धन उत्पन्न करने के लिए Agrobacterium rhizogenes से संक्रमित करते हैं । यह मृदा जीवाणु है । जिसके द्वारा प्राकृतिक आनुवंशिक रुपान्तरण संभव है ।

बोध प्रश्न

11. ऐसे मुख्य कारक जो पुनर्सयोजन के लिए आवश्यक हैं -
    - अ) वांछित जीन का निवेशन
    - ब) जीन का लक्षित प्रजाति तक पहुँचना
    - स) अ व ब दोनों

द) उपरोक्त कोई नहीं

12. आनुवंशिक रुपान्तरण (genetic transformation) की सीमाएं है -

अ) एन्जाइम की कम जानकारी

ब) कोशिका की सीमित आतरिक जानकारी

स) अ व ब दोनों

द) कोई नहीं

13. किस बैक्टीरिया द्वारा प्राकृतिक आनुवंशिक रुपान्तरण संभव है

अ) राइजोजीन

ब) ऐग्रोबैक्टीरियम ट्यूनिफेसीएस

स) अ व ब दोनों

द) कोई नहीं

14. वाहक में गुण होने चाहिए -

अ) प्लाज्मिड चयन

ब) प्लाज्मिड प्रतिलिपिकरण

स) टी.डी.एन.ए. क्षेत्र

द) उपरोक्त सभी

कई बार ये रुपान्तरित मूल (transformed root) सम्पूर्ण पादप में परिवर्तित हो जाती है और द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन बढ़ा देती है । आजकल शोध में रोमिल मूल संवर्ध (hairy root culture) पर काफी जोर दिया जा रहा है । किन्तु इसकी भी अपनी सीमाएं है ये संवर्ध (culture) वही द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादित करते हैं जो जड़ में उत्पन्न होते हैं । इसी प्रकार यदि Ti प्लाज्मिड से संक्रमित किया जाए तो कैलस एक (हल) में परिवर्तित हो जाते हैं । वृद्धि नियामक में आक्सिन की सहायता से कैलस संवर्धन में shooting की जाती है । तम्बाकू (Nicotiona tabacum) में निकोटिन का उत्पादन जैव रुपान्तरण के द्वारा करने के लिए कैलस को प्ररोह संवर्धन में परिवर्तित एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमीफेसीयिन्स (Agrobacterium tumifaciens) के ऑक्सिन लोकस पर उत्परिवर्तन कर संक्रमित करते हैं ।

12.6 सारांश (Summary) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद हमने जाना कि द्वितीयक पादप मेटाबोलाइटों के वृहद् उत्पादन हेतु जैव रुपान्तरण एक प्रभावशाली तकनीक है । कोशिका निश्चलन के द्वारा भी द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उत्पादन बढ़ाया जा सकता है । निश्चलीकृत पादप कोशिका में, सामान्य कोशिका की तुलना में द्वितीयक पादप मेटाबोलाइटों का उत्पादन होता है । द्वितीयक मेटाबोलाइट हेतु उत्तरदायी जीन के दूसरे पादपों में स्थानान्तरण से आनुवंशिक रुपान्तरण द्वारा भी इनके उत्पादन में आशातीत वृद्धि प्राप्त की जा सकती है ।

12.7 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. अ 8. अ

2.	अ	9.	स
3.	सही	10.	अ
4.	द	11.	स
5.	सही	12.	स
6.	अ	13.	स
7.	द	14.	द

12.8 अभ्यासार्थ प्रश्न (Excercie Question) :

1. पूर्ववर्ती क्या है?
2. उत्पाद क्या है?
3. जैव परिवर्तन की परिभाषा दीजिये व द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन में इसकी भूमिका का उल्लेख कीजिये ।
4. जीन रुपान्तरण का पादप द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन के लिए प्रक्रिया का संक्षिप्त विवरण दीजिये।
5. जैव उत्प्रेरक की परिभाषा दीजिये व द्वितीयक मेटाबोलाइट के वृहद् उत्पादन में योगदान का उल्लेख कीजिये ।
6. जैव परिवर्तन के कुछ उदाहरण लिखिये ।
7. जीन रुपान्तरण के उदाहरणों से समझाइये कि कौन-कौन से सूक्ष्मजीव इसमें कार्य करते हैं ?
8. निश्चलीकरण और इसके अनेक तरीकों का विस्तृत विवरण लिखिये ।
9. पुनर्संयुक्त डी.एन.ए. तकनीक क्या है ? द्वितीयक मेटाबोलाइट उत्पादन में इसकी भूमिका का विवरण दीजिये ।
10. कोशिका संवर्धन के माध्यम से द्वितीयक मेटाबोलाइट का वाणिज्यिक उत्पादन उदाहरण सहित समझाइये ।
11. निश्चलीकृत कोशिकाओं की परिभाषा व उनका उपयोग बताइये ।
12. जैव रुपान्तरण के अनुप्रयोग और सीमाएं बताइये ।

12.9 शब्दावली (Glossary) :

1.	जैव परिवर्तन	Bio conversion
2.	द्वितीयक मेटाबोलाइट	Secondary metabolitecs
3.	आनुवांशिक रुपान्तरण	Genetic transformation
4.	निश्चलीकृत कोशिकाएं	Immobilsed cells
5.	जैव रुपान्तरण	Biotransformation
6.	जैव रिएक्टर	Bioreactors
7.	निलम्बित कोशिकाएं	Suspended cells
8.	जैव उत्प्रेरक	Biocatalyst

9.	त्रिविम विशिष्टता	Stereospecificity
10.	प्रक्षेत्र विशिष्टता	Regiospecificity
11.	हाइड्रॉक्सीकरण	Hydroxyation
12.	ऑक्सीकरण	Oxidation
13.	अपचयन	Reduction
14.	आनुवंशिक बदलाव	Genetic manipulation
15.	वाहक	Vector
16.	मार्कर जीन	Market gene

12.10 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. स्ट्रायर, बायोकेमेस्ट्री, फ्रीमान एण्ड कम्पनी, न्यूयार्क ।
2. डोरान हेयरीरूट : कल्वर एण्ड एप्लीकेशन, हाडबुर्ड एकेडेमिक्स न्यूयार्क
3. रामावत एण्ड मेरीलोन बायोटेक्मोलॉजी सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स ऑक्सफोर्ड आई.बी.एच. पब्लि. कम्पनी नई दिल्ली ।
4. बेल तथा चार्ल वुड, सेकेण्डरी प्लान्ट प्रोडक्ट्स, स्प्रिंगर - वरलाग, बर्लिन ।
5. हारबोर्न तथा मेब्री, द फ्लेवनॉइड्स : एडवान्सेज इन रिसर्च, चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
6. हरबर्ट, द बायोस्किथैसिस ऑफ सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
7. टचस्टान, प्रेक्टिस ऑफ थिनलेयर क्रोमेटोग्राफी, जॉनविले एण्ड सन्स, न्यूयॉर्क ।

इकाई 13

द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट्स-IV : औद्योगिक यौगिक (Secondary Plant Metabolites-IV : Industrial Compounds)

13.0 उद्देश्य
13.1 प्रस्तावना
13.2 अर्बुदरोधी यौगिक
13.3 खाद्य योज्यक,
13.4 कीटनाशक
13.5 पारम्परिक चिकित्सा पद्धति के उत्पाद तथा उनका पादप जैव प्रौद्योगिकी में महत्व
13.6 सारांश
13.7 बोध प्रश्नों के उत्तर
13.8 अभ्यासार्थ प्रश्न
13.9 शब्दावली
13.10 संदर्भ ग्रन्थ

13.0 उद्देश्य (Objectives):

पादप द्वारा निर्मित द्वितीयक मेटाबोलाइटो का मानव रोगों की रोकथाम में महत्त्वपूर्ण योगदान है । इनसे विभिन्न अर्बुद तथा विषाणु संक्रमण (Tumor and viral infection) की भी रोकथाम की जा सकती है । ये द्वितीयक मेटाबोलाइट भोजन योजक (food additives) तथा कीटनाशक (insecticides) की तरह भी उपयोग मे आते हैं । कोशिका तंत्र को निश्चलीकृत (immobilized) करके उनका औद्योगिक स्तर पर उत्पादन तथा उपयोग, उस समय जब वातावरण अनुकूल न हो, किया जा सकता है । इस निश्चलीकृत कोशिकातंत्र द्वारा उन रसायनों का उत्पादन भी पात्र में संभव है जो साधारणत: बहुत महंगे होते हैं तथा प्राकृतिक वातावरण में जिनका उत्पादन संभव नहीं है । इस अध्याय के अध्ययन के बाद आप द्वितीयक पादप मेटाबोलाइट के औद्योगिक उत्पादन के बारे में जान जाऐंगे ।

13.1 प्रस्तावना (Introduction) :

पादपों से प्राप्त द्वितीयक मेटाबोलाइटों का विलगन तथा उपयोग बहुत से संक्रामक रोगों के उपचार में पिछले दशक से किया जा रहा है । इन द्वितीयक मेटाबोलाइटो का उपयोग पारम्परिक रुप से भी पादप सत्वों के रुप में होता रहा है । इन्हीं में से कुछ द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उपयोग अर्बुदरोधी, खाद्य योजक और कीटनाशी की तरह होता है । ये अर्बुदरोधी यौगिक किन पादपों में मिलते हैं ? इनकी पृथक्करण तकनीक क्या है? इनके शोध में क्या प्रगति हो रही है? इनकी रासायनिक संरचना क्या

है ? इनके प्रकार व उपयोग क्या है? इन सब प्रश्नों के उत्तर जानने के लिए हम निम्न बिन्दुओं का अध्ययन करेंगे ।

13.2 अर्बुदरोधी यौगिक (Antitumor Compounds) :

पादपों का प्रयोग सदियों से अर्बुद रोगों की रोकथाम में हो रहा है किन्तु 1959 से पादप सत्वों (plant extracts) का उपयोग विभिन्न प्रकार के अर्बुदों की चिकित्सा करने में किया गया है । इसमें उन सत्वों के द्वारा अर्बुद के प्रति विमन्दन सक्रियता को जाँचा गया तथा जैव सक्रिय निर्देशित प्रभाजन (bioactivity guided fractionation) द्वारा अशोधित सत्व (crude extract) से उस सक्रिय जैवअणु (active bimolecule) तक पहुँचा गया जो वास्तव में अर्बुद को नष्ट कर रहा है । अर्बुद बहुत से देशों में प्रमुख मृत्युकारक (major killer) की तरह सामने आ रहा है । यह औद्योगिकीकरण (industrialization) का दुष्परिणाम है जो कैंसर के रुप में फैल रहा है और अगर इसकी रोकथाम न की गई तो यह महामारी की तरह फैल जाएगा और संसार को नष्ट कर सकता है । इसलिए शोधकार्य तीव्र गति से चल रहा है कि किस तरह कैंसर पर विजय प्राप्त की जाए । अब तक बीस से अधिक औषधियों की खोज की जा चुकी है (सारणी 13.1) । ये संश्लेषित और प्राकृतिक दोनों तरह की औषधियाँ है ।

सारणी 13.1 पादप प्रजातियां और उनसे पृथक किए द्वितीयक मेटाबोलाइट जिनकी अर्बुदरोधी सक्रियता स्थापित है ।

Plant species	Compound	Chemical nature
Baccharis Megapotamica	Baccharin	Trichothecine
Brucca antidysenterica	Camptothecine	Quassinoid
Camptotheca acuunimata	Vincreistine, Vinblastine	Alkaloid
Catharauthus roseus	Harringtonine,	Indole alkaloid
Cephalotaxus harringtonia	Homoharringtonine	Alkaloid
Colchicum speciosum	3-dexycolhicine	Alkaloid
Fagara zanthoxyloides	Fagaroin	Alkaloid
Heliotropium indicum	Indine=N-oxide	Alkoliad
Holacantha emoryi	Holacanthone	Quassioid
Maytenus bucehananii, Puttelicka verrucosa	Maytansie	Mayt tansinoside
Ochrosia elliptica	Ellipticine, 9-methoxy-E	Alkaloid
Podophyllum peltatum, P. hexandrum	Podophyllotoxin	Lignans

Taxus brevifolia, T. baccata	Taxol	Diterpene
Thalictrum dasycarpum	Thalicarine	Alkaloid
Triplerygium wilfordii	Tripdiolide, Tryptolide	Diterpene
Withania somnifera	Withanolide-A, Withaferie	Alkaloid

कैंसर क्या होता है ? सीधे-सीधे शब्दों में जब कोशिकाओं का विभाजन अनियंत्रित हो जाता है तो अर्बुद गांठ का रुप ले लेता है । शरीर के जिस हिस्से में यह होता है वह हिस्सा असीमित कोशिका विभाजन कर कैंसर का रुप ले लेता है । इसके विरूद्ध यदि हमें औषधी चाहिए तो उसकी क्रियाविधि का विस्तृत अध्ययन करना होगा । प्राकृतिक या संश्लेषिताओ व निम्नलिखित गुण होने चाहिए -

अर्बुदरोधी (antitumor) यौगिक की रासायनिक संरचना इस प्रकार की होनी चाहिए कि वह यौगिक कोशिका में जाकर न्यूक्लिक अम्ल का एल्कलीकरण कर दे । इससे कोशिका विभाजन रुक जाएगा और अर्बुद नहीं बनेगा । इसके विपरीत यदि कोई ऐसा यौगिक हो जिसमें क्षमता हो कि वो न्यूक्लिक अम्ल का संश्लेषण रोक दें या उसका पूर्ववर्ती नहीं बनने दे, तो यह यौगिक भी अर्बुद रोधी की भांति कार्य करेगा । उदाहरणत: 5-फ़्लोरो यूरेसिल, थाइमेडेट सिन्थेटेज एन्जाइम की सक्रियता को रोक देता है जो न्यूड्क्लक अम्ल का पूर्ववर्ती है ।

कोशिका विभाजन में तर्क तन्तु की महत्त्वपूर्ण भूमिका होती है । कोलचीसिन और विनक्रिसटाइन इन तर्कुओं को नहीं बनने देते हैं और कोशिका विभाजन रुक जाता है । इस प्रकार के यौगिक भी अर्बुदरोधी की तरह उपयोगी है ।

यदि कोई रासायनिक यौगिक उस प्रोटीन के साथ जुड़ जाए जो गुणसूत्री DNA के निर्माण में उपयोगी है, तो भी डी.एन.ए. का निर्माण रुक जाएगा, परिणामस्वरूप वहां अर्बुदकारी वृद्धि रुक जाएगी । उदाहरणत: कुनैन (quinine), इथिडियम ब्रोमाइड या एक्टिनोमाइसिन D इस तरह के यौगिक है जो हिस्टोन, डी.एन.ए. तथा डी.एन.ए. पोलीमरेस के साथ बंधुता रखते हैं । इस प्रकार विभिन्न प्रकार के रसायनों का उपयोग कर हम विभिन्न प्रकार की कैंसरकारी वृद्धि को रोक सकते हैं । इसी प्रकार कुछ रासायनिक यौगिक कोशिक चक्र को भी अवरुद्ध करने की क्षमता रखते हैं । इन यौगिकों को प्रायोगिक प्रमाणों के आधार पर ही अर्बुदरोधी कारक माना जाता है । किसी भी अशोधित पादप सत्व से अन्त: पात्रे परिस्थिति में मानव कैंसर कोशिका वंशक्रम पर परीक्षण किए जाते हैं, कि किस सत्व के द्वारा कोशिका विभाजन अवरुद्ध होता है । फिर उस पादप सत्व को पुन: प्रभाजित (fractionate) करके सक्रिय प्रभाजन का निर्धारण करते हैं । इसमें से सक्रिय यौगिक (active compound) को विलगित कर उसकी कोशिका बिभाजन पर प्रतिक्रिया देखते हैं । यदि सक्रिय यौगिक अंत:पात्रे कोशिका विभाजन रोक देता है, तो यह शोध किया जाता है कि यह यौगिक एल्कलीकरण, तर्क तन्तु अवरोधन या डी.एन.ए. के संश्लेषण में से किस-किस क्रिया को प्रभावित कर कोशिक विभाजन को रोकता है, इसी आधार पर औषधि को कैंसर रोगी को दिया जाता है ।

कुछ अर्बुदरोधी औषधियों के उदाहरण इस प्रकार है -

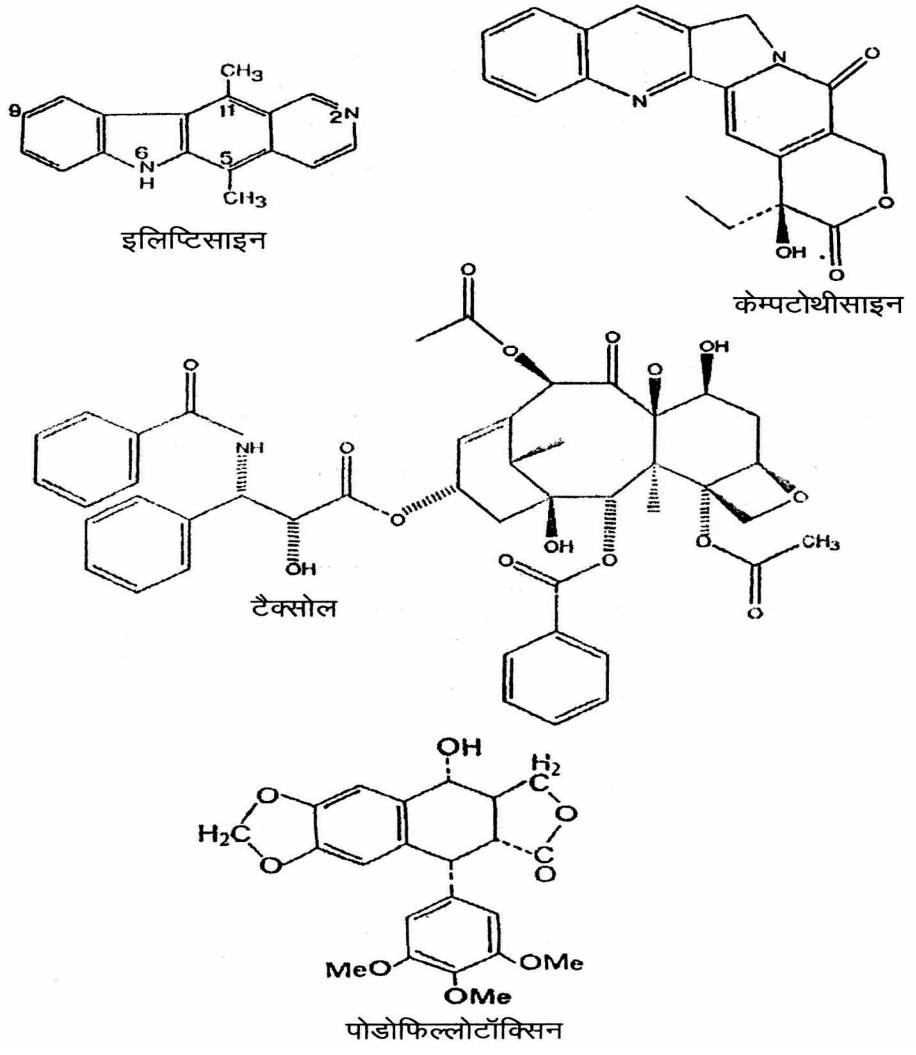
संश्लेषित औषधियां (Synthetic Drugs)

1. फ्लेवेनोएसीटिक अम्ल (Flavoneacetic acid)

2. टेरोक्सीरोन (Teroxirone)
3. फ्लोरोयूरेसिल (Fluorouracil)
4. प्रोकार्बाजीन (Procarbazine)
5. टेमोक्सीफेन (Tamoxifan)

प्राकृतिक औषधियां (Natural Drugs)

1. विनक्रिसटाइन (Vincristine)
2. विनब्लास्टिन (Vinblastine)
3. टेक्सॉल (Taxol)
4. एक्टिनोमाइसिन-डी (Actinomycin-D)
5. एपिपोडोफिलोटॉक्सिन (Epipodophyllotoxin)



चित्र 13.1 : कुछ अर्बुदरोधी द्वितीयक मेटाबोलाइटों की संरचना

उपरोक्त उदाहरणों से ज्ञात होता है कि पादप आधारित कुछ ही रासायनिक यौगिक हैं जो औषधि की भाँति प्रयुक्त होते हैं । अधिकतर औषधियां संश्लेषित उद्भव की है तथा इन संश्लेषित औषधियों के अप्रत्यक्ष प्रभाव (side effect) भी होते हैं । यह कहना भी गलत नहीं होगा कि कैंसर की समूल चिकित्सा आज भी संभव नहीं है इस पर अनवरत शोध कार्य जारी है ।

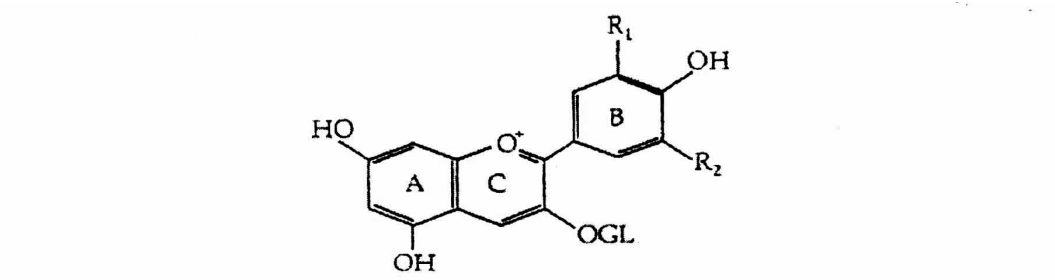
प्राकृतिक उद्भव की कैंसररोधी औषधियों की मांग उत्पादन की अपेक्षा कहीं अधिक है । इनका विलगन तथा शुद्धिकरण अत्यन्त महंगा है । टेक्सॉल तथा पोडोफिलोटॉक्सिन जैसी औषधि के विलगन के लिये पादप वृद्धि की अनेक वर्षों तक प्रतीक्षा करनी पड़ती है । इनमें से कुछ पादप संकटग्रस्त (endanggered) हैं इसलिए इन पादपों से कैंसररोधी औषधियों के उत्पादन से पहले पादपों का सूक्ष्म प्रवर्धन (micropropogation) तथा स्व:स्थाने परिरक्षण (in situ conservation) भी आवश्यक है । ऐसी स्थिति में यह आवश्यक हो जाता है कि अन्य अर्बुदरोधी औषदियों की खोज की जाए । इसके लिए **राष्ट्रीय कैंसर संस्थान, यू.एस.ए. (National Cancer Institute, USA)** में तीव्र गति से पादपों के सक्रिय सत्वों पर विविक्तिकरण का कार्य चल रहा है ताकि आने वाले समय में अधिकाधिक अर्बुदरोधी औषधियाँ उपलब्ध हो सकें (चित्र 13.2)

बोध प्रश्न

1. द्वितीयक मेटाबोलाइट उपयोगी है क्योंकि ये हैं -
   अ) खाद्य योजक ब) अबुर्दरोधी यौगिक
   स) कीटनाशक द) उपरोक्त सभी
2. कैंसर में होता है -
   अ) असीमित कोशिका विभाजन ब) मँद कोशिका विभाजन
   स) अ व ब दोनों द) उपरोक्त में से कोई नहीं
3. Catharanthus roseus में से पृथक किये एल्केलाइड जो अबुर्दरोधी सक्रियता प्रदर्शित करते है -
   अ) विनक्रिसटइन ब) विलबलसिटन
   स) अ व ब दोनों द) कोई भी नही
4. अबुर्दरोधी यौगिक प्राकृतिक व संश्लेषित दोनों प्रकार के हो सकते हैं । सत्य/असत्य
5. Taxus bacata में से पृथक किया अबुर्दरोधी यौगिक है -
   अ) रेक्सॉल ब) बैक्सीलोल
   स) टेक्सॉल द) कोई भी नहीं

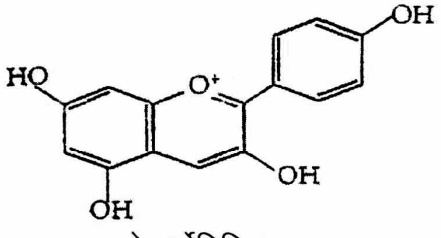
13.3 खाद्य योजक (Food Additives) :

प्राकृतिक खाद्य योजक हमें पादपों से प्राप्त होते है तथा इनका उपयोग भोजन को सुवासित (flavoured) करने के लिए किया जाता है । इन दिनों प्राकृतिक खाद्य योजकों का उपयोग अधिक हो रहा है क्योंकि इनका विषाक्वन स्तर (toxicity level) संश्लेषित उत्पादों से बहुत कम या नगण्य होता है ।

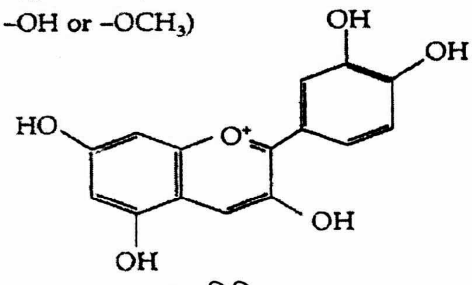


फ्लेविलियम धनायन (मूल संरचना)

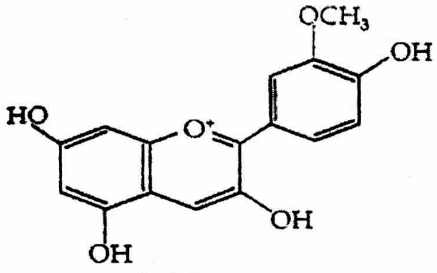
(R_1 and R_2 = –H or –OH or –OCH_3)



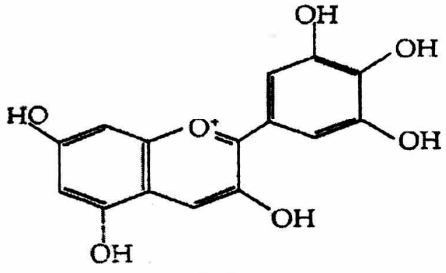
पेलार्गोनिडिन



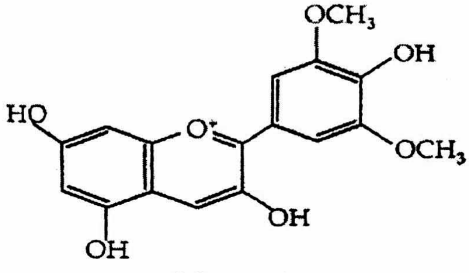
सायनिडिन



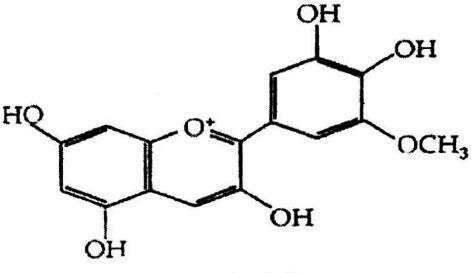
पियोनिडिन



डेल्फिनिडिन



माल्वीडिन



पेटूनिडिन

चित्र 13.2 : विभिन्न एन्थोसाइनिन्स की रासायनिक संरचना

इनकी मांग इतनी ज्यादा बढ़ गई है कि इनकी सतत् तथा नियमित आपूर्ति के लिए जैवप्रौद्योगिकी विधियां (Biotechnological Processes) खोजने होंगे ताकि समय रहते मांग के अनुसार उत्पादन में वृद्धि की जा सके । कुछ उपयोगी खाद्य योजकों का जैव प्रौद्योगिकी प्रक्रिया द्वारा उत्पादन किया भी जा रहा है जैसे, अंगूर (vitis venifera) और गाजर (Daucus carota) से एन्थोसाइनिन (anthocyanin) तथा चुकन्दर (Beta vulgaris) से बीटालिन्स (betalins) का उत्पादन कोशिका संवर्धन (cell culture) से किया जा रहा है । इसी प्रकार लाल मिर्च (capsicum annuum) से

केपसेसिन (capsicin) को भी निश्चलीकृत कोशिक संवर्ध से उत्पादित किया जा रहा है । वनीला (vanilla) का उत्पादन भी इसी प्रकार से किया जा रहा है । द्वितीयक मेटाबोलाइट्स में फीनोलिक यौगिक (phenolic compounds) ऐसे यौगिक है जो रंगीन यौगिकों (coloured compounds) के नाम से जाने जाते हैं । ये तीन प्रकार से खाद्य योजक के रुप में प्रयुक्त होते हैं ।

(i) वर्णक (colouring)

(ii) सुवासक (flavouring)

(iii) मधुरक (seetening)

वर्णी कारक (Colouring Agent)

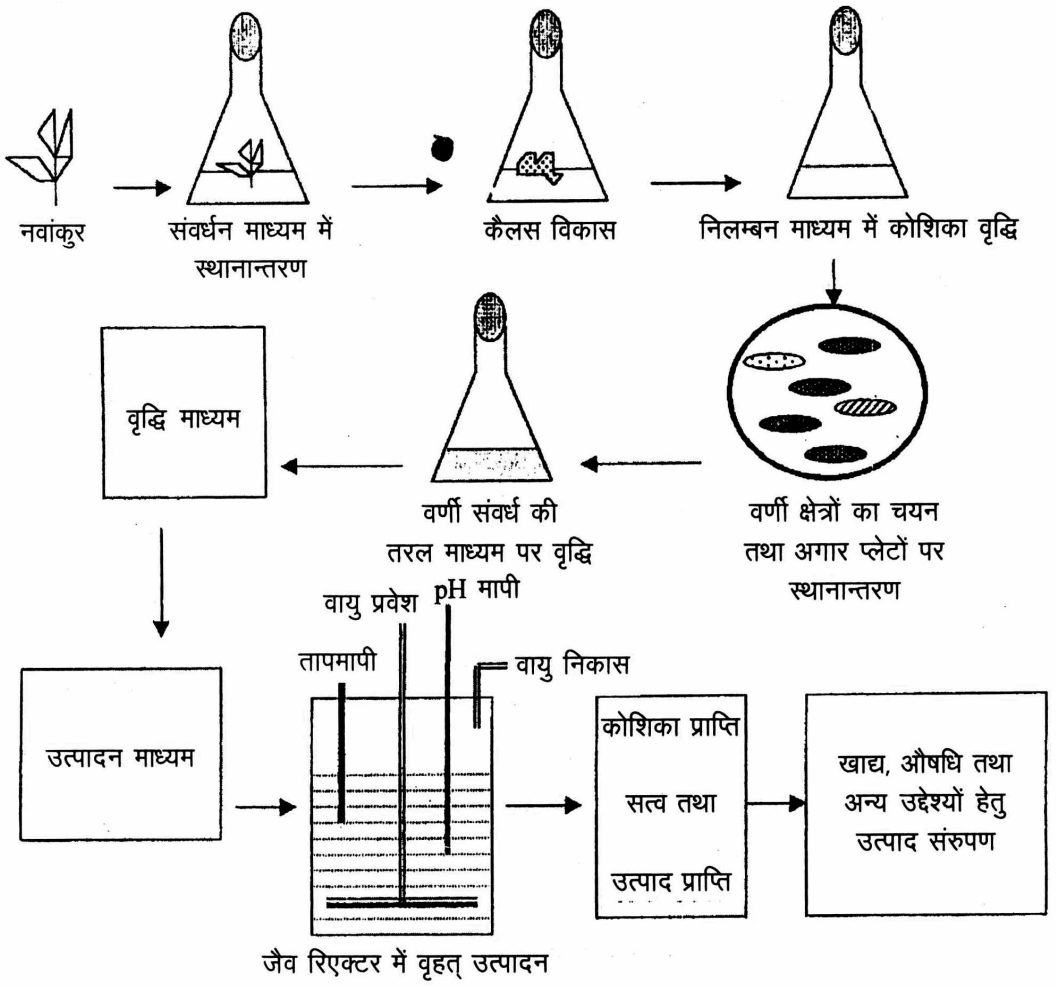
पादपों के पुथ दलों से प्राप्त वर्णक, खाद्य पदार्थों में वर्णीकारक की भांति कार्य करते हैं ।

एन्थोसाइनिन आवृत्तबीजियो के अभिलाक्षणिक वर्णक हैं जो मूल, पर्ण, पुष्पों तथा फलों में मिलते हैं किन्तु पुष्पों में इनकी मात्रा अधिक होती है (चित्र 13.2) । कुछ कुलों जैसे सोलेनेसी, रोजेसी, फेबेसी, क्रुसीफेरी आदि के पुष्पों में एन्थोसाइनिन अधिक मात्रा में मिलते हैं । ये वर्णक प्रकृति में अस्थाई होते हैं । अतः इनकी बहुत कम मात्रा का उत्पादन हो पाता है । एन्थोसाइनिन अम्लीय pH पर स्थाई होते हैं । अगर एन्थोसाइनिन का बहुत अच्छा स्त्रोत है । पादप कोशिका संवर्धन के माध्यम से एन्थोसाइनिन का उत्पादन दस से बीस प्रतिशत तक बढ़ाया जा सकता है ।

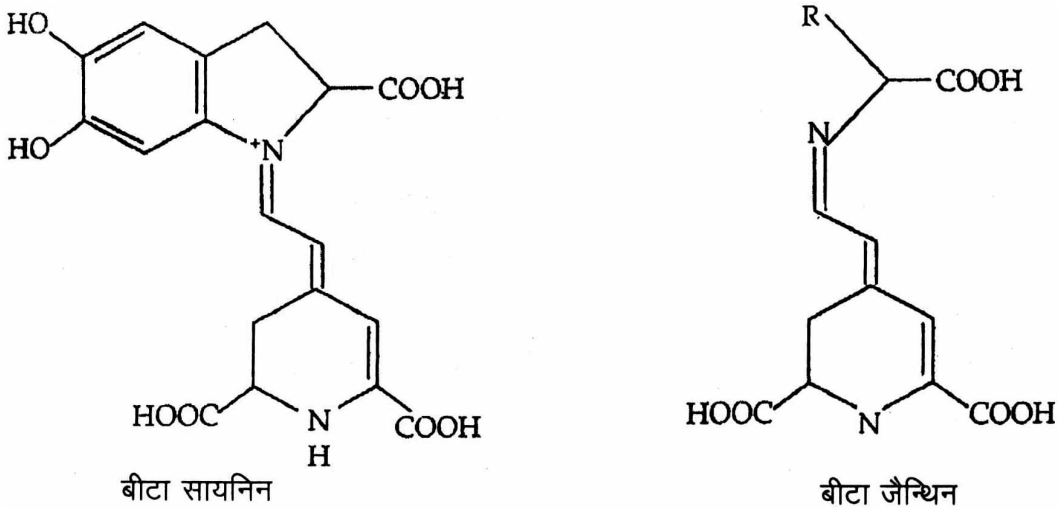
आयनिक बंध के आधार पर एन्थोसाइनिन की आधारभूत संरचनायें फ्लैविलीयम केटाअन (flavylium cation) की बनी होती हैं जिसमें हाइड्राक्सिल समूह की स्थिति के आधार पर विभिन्न वर्णकों की पहचान की जाती है । अगरों के अन्तःपात्रे संवर्धन में यदि सुक्रोस द्वारा परासरणीय तनाव (osmotic stress) उत्पन्न कर दिया जाए तो एन्थोसाइनिन उत्पादन बढ़ जाता है (चित्र 13.3) । पादप हार्मोन भी एन्थोसाइनिन उत्पादन में अहम् भूमिका निभाते हैं । अंगूरों के संवर्धन में 2.4,डी का उपयोग एन्थोसाइनिन के उत्पादन को विमंदित कर देता है तथा इण्डोल एसीटिक अम्ल (indoe acetic acid) का उपयोग उत्पादन पर उद्दीपन प्रभाव डालता है । आधुनिक शोधों से ज्ञात हुआ है कि कवक एलीसिटर्स (fungal elicitors) के उपयोग से उत्पादन 1.25 गुना तक बढ़ जाता है ।

बीटालिनस (Betalins) चीनोपोडीएसी तथा अमरेन्थेसी कुल के अभिलाक्षणिक वर्णक है । फाइटोलैकेसी कुल में बीटाजेन्थिन पाये जाते है जो चमकदार, पीले-नारंगी रंग के होते हैं, साथ ही नीले से लाल रंग के बीटासाइनिन भी पाये जाते हैं (चित्र 13.4) । ये बहुत कम तापमान पर डेयरी तथा माँस जैसे अवशीतित (refrigerated) उत्पादों के लिए प्रयुक्त होते हैं ।

बीटालिन्स के उत्पादन में अन्तःपात्रे रोमिल मूल संवर्ध (hairy root culture) अत्यधिक उपयोगी है । एन्थोसाइनिन की तरह बीटानिन का भी अधिकतम उत्पादन स्थिर अवस्था में होता है । यह वह अवस्था है जब कोशिकायें विभाजन से संतृप्त होकर प्राथमिक मेटाबोलाइट बनाना समाप्त कर देती हैं तथा अभावावस्था (stress condition) में वृद्धि रुक जाती है तथा द्वितीयक मेटाबोलाइट का उत्पादन प्रारम्भ हो जाता है ।



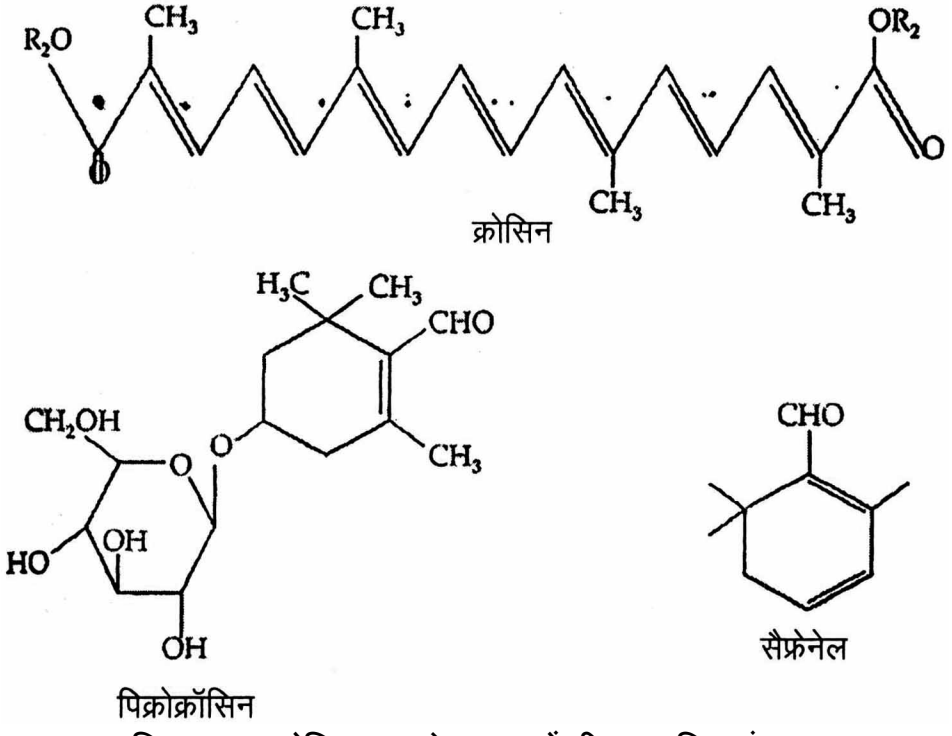
चित्र 13.3 : कोशिका संवर्धन द्वारा पादप एन्थोसाइनिन का उत्पादन



चित्र 13.4 : विभिन्न बीटासाइनिन्स की रसायनिक संरचना

चुकन्दर से बीटालिन्स उत्पादन के लिए एम.एस. माध्यम में चुकन्दर की उच्च उत्पादन किस्म से कर्त्तोतक लेकर, नवांकुर में *एग्रोबैक्टीरियम राइजोजीन्स* (*Agrobacteria rhizogenes*) का संरोपण कर देते हैं । जिससे उत्पादन में 1.5 गुना तक वृद्धि देखी गई है । इस जीवाणु के सरोपण से रोमिल मूल (hairy roots) बनती है जिनमें प्राकृतिक रुप से बीटानिन उत्पन्न होता है ।

क्रॉसिन एक लाल वर्णक (Red pigment) है जो *क्रॉकस सटाइवस* (*Crocus sativus*) अर्थात् केसर में मिलता है । प्राकृतिक रुप से यह वर्तिकाग्र पर उत्पन्न होता है (चित्र 13.5) ।



चित्र 13.5 : क्रोसिन व उसके व्युत्पन्नों की रासायनिक संरचना

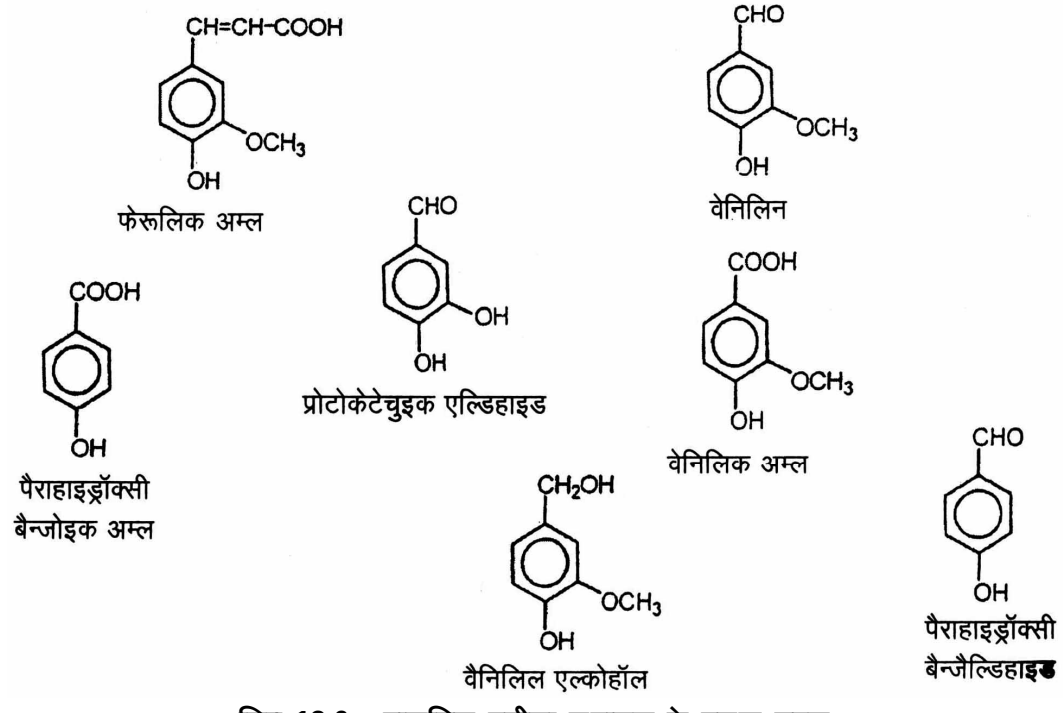
यह एक अत्यधिक कीमती परन्तु कम उत्पादन वाला उत्पाद है इसलिए इसमें मिलावट की संभावना रहती है । इसका उत्पादन भी सीमित भौगोलिक क्षेत्र में होता है । एक किलोग्राम केसर वर्तिकाग्र के लिये लगभग 1,50,000 पुष्पों की आवश्यकता होती है, इसके अन्तःपात्रे उत्पादन हेतु शोधकार्य प्रगति पर है ।

चूँकि केसर का स्त्रोत पुष्प के वर्तिकाग्र का वह भाग है जो रंगीन और सुविकसित है तथा वर्ष में केवल एक बार पुष्पों के खिलने पर प्राप्त होता है अत: इस द्वितीयक मेटाबोलाइट को जैव प्रौद्योगिकी तकनीक से अंतःपात्रे विधि से उत्पन्न किया जाए तो इसके उत्पादन में वृद्धि हो सकती है । यदि एल.एस. (Linsmair and Skoog) माध्यम पर तरुण वर्तिकाग्र और अण्डाशय को संवर्धित करें तो सीधे ही वर्तिकाग्र जैसी संरचना उत्पन्न होती है और इससे मिलने वाला क्रॉसीन लगभग प्राकृतिक क्रॉसीन जैसा ही होता है । अन्तःपात्रे उत्पन्न क्रोसिन को विलगित कर उसका गुणात्मक एवम् मात्रात्मक आकलन किया गया जिसमें यह देखा गया कि इसमें क्रोसिन और पिक्रोसिन की मात्रा प्राकृतिक रुप से उत्पन्न वर्तिकाग्र की तुलना में कम है और सेफ्रेनेल तो नगण्य होता है । वेकन्टरमन ने सुझाव दिया कि यदि

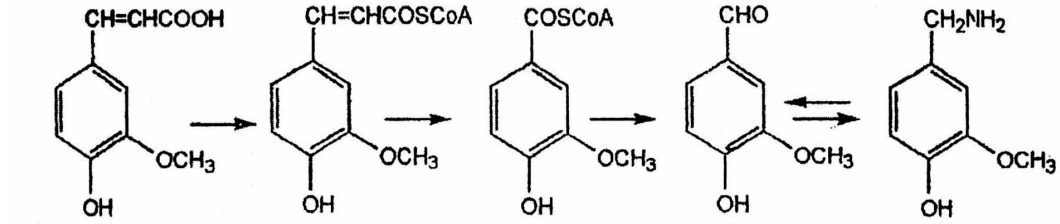
एम.एस. माध्यम को 2,4,डी और काइनेटिन से सम्पूर्ति करके कुछ समय पश्चात् संवर्ध को आई.बी.ए. (IBA) और काइनेटिन वृद्धि नियामक युक्त माध्यम पर स्थानान्तरित करें तो कैलस संवर्ध में लाल वर्णक उत्पन्न होता है जो प्राकृतिक केसर के समान ही है ।

सुवासक (Flavours)

कुछ ऐसे खाद्य योजक हैं जो न सिर्फ भोजन का स्वाद बढ़ाते हैं बल्कि भोजन को विशिष्ट गन्ध प्रदान कर उसे सुवासित भी बनाते हैं । वनीला संगध सार इसका बहुत अच्छा उदाहरण है जो आइसक्रीम् केक आदि को सुवासित करने के लिए प्रयुक्त हो रहा है । इसी प्रकार विभिन्न गन्धक युक्त यौगिक लहसुन या प्याज से उत्पन्न होते है । इस अध्याय में हम वनीला के उत्पादन का विस्तार से अध्ययन करेंगे । प्राकृतिक रुप से यह वनीला पादप (Vanilla planifolia) के शिम्ब से उत्पन्न होता है । खपत के अनुपात में उत्पादन यथेष्ट नहीं होता इसलिए वर्तमान समय में संश्लेषित वनीला से ही आपूर्ति संभव हो पा रही है । जैसा कि सर्वविदित है कि संश्लेषित उत्पाद के अप्रत्यक्ष प्रभाव (side effect) होते हैं अत: जैव प्रौद्योगिकी रुप से अन्तःपात्रीय तंत्र में उत्पन्न वनीला ही ज्यादा उपयुक्त होगा (चित्र 13.6) । सबसे पहले पर्ण तथा स्तम्भ को कर्त्तोतक (explant) के रुप में प्रयोग करते हुए कैलस संवर्ध उत्पन्न किया गया तथा हर्णोनों के विभिन्न संयोजनों का प्रयोग किया गया । काइनेटिन का प्रयोग करने पर कोशिका निलम्ब संवर्ध में वेनिलिक अम्ल का संश्लेषण हुआ । जब पूर्ववर्ती फेरुलिक अम्ल (ferulic acid) को माध्यम में डाला गया तो वनीला के संवर्ध में वनीला का उत्पादन 1.7 गुना तक बढ़ गया । साथ ही यह भी देखा गया कि फेरुलिक अम्ल की अधिक मात्रा वनीला का उत्पादन नहीं बढ़ाती है ।



चित्र 13.6 : प्राकृतिक वनीला सुवासक के प्रमुख घटक



चित्र 13.7 : फैरूलिक अम्ल तथा वैनीलेमाइन से वेनिलिन निर्माण

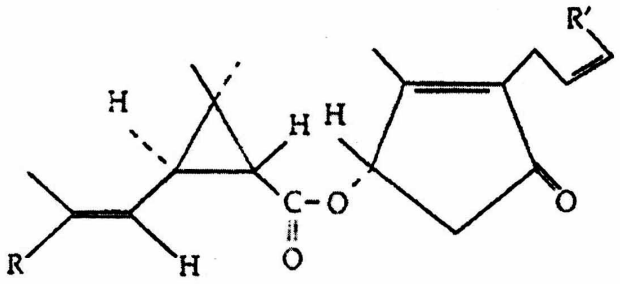
मधुरक (Sweetners)

खाद्य योजकों में मधुरक ऐसे पदार्थ है जो खाद्य उद्योगों (food industry) में मुख्य भूमिका निभाते हैं । ये बहुत उपयोगी संघटक हैं जो भोजन को मधुरता प्रदान करते हैं । पारम्परिक रुप सेशर्करा को ही मधुरक की तरह काम में लिया जाता रहा है किन्तु इसमें ऊर्जा की मात्रा ज्यादा होने के साथ-साथ मधुमेह के रोगियों के लिए भी इसको उपयोग में लेने की सलाह नहीं दी जाती है । इसलिए खाद्य उद्योगों में मधुरक के अन्य संश्लेषित रुप काम में लिये जा रहे हैं । चूंकि संश्लेषित होने के कारण इनके हानिकारक प्रभाव होने की संभावना है, इसलिए पादपों के द्वितीयक मेटाबोलाइट प्राकृतिक मधुरक के स्त्रोत के रुप में प्रयुक्त किये जा रहे है । उदाहरणत: स्टीवियोसाइड (steviosides) प्राकृतिक रुप से स्टीविया एडियाना (stevia Rbaudiana) के प्रकन्द (rhizome) में उत्पन्न होता है । मधुमेह के रोगी के लिये यह एक सुरक्षित मधुरक है । जैव प्रौद्योगिकी रुप से इसके उत्पादन के लिये स्टीविया पादप के जड़ तथा स्तम्भ को कर्त्तोत्तक (explant) के रूप में एम.एस. माध्यम पर संवर्धित किया जाता है इसमें स्टीवियोसाइड के संश्लेषण के लिए ग्लूकोस तथा स्ट्रेप्टोमाइसिस प्रजातियों का माध्यम में होना आवश्यक है । ये जैव रुपान्तरण द्वारा स्टीवियोसाइड्स के संश्लेषण को प्रेरित करते हैं ।

13.4 कीटनाशक (Insecticides) :

भारतवर्ष में तेजी से बढ़ते हुये औद्योगीकरण एवम् पर्यावरणीय असंतुलन के फलस्वरूप फसलों को पर्याप्त जल और पोषक तत्व नहीं मिल पाते हैं साथ ही प्रतिरोधकता कम होने से किसी भी कीट के आक्रमण से फसल नष्ट हो जाती है । यह खाद्य असुरक्षा का एक बहुत बड़ा कारण है । इन कीटों से बचाव के लिए प्रयोग किये जाने वाले रासायनिक कीटनाशक बहुत ही विषैले एवं अजैव अपघटनीय (non-biodegradable) होने के कारण अत्यन्त हानिकारक होते हैं । अत: इन दिनों प्राकृतिक कीटनाशकों का उपयोग अधिकाधिक किया जा रहा है (चित्र 138) । पादपों में कीट आक्रमण के विरूद्ध यांत्रिक और रासायनिक सुरक्षा तंत्र काम करते हैं । यांत्रिक सुरक्षा तंत्र में पादप ऐसे द्वितीयक मेटाबोलाइटों का उत्पादन करते हैं जो कीट आक्रमण से उसकी सुरक्षा करते हैं । ये विभिन्न तरह की रासायनिक संरचना वाले यौगिक होते हैं । जैसे एल्केलॉइड (निकोटिन) जटिल ईस्टर (पाइरेथिन), विषम चक्रीय सगंध यौगिक (रोटेनॉइड्स), स्टीरॉइड (फाइटोएक्डाईस्टीरान) आदि । पादपों से विलगित ये कीटनाशक विभिन्न कीटों के प्रति सक्रिय होते हैं । इनकी विशिष्टता यह है कि ये यौगिक कीटों के लिये तो घातक हैं किन्तु मनुष्य के स्वास्थ्य पर इनका कोई दुकभाव नहीं होता है । इस इकाई में पादपों से विलगित कीटनाशक तथा उनके अन्तःपात्रे उत्पादन के बारे में पढ़ेगे ।

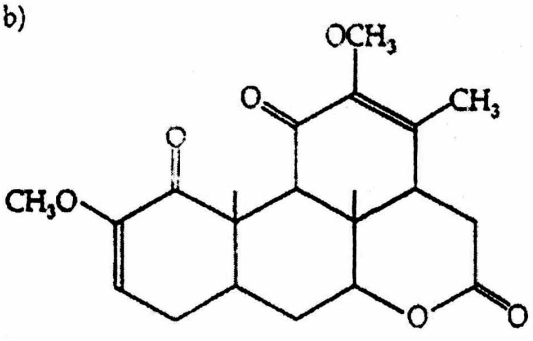
a)



पाइरेप्रिन

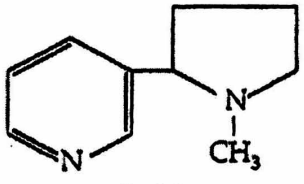
	R	R′	
Pyrethrin I	Me	CH: CH_2	$C_{21}H_{28}O_3$
Jasmolin I	Me	$CH_2.CH_3$	$C_{21}H_{30}O_3$
Cinerin I	Me	CH_3	$C_{20}H_{28}O_3$
Pyrethrin II	COO Me	CH: CH_2	$C_{22}H_{28}O_5$
Jasmolin II	COO Me	$CH_2.CH_3$	$C_{22}H_{30}O_5$
Cinerin II	COOMe	CH_3	$C_{21}H_{28}O_5$

b)



क्यूसीन

c)



निकोटिन

चित्र 13.8 : पादप मूल के कीटनाशक

सारणी 13.3 : प्रमुख खाद्ययोजक जो पादप कोशिका संवर्ध से उत्पन्न किये जा सकते है :

Product Type	Plant	Source
Colours		
Anthocyanin	*Vities vinifera*	Cell cultures
	Daucus carota	Cell cultures
	Euphorbia millii	Cell cultures
Betalaines	*Beta vulgaris*	Cell cultures and hairy root cultures
Crocin and Crocetin	*Crocus sativus*	Stigma proliferated in culture

Flavours Capscium and Capsaicin	*Capiscum frutescens* *Capsicum annuun*	Immobilized cell cluture

फाइटोएक्टाईस्टीरोन्स मुख्यत: पोलीपोडियम वलगैर (*Pollypodium vugare*), एकाइरेन्थ एसपेरा (*Achyranthus aspera*) एवम् साइडा प्रजातियां (*Sida spp.*) से प्राप्त होते हैं । ये यौगिक कीटों की वृद्धि चक्र को प्रभावित करते हैं जिससे असामान्य वयस्क बनते हैं । प्राकृतिक रुप से इनका उत्पादन जड़ो से होता है । अत: अन्तःपात्रे उत्पादन के लिए एम.एस. माध्यम को *एग्रोबैक्टीरियम राजोजीन्स* (*Agrobacterium rhizogenes*) से सरोपित कर रोमिल मूल संवर्ध बनाया गया है जिससे इन फाइटोएक्डाईस्टीराइड्स का उत्पादन होता है । इसमें यदि वृद्धिकारक NAA डाला जाए तो उत्पादन में और वृद्धि हो जाती है ।

इसी प्रकार नीम (*Azadi achta indica*) से ऐजारेक्टिन (Azarachtin) प्राप्त होता है । इसी कीटनाशक को 1985 में पहली बार जैवकीटनाशी नाम दिया गया । अन्तःपात्रे उत्पादन के लिए एम.एस. माध्यम में IAA डालने से उत्पादन में वृद्धि होती है । इसी प्रकार *डेरिस* (*Derris*), *टेफ्रोशिया* (*Tephrosia*) इत्यादि पादपों से रोटेनाइड्स प्राप्त होते हैं इन्हें मतस्य विष (Fish poison) भी कहते हैं । ये पादपों की जड़ों से प्राप्त होते है । ऊतक संवर्धन द्वारा *डेरिस इलिप्टा* (*Derris ellipta*) से इनका उत्पादन किया जाता है ।

पाईरेथिन्स पादपों से विलगित कीटनाशकों का ऐसा समूह है जो विस्तृत परास (board range) वाले कीटनाशी कहलाते हैं । ये कीटों की अनेकों जातियों पर प्रभाव डालते हैं और इनकी स्तनधारियों पर विषाक्तता नगण्य होती है। इनमें एथीलीन डाईक्लोराइड और कार्बनटेट्राक्लोराइड के साथ बंधन की क्षमता होती है । इनका एरोसोल (Aerosol) स्प्रे बनाकर छिड़कने से कीटजनित बीमारियों को रोका जा सकता है । पाइरेथीन के अन्तःपात्रे उत्पादन के लिए पर्णों का उपयोग किया जाता है । एम.एस. माध्यम को 2,4-डी एवम् बी.ए. (BA) से सम्पूरित करने पर उत्पादन बढ़ जाता है ।

सन् 1700 के आसपास से ही अशोधित तम्बाकू सत्व को कीटनाशक की तरह प्रयुक्त किया जा रहा है । बीसवीं में शुद्ध निकोटिन को विलगित कर उसके सल्फेट व्युत्पन्न को कीटनाशक की तरह प्रयुक्त किया गया । यह व्यवसायिक रुप से अत्यधिक सफल या प्रसिद्ध हुई । वर्तमान समय में इसका सीमित उपयोग किया जा रहा क्योंकि यह अन्य कीटनाशकों की तुलना में महंगी, गन्धयुक्त तथा विषैले दुष्यप्रभाव प्रकट करती है । इसके अन्तः पात्रे उत्पादन के लिए रोमिल मूल संवर्धन तकनीक उपयुक्त है ।

इन कीटनाशकों की माँग प्राकृतिक उत्पाद से पूरी कर पाना बहुत मुश्किल है । औद्योगिक रुप से उत्पादन हेतु उतक संवर्धन तकनीक की निम्न सीमाऐं है ।

लघुदीप्त पादप (short day plants) हैं जिन्हें 12 घंटे का दीप्तिकाल चाहिए साथ ही पुष्पन के समय 17-20°C तापमान उपयुक्त होता है । इनमें वर्ष में एक बार ही पुष्पन होता है । आनुवंशिक बदलाव (genetic manipulation) माध्यम से इसका उत्पादन संभव है । इस पर शोध जारी है । औद्योगिक

रुप से महत्वपूर्ण द्वितीयक मेटाबोलाइटों का वृहद् उत्पादन अनेक विधियों से किया जा रहा है । इन विधियों में पादप ऊतक संवर्धन, जैवरिएक्टर एन्जाइम ओरचन, जैव रुपान्तरण तथा निश्चलीकृत कोशिका संवर्ध आदि प्रमुख है । इन सभी विधियों के विषय में आधारभूत जानकारी आप पिछली इकाई में प्राप्त कर चुके है । निश्चलीकृत कोशिका संवर्धन तकनीक तथा इसके उपयोग व इस विधि से तैयार किये जाने वाले द्वितीयक मेटाबोलाइट्स का विस्तृत अध्ययन आप पिछली इकाई में कर चुके है ।

13.5 पारम्परिक चिकित्सा पद्धति के उत्पाद तथा उनका पादप जैवप्रौद्योगिकी में महत्व (Products of Traditional Medicinal & Their Importance in Biotechnology) :

चिकित्सा की प्रागैतिहासिक पद्धति आर्युवेद है जिसमें यह माना जाता है कि समस्त जीवित प्राणियों की उत्पत्ति जाँच वस्तुओं से हुई है, ये हैं आकाश (sky), अग्नि (fire). वायु (air), जल (water) तथा पृथ्वी (earth) । इनके विभिन्न संयोजनों से ही शरीर का निर्माण हुआ है साथ ही वात (space & air), पित्त (energy and liquid) तथा कफ (liquid and solid) में अनुपात बिगड़ने से सारी बीमारियां उत्पन्न होती हैं, अत: ये त्रिदोष कहलाते हैं । इन्हीं पर आधारित इस चिकित्सा पद्धति में पादपों के विभिन्न सत्वों से रोगों का उपचार किया जाता है । प्रागैतिहासिक पुस्तक चरक संहिता में विभिन्न पादपों के गुणों तथा रोगों में उनके उपयोग का वर्णन है । इस बिन्दु के अन्तर्गत हम कुछ औषधीय पादपों का अध्ययन करेंगे तथा जानेंगे कि इनका अन्तःपात्रे उत्पादन किस प्रकार बढ़ाया जा सकता है ।

i) *आरटीमीसीय एनुआ* (*Artemesia annua*)

यह एस्टरेसी कुल का पादप है, यूरोप और अमेरिका के जगलों में स्वाभाविक रुप से उगता है । भारतवर्ष में इसकी खेती की जाती है । इस पादप से आरटीमीसिन (artemisin) औषधि प्राप्त की जाती है । यह एक 0.5-1.75 मीटर की ऊँचाई वाला शाकीय पादप है । इसकी पत्तियाँ संयुक्त होती है तथा इनसे अत्यधिक सुगन्धित एवं कटु सत्व निकाला जाता है । इससे प्राप्त आरटीमिसिन औषधि मलेरिया के उपचार में काम आती है । ऊतक संवर्धन के द्वारा इसकी वृद्धि के लिए एम.एस. माध्यम में सुक्रोज, मायोइनोसीटोल, NAA, BAP डाला जाता है । इसके ऊतक संवर्धन को ऐग्रोबैक्टीरियम राइजोजीन्स से सरोपित करें तो उत्पन्न रोमिल मूल संवर्ध से अधिकतम मात्रा में आरटीमिसिन का उत्पादन संभव है ।

ii) *ग्लासीराइजा ग्लेबरा* (*Glycyrrhiza glabra*)

इसका सामान्य नाम मुलेठी है तथा यह लेगुमिनोसी कुल का सदस्य है । औद्योगिक स्तर पर इसका उत्पादन स्पेन और इग्लैण्ड में किया जाता है । इसमें कायिक प्रवर्धन स्टोलन (stolens) के द्वारा होता है । ग्लाइसिराइजिन (glycyrrhizin) एक टरपीनॉइड है, जो इसी पादप से प्राप्त किया जाता है । कुछ फ्लेवेनाइड्स भी इसमें उपस्थित होते हैं जो पाचन तंत्र संबंधित बीमारियों में उपयोगी है । पारम्परिक चिकित्सा पद्धति में इसका उपयोग कफ सारक की तरह किया जाता है ।

13.6 सारांश (Summary) :

द्वितीयक मेटाबोलाइटो के वृहद उत्पादन एवं इनके अनुप्रयोगों का विस्तृत अध्ययन, जैवप्रौद्योगिकी के विद्यार्थियों के लिये ज्ञानवर्धन होने के साथ-साथ उपयोगी भी है । इस इकाई में वर्णित विभिन्न द्वितीयक मेटाबोलाइटों जैसे - विनक्रिस्टीन विनब्लास्टीन, फैगोरोनीन पोडोफिल्लोटॉक्सिन, टैक्सोल, बियाफेरिन आदि अनेक गंभीरे रोगों के उपचार में कारगर औषधियों के रूप में प्रयोग किये जा रहे हैं । टैक्सोल नामक द्वितीयक मेटाबोलाइट केंसर जैसे- असाध्य रोग के उपचार में उपयोग किया जा रहा है । द्वितीयक मेटाबोलाइटों से अन्य अनेक उपयोगी उत्पाद भी तैयार किये जा रहे है । इनमें खाद्य योजक जैसे - वर्णीकारक मधुरम, सुवासक आदि प्रमुखता से अनेक खाद्य पदार्थों की गुणवत्ता बढ़ाने में प्रयोग किये जा रहे है । इनके अतिरिक्त द्वितीयक मेटा, कीटनाशकों के रूप में भी उत्पादित व उपयोग किये जा रहे है । कृषि की उपज बढाने व रासायनिक कीटनाशकों के दुष्प्रभावों को दूर करने के लिये वर्तमान में जैव अपहासीय कीटनाशकों जैसे पाइरेथ्रिन, निकोटिन, रोटेनॉइड्स आदि का वृहद उपयोग किया जा रहा है ।

बोध प्रश्न

6. खाद्य योजक भोजन के स्वाद को ..... है -
   - अ) बढ़ाते
   - ब) घटाते
   - स) कोई असर नहीं डालते
   - द) उपरोक्त सभी

7. वनीला का उत्पादन *Vanila plantfolia* से पात्र में किसी विधि से संभव है-
   - अ) कोशिका संवर्धन
   - ब) कैलस संवर्धन
   - स) भ्रूणाभ
   - द) रोमिल मूल संवर्ध

8. एन्थोसाइनिन का रंग होता है -
   - अ) लाल
   - ब) नीला
   - स) बैंगनी
   - द) उपरोक्त सभी

9. शर्करा के बिना एन्थोसाइनिन कहलाते हैं -
   - अ) एन्थोराइडिन
   - ब) एन्थोसाइनिडिन
   - स) एन्थोमाइडिन
   - द) उपरोक्त सभी

10. बीटालिन्स किस कुल के पौधों पाये जाते हैं -
   - अ) केवल चीनोपोडिएसी
   - ब) केवल अमरेनथेसी
   - स) केवल सोलेनेसी
   - द) अ व ब दोनों में

11. सुवासक द्वितीयक मेटाबोलाइट से भोजन का स्वाद है -
   - अ) बढ़ता
   - ब) घटता
   - स) कोई असर नहीं
   - द) उपरोक्त सभी

12. कौनसा पूर्ववर्ती डालकर वनीला उत्पादन बढ़ाया जा सकता है -
   - अ) फेरुलिक अम्ल
   - ब) स्टीरोसाइड्स
   - स) कैथेरेन्थीन
   - द) उपरोक्त सभी

13. मधुरक के रुप में काम में आने वाला द्वितीयक मेटाबोलाइट है -

अ) डिजिटॉक्सिन ब) स्टीरॉसाइट्स

स) कैथेरेन्थीन द) LDOPA

14. किसी संश्लेषित भोज्य यौगिक का उपयोग करने से ..... होता है -

अ) अप्रत्यक्ष प्रभाव ब) अच्छा प्रभाव

स) कोई प्रभाव नहीं द) अ व ब दोनों

15. प्राकृतिक कीटनाशक कीटों पर प्रभाव डालते हैं ..... उनके

अ) वृद्धिचक्र को निष्क्रिय कर ब) आखों को निष्क्रिय कर

स) पाचन तंत्र को निष्क्रिय कर द) उपरोक्त मे कोई नहीं

16. रोटेनायड प्राप्त होते हैं ..... से

अ) डेरिस प्रजातियों ब) टेफ्रोशिया प्रजातियों

स) अ व ब दोनों द) स्टीविया प्रजातियों

17. प्राकृतिक कीटनाशक अजैव अपघटनीय होते हैं - सत्य/असत्य

18. डेरिस से पृथक किये कीटनाशकों को ..... भी कहते हैं -

अ) मल्ल विष ब) अश्व विष

स) हाइड्रा विष द) उपरोक्त में से कोई नही

19. *Artemesia annua* से प्राप्त होने वाला द्वितीयक मेटाबोलाइट है ।

20. *Glycyrrhiza glabra* से पृथक किया ग्लाइकोराइजिन एक ..... है ।

अ) फ्लेविनॉयड ब) एल्केलोयड

स) टर्पिनॉइड द) उपरोक्त में से कोई नहीं

13.7 बोध प्रश्नों के उत्तर

1.	द	11.	अ
2.	अ	12.	अ
3.	स	13.	ब
4.	सत्य	14.	अ
5.	स	15.	अ
6.	अ	16.	स
7.	अ	17.	असत्य
8.	द	18.	अ
9.	ब	19.	आरटीमिसिन
10.	द	20.	स

13.8 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question) :

अर्बुदरोधी यौगिक	Antitumor Compounds
खाद्य योजक	Food Additives

कीटनाशक	Insecticides
एल्किल कारक	Alkylating Agents
प्रति-मेटाबोलाइट	Antimetabolites
संश्लेषित औषधियाँ	Synthetic Drugs
प्राकृतिक औषधियाँ	Natural Drugs

13.9 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question) :

1. अबुर्दरोधी यौगिक की परिभाषा और इसके प्रकार उपयुक्त उदाहरण सहित लिखिए ।
2. अबुर्दरोधी यौगिकों के स्त्रोत और प्रकृति से पृथक किये कुछ यौगिकों के उदाहरण लिखो ।
3. खाद्य योजक के रुप में प्रयुक्त द्वितीयक मेटाबोलाइट और इनका उपयोग उपयुक्त उदाहरण सहित लिखिए ।
4. एन्थोसाइनिन व इनके पृथक्करण की उपयुक्त विधि को विस्तार से समझाइए ।
5. खाद्य योजक वनीला और कोसीन के कार्य व पात्र में उत्पादन का विस्तार से वर्णन कीजिए।
6. प्राकृतिक कीटनाशकों के उपयोग लिखिए ।

13.10 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. रामावत एण्ड मेरीलोन बायोटेक्मोलॉजी सेकेण्डरी मेटोबोलाइट्स ऑक्सफोर्ड आई.बी.एच पब्लि कम्पनी, नई दिल्ली ।
2. बेल तथा चार्ल वुड, सेकेण्डरी प्लान्ट प्रोडक्ट्स, स्प्रिंगर - वरलाग, बर्लिन ।
3. हारबोर्न तथा मेब्री, द फ्लेवनॉइड्स एडवान्सेज : इन रिसर्च, चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन।
4. हरबर्ट, द बायोसिन्थेसिस ऑफ सेकेण्डरी मेटाबोलाइट्स चेपमेन एण्ड हॉल, लंदन ।
5. टचस्टान, प्रेक्टिस ऑफ थिनलेयर क्रोमेटोग्राफी, जॉनविले एण्ड सन्स, न्यूयॉर्क ।

इकाई 14

पादप जैवप्रौद्योगिकी में आण्विक तकनीक

(Molecular Techniques in Plant Biotechnology)

इकाई की रूपरेखा

14.0 उद्देश्य

14.1 प्रस्तावना

14.2 आण्विक चिन्हक

- 14.2.1 रेस्ट्रिक्शन खण्ड परास बहुरूपता
- 14.2.2 यादृच्छिक प्रवर्धित बहुरूपी डी.एन.ए.
- 14.2.3 अनुक्रम अंकित स्थल
- 14.2.4 माइक्रोसैटेलाइट चिन्हक
- 14.2.5 एकल रज्जु संरुपण बहुरूपता
- 14.2.6 अनुक्रम अभिलाक्षणिक प्रवर्धित क्षेत्र
- 14.2.7 प्रवर्धन खण्ड परास बहुरूपता

14.3 आण्विक चिन्हको के अनुप्रयोग

- 14.3.1 समेकित आनुवंशिक मानचित्रों का विकास
- 14.3.2 जीन अंकन तथा चिन्हक के माध्यम से चयन
- 14.3.3 मात्रात्मक लक्षण स्थल मानचित्रण
- 14.3.4 तुलनात्मक मानचित्रण
- 14.3.5 गुणसूत्र गमन एवं जीनों की मानचित्र आधारित क्लोनिंग
- 14.3.6 फसल जर्मप्लाज का डीएनए. फ्रिंगर प्रिंटिग

14.4 सारांश

14.5 बोध प्रश्नों के उत्तर

14.6 अभ्यासार्थ प्रश्न

14.7 शब्दावली

14.8 संदर्भ ग्रन्थ

14.0 उद्देश्य (Objectives) :

किसी भी पादप के सम्पूर्ण जीनोम को भली-भाँति जानने के लिए यह आवश्यक है कि उस पादप जीनोम का सम्पूर्ण मानचित्र उपलब्ध हो । यद्यपि पारम्परिक रुप से लक्षण प्रारुपण के आधार पर संभावित मानचित्र तैयार किए गए हैं तथापि सम्पूर्ण एवं वास्तविक मानचित्रण आण्विक चिन्हको के द्वारा ही संभव हो पाया है । इस अध्याय में हम विभिन्न

प्रकार के आण्विक चिन्हको को अध्यनन करेंगे साथ ही इन चिन्हको के विभिन्न अनुप्रयोगों के माध्यम से जानेंगे कि आणविक चिन्हक न सिर्फ जीन मानचित्रण बल्कि पादप प्रजनन में भी विभिन्न प्रकार से उपयोगी हैं ।

14.1 प्रस्तावना (Introduction) :

मेण्डल के आनुवंशिकता नियमों तथा सट्टन के आनुवंशिकता के गुणसूत्रीय सिद्धांत के साथ ही पारम्परिक आनुवंशिकता की नींव रखी गई । इन खोजों ने यह स्थापित किया कि लक्षण, विभिन्न कारकों (जिन्हें अब जीन कहा जाता है) के द्वारा नियंत्रित होते हैं, जो जनकों से संतति में स्थानान्तरित होते हैं तथा गुणसूत्र (chromosomes) पर व्यवस्थित होते हैं । प्रथम आनुवंशिक मानचित्र (genetic map) स्टुअर्टवेण्ट (Stuertwent, 1913) ने ड्रॉसोफिला गुणसूत्र का तैयार किया था । तब से अब तक कितने ही पादपों, यहाँ तक कि मानव तथा जीवाणुओं के भी आनुवंशिक मानचित्र (genetic map) तैयार किए जा चुके हैं । आनुवंशिक मानचित्र (genetic map) तैयार करने के लिए तीन प्रकार के चिन्हक (market) काम में लिए जाते हैं । ये हैं - आकारिकीय लक्षण (Morphological traits) आधारित चिन्हक । जैव रासायनिक या प्रोटीन आधारित चिन्हक (Biochemical or protein based marker) तथा आण्विक (डी.एन.ए.) आधारित चिन्हक (molecular (DNA) based marker) ।

आकारिकीय लक्षण आधारित चिन्हक (Morphological Traits Marker)

पारम्परिक सहलग्न मानचित्र (conventional linkage maps) मात्र उन्हीं जीन्स (genes) पर आधारित होते थे जिनका स्पष्ट लक्षण प्रारुप (phenotype) दृष्टिगोचर होता था । यह तकनीक नग्न नेत्र बहुरुपता (nacked eye polymorphism - NEP) भी कहलाती है, जिसमें आनुवंशिकता स्पष्ट दृष्टिगोचर होती है ।

यह विधि बहुत ही साधारण है तथा इसमें किसी विशिष्ट प्रयोगशाला उपकरण की आवश्यकता नहीं होती । यद्यपि जीन मानचित्रण हेतु यह विधि काफी प्रभावी है फिर भी इसकी कुछ सीमाऐं हैं -

1. लक्षण प्रारुप में दृष्टिगोचर होने वाले जीनों (Genes) की संख्या अपेक्षाकृत काफी कम होती है।
2. इस विधि से जीन मानचित्रण में अधिक समय लगता है ।
3. इस विधि से संख्यात्मक लक्षण प्रारुपों का मानचित्रण संभव नहीं है ।
4. आकारिकीय लक्षण प्रारुपण, पर्यावरण तथा विकासात्मक प्रावस्थाओं से अत्यधिक प्रभावित होते हैं ।

प्रोटीन आधारित चिन्हक (Protein Based Marker)

ये चिन्हक प्रोटीनों के इलेक्ट्रोफोरेटिक परिवर्त्तों (electrophoretoc variants) पर आधारित होते हैं उदाहरणत: आइसोजाइम विश्लेषण पर आधारित बहुरापता । आइसोजाइम एन्जाइमों के परिवर्त रूप हैं जो उनके वैद्युत आवेश के आधार पर इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा विलगित होते हैं ।

आण्विक चिन्हक (Molecular Marker)

ये सामान्यत: डी.एन.ए. (DNA) चिन्हक कहलाते हैं । यह तकनीक आनुवंशिक मानचित्रण में एक महत्त्वपूर्ण मील का पत्थर है जो केन्द्रकीय माइटोकॉनड्रीयल तथा क्लोरोप्लास्ट जीनोम को सम्पूर्ण रुप से निरुपित करती है । इस अध्याय में हम इन्हीं चिन्हको का विस्तार से अध्ययन करेंगे -

14.2 आण्विक चिन्हक (Molecular marker) :

सामान्य रुप से तीन प्रकार के जीन मानचित्रण होते हैं -

1. आनुवंशिक (सहलग्नता) मानचित्र (Genetic (linkage) map)
2. कोशिकानुवंशिक मानचित्र (Cytogenetic map)
3. भौतिक / आण्विक मानचित्र (Physical / molecular map)

मानचित्र विश्लेषण (map analysis) हेतु तीन प्रकार के आण्विक चिन्हक प्रयुक्त होते हैं -

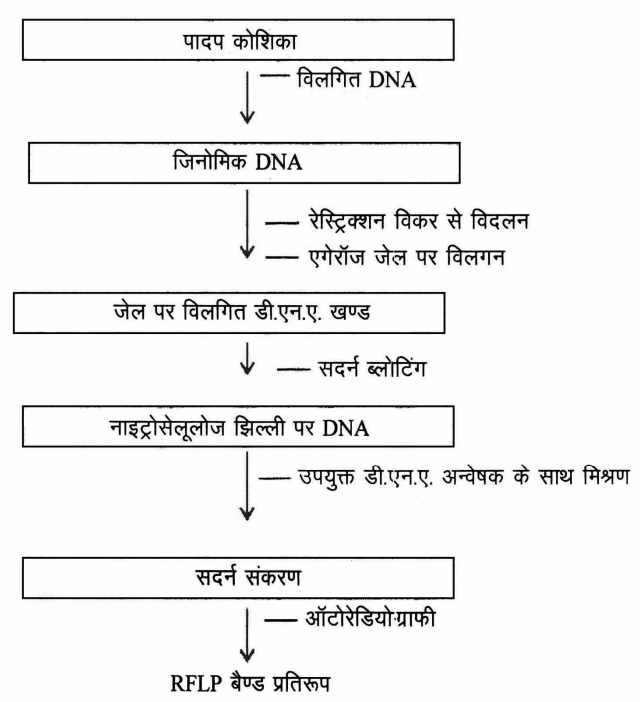
1. आइसोजाइम (Isozymes)
2. रेस्ट्रिमान खण्ड - परास बहुरापता (Restriction Fragment - Length Polymorphism - RFLP)
3. पी.सी.आर. आधारित आण्विक चिन्हक ।

इसके अलावा दूसरे भी अन्य परिवर्ती (variants) हैं जो आण्विक चिन्हक (molecular maker) की भाँति प्रयुक्त होते हैं जैसे - यादृच्छिक प्रवर्धित बहुरुपी डी.एन.ए. (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD), प्रवर्धित खण्ड परास अनुक्रम - लाक्षणिक प्रवर्धित क्षेत्र (Sequence - Charaterized Amplified Region - SCAR), एकल रज्जु संरुपण बहुरुपिता (Single Strand Comformation Polymorphism - SSCP), साधारण रज्जु पुनरावर्तक (Simple Strand Repeates - SSR) तथा परिवर्ती परास न्यूक्लियोटाइड अनुबद्ध पुनरावर्तक (Variable Length Nucleotide Tandem Repeats - VNTR) । इस इकाई में हम कुछ महत्त्वपूर्ण आण्विक चिन्हको (molecular markers) का अध्ययन करेंगे ।

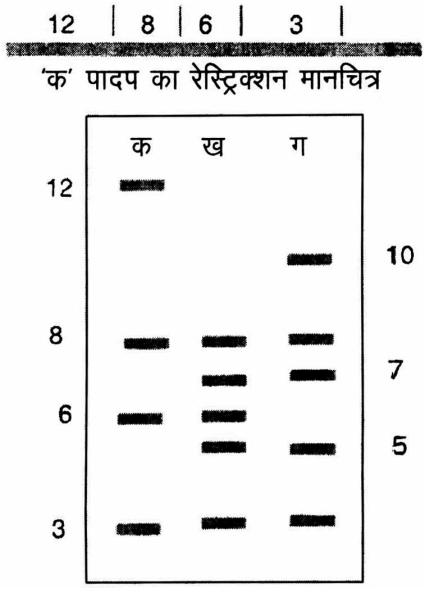
14.2.1 रेस्ट्रिमान खण्ड परास बहुरुपता (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

जब एक ही प्रजाति के अलग-अलग व्यक्तिगत (individual) जीनोमिक डी.एन.ए. (genomic DNA) को रेस्ट्रिमान एन्जाइम द्वारा विदलित (cleaved) किया जाता है, तो इनके इलेक्ट्रोफोरेसिस प्रतिरुप को अन्वेषित करने पर ज्ञात होता है कि इनके खण्ड-परास (fragment - length) में विविधता है । नाइट्रोसेलूलोज झिल्ली पर ब्लोटिंग प्रतिरुप को रेडियो लेवल डी.एन.ए. के साथ अन्वेषित करने पर, डी.एन.ए. के संकरण में यह विविधता परिलक्षित होती है । ये अद्‌वितीय, परन्तु सामान्य एवं पुनावर्तित डी.एन.ए. अनुक्रम (unique, common & repeated DNA sequence) ही रेस्ट्रिमान खण्ड परास बहुरुपता (Restriction Fragment Length Poymorphism - RFLP) कहलाते हैं । एक रेस्ट्रिमान एन्जाइम से विदलन के उपरान्त, एक डी.एन.ए. खण्ड में मिलने वाली बहुरुपता, एक RFLP कहलाती है । (चित्र 14.1)

एक काल्पनिक उदाहरण के माध्यम से इसे समझा जा सकता है । यदि हम तीन पादपों क ख तथा ग की कल्पना करें जहाँ 'क' एक मूल पादप है जबकि 'ख' तथा ग इसके उत्परिवर्तित (mutant) रुप हैं । इसे RFLP के आधार पर समझाया जा सकता है । उत्परिवर्तन 'ख' तथा 'ग' में 'क' के अतिरिक्त / अलग रेस्ट्रिमान स्थल देखें जा सकते हैं । (चित्र 14.2)



चित्र 14.1 : पारम्परिक RFLP विश्लेषण



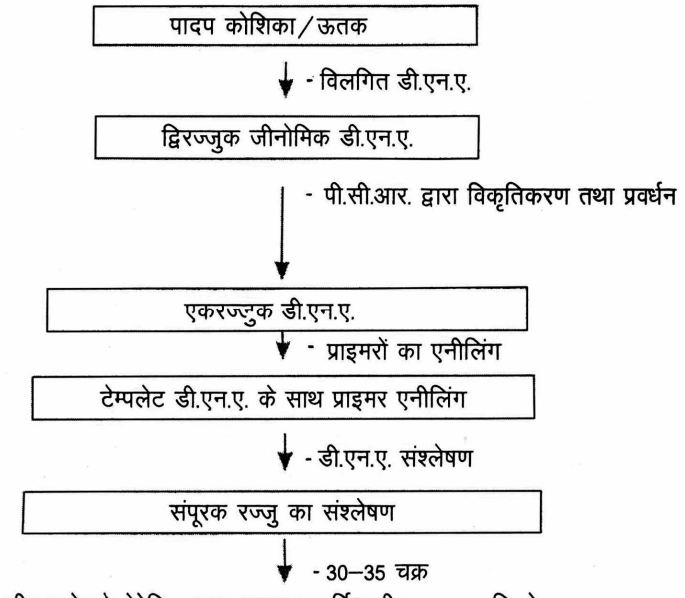
चित्र 14.2 : तीन पादपों में RFLP का अन्वेषण

RFLP सहप्रभावी (co-dominant) चिन्हक होते हैं, जो विषमयुग्मजी को समयुग्मजी से प्रजाति या समष्टि स्तर पर विभेदित करने में सक्षम हैं । किसी वातावरण में, विकास की किसी भी प्रावस्था में, किसी भी ऊतक से यह तकनीक जीन प्रारुप (genotype) या कृषिजोपजाति (cultivar) की पहचान

करने में यह तकनीक सक्षम है । RFLP को एक अद्‌वितीय डी.एन.ए. अनुक्रम जिसे जीनोमिक अन्वेषी (genomic probe) कहा जाता है के माध्यम से पहचाना जाता है ।

14.2.2 यादृच्छिक प्रवर्धित बहु रुपित डी.एन.ए. (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD)

विलियम्स तथा सहयोगियों (Williams *et al*. 1991) ने RADP तकनीक को विकसित किया । यह PCR आधारित तकनीक है तथा वहाँ ज्यादा उपयोगी है जहाँ दूसरे आण्विक चिन्हक जैसे आइसोजाइम तथा RFLP उपलब्ध नहीं होते हैं । यदि हमें किसी ऐसे डी.एन.ए. खण्ड के बारे में पता हो जो पूरे जीनोम में यादृच्छिक (ramdom) रुप से वितरित है, तो उस अनुक्रम के लगभग 10 bp का एक ओलीगो न्यूक्लियोटाइड संश्लेषित कर, किसी डी.एन.ए. खण्ड में संवर्धन से पूर्व उसके दोनों सिरों पर इस ओलीगोन्यूइक्लियोटाइड को चिन्हक के रुप में प्रयुक्त किया जा सकता है ।
पी.सी.आर. द्‌वारा प्रवर्धित डी.एन.ए. खण्ड दोनों सिरों पर उस 10 bp अनुक्रम द्‌वारा बद्ध होगा । यादृच्छिक रुप से प्राप्त एवं प्रवर्धित डी.एन.ए. चिन्हक ही यादृच्छिक प्रवर्धित बहु रुपी डी.एन.ए. (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) कहलाता है (चित्र 14.3) । दो अलग-अलग व्यष्टियों (individuals) का RAPD भी अलग-अलग होगा अत: इसे आण्विक चिन्हक की उपयोग में लाया जा सकता है । न्यूक्लियोटाइडों के विविध संयोजनों से कितने ही ओलीगोन्यूक्लियोटाइड अभिकल्पित एवं संश्लेषित किए जा चुके हैं जो बाजार में उपलब्ध है ।



चित्र 14.3 : PCR के माध्यम से RAPD विश्लेषण के विभिन्न चरण

14.2.3 अनुक्रम अंकित स्थल (Sequence Tagged Sites - STS)

किसी विशिष्ट वांछित लक्षण से सम्बन्धित RFLP चिन्हक, PCR आधारित अनुक्रम अंकित स्थल (Sequence Tagged Sites - STS) चिन्हक में आसानी से परिवर्तित किए जा सकते हैं । ये

चिन्हक उस अनुक्रम पर आधारित होते हैं जो न्यूक्लियोटाइड इलेक्ट्रोफोरेसिस में बहुरापित बैण्ड प्रतिरुप देते हैं । STS, जीनोमिक अनुक्रम के ऐसे लघु खण्ड होते हैं जिन्हें PCR के माध्यम से अन्वेषित किया जा सकता है । इस तकनीक के उपयोग से RFLP विश्लेषण में, डी.एन.ए. संकरण जैसे अपेक्षाकृत कठिन चरण को विलोपित किया जा सकता है । जीनोम मानचित्रण में प्रत्येक STS स्थल को एक विशिष्ट पहचान स्थल के रुप में चित्रित किया जाता है । एक आनुवंशिक मानचित्र को भौतिक मानचित्र में परिवर्तित करने में भी STS महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है ।

STS चिन्हक की सबसे बड़ी सीमा है कि एक उपयुक्त चिन्हक अभिकल्पन के लिए आवश्यक डी.एन.ए. अनुक्रम को प्राप्त करने हेतु अत्यधिक प्रयास और समय की आवश्यकता पड़ती है ।

14.2.4 माइक्रोसैटेलाइट चिन्हक (Microsatellite marker)

माइक्रोसैटेलाइट तथा मिनीसैटेलाइट शब्दों का प्रयोग पहली बार लिट तथा लट्टी (Lit & Lutty, 1989) तथा जेफ्रे (Jeffrey, 1985) ने क्रमश: किया । ये दोनों ही पुनरावर्ती डी.एन.ए. (repetitive DNA) है ।

माइक्रोसैटेलाइट या साधारण अनुक्रम पुनरावर्त्तक (Simple Sequence Repeats, SSR) वे पुनरावर्तित (1-6 bp long) अनुक्रम हैं जो पूरे जीनोम में वितरित होते हैं । जब से माइक्रोसैटेलाइट अनुक्रम किसी रेस्ट्रिमान एन्जाइम से बिदलित डी.एन.ए. के साथ संकरित (bybridized) कराए जाते हैं तो कितने ही विविध स्थलों (loci) को अन्वेषित करते हैं ।

मिनीसैटेलाइट या परिवर्ती अनुक्रम के परिवर्ती अंक (Variable Number of Tandem Repeats - VNTR) ऐसे विविध पुनरावर्तित अनुक्रम (10-60 bp long) हैं, जिनमें बहुविकल्पी लोकस (multiple allelic loci) के प्रति अत्यधिक बहुरुपता (polymorphism) होती हैं ।

माइक्रोसैटेलाइट या मिनीसैटेलाइट चिन्हक, किसी अन्य चिन्हक की अपेक्षा अधिक एलिलिक विविधता को अन्वेषित कर सकते हैं ।

14.2.5 एकल रज्जु संरुपण बहुरुपता (Single Strand Conformation Polymorphism - SSCP)

डी.एन.ए. बहुरुपता तथा बिन्दु उत्परिवर्तन (point mutation) के अन्वेषण तथा जीन विश्लेषण के लिए यह एक सशक्त तथा अपेक्षाकृत तीव्र तकनीक है । SSCP समान आण्विक भार के डी.एन.ए. खण्डों में विषमयुग्मिता (heterozyocity) को पहचान सकता है । यही नहीं यह तकनीक एकल न्यूक्लियोटाइड परिवर्तन को भी अन्वेषित कर सकती है । असममित - पी.सी.आर. के दौरान पुन:एनीलिंग की समस्या से बचने के लिए यह तकनीक विकसित की गई जिसमें विकृतिकरण (denaturation) चरण को विलोपित कर दिया गया तथा इलेक्ट्रोफोरेसिस के लिए अपेक्षाकृत अधिक मात्रा में नमूनों (samples) को लोड किया जा सकता है । यह तकनीक आनुवंशिक मानव रोगों के अन्वेषण में भी उपयोगी सिद्ध हुई है ।

14.2.6 अनुक्रम अभिलाक्षणिक प्रवर्धित क्षेत्र (sequence Characterized Amplified Regions - SCAR)

इस तकनीक में एक विशिष्ट लोकस क्षेत्र के अनुक्रम को प्रवर्धित (amplified) कर अपेक्षाकृत लम्बे (22-24 bp) प्राइमर अभिकल्पित (define) किए जाते हैं । यह तकनीक मिशेल मोर एवं उसके साथियों (Michelmore et al., 1991) ने दी । ये प्राइमर संरचना एवं उपयोग में STS चिन्हक के समान ही होते हैं । अनुक्रम में विविधता, इलेक्ट्रोफोरेसिस प्रतिरुप में बन्ध की उपस्थिति या अनुपस्थिति के आधार पर अन्वेषित की जाती है ।

मानचित्र आधारित क्लोनिंग, भौतिक मानचित्रण तथा लोकस विशिष्टता आदि इस तकनीक की विशेषता है । SCAR तुलनात्मक मानचित्रण तथा समजातिता के अध्ययन में भी उपयोगी है ।

14.2.7 प्रवर्धन खण्ड परास बहुरुपता (Amplification Fragment Length Polymorphism - AFLP)

सम्पूर्ण जीनोम में बहुरुपता (polymorphism) को अन्वेषित करने हेतु अत्यधिक संवेदनशील यह तकनीक, RFLP तथा RADP का संयोजन है । यह विषमयुग्मज और समयुग्मजों में विभेदन हेतु RADP से बेहतर तकनीक है । इसकी उच्च पुनरुत्पादन क्षमता (reproducibility) के कारण यह तकनीक सार्वभौमिक रुप से प्रयुक्त होती है । यह तकनीक भी रेस्ट्रिक्शन विकरों से उत्पन्न डी.एन.ए. खण्डों के PCR प्रवर्धन पर ही आधारित है । यद्यपि यह तकनीक महंगी है, फिर भी जीनोम मानचित्रण हेतु उपयोगी सिद्ध हुई है ।

इस तकनीक में डी.एन.ए. को दो रेस्ट्रिक्शन विकरों (उदाहरणार्थ - EcoRI तथा Msel) से विदलित कर, उत्पन्न खण्डों के दोनों सिरों पर द्विरज्जुक (double stranded) ऑलीगोन्यूक्लियोटाइड जोड़ दिए जाते हैं । इन विदलित खण्डों को $^{32}P_4$ से लेबल कर चयनित रुप से PCR द्वारा प्रवर्धित किया जाता है । 1-3 अतिरिक्त रुप से जोड़े गए न्यूक्लियोटाइडों के अनुसार प्राइमर अभिकल्पित किया जाता है, तथा सिर्फ उन्हीं डी.एन. खण्डों का प्रवर्धन किया जाता है जिनमें रेस्ट्रिक्शन स्थल तथा अतिरिक्त डक्लियोटाइड दोनों होते हैं ।

अब इलेक्ट्रोफोरेरिटक जेल पर इस DNA उत्पाद को विश्लेषित किया जाता है । ऑटोरेडियोग्राफी के द्वारा इनका अध्ययन किया जाता है । यदि PCR में रेडियोलेबल न्यूक्लियोटाइड प्रयुक्त नहीं किए जाएँ, तो प्रदीप्त या रजत रंजक के माध्यम से इन प्रवर्धित डी.एन.ए. खण्डों का अध्ययन किया जाता है ।

बोध प्रश्न

1. किसी रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम से विदलन के उपरान्त मिलने वाली बहुरुपता, जो जीन प्रारुप तथा कृषिजोपजाति की पहचान में सक्षम है, कहलाती है?

   .....

2. RAPD तकनीक किस के द्वारा विकसित की ?

   .....

3. आण्विक चिन्हक विश्लेषण की किस तकनीक में डी.एन.ए. संकरण की आवश्यारुता नहीं होती?

.....

4. एलिलिक विविधता को अन्वेषित कर सकने वाले चिन्हक है ?

.....

5. किस आण्विक तकनीक के प्रयोग से PCR में पुन:एनीलिंग की समस्या से बचा जा सकता है ?

.....

6. कौनसी तकनीक RFLP तथा RADD का संयोजन है?

.....

14.3 आण्विक चिन्हको के अनुप्रयोग (Applications of Molecular Markers) :

आण्विक चिन्हको ने अनेकों प्रजातियों की जीनोम संरचना को समझने, उनके उद्विकासीय सम्बधों तथा फसल उन्नयन कार्यक्रमों में जीनोम बदलाव (genome manipulation) आदि में महत्वपूर्ण भूमिका अदा की है । फसली पादपों की जीनोम संरचना तथा पुर्नसंयोजन के अध्ययन में आण्विक मानचित्रों से बहुत सारी सूचनाऐं उपलब्ध कराई हैं । ये मानचित्र चिन्हक आधारित चयन, मानचित्र आधारित जीन क्लोनिंग, उद्विकासीय सम्बन्धों का अध्ययन तथा बाहरी जर्मप्लाज्म की पहचान हेतु सूचना प्रदान करते हैं । आण्विक चिन्हको के कुछ अनुप्रयोगों का हम विस्तार से अध्ययन करेंगे ।

14.3.1 समेकित आनुवंशिक मानचित्रों का विकास (Development of Integrated Genetic Map)

एक वृहद् संख्या में आण्विक चिन्हक उपलब्ध हैं जो आनुवंशिक, कोशिकीय तथा आण्विक रुप से समेकित तथा संतृप्त आनुवंशिक मानचित्र तैयार करने हेतु पर्याप्त सूचनाऐं उपलब्ध कराता है । अनेक फसलों के लिए अब समेकित मानचित्र उपलब्ध है । उदाहणार्थ धान (Rice) में 2300 डी.एन.ए. चिन्हको का मानचित्रण किया गया है, वहीं जौ (Barley) के सात गुणसूत्रों के मानचित्रण के लिए 600 चिन्हको का उपयोग किया गया है । टमाटर (Tomato) का आनुवंशिक मानचित्रण भी लगभग 1000 चिन्हको पर आधारित है ।

14.3.2 जीन अंकन तथा चिन्हक के माध्यम से चयन (Gene tagging and Marker Assisted Selection)

आण्विक चिन्हको के माध्यम से, सहलग्नता के द्वारा वांछित जीन की स्थिति ज्ञात करना, जीन अंकन (gene tagging) कहलाता है । ऐसा आण्विक चिन्हक जो जीन के साथ सहलग्न है एक अंकन (tag) की भाँति कार्य कर सकता है, जो पादप प्रजनन कार्यक्रमों में अप्रत्यक्ष जीन चयन में उपयोगी है ।

अब तक अनेकों रोग तथा कीट प्रतिरोधी जीनों को आण्विक चिन्हको के माध्यम से अंकित (tagged) किया जा चुका है । निकट समजीनी क्रम (Near Isogenic Lines - NILs) के माध्यम से सहलग्न चिन्हको को अधिक प्रभावी ढंग से प्राप्त किया जा सकता है । प्रतीप संकरण (back crossing) तथा चयन (selection) के पुनरावर्तित चक्रों (repetitive cycles) के माध्यम से अनेक फसलों के लिए NILs उत्पन्न किए गए है । संतृप्त आण्विक मानचित्रों के विकास, आण्विक चिन्हको के साथ निकट सहलग्नता तथा इन चिन्हको के P.C.R आधारित चिन्हको में रुपान्तरण ने पादप प्रजनन कार्यक्रमों में चिन्हको के माध्यम से चयन को संभव बनाया है ।

14.3.3 मात्रात्मक लक्षण स्थल मानचित्रण (Quantitative Trait Loci Mapping - QTL)

अनेक महत्वपूर्ण लक्षण जैसे उपज गुणवत्ता, सूखा, लवणता व अन्य अजैविक तनावों के प्रति सहिष्णुता आदि प्रकृति में मात्रात्मक रुप से नियंत्रित होते हैं । ऐसे लक्षण आनुवंशिक रुप से एक से अधिक जीनों द्वारा नियंत्रित होते हैं तथा अंतिम लक्षण प्रारुप इन सभी जीनों का समेकित प्रभाव होता है । ऐसे लक्षणों को मात्रात्मक लक्षण स्थल (Quantitative Trait Loci -QTL) कहते है । ऐसे लक्षणों को नियंत्रित करने वाली जीन, पालीजीनिक जीन या सूक्ष्मजीन (polygeic or minor gene) कहलाती है । ये पर्यावरणीय कारकों से प्रभावित होती है । गुणसूत्रों पर प्रमुख QTLs का मानचित्रण संभव है । लक्षण, जनक की प्रकृति तथा लक्षण प्रारूप में विविधता के आधार पर QTLs की संख्या निर्भर करती है । QTLs का सूक्ष्म प्रभाव भी चिन्हक विधि से अन्वेषित किया जा सकता है । यह i. मानचित्रण की निकटतम चिन्हक से दूरी तथा ii. विसंयोजित समष्टि (segregated population) के आकार पर निर्भर करता है ।

14.3.4 तुलनात्मक मानचित्रण (Comparative Mapping)

आण्विक चिन्हको के माध्यम से पता चलता है कि अनेक असम्बन्धित प्रजातियों के जीनोम के कुछ हिस्सों के मानचित्र समानान्तरता प्रदर्शित करते हैं । इन चिन्हको ने पादप जीनोम में सहलग्नता सम्बन्धी सूचनाओं के भंडार में अतुलनीय वृद्धि की है । तुलनात्मक मानचित्रण के आधार पर छोटे जीनोम आकार की प्रजातियों का उपयोग आर्थोलोगस जीनों की स्थितिक (positional) क्लोनिंग में भी किया जाता है ।

14.3.5 गुणसूत्र गमन एवं जीनों की मानचित्र आधारित क्लोनिंग (Chromosome Walking and Map Based Cloning of Genes)

लक्षण प्रारुप (phenotype) के आधार पर, संतृप्त आनुवंशिक मानचित्र, पादप जीन पृथक्करण हेतु सुविधा प्रदान करता है । यीस्ट कृत्रिम गुणसूत्र (YAC) तथा जीवाणु कृत्रिम गुणसूत्र (BAC) लाइब्रेरी के सतत् विकास ने मानचित्र स्थिति के आधार पर जीन क्लोंनिग की संभावनाओं तथा डी.एन.ए. अनुक्रमण में अशातीत वृद्धि की है ।

मानचित्र आधारित क्लोनिंग में चार प्रमुख चरण होते हैं -

i. वांछित क्षेत्र हेतु उच्च विभेदन क्षमता के आण्विक सहलग्नता मानचित्र का विकास
ii. एक गुणसूत्र गमन द्वारा आवश्यक भौतिक दूरी का निर्धारण

iii. जीनोम में वृहद् खण्ड युक्त डी.एन.ए. लाइब्रेरी के माध्यम से गुणसूत्र गमन

iv. रुपान्तरण के माध्यम से वांछित जीन के पृथक्करण का सत्यापन ।

14.3.6 फसल जर्मप्लाज्म का डी.एन.ए. फ्रिंगर प्रिंटिग (DNA Finger Printing of Crop Germ Plasm)

कुछ दशकों पूर्व फसली पादप तथा उनके अन्य सम्बन्धियों के आनुवंशिक संगठन की जानकारी उनके प्रजनन विज्ञान, शारीरिक लक्षण, पेडिग्री अभिलेख (pedigree record), प्रजनन व्यवहार, स्वस्थाने (in situ) तथा बाह्य स्थाने (ex situ) कृषि लक्षणों के संरक्षण, गुणसूत्र संरचना तथा व्यवहार एवं प्रोटीन चिन्हको पर आधारित होती थी । आजकल RFLP के माध्यम से प्राप्त आनुवंशिक आँकड़े वर्गिकी, आनुवंशिकी तथा विकासीय सूचनाओं के विश्लेषण के लिए प्रयुक्त होते हैं । डी.एन.ए. अनुक्रमण में विविधता, इन आणविक चिन्हको को अधिक विश्लेषक बनाती है । मिनी सैटेलाइट तथा माइक्रोसैटेलाइट चिन्हको से प्राप्त आंकड़े भी जीनीय विविधता के अन्वेषण हेतु डी.एन.ए. फिंगर प्रिंटिग के लिए प्रयुक्त होते हैं । यह फिंगर प्रिटिग पादप प्रजातियों के संरक्षण, पंजीकरण, प्रमाणीकरण तथा पेंटेंट में उपयोगी है । पादप के आनुवंशिक स्रोतों के प्रबंधन व उन्नयन में भी डी.एन.ए. चिन्हक उपयोगी है । प्रोटीन तथा आकारिकीय चिन्हको की अपेक्षा, आनुवंशिक विविधता के निर्धारण हेतु डी.एन.ए. चिन्हक अधिक युक्तिसंगत है । भविष्य में ये डी.एन.ए. आधारित परीक्षण (test) आनुवंशिक पहचान हेतु बहुमूल्य सिद्ध होंगे ।

14.3.7 आण्विक विविधता के आधार पर संकर ओज की भविष्यवाणी (Prediction of Heterosis based on Molecular Diveristy)

पादप प्रजनन कार्यक्रमों में सकर ओज की भविष्यवाणी बहुत महतवपूर्ण है । आण्विक मानचित्रों की उपलब्धता, संकर के लक्षणों के बारे में ज्यादा सटीक जानकारी देती है तथा खेत में विविक्तिकरण (screening) में लगने वाले समय एवं श्रम से बचाती है । फसली पादपों में कोशिकाद्रव्यी नरबंध्यता (Cytoplasmic Male Sterlity - CMS) की आनुवंशिकता का माइटोकॉण्ड्रियल जीनोम के माध्यम से होना, आण्विक चिन्हको के आधार पर ही सत्यापित किया गया है ।

RFLP मानचित्रण बनाम पारम्परिक मानचित्रण एवं सहलग्नता विश्लेषण **(RFLP Maps Verseus Coventional Maps and Linkage Analysis)**

RFLP मानचित्रण का मुख्य उद्देश्य होता है ऐसा संतृप्त आणविक मानचित्र तैयार करना, जिस पर RFLP चिन्हक पूरे गुणसूत्र में 10-20 सेन्टीमोरगन (cm) की दूरी पर समान रुप से वितरित होते है । इस प्रकार के मानचित्र में पारम्परिक रुप से ज्ञात कोई भी जीन RFLP चिन्हक से कुछ सेन्टीमोरगन की दूरी पर ही स्थित होता है इस प्रकार यदि पारम्परिक आनुवंशिक मानचित्र लगभग 1500 सेन्टीमोरगन का है तो एक संतृप्त मानचित्र पर कम से कम 150 समान रुप से वितरित RFLP चिन्हक होंगे । RFLP मानचित्रण के निर्माण के तुरन्त बाद यह आवश्यक है कि इन चिन्हको के साथ उपलब्ध पारम्परिक आनुवंशिक मानचित्र में सहलग्न समूहों (linkage groups) की स्थापना की जायें ।

एक बार RFLP मानचित्र बनने के बाद इस मानचित्र के ऊपर पारम्परिक जीनों को स्थापित किया जाता है इसके लिए यह आवश्यक है कि जिस समष्टि (population) के लिए मानचित्रण किया जा रहा है उसमें पारम्परिक जीन तथा RFLP चिन्हक विसयोजित हो ।

इस मानचित्र के आधार पर उपलब्ध आकड़ों से सहलग्नता विश्लेषण (linkage analysis) संभव है । आनुवंशिक मानचित्रण एवं सहलग्नता विश्लेषण हेतु कम्प्यूटर प्रोग्रेम Linkage-1 तथा Mapmaker सोफ्टवेयर उपलब्ध है ।

चिन्हको के सहलग्नता एवम् विसंयोजन के विश्लेषण के लिए "काई स्क्वेयर टेस्ट" (Chi-squre test) किया जाता है ।

बोध प्रश्न

7. जौ के सात गुणसूत्रों के मानचित्रण हेतु ..... चिन्हको का उपयोग किया गया है -
8. सहलग्न चिन्हको को प्राप्त करने का सबसे प्रभावी तरीका है -
   .....
9. ऐसे आनुवंशिक लक्षणों के स्थल जो एक से अधिक जीनों द्वारा नियंत्रित होते हैं, कहलाते है -
   .....
10. आर्थोलोगस जीनों की स्थितिक क्लोंनिग हेतु आवश्यक है -
    .....
11. सहलग्नता विश्लेषण आधारित होते हैं -
    .....

14.4 सारांश (Summary) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप सभी जान गए होंगे कि आण्विक चिन्हको के विभिन्न प्रकारों का ज्ञान पादप जैव प्रौद्योगिकी में कितना उपयोगी है । इनकी विश्वसनीयता ने अन्य सभी चिन्हको के प्रयोग से इन्हें श्रेष्ठ सिद्ध किया है । इन आण्विक चिन्हको के माध्यम से तैयार किए गए मानचित्र न केवल जीनोम सम्बन्धी सूचनाऐं प्रदान करते हैं बल्कि पादप प्रजनन हेतु भी नए आयाम स्थापित कर रहे हैं ।

14.5 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. RFLP
2. विलियम्स तथा उसके साथियों ने
3. STS
4. माइक्रोसैटेलाइट तथा मिनीसैटेलाइट चिन्हक
5. SSCP
6. AFLP

7. 600
8. निकट समजीन क्रम (NIL)
9. मात्रात्मक लक्षण स्थल (QTL)
10. तुलनात्मक मानचित्रण
11. RFLP मानचित्रों पर

14.8 अभ्यासार्थ प्रश्न (Excercise Qeustions) :

1. निम्न पर संक्षिप्त टिप्पणी लिखें -
   a. RAPD
   b. RFLP
   c. AFLP
   d. SSCP
   e. सहलग्नता विश्लेषण
2. आण्विक चिन्हको के अनुप्रयोगों पर विस्तृत लेख लिखें ।

14.7 शब्दावली (Glossary) :

1.	आकारिकीय लक्षण	Morphological Trait
2.	आण्विक चिन्हक	Molecular Marker
3.	आनुवंशिक मानचित्रण	Genetic Mapping
4.	संकर ओज	Heterosis
5.	सहलग्नता विश्लेषण	Linkage

14.8 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. दुबे, ए टेक्सट बुक ऑफ बॉयोटेक्मोलॉजी, एस. चाद एण्ड कम्पनी, नई दिल्ली ।
2. चेन्नारयप्पा, मोलीक्यूलर बॉयोटेक्मोलॉजी. प्रिंसिपल्स एण्ड प्रेक्टिस, यूनिवर्सिटी प्रेस, हैदराबाद।
3. गुजा, मोलीक्यूलर बॉयोलोजी एण्ड जेनेटिक इंजीनियरिंग, रस्तोगी पब्लिकेशन्स, मेरठ ।

इकाई 15

पराजीनी पादप

(Transgenic Plants)

इकाई की रूपरेखा

15.0 उद्देश्य

15.1 प्रस्तावना

15.2 जीन

15.2.1 जीन परिचय एवं परिभाषा

15.2.2 जीन नियमन

15.2.3 आनुवंशिक कूट

15.2.4 फसल सुधार की दृष्टि से जीन की रचना में परिवर्तन जीनोम तथा जीन पूल

15.3 जीनोम तथा जीन पूल

15.3.1 परिचय

15.3.2 जीनोमिकी - संरचनात्मक, प्रकार्यात्मक एवं तुलनात्मक

15.3.3 जीनोम अनुक्रमण

15.3.4 जीनोम मानचित्रण

15.3.5 cDNA व जीनोमिक लाइब्रेरी

15.4 आधारभूत पराजीनिकता

15.4.1 परिचय

15.4.2 पराजीनी पादप प्राप्त करने के मुख्य चरण

15.5 अभाव प्रतिरोधकता

15.6 उत्पादन, वृद्धि तथा पोषण गुणवत्ता हेतु पराजीनी पादप

15.6.1 शाकनाशी प्रतिरोधी

15.6.2 रोग प्रतिरोधी - वाइरस, जीवाणु तथा कवक प्रतिरोधी

15.6.3 कीट-पीड़क प्रतिरोधी

15.6.4 नरबच्चता तथा संकर बीज उत्पादन हेतु पराजीनी पादप

15.6.5 खाद्य प्रसंस्करण हेतु पराजीनी पादप

15.6.6 पौधों में नाइट्रोजन स्थिरीकरण बढ़ाने हेतु पराजीनी पादप

15.6.7 चिकित्सा के क्षेत्र में पराजीनी पादप

15.7 पराजीनी पादपों के कुछ उदाहरण

15.7.1 द्विबीजपत्री पराजीनी पादप

15.7.2 एकबीजपत्री पराजीनी पादप

15.8 भारत में पराजीनी पादप-संभावनाएँ एवं विकास
15.9 आण्विक खेती
15.10 सारांश
15.11 बोध प्रश्नों के उत्तर
15.12 अभ्यासार्थ प्रश्न
15.13 शब्दावली
15.14 संदर्भ ग्रन्थ

15.0 उद्देश्य (Objectives)

प्रस्तुत इकाई में हम यह समझेंगे कि साधारण पादपों से पराजीनी पादप कैसे प्राप्त किए जा सकते हैं, साथ ही हम यह भी जानेंगे कि पराजीनी पादपों के उपयोग से हमें कृषि, उत्पादन तथा पोषण गुणवत्ता के क्षेत्र में क्या सफलतायें मिली हैं तथा क्या शोध कार्य चल रहे हैं, इसके अलावा आण्विक खेती के बारे में भी पढ़ेंगे । बोध प्रश्नों की सहायता से विद्यार्थीगण बीच-बीच में स्वयं को जाँच भी सकेंगें ।

15.1 प्रस्तावना (Introduction)

जीन अभियान्त्रिकी द्वारा आनुवांशिक विविधता, जो फसल सुधार अर्थात् पादप किस्मों की प्रजातियों में सुधार के लिए आवश्यक है, आसानी से लाई जा सकती है । सर्वप्रथम 1983 में विचित्रक (chimeric) पादप ऊतक में समायोजित जीन की सफल अभिव्यक्ति देखी गई । जीन रूपान्तरण व स्थानान्तरण के प्रयोग बीसवीं शताब्दी से ही आरम्भ हो गऐ थे । इस संदर्भ में **ग्रिफिथ** (Griffith) का नाम सबसे पहले आता है जिन्होंने 1928 में चूहों पर जीवाणु *डिप्लोकोकस न्यूमोनी* के दो प्रभेदों का प्रयोग कर रुपान्तरण प्रदर्शित किया था ।

इसी प्रकार **हर्शे एवं चेज** (1952) ने जीवाणु, वाइरस व **फ्रैन्क्रल एवं कोनार्ट** (Franckel and Konart) ने तम्बाकू मोजेक वाइरस पर विभिन्न प्रयोगों से रुपान्तरण की किया दर्शाई । कई वर्षों के अनुसंधानों व प्रयोगों के आधार पर 1972 में **डोय व अन्य** (Doy *et al*.) ने ऐरेडिपोप्सिस व टमाटर में यह प्रक्रिया दर्शाई । इन्होंने इन पौधों के कैलस संवर्धों का जीन रुपान्तरण λ भोजी वाइरस के DNA द्वारा सफलतापूर्वक करवाया । इस प्रकार के बाहरी DNA द्वारा रूपान्तरण **ट्रान्सजेनेसिस** (Transgenesis) कहलाता है । इस प्रक्रिया से उत्पन्न पौधों को पराजीनी अथवा ट्रान्सजेनिक पादप कहते हैं । उच्च पादपों में जीन अभियान्त्रिकी क्रिया द्वारा जीन स्थानान्तरण कठिन होता है, क्योंकि -

(क) सूक्ष्मजीवों की अरोक्षा पादपों का जीनोम बहुत बड़ा होता है ।

(ख) पादपों की विकास व वृद्धि की प्रक्रिया अत्यन्त जटिल होती है अत: स्थानान्तरण से पहले पूरी जानकारी होनी परमावश्यक है ।

इन कठिनाईयों के बावजूद भी कई पादपों में सफलतापूर्वक जीन स्थानान्तरण किया जा चुका है जिनमें विभिन्न कुलों के पचास से भी अधिक पादप शामिल है ।

15.2 जीन (Gene)

15.2.1 जीन परिचय एवं परिभाषा (Gene Introduction and definition)

जीन शब्द को एक ग्रीक शब्द जैनेटिक्स से लिया गया है जिसका अर्थ है उत्पन्न होना अथवा पैदा होना । सन् 1909 में पहली बार **जॉहनसन** (Johannson) ने इस शब्द का प्रयोग किया । बाद में **टी.एच. मौरगन** (1T.H. Morgan) ने कणिकीय जीन सिद्धान्त प्रतिपादित किया जिसके अनुसार गुणसूत्रों पर जीन गाँठों के समान संरचनाएँ होती है । इस कार्य के लिए मौरगन को नोबेल पुरस्कार से सम्मानित किया गया । किन्तु DNA की आनुवंशिक सूचनाओं के वाहक के रूप में पुष्टि होने पर यह सिद्धान्त अमान्य हो गया । **एवरी, मक्लियोड एवं मककार्थी** (Avery, Mcleod and McCarthy) ने सर्वप्रथम DNA के आनुवंशिक पदार्थ होने की पुष्टि प्रयोगों द्वारा की । कुछ वाइरसों में RNA भी आनुवांशिक पदार्थ होता है । यह माना गया कि जीन DNA पर उपस्थित होते हैं । जीन की चिरसम्मत (clasical) अवधारणा के अनुसार जीन, कार्यिकी (physiology), गुणों के संचरण (Transmission of traits) तथा उत्परिवर्तन (mutation) की इकाई हैं । विलगित जीन की संरचना सबसे पहले **शेपीरो व साथियों** ने प्रकाशित की । इन्होंने लैक ओपेरौन (Lac Operon) का शुद्धिकरण कर इसके चित्र लिए थे । 1941 में **बीडल व टैटम** (Beadle and Tatum) ने न्यूरोस्पोरा पर कार्य कर यह स्पष्ट कर दिया कि जीन वे क्रियात्मक इकाइयाँ हैं जो आनुवंशिक गुणों को पीढ़ी दर पीढ़ी वहन करती हैं । 1958 में **बीडल टैटम तथा लेडरबर्ग** (Beedle, Tatum and Lederberg) को कार्यिकी आनुवंशिकी के लिए नोबेल पुरस्कार दिया गया।

आधुनिक अवधारणा के अनुसार जीन की निम्न परिभाषा दी जाती है - "डी.एन.ए. का छोटे से छोटा वह खण्ड जो एक संरचनात्मक व क्रियात्मक विशेषक हेतु निर्धारित होता है तथा जो पॉलीन्यूक्लियोटाइडो से बना होता है, जीन कहलाता है ।"

हम यह जानते हैं कि प्रत्येक कोशिका में एक केन्द्रक होता है जिसमें गुणसूत्र होते हैं । इन्हीं गुणसूत्रों में जीन उपस्थित होते हैं । किसी जीव में जो भी लक्षण होते हैं वे सभी इन जीनों के कारण होते हैं । अर्थात् DNA का वह खण्ड जो किसी लक्षण अथवा गुणधर्म को निर्धारित करे, जीन कहलाता है । ये जीन प्रोटीन का उत्पादन करते हैं तथा वही किसी जीव की क्षमताओं, गुणधर्मों तथा लक्षणों का निर्धारण करते हैं ।

अब यह स्पष्ट हो गया है कि जीन अविभेदित इकाई न होकर छोटी-छोटी उपइकाइयों की बनी होती है । इन इकाइयों को सिस्ट्रॉन (Cistron), रेकोन (Recon) एवं म्यूटॉन (Muton) कहा जाता है । जीन की सिस व ट्रॉस स्थिति कार्य प्रणाली को प्रभावित करती है अत: बेन्जर (Benzer) ने इस क्रियात्मक जीन को सिस्ट्रॉन (Cistron) कहा ।

(i) सिस्ट्रॉन (Cistron)

आनुवंशिक जीनीय विश्लेषणों से यह सिद्ध हो चुका है कि जीन, क्रियात्मक, पुर्नसंयुग्मन तथा उत्परिवर्तन हेतु एक इकाई की तरह व्यवहार नहीं करता है । अत: यह आवश्यक हो जाता है क्रियात्मक, पुर्नसंयुग्मन तथा उत्परिवर्तन हेतु जीनीय इकाई को परिभाषित किया जायें । इस दृष्टिकोण को ध्यान में रखते हुए

बेन्जर (Benzer) ने सिस्ट्रॉन को जीन की क्रियात्मक इकाई के रुप में परिभाषित किया तथा यह सिस-ट्रॉन्स (cis-trans) परीक्षण पर आधारित था ।

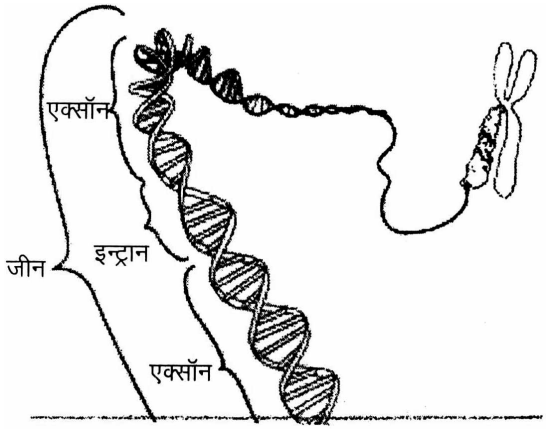
ii) रेकोन (Recon)

पहले ऐसा माना जाता था कि संभावतया जीन विनिमय की घटना दो जीनों के मध्य ही हो सकती है । किन्तु बेन्जर के अनुसार यह एक क्रियात्मक जीन अर्थात् सिस्ट्रॉन के बीच हो सकती है । एक सिस्ट्रॉन में कई पुनर्योजी इकाइयाँ होती हैं । इन्हें ही रेकोन कहा है । अत: यह स्पष्ट हो जाता है कि जीन विनिमय की घटना जीन के अंदर ही प्रतिपादित होती है तथा रेकोन जो कि जीन की पुनर्योजी इकाई है, उसकी क्रिया इकाई से अर्थात सिस्ट्रॉन से छोटी होती है ।

iii) म्यूटॉन (Muton)

बेन्जर ने यह स्पष्ट किया कि गुणसूत्र की छोटी से छोटी वह इकाई जो उत्परिवर्तन में भाग लेने में सक्षम होती है, म्यूटॉन कहलाती है । इसका अर्थ यह हुआ कि यह इकाई न्यूक्लियोटाइड है क्योंकि DNA की वह सबसे छोटी इकाई जो उत्परिवर्तित हो सके वह न्यूक्लियोटाइड ही होती है । इससे यह भी स्पष्ट हो जाता है कि एक जीन कई सिस्ट्रॉनों की बनी होती है, एक सिस्ट्रॉन कई रेकोनों की तथा एक रेकोन एक या अधिक म्यूटॉनों की बनी होती है ।

1970 के दशक में कुछ प्राणी वाइरसों में यह पाया गया कि पॉलीपेप्टाइडों को कोडित करने वाली DNA श्रृंखलाऐ सतत् न हो कर छोटे-छोटे खण्डों में उपस्थित होती है । **गिल्बर्ट** (Gilbert) ने इन्हें इन्ट्रोन (intron)ऐ नाम दिया । इन्हें अलग-अलग रुप से बाधित जीन (interrupted gene), इंसर्ट्स (inserts) तथा जंक DNA (Junk DNA) भी कहा गया (चित्र 15.1) ।



चित्र 15.1 : जीन एक्जॉन व इन्ट्रॉन दर्शाते हुए ।

इन्हे विपाटित जीन (split gene) कहा गया । इनकी खोज के लिए रिचर्ड जे. रॉबर्ट (Richard J. Robert) एवं फिलिप शार्प (Philip Sharp) को 1993 में नोबेल पुरस्कार दिया गया ।

15.2.2 जीन नियमन (Gene Regulation)

एक कोशिका में उपस्थित गुणसूत्रों में कई जीन्स उपस्थित होते हैं । ये सभी क्या एक साथ एक समय में अभिव्यक्त होते हैं? नहीं । एक समय में कुछ ही जीन अभिव्यक्त होते हैं तथा शेष की अभिव्यक्ति आवश्यकता पड़ने पर ही होती है । इस आवश्यकता का नियन्त्रण कई प्रकार से होता है जैसे कोशिकीय

स्तर पर अथवा अनुलेखन, अनुवादन या पश्च अनुवादन स्तर पर । एफ. जैकब एवं जे. मोनोड (F. Jacob and J. Monad) ने सर्वप्रथम ओपेरॉन मॉडल (operon model) दिया । ओपेरॉन वास्तव में जीन प्रदर्शन की वह सम्पूर्ण इकाई होती है जो दो भागों से निर्मित होती है अर्थात् संरचनात्मक जीन व संचालक जीन ।

i) संरचनात्मक जीन (Controller Gene)

संरचनात्मक जीन स्वतन्त्र रूप से m-RNA अणु को अनुलेखित करता है तथा इसमें तीन जीन (Z,Y,A)उपस्थित होते हैं । इन जीनों से क्रमश: β -गैलेक्टोसाइडेज, परमिएज व एसिटाइलेज एन्जाइमों का संश्लेषण होता है।

ii) संचालक जीन (Controller Gene)

ओपेरोन का यह भाग तीन इकाईयों से बना होता है -

(क) नियामक जीन (Regular Gene - I)

(ख) प्रमोटर जीन (Promoter Gene - P)

(ग) ओापरेटर जीन (Operator Gene - O)

(क) नियामक जीन

यह जीन सक्रिय तथा निष्क्रिय प्रकार का होता है तथा प्रोटीन को कोडित करता है । यह संरचनात्मक जीन का अनुलेखन नियन्त्रित करता है ।

(ख) प्रमोटर जीन

इसमें पेलिन्ड्रोमिक श्रृंखलाएँ पाई जाती है । इन श्रृंखलाओं की पहचान उन प्रोटीनों द्वारा होती है जिनमें सममिताकार रुप से व्यवस्थित उपइकाईयाँ उपस्थित हों । प्रमोटर जीन लगभग 100 न्यूक्लियोटाइड लम्बा होता है । यह cAMP व CRP संकुल अनुलेखन में सहायक होता है ।

(ग) ऑपरेटर जीन

यह लैक-2 (Lac-2) जीन के पास उपस्थित होता है तथा लगभग 20 क्षार युग्मों का बना होता है । ये क्षार युग्म पेलिन्ड्रोमिक प्रकार के होते हैं । रिप्रेसर प्रोटीन इसके साथ बन्धित होता है तथा प्रमोटर क्षेत्र को डी.एन.एज (DNAase) एन्जाइम द्वारा पाचित होने से बचाता है । ऑपरेटर जीन का एक भाग प्रमोटर जीन के साथ अतिव्यापित रहता है । रिप्रेसर जीन के इसके साथ बंधित होने पर Z, Y, A संरचनात्मक जीन का अनुलेखन भी अवरूद्ध हो जाता है । ऑपेरोन परिपथ का नियन्त्रण नियामक जीन द्वारा होता है ।

जीन नियमन प्रोकैरियोट्स में अनेक विधियों द्वारा सम्पन्न होता है -

(क) एन्जाइम प्रेरण द्वारा

(ख) एन्जाइम अवमंदन द्वारा

(ग) लैक्टोज ओपेरॉन तथा धनात्मक अनुलेखन नियन्त्रण

(घ) लैक्टोज ओपेरॉन तथा धनात्मक अनुलेखन नियन्त्रण

(ङ) ट्रिप्टोफेन ओपेरॉन

(च) एंटीटर्मिनेशन

इसी प्रकार यूकैरियोट्स में जीन नियन्त्रण धनात्मक विधि से होता है । इसका मॉडल डेविडसन-ब्रीटिन (Davidsom - Britten) ने दिया था । इसे ब्रिटिन-डेविडसन मॉडल अथवा जीन बैटरी मॉडल कहा जाता है । इसके अनुसार चार प्रकार के स्थल उपस्थित होते हैं -

(i) **प्रोड्यूसर जीन (Producer Gene)** - यह प्रोकैरियोट्स की संरचनात्मक जीन की तरह होता है ।

(ii) **रिसेप्टर स्थल (Receptor Site)** - संरचनात्मक जीन के बाईं ओर यह स्थल होता है । यह उसी गुणसूत्र अथवा दूसरे जोडे पर उपस्थित हो सकता है ।

(iii) **इन्टीग्रेटर जीन (Integrator Gene)** - यह प्रोकैरियोट्स में उपस्थित नियामक जीन की तरह होता है तथा यह एक एक्टीवेटर RNA का निर्माण करता है जो एक नये प्रकार के प्रोटीन का संश्लेषण करता है ।

(iv) **संवेदी स्थल (Sensor Site)** - यह इंटीग्रेटर जीन के निकट ही उपस्थित होता है तथा इसमें विशिष्ट एन्जाइम के सब्स्ट्रेट स्थल को पहचानने की क्षमता होती है । जिस समय सब्स्ट्रेट, सेन्सर स्थल से बंधित होता है तब इंटीग्रेटर जीन सक्रिय हो कर एक्टीवेटर RNA का अनुलेखन करता है ।

एक्टीवेटर RNA गुणसूत्र पर ग्राही स्थल के साथ बंधित होकर संरचनात्मक जीन का अनुलेखन प्रारम्भ करता है । यह संरचनात्मक जीन विषमांगी RNA (Ln-RNA)का संश्लेषण करता है तथा यही RNA संसाधन द्वारा m-RNA में रुपांतरित हो जाता है । यह m-RNA प्रोटीन संश्लेषण में भाग लेता है।

15.2.3 आनुवांशिक कूट (Genetic Code)

हम सब जानते हैं कि न्यूक्लिक अम्लों में आनुवंशिक सूचनाएँ निहित होती हैं । न्यूक्लिक अम्ल स्वयं पॉलीन्यूक्लियोटाइड होते हैं तथा ये सूवनाएँ पॉलीन्यूक्लियोटाइड से पॉलीपेप्टाइड में स्थानान्तरित होती हैं । हम यह भी जानते हैं कि एक DNA के अणु में चार नाइट्रोजन क्षार उपस्थित होते हैं । ये है एडीनीन (A), गुआनीन (G), थाइमीन (T) तथा साइटोसीन (C) । ये नाइट्रोजन क्षार न्यूक्लियोटाइड का संघटन करते हैं । DNA के अन्य घटक डीऑक्सीराइबोज शर्करा तथा फॉस्फोरिक अम्ल होते हैं । इन सबमें केवल नाइट्रोजन क्षार में परिवर्तन होता है । प्रकृति में उपरिथत 20 प्रकार के अमीनो अम्ल अनेक प्रोटीनों का संश्लेषण करते हैं । DNA से इन प्रोटीनों तक आनुवंशिक सूचनाएँ m-RNA प्रवाहित करता है । m-RNA के निर्देशन में ही प्रोटीन का संश्लेषण होता है और यह तभी संभव हो पाता है जब आनुवंशिक कूट का उद्ववविकास हुआ हो । m-RNA में उपस्थित यह कूट ही आनुवंशिक कूट कहलाता है । कोई भी संदेश जो ऐसे कूट के रुप में होता है, उसे क्रिप्टोग्राम (Cryptogram) कहा जाता है ।

एफ.एच.सी. क्रिक (F.H.C. Crick) के सिद्धान्त के अनुसार m-RNA में आनुवंशिक कूट होता है तथा इसकी सबसे छोटी इकाई कोडोन (codon) होती है । यह कोडोन m-RNA पर उपस्थित तीन न्यूक्लियोटाइड की श्रृंखला होती है जो किसी विशेष अमीनो अम्ल को निरुपित करती है । आनुवंशिक कोड इन समस्त न्यूक्लियोटाइडों की श्रृखलाएँ होती है जिनमें प्रोटीन संश्लेषण की सूचनाएँ निहित हों

। इस सिद्धान्त के अनुसार कोडोन की त्रिक प्रकृति होती है अर्थात् आनुवांशिक कोड **त्रिक** (triplet) प्रकार का होता है ।

आनुवांशिक कूट के अनुसार इकसठ कोडोन अमीनो अम्लों को निरुपित करते हैं । इनमें से चार कोडोन संकेतात्मक होते हैं अर्थात् AUG कोडोन श्रृंखला आरम्भन तथा UAA,UAG तथा UGA श्रृंखला समाप्ति के संकेत होते हैं । इसी प्रकार प्रोकैरियोटिक जीवों में श्रृंखला आरम्भन का संकेत GUG भी होता है । (सारणी 1)

सारणी 1 : **RNA** का जीनीय शब्दकोष (The Trincleotide codon written in 5 → 3 direcetion)

A
C
G
U

Single code 4 x 1 = 4 codons

AA	AC	AG	AU
CC	CA	CG	CU
GG	GU	GC	GA
UU	UG	UA	UC

Dobule code 4 x 4 = 16 codons

(A) (B)

	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA*Stop	UGA *Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG*Stop	UGG Trip	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	ACC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Ile	ACG Thr	AAG Lys	AGC Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

आनुवंशिक कूटों के गुण

i) कोडीन सदैव त्रिक (triplet) होता है ।

ii) कोडोन अपभ्रष्ट (degenerate) होता है ।

iii) कोडोन में अतिव्यापन (overlapping) नहीं होती है ।

iv) कोडोन संदिग्ध (ambiguous) नहीं होता है ।

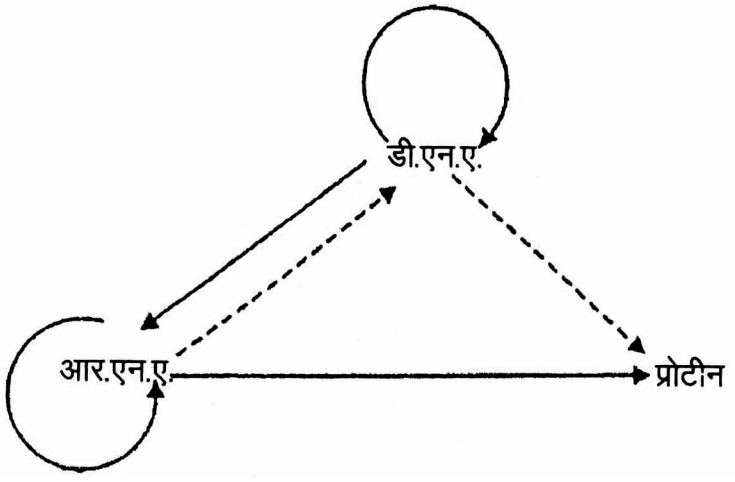
v) कोडोन में कोमा (comma) नहीं होता है ।

vi) कोड में ध्रुवता (polarity) उपस्थित होती है ।

vii) कोड सदैव सार्वत्रिक (universal) होता है ।

viii) श्रृंखला आरंभन (initation) तथा श्रृंखला समापन (termination) कोडोन उपस्थित होते हैं ।

ix) क्रिक के अनुसार आनुवांशिक सूचनाएँ सदैव एक ही दिशा में अर्थात् DNA से RNA में तथा RNA से प्रोटीन में प्रवाहित होती हैं । यह प्रवाह सेन्ट्रल डोगमा (Central Dogma) कहलाता है । (चित्र 15.2)



चित्र 15.2 : सेन्ट्रल डॉगमा



x) यदि किसी समय RNA से DNA का निर्माण हो जैसे राऊ सारकोमा वाइरस (Rous sarcoma Virus) तब यह क्रिया व्युत्क्रम अनुलेखन (Reverse transcription) कहलाती है ।

आनुवांशिक संकेतों का कटूवाचन

हम जान चुके हैं कि DNA में उपस्थित आनुवंशिक सूचनाएँ नाइट्रोजन क्षारों की श्रृंखला के रूप में होती है । ये सभी सूचनाएँ DNA से RNA में अनुलेखन द्वारा तथा RNA से प्रोटीन में अनुवादन द्वारा स्थानान्तरित होती है । पात्र संश्लेषण की विधि से सभी 20 अमीनो अम्लों के कोडोनों का पता लगाया जा चुका है जो सारणी-2 में देखा जा सकता है -

सारणी 2. विभिन्न अमीनो अम्ल तथा उनके कोडोन

S.No.	Amino Acid	Abbreviation	DNA-Code	mRNA Transcription
1.	Alanine	Ala	CGA.GCC,GGT,CGC	GCU,GCC,GCA,GCG

2.	Arginine	Arg	GCA,GCT,GCC,TCT, GCG,TCC	CGU,CGA,CGG,AGA, CGC, AGG
3.	Aspargine	Asn	TTA,TTG	AAU,AAC
4.	Aspartic acid	Asp	CTA,CTG	GAU,GAC
5.	Cystein	Cys	ACA,ACG	UGU,UGC
6.	Glutamine	Gln	GTT,GTC	CAA,CAG
7.	Glutamie Acid	Glu	CTT,CTC	GAA,GAG
8.	Glycine	Gly	CCA,CCG,CCT,CCC	GGU,GGC,GGA,GGG
9.	Histidine	His	GTA,GTG	CAU,CAC
10.	Isoleucine	Ile	TAT,TAA,TAG	AUA,AUU,AUC
11.	Leucine	Leu	AAT,AAC,GAA,GAG, GAT,GAC	UUA,UUG,CUU,CUC, CUA, CUG
12.	Lysine	Lys	TTT,TTC	AAA,AAG
13.	Methionine	Met	TAC	AUG
14.	Phenylalanin e	Phe	AAA,AAG	UUU,UUC
15.	Proline	Pro	GGA,GGG,GGT,GG C	CCU,CCC,CCA,CCG
16.	Serine	Ser	AGA,AGG,AGT,AGC, TCA,TCG	UCU,UCC,UCA,UCG, AGU, AGC
17.	Theeonine	Thr	TGA,TGG,TGT,TGC	ACU,ACC,ACA,AGG
18.	Tryptophan	Trp	ACC	UGG
19.	Tyrosine	Tyr	ATA,ATG	UAU,UAC
20.	Valine	Val	CAA,CAG,CAT,CAC	GUU,GUC,GUA,UGU
21.	Terminatin Codon		ATT,ATC,ACT	UAA,UAG,UGA

इस प्रकार हमने यह समझा कि आनुवंशिक जगत में आनुवंशिक कूट की कितनी महत्ता है । ये भी विभिन्न जीवों में पाये जाने वाले अन्तर के लिए उत्तरदायी हैं तथा संरचनात्मक एवं क्रियात्मक विभिन्नता उत्पन्न करते हैं । अलग-अलग प्रोटीनों का निर्माण पूर्णतया इन्हीं पर निर्भर करता है ।

15.2.4 फसल सुधार की दृष्टि से जीन की रचना में परिवर्तन (Changes in Structure of Gene with Respect to Crop Improvement)

हम सब जानते हैं कि जीन आने वाली पीढियों में अपरिवर्तित रुप से संप्रेषित होते हैं । स्वत: उत्परिवर्तन के कारण प्रत्येक पीढ़ी में 10^{-4} से लेकर 10^{-7} प्रति जीन की दर से कुछ आशिक बदलाव होते रहते हैं ।

उत्परिवर्तन (mutations) जीवों में आनुवंशिक विविधता के स्त्रोत होते हैं । यही विविधता पुनर्योजन तकनीक द्वारा भी लाई जा सकती है तथा इसका उपयोग फसल सुधार में किया जा सकता है । जीन संप्रेषण की प्राकृतिक विधियों का उपयोग करके दूरस्थ वर्गकों (taxa) में जीन स्थानान्तरण नहीं किया जा सकता है । इसकी कुछ सीमायें हैं, जो निम्न है -

जीन स्थानान्तरण की प्राकृतिक विधियां बहुत कम परिशुद्ध होती हैं जिससे वांछित जीन संयोजन प्राप्त करना कठिन होता है ।

(क) इनसे बहुत अधिक व दूरस्थ प्रजातियों में जीन स्थानान्तरण नहीं किया जा सकता है ।

(ख) यही कारण है कि पुनर्योजन प्लम तकनीक विकसित की गई है जिसके बारे में हम आगे पढ़ेंगे।

किसी जीन द्वारा उत्पन्न प्रोटीन का अमीनो एसिड क्रम पता करने पर उसके क्षारक क्रम को ज्ञात कर सकते हैं । इस क्षारक क्रम के पॉलीन्यूक्लियोटाहडों का रासायनिक संश्लेषण किया जा सकता है । संपूर्ण जीन का संश्लेषण 50 न्यूक्लियोटाइडों तक के खण्डों का उपयोग करके किया जाता है । पूरे जीन को ऐसे खण्डों में संश्लेषित किया जाता है कि प्रत्येक खण्ड अपने पूरक रज्जुक के दो पास के खण्डों के कुछ भाग का पूरक (complementary) हो । सभी ऐसे खण्डों को जोड़ने पर वे पूरक क्षारक युग्मन के कारण सही क्रम में संरेखित हो जाते हैं व जीन का द्विरज्जुकी स्वरूप बना लेते हैं । इनके पड़ोसी छोर लाइगेज एन्जाइम द्वारा जोड़ दिये जाते है । संपूर्ण जीन का रासायनिक संश्लेषण तभी करते हैं जब प्राकृतिक जीन के क्षारक क्रमों में परिवर्तन करना आवश्यक हो जैसे *बैसिलस थुरिजिंऐन्सिस* (*Bacillus thuringiensis*) के cry gene का क्षारक क्रम परिवर्तित करके इस प्ररिवर्तित जीन का रासायनिक संश्लोश्ण सफलतापूर्वक कर लिया गया है । आगे हम इसके बारे में विस्तार से पढेंगे ।

15.3 जीनोम तथा जीन पूल (Genome and Gene Pool) :

15.3.1 परिचय (Introduction)

किसी अगुणित कोशिका में उपस्थित जीनों के कुल समूह को जीनोम कहते हैं । प्रोकैरियोट्स के जीनोम का आकार यूकैरियोटिक जीवों के जीनोम की तुलना में कम होता है । किन्तु यहाँ एक बात समझनी आवश्यक है कि जीनोम के आकार व यूकैरियोटिक जोंवों में जटिलता के बीच कोई सम्बन्ध नहीं है । एक कोशिकीय अमीबा **डूबिया** (*Amoeba dubia*) के जीनोम का आकार बहुत बड़ा है जिसमें लगभग 670 बिलियन क्षार युग्म होते हैं । यह मानव जीनोम से भी लगभग 200 गुना बड़ा होता है जिसमें केवल 3 बिलियन क्षार युग्म तथा 20,000-25,000 जीन होते हैं ।

जीनोम का जीन घनत्व उसमें उपस्थित no. of genes per million base pairs से मापी जाती है । इसे मेगाबेस अथवा Mb कहते हैं । यूकैरियोटिक जीनोमों की तुलना में यह प्रोकैरियोटिक जीनोमों में कहीं अधिक होती है । मानव जीनोम का जीन घनत्व लगभग 12–15 जीन/Mb माना जाता है ।

प्रोकैरियोट्स में लगभग सभी जीन एक गोल (circular) DNA के एकल गुणसूत्र पर उपस्थित होते हैं । इनमें तथा कुछ यूकैरियोट्स में प्लाडिमडो पर भी कुछ जीन होते हैं । यूकैरियोटिक जीवों में अनेक लीनियर DNA हैलिक्स DNA-प्रोटीन कॉम्प्लेक्स में परिवेशित रहते हैं । यहां पर यह समझना आवश्यक है जीन के नियामक क्षेत्र व जंक DNA भी जीनोम का हिस्सा माने जाते हैं परन्तु संरचनात्मक क्षेत्र जैसे टिलोमियर क्षेत्र इसका हिस्सा नहीं माना जाता है ।

कुछ जीवों के जीनोमों के आमाप तथा उनमें उपस्थित कुल जीनों की संख्या सारणी 3 में दर्शाई गई है ।

सारणी 3 : कुछ जीवों की जीन संख्या व जीनोम आमाप

क्र.स.	प्रजाति	जिन संख्या	जीनोम आमाप (मेगाबेस युग्म)
1.	माइकोप्लाज्मा जीनेटेलियम	500	0.58
2.	ई. कोलाई	4,400	4.64
3.	ऐरेबिडोप्सिस थालियाना	25,500	13.0
4.	ओराइजा सटाइव (चावल)	20,000	415
5.	ओराइजा मिलेनोगेस्टर	13,700	180
6.	जिया मेज़ (मक्का)	20,000	2,500
7.	होर्डियम वल्गेर (जौ)	20,000	5,300
8.	मानव	35,000	3,300
9.	खमीर	6,548	12.8

पहली बार मानव जीनोम संरचना को क्रमबद्ध रूप में 2001 में प्रस्तुत करने का दावा किया गया था तथा चार पुरूषों का DNA नक्शा तैयार किया गया था । हाल ही में लीडेन यूनिवर्सिटी में किए शोध में दल की एक वैज्ञानिक महिला की जीनोम संरचना के क्रम को श्रृंखलाबद्ध करने की रिपोर्ट आई है । इसकी पुष्टि होनी अभी बाकी है । इस प्रकार DNA की जैविक संरचना को पूर्ण रूप से व्यतरिथत क्रम में विश्लेषण करने को जीनोम विश्लेषण कहते हैं जिसमें जीव से संबंधित सम्पूर्ण आनुवांशिक सूचनाएँ निहित होती हैं ।

जीनोम शब्द का उपयोग सर्वप्रथम **विंकलर** (Winkler) ने 1920 में किया था । इन्होंने वाइरस ताश अन्य सभी जीवों में उपस्थित सारे गुणसूत्री व गुणसूत्री-बाह्य (chromomal and extra chromosomal) जीन समूह के लिए इसका उपयोग किया था ।

15.3.2 जीनोमिकी (Genomics)

जीनोमिकी (Genomics) में जीनोम का सम्पूर्ण चित्रण (Genome mapping), उनके क्षारक अनुक्रमण (Base sequencing) तथा उनके द्वारा कोडित प्रोटीनों के प्रकार्यों को ज्ञात किया जाता है । प्रोटीयोमिकी (Proteomics) में जीनोम में उपस्थित सभी जीनों द्वारा कोडित प्रोटीनों का विस्तृत अध्ययन किया जाता है ।

जीनोमिकी को संरचनात्मक तथा प्रकार्यात्मक (structural and functional) भागों में बांटा गया है ।

i) **संरचनात्मक जीनोमिकी** - इसमें जीवों के सम्पूर्ण जीनोमों के क्षारक क्रम और उनके द्वारा कोडित प्रोटीनों को ज्ञात करते हैं ।

ii) **प्रकार्यात्मक जीनोमिकी -** इसमें जीनों की अभिव्यक्ति का प्रतिरुप तथा इनके उपापचयी पथों का अध्ययन करते हैं ।

इनके अलावा एक और प्रकार की जीनोमिकी होती है जिसे तुलनात्मक जिनोमिकी (comparative genomics) कहते हैं । इसमें विभिन्न जीवों के जीनोमों की संरचना व प्रकार्य का अध्ययन तुलनात्मक रुप से किया जाता है । इसके प्रयोग से कुछ महत्वपूर्ण बातें ज्ञात हुई हैं जो कि निम्न हैं -

i) *माइप्लाज्मा जेनिटेलियम* का जीनोम आमाप 0.58 x 10_6 bp तथा बेसिलस मैगोटेरियम का जीनोम आमाप 30 x 10^6bp देखा गया । अत: जीनोम आमाप में विविधता का ज्ञान हमें तुलनात्मक जीनोमिकी के कारण ही हो सका ।

ii) जीवाणुओं में सदैव प्रारुपी ओपेरॉन होते हैं जैसे ई. कोलाई के जीनोम में लगभग 600 ओपेरॉन होते हैं ।

iii) कुछ जीवाणुओं में जीनोम दो या अधिक वलयाकार गुणसूत्रों से बनता है । इसका अर्थ हुआ कि कम से कम एक की उत्पत्ति अवश्य प्लाज्मिड से होती है ।

iv) **ड्रोसोफिला** तथा मनुष्यों का अनेक रोगों में परिपथ एक जैसा पाया जाता है । अत: ड्रोसोफिला का उपयोग मनुष्यों में कई रोगों के अध्ययन के लिए किया जाता है ।

v) यूकैरियोटिक जीवों के जीनोमों में पुनवर्ती (repetitive) DNA उपस्थित होता है तथा यह अलग परिमाणों में मिलता है । अत: यही DNA जीनोम आमाप में विविधता का प्रमुख कारण होता है ।

vi) जीनोम आमाप बढ़ने के साथ-साथ उनमें उपस्थित जीनों की सघनता कम होती जाती है । जैसे खमीर में जीन सघनता प्रति 2 Kb जीनोम में 1 जीन होती है ।

vii) कुछ पादप प्रजातियों जैसे जौ, मक्का आदि में कुछ क्षेत्रों में जीन बहुत सघन होते हैं । इन सघन खण्डों के बीच में लम्बे व जीन रहित खण्ड होते हैं ।

viii) कुछ जीवाणुओं के जीनोम कुछ यूकैरियोटिक जीवों के जीनोमों से भी बड़े होते हैं ।

ix) जीनोम में उपस्थित अनन्य (Unique) DNA क्रमों की बढती संख्या पर जीनोम की जटिलता निर्भर करती है, न कि जीनोम पर उपस्थित जीनों की संख्या पर ।

x) बहुत अधिक भिन्नता रखने वाले जीवों के जीनोम बहुत कुछ समान हो सकते हैं । जैसे कि मनुष्य व चूहों के जीनोम अनुक्रमों में 97.5% तक समानता पाई जाती है ।

15.3.3 जीनोम अनुक्रमण (Genome Sequencing)

इसके लिए निम्न विधियाँ अपनाई जाती है -

i) जीनोम को सबसे पहले कॉज्मिड या BAC (बैक्टीरियाई कृत्रिम क्रोमोसोम; Bacterial artificial chromosome) खण्डों में विभक्त करते हैं । इन खण्डों को काज्मिड अथवा BAC में क्लोन किया जाता है और अनेक प्रतियाँ प्राप्त कर ली जाती है ।

ii) इन क्लोनों के DNA निवेश्यो से अनुक्रमण करने योग्य लम्बे DNA खण्ड प्राप्त कर लिये जाते हैं । फिर इनका अनुक्रमण किया जाता है ।

iii) इन खण्डों से प्राप्त क्षारक क्रमों को क्रमबद्ध रुप से संरेखित (align) किया जाता है जिससे पूरे गुणसूत्र का तथा इसी प्रकार पूरे जीनोम का क्षारक क्रम ज्ञात किया जा सके ।

iv) यूकैरियोटिक जीवों के जीनोमों के प्रत्येक गुणसूत्र की अलग जीनोम लाइब्रेरी बनाते हैं ।

v) इस प्रकार प्राप्त क्षारक क्रमों को कम्प्यूटर की मदद से क्रमबद्ध कर लेते हैं । इसे अनुक्रमण की शॉट गन विधि (shot-gun method of sequencing) कहते हैं ।

दूसरी विधि क्लोन से क्लोन अथवा काटिगो का दिष्ट अनुक्रमण (Directed sequencing of contings) कहलाती है । इसमें पहले कांटिग क्लोनों का निर्धारण व अनुक्रमण किया जाता है ।

15.3.4 जीनोम चित्र

जीनोम के समस्त गुणसूत्रों के संरचनात्मक व प्रकार्यात्मक संघटन को जीनोम चित्र (genome map) कहते हैं । ये दो प्रकार के होते हैं (1) आनुवंशिक अथवा सहलग्नता चित्र (genetic or linkage maps) तथा (2) भौतिक चित्र (physical maps) । आनुवंशिक चित्रों में विभिन्न चिन्हको (markers) का प्रयोग किया जाता है तथा भौतिक चित्रों में विभिन्न DNA क्रमों की जीनोम के गुणसूत्रों में भौतिक स्थिति दशाई जाती है । जब कभी दोनों प्रकार के चित्रों को एक साथ दर्शाते हैं, तब इसे समेकित चित्र (integrated map) कहा जाता है । यहाँ उपयोग में लाये जाने वाले चिन्हक (marker) वास्तव में DNA के खण्ड या क्रम होते हैं जिन्हें गुणसूत्र चित्रण में चिन्हक जीन की तरह उपयोग में लाया जाता है । अत: इन्हें आण्विक चिन्हक कहते हैं । किसी भी प्रजाति के सभी भिन्न गुणसूत्रों का रैखिक चित्र जिस पर सभी आण्विक चिन्हको की स्थिति दर्शाई हो, उस प्रजाति का आण्विक चित्र (molecular map) कहलाता है । किसी जीव के जीनोम के अध्ययन के लिए इन्हें तैयार किया जाता है । अब तक कई पादपों के आण्विक चित्र तैयार कर लिए गये है ।

इसी प्रकार किसी एकल जनसंख्या अथवा प्रजाति में उपस्थित सभी जीनों की कुल संख्या को जीन पूल कहा जाता है ।

15.3.5 cDNA व जीनोम लाइब्रेरी

आज जैव प्रौद्योगिकी की महत्त्वपूर्ण शाखा पुनर्योजन डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी (Rcombinant DNA Technology) का उपयोग करके मनुष्य ने यह संभव कर दिखाया है कि पूर्णतया भिन्न DNA के अणुओं को जोड़कर नवीन गुणधर्म वाला DNA खण्ड अथवा जीन निर्मित किया जा सकता है । यहाँ यह बताना आवश्यक है कि सर्वप्रथम **डॉ. हरगोविन्द खुराना** (Dr. H.G. Khorana) ने 1970 में परखनली में जीन का संश्लेषण कर लिया था । इस कार्य के लिए उन्हें नोबेल पुरस्कार भी मिला । DNA के खण्डों को पहले विशिष्ट प्रतिबन्धित एन्जाइमों द्वारा काट दिया जाता है तथा फिर इन्हें

आपस में अथवा किसी वाहक खण्ड में जोड़ दिया जाता है । इस पूरी प्रक्रिया के बारे में हम आगे विस्तार से पढ़ेंगे । ऐसे DNA खण्ड काइमेरिक जीन कहलाते हैं । इस प्रकार इस तकनीक ने जीन की संरचना में क्रान्तिकारी परिवर्तन ला दिए हैं ।

प्रतिबंधन एन्जाइमों को सर्वप्रथम **ब्लिगन** (Bligen, 1970) ने पहचाना व वियोजित किया । इनकी खोज के लिए **आर्बर, नाथन्स तथा स्मिथ** (Arber, Nothens and Smith) को 1978 में नोबेल पुरस्कार दिया गया । **हेमिल्टन स्मिथ** (Hamilton Smith) ने *ई. कोलाई* (*E. coli*) की कोशिकाओं में से इन एन्जाइमों की खोज की । इनका नामकरण रेस्ट्रिक्शन एन्होन्यूक्लिएज टाइप II किया गया तथा इनकी सहायता से *ई. कोलाई* जीवाणु में कई रुपान्तरण तकनीकें विकसित की गई ।

दूसरी ओर डेनियल नाथन्स (Daniel Nathanes) ने इन एन्जाइमों की सहायता से बन्दर के ट्यूमर वाइरस - SV04 के DNA को अलग किया । सन् 1971 में सबसे पहले पॉलबर्ग व अन्य (Paulberg *et al.*) ने DNA के पुनर्योजित अणु का सफलतापूर्वक निर्माण किया ।

आज इस तकनीक का उपयोग पौधों के जीनोम के आण्विक संगठन में सुधार के लिए व्यापक रूप से किया जा रहा है तथा निरन्तर इस दिशा में प्रगति हो रही है । आज हम इच्छित जीन को सीधे cDNA लाइब्रेरी व जीनोमिक लाइब्रेरी से प्राप्त कर सकते हैं ।

(क) cDNA लाइब्रेरी

cDNA लाइब्रेरी - रुपान्तरित जीवाणु या जीवाणुभोजियो की उस समष्टि को कहते हैं, जिसमें सजीव कोशिका से प्राप्त सभी mRNA निवेश्य खण्ड प्लाज्मिड अथवा विभोजी (phage) वाहकों में पाये जाते हैं । इसको कॉम्प्लिमेन्ट्री DNA (cDNA) कहते हैं । इनके संश्लेषण के मुख्य चरण हैं - (1) वांछित m-RNA का चयन (2) cDNA का संश्लेषण (3) cDNA का वाहक में समाकलन ।

cDNA का महत्व यह है कि प्रोकैरियोटिक कोशिका में यूकैरियोटिक जीनों की अभिव्यक्ति के लिए इन जीनों की cDNA प्रतियों का उपयोग सर्वथा अनिवार्य होता है । वास्तव में जैसा हम जानते है कि यूकैरियोटी जीनों में इन्ट्रोन होते हैं जो mRNA के परिपक्व होने के समय निष्कासित कर दिए जाते हैं परन्तु प्रोकैरियोटिक जीनों में mRNA में से इंट्रॉन निष्कासन की ऐसी व्यवस्था अनुपस्थित होती है । अत: अनेक जीन जैसे इंटरफेरॉन व रुधिर थक्काकरण कारक VIII C आदि व अन्य प्रकार के m-RNA की cDNA प्रतियों की क्लोनिंग व अभिव्यक्ति जीवाणुओं' में की गई है । कुछ वाइरस जीनोम तो RNA के ही बने होते हैं इसलिए इनका क्लोनीकरण सिर्फ cDNA के रुप में ही किया जा सकता है ।

जब प्राकृतिक जीनों का उपयोग किया जाता है तब उसके जीनोम का बडा आकार इनके वाहक के साथ क्लोनिंग में कठिनाई उत्पन्न करता है । अत: प्रतिबन्धन एन्जाइमो की सहायता से इन्हें सामान्यत: 5 Kb आकार के टुकड़ों में काटकर जीन लाइब्रेरी बनाते हैं ।

(ख) जीनोमिक लाइब्रेरी (Gemomic Library)

यदि किसी जीव के सम्पूर्ण जीनोम के क्लोन किए गये DNA खण्डों का पूर्ण संग्रहण करते हैं तो उसे जीनोमिक लाइब्रेरी कहते हैं । इसमें प्लाज्मिड क्लोनों अथवा फाज लयनजों (lysates) का विशिष्ट संग्रह होता है जिसमें DNA निवेश्य (inserts) के रुप में उपस्थित विभिन्न DNA खण्डों का सम्पूर्ण

योग किसी सम्बन्धित जीव के पूरे जीनोम का प्रतिनिधित्व करता है । इन लाइब्रेरियों में सामान्यत: कुछ खण्ड प्राकृतिक दशा की अपेक्षा काफी कम आवृति में होते हैं या फिर पूरी तरह अनुपस्थित होते हैं । जीनोम लाइब्रेरी बनाने के लिए जीव का सम्पूर्ण जीनोमी DNA विलगित करते हैं तथा प्रतिबन्धित एन्जाइमों अथवा यान्त्रिक या ध्वनिक विधियों से उपयुक्त खण्डों मे काट लेते हैं । 4 bp के अभिज्ञान स्थलों वाले एन्जाइम इनका आंशिक पाचन करके उपयुक्त परिमाप वाले DNA खण्ड काट देते हैं । इन खण्डों के मिश्रण को जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस या सुक्रोज प्रवणता अपकेन्द्रण द्वारा उपयुक्त आमाप के खण्डों में अलग किया जाता है तथा इन्हें वाहक से समाकलित कर क्लोन किया जाता है । प्राय: λ वाहक एवं कॉस्मिड वाहक का उपयोग किया जाता है । वाहकों में समाकलित DNA खण्डों को समग्र रुप से उपयुक्त जीवाणु परपोषी में क्लोन करते हैं ।

इस प्रकार यह स्पष्ट है कि विभिन्न फसलों व विशेषकर आर्थिक महत्व के पौधों की गुणवत्ता सुधारने व वांछित लक्षणों की प्राप्ति के लिए cDNA व जीनोमिक लाइब्रेरी नितान्त उपयोगी है ।

15.4 आधारभूत पराजीनिकता (Basics of Transgenesis) :

15.4.1 परिचय (Introduction)

आर्थिक महत्व के अनेक पौधों की उत्तम गुणवत्ता वाली, बेहतर किस्मों का विकास करना आवश्यक है । इस प्रक्रिया में पुनर्योजन डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी (Recombinant DNA Technology) अथवा जीन अभियान्त्रिकी (Genetic Engineering) का सहयोग अपरिहार्य है । इन तकनीकों के प्रयोग द्वारा किसी भी जीव से विलग की गई जीन अथवा संश्लेषित जीन किसी भी पादप जाति में आसानी से स्थानान्तरित की जा सकती है । इस प्रकार जीन में इच्छित बदलाव (manipulation) द्वारा वांछित DNA के खण्डों या जीनों का समावेश कर सकते हैं तथा हानिकारक अथवा अनुपयोगी जीनों को प्रतिस्थापित कर सकते हैं । इससे फसल सुधार की असीम सम्भावनाएँ बनती हैं ।

इन तकनीकों के प्रयोग से कई प्रकार के फसली पौधों में उपयोगी जीनों को समाहित करके विभिन्न पराजीन किस्में (transgenic varieties) विकसित कर ली गई हैं जो अपने मूल स्वरुप की अपेक्षा बेहतर गुणों से युक्त है । इनका सबसे बड़ा लाभ यह है कि इनके उन्नत गुण आगामी पीढियों में भी स्थानान्तरित होते रहते हैं।

जीन अभियांत्रिकी तकनीक के द्वारा पौधों में बाहरी DNA द्वारा रुपान्तरण की क्रिया को पराजीनिकता (Transgenic) कहा जाता है तथा इस प्रकार से विकसित किए गए पौधे-पराजीनी पौधे (Transgenic plants) कहलाते हैं । फसल सुधार, उत्पादकता, कृषि तथा व्यवसायिक दृष्टिकोण से विभिन्न प्रकार के उपयोगी लक्षण वाले पराजीनी पौधों को विकसित किया जा सकता है ।

15.4.2 पराजीनी पादप प्राप्त करने के मुख्य चरण

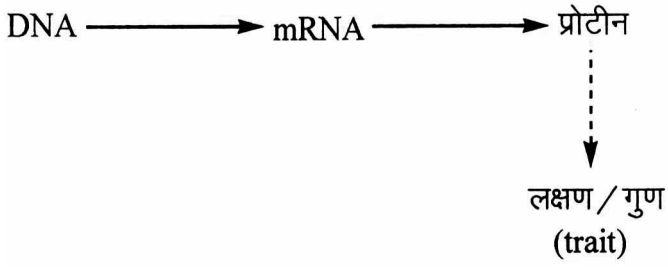
पराजीनी पादप कैसे बनता है ? जैसा हमने पहले पढ़ा कि पुनर्योजन DNA प्रौद्योगिकी तथा जीन अभियान्त्रिकी की तकनीकों का प्रयोग पराजीनी पादप बनाने में किया जाता है । पराजीनी पादप उत्पन्न करने के मुख्य चरण निम्न है -

1. डी.एन.ए. को समझना (Understanding DNA)

2. इच्छित जीनों की पहचान करना तथा उनको पृथक करना (Identification and isolation of desired genes)
3. इच्छित या इतर जीनों को वाहक में जोड़ना (Integration of Desired or Foreign genes into the vectors)
4. जीवाणु कोशिका में प्लाज्मिड वाहक का प्रवेश एवं दाता DNA का गुणन (Introduction of plasmid into the bacterial cell and multiplication of donor DNA)
5. वांछित क्लोनीकृत जीनों की पहचान तथा अन्य पादप कोशिका में स्थानान्तरण (Recognition of desired cloned genes and their transfer to other plant)
6. चयन तथा पुनर्जनन (Selection and Regeneration)
7. पादप प्रजनन तथा परीक्षण (Plant breeding and testing)

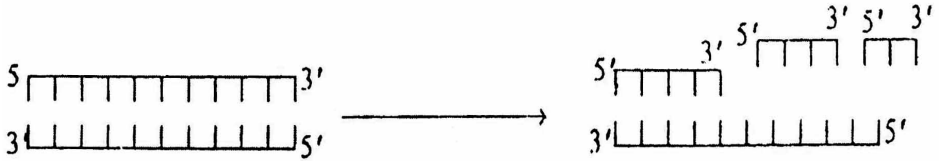
(1) DNA को समझना (Understanding DNA)

यह बात हम सभी जानते है कि सब जीवधारियों की कोशिकाओं में आनुवंशिक पदार्थ अर्थात् DNA उपस्थित होता है । यह शरीर की सभी गतिविधियों को नियन्त्रित करता है तथा लक्षणों को भावी पीढ़ियों तक ले जाने कार्य भी करता है । इसकी संरचना व आनुवंशिक कोड (genetic code) ने यह पूर्णतया स्पष्ट कर दिया है कि सभी जीवधारियों में मूल आनुवंशिक संरचना व नियन्त्रण लगभग एक जैसा है । यह DNA अनुलेखन (trancription) के द्वारा mRNA का निर्माण करता है । इसके बाद अनुदन (translation) की क्रिया द्वारा प्रोटीन का संश्लेषण होता है । यही प्रोटीन किसी विशेष लक्षण (trait) का निर्धारण करती है । इस पूरी प्रक्रिया के समय यदि कोई छोटी सी भी गड़बड़ी हो जाये तो बनने वाली निर्धारित प्रोटीन की जगह कोई अन्य प्रोटीन बन जाएगी तथा उससे उत्पन्न होने वाले लक्षण तथा होने वाली क्रियाएँ पूरी तरह बदल जायेंगी ।



पुनर्योजी DNA दो अलग स्त्रोतों से लिए गये DNA खण्डों को जोड़ कर बनाया जाता है । यह एक ऐसा खण्ड होता है जिसके साथ वांछित DNA के खण्ड को निवेशित करते हैं । वांछित जीन अथवा DNA अणुओं के निर्माण के लिए प्रतिबन्धन एन्जाइमों (Restriction enzymes) का प्रयोग किया जाता है (चित्र 15.5) । इनकी सहायता से DNA खण्डों को काटकर, इच्छित टुकड़े अलग कर लेते हैं । इसके बाद पृथक वांछित टुकड़ों को आपस में अथवा वाहक खण्डों (vector DNA) से जोड़ देते हैं इन खण्डों को जोडने में लाइगेज एन्जाइम का प्रयोग किया जाता है । इस प्रकार एक नया परम खण्ड या जीन बन जाता है । ऐरने खण्डों को काइमेरिक जीन (chimeric gene) कहा जाता है । इस प्रकार की तकनीक का प्रयोग पौधों में विशिष्ट गुणों के सुधार करने में किया जाता है ।

इस प्रकार रोग को उत्पन्न करने वाली प्रोटीन तथा उसका निर्धारण करने वाली जीन के साथ हेर-फेर (manipulation) करके एक नवीन गुणधर्म वाला DNA खण्ड अथवा जीन यदि निर्मित कर लिया जाए तो रोगमुक्त पौधा प्राप्त किया जा सकता है । जीन अभियान्त्रिकी अथवा पुनर्योजी डी.एन.ए. तकनीक ने यह संभव कर दिखाया है ।



चित्र 15.5 : प्रतिबंधन एण्डोन्यूक्लिएज (Restriction endocnuclease) एन्जाइम

(2) इच्छित जीनों की पहचान करना तथा उनको पृथक करना (Identification and isolation of desired genes)

एक पराजीनी पादप बनाने के लिए सबसे महत्वपूर्ण चरण वाछित गुणों वाली जीन की पहचान करना है । हम अभी तक उन विशिष्ट जीनों के बारे बहुत अधिक नहीं जान पाऐ हैं जो उपज बढ़ाती हों, साथ ही विभिन्न प्रतिबलों के लिए प्रतिरोधी हों तथा उत्पाद की गुणवत्ता भी प्रभावित करता हों । इस बात से कोई खास लाभ नहीं है कि हम एक जीन की पहचान करें जो उनमें से कोई एक गुण को प्रभावित करता हो, बल्कि इस क्षेत्र में खोज की जानी चाहिए कि यह जीन कैसे नियन्त्रित (regulate) होती है, पौधों पर इसके और क्या-क्या प्रभाव हैं, तथा यह साथ की अन्य जीनों से किस प्रकार परस्पर क्रिया (interact) करता है?

एक DNA अणु में विशिष्ट न्यूक्लियोटाइडों के अनुक्रम होते हैं । ये अनेक प्रकार की प्रोटीनों को कोड करते हैं । इसलिए जीन की पहचान करने से अर्थ है, इस विशेष न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम को पहचानना । सभी प्राणियों में विशेष प्रकार के प्रतिबन्धन एन्जाइम (restriction endonuclease enzymes) अथवा न्यूक्लिएज एन्जाइम (nuclease enzyme) पाऐ जाते हैं । ये बाहरी DNA से अपनी कोशिका के DNA की रक्षा करते हैं । इन्हें अनुक्रम-विशिष्ट एन्जाइम भी कहा जाता है । DNA के अणु में जिस स्थान पर न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम तथा प्रतिबन्धन एन्जाइम अनुक्रम तुल्यपरक होता है वहीं यह एन्याइम, DNA को काट देता है । इस प्रकार वांछित DNA खण्ड अलग हो जाता है । अलग-अलग जीवों में ये एन्जाइम्ज अलग-अलग होते हैं । कई प्रोकैरियोटिक जीवों की कोशिकाओं में से अंख्य एन्जाइम पृथक किऐ गऐ हैं । सामान्यत: ये तीन प्रमुख प्रकार के होते हैं जिन्हें RI, RII तथा RIII कहते हैं ।

अधिकतर इन एन्जाइमों द्वारा DNA पर जो काट लगता है, उससे दो प्रकार के सूत्र उत्पन्न होते हैं - पहले सातरित प्रकार के जिसमें सिरे चिपचिपे (sticky ends) कहलाते हैं क्योंकि ये आपस में जुड़ सकते हैं तथा दूसरे सममित जिनसे कुंठित सिरे (blunt ends) बनते हैं तथा ये अन्य DNA सिरों से नहीं जुड़ सकते ।

इन एन्जाइमों की सक्रियता पर DNA की श्रेणी या स्त्रोत का प्रभाव नहीं पड़ता । यही इनकी विलक्षणता है।

(3) इच्छित या इतर जीनों को वाहक में जोड़ना (Integration of desired or foreign genes into the vector)

जैसा हमने पढा कि प्रतिबन्धन एन्जाइमों के द्वारा DNA कई खण्डों ने विभक्त हो जाता है । इनमें से जो स्वयं को अभिव्यक्त कर सकते हैं, वे अपनी सूचना mRNA के रुप में अनुलेखित कर देते हैं । इस प्रकार इनकी जो प्रतिलिपियाँ प्राप्त होती हैं, उन्हें DNA (complimentary DNA) कहते हैं । चूंकि इस क्रिया में RNA द्वारा cDNA बनता है इसलिए इसे प्रतिलोमी अनुलेखन कहते हैं । इस क्रिया के द्वारा प्राप्त cDNA को उपयुक्त वाहक (Ligase) के साथ जोड़ दिया जाता है । जिस समय इस वाहक का बहुगुणन होता है उसी के साथ-साथ cDNA का भी बहुगुणन हो जाता है । एक विशेष एन्जाइम लाइगेज (Ligase) वाहक व जीन को जोड़ने का कार्य करता' है ।

जो जीन हमें चाहिऐं उसमें रोग प्रतिरोधी, खरपतवाररोधी, उच्च लवण सान्द्रता विरोधी, निम्न ताप प्रतिरोधी जीन तथा अच्छे गुणों वाले जैसे नाइट्रोजन स्थिरीकरण, उच्च पैदावार, बेहतर निधानी आयु वाले फल-सब्जी आदि के जीन हो सकते हैं । पादपों में एग्रोबैक्टीरियम के Ti प्लाज्मिड को पृथक किया जा चुका है । इसे वाहक के रुप में प्रयुक्त करने से पहले रुपान्तरित किया जाता है । ऐग्रोबैक्टीरियम के अतिरिक्त पादप विषाणु भी उपयोग में लिए जाते हैं ।

(4) जीवाणु कोशिका में वाहक का प्रवेश एवं दाता DNA का गुणन (Introduction of plasmid into the bacterial cell and multiplication of donor DNA)

एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम द्वारा काटे गऐ वांछित जीन व Ti प्लाज़्मिड को लाइगेज एन्जाइम द्वारा जोड़ दिया जाता है । इस पुनर्योगज प्लाज्मिड (recombinant plasmid) के रुप में इच्छित जीनों को जीवाणु कोशिका में प्रविष्ट कराया जाता है । यह प्रक्रिया रुपान्तरण (transformation) कहलाती है; जीवाणु कोशिकाओं की संख्या में वृद्धि के साथ-साथ इच्छित जीनों की संख्या भी बढ़ती जाती है जिसे क्लोनिंग (cloning) कहते हैं ।

पादपों में रुपान्तरण के दो मुख्य तरीके होते हैं -

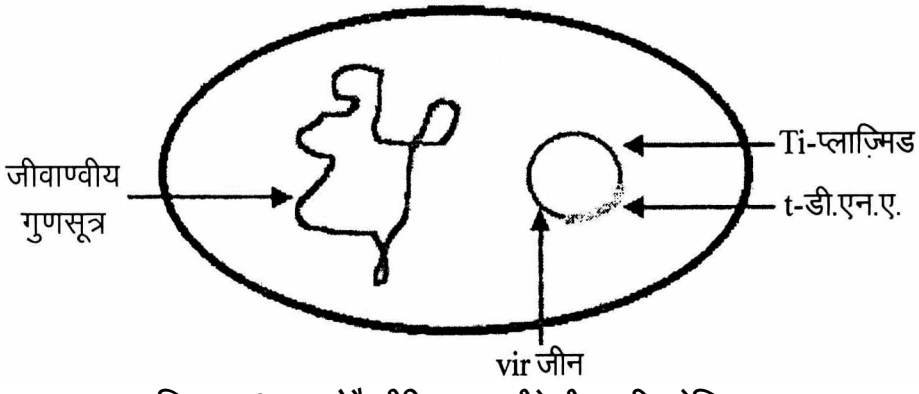
(i) ऐग्रोबैक्टीरियम द्वारा

(ii) प्रत्यक्ष स्थानान्तरण द्वारा

(i) *एग्रोबैक्टीरियम* द्वारा आनुबांशिक रुपान्तरण (*Agrobacterium* mediated genetic transformation)

DNA के स्थानान्तरण के लिए जीवाणु ऐग्रोबैक्टीरियम की दो प्रजातियाँ उपयोग में लाई जाती हैं । ये क्रमश: *ऐ. ट्यूमीफेशीन्स* (*A. tumefasciens*) तथा *ऐ. राईजोजीन्स* (*A. rhizogenes*) कहलाती है । ये दोनों क्रमश: किरीट पिटिका रोग (crown gall disease) तथा रोमिल मूल रोग (hairy root disease) उत्पन्न करती है । ऐग्रोबैक्टीरियम सामान्यत: द्विबीजपत्री पौधों को संक्रमित करता है । रोग का संक्रमण प्ररोह एवं मूल के संधिस्थल (crown) पर होता है । जीवाणु पादप कोशिका में संलग्न होकर उसका रुपान्तरण करने लगता है । अत: इन कोशिकाओं की अतिवृद्धि (hypertrophy) तथा तीव्र गति से विभाजन (phperplasia) होने लगता है जिसके कारण एक अर्बुद (tumor) बन जाता है ।

दोनों प्रजातियों में रोग संक्रमण की क्षमता इनके प्लाज्मिडों में होती है । इन प्लाज्मिडों को क्रमश: Ti तथा Ri प्लाज्मिड कहा जाता है (Ti- Tumor inducing तथा Ri- Root inducing) । ये प्लाज्मिड अपने DNA खण्डों के टुकडों को परपोषी DNA में स्थानान्तरित कर देते हैं । इसलिए इन टुकड़ों को स्थानान्तरण DNA (transfer अथवा t-DNA) कहते हैं । (चित्र 15.6)



चित्र 15.6 : *एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमीफेशीन्स* की कोशिका.

तीन रुपान्तरण के लिए *ऐ. ट्यूमीफेशीन्स* की अर्बुद उत्पन्न करने वाली जीनों में या तो बदलाव लाया जाता है या फिर इन्हें नष्ट कर दिया जाता है । अर्बुद उत्पन्न करने की क्षमता वाली जीने t- DNA भाग में होती है । अत: अर्बुद प्रेरकजीन रहित प्लाज्मिड का उपयोग जीन स्थानान्तरण के लिए किया जाता है । इसमें उपयोगी जीनों को ऐसे t- DNA के साथ जोड़ते हैं । इसके अलावा एक चिन्हक जीन (marker gene) भी जोड़ा जाता है । उदाहरण - कैनामाइसिन प्रतिरोधी जीन । कैनामाइसिन एक एंटीबायोटिक है जो शाकनाशी की तरह उपयोग में लिया जाता है । ऐसे ऐग्रोबैक्टीरियम से पौधों को संक्रमित करवा दिया जाता है । अब इसेका प्लाज़्मिड बहु गुणित होता है तथा पुनर्योगज प्लाज्मिडों की संख्या बढ़ती जाती है । साथ ही वांछित जीन (केनामाइसिन प्रतिरोधी) परपोषी कोशिकाओं की DNA से जुड़ जाता है । अत: यह परपोषी पादप भी कैनामाइसिन के प्रति प्रतिरोधक हो जाता है । इस प्रकार खेतों में उपयोग में लाऐ जाने वाले विभिन्न शाकनाशी रसायनों के प्रति पौधों को प्रतिरोधी बनाया जा सकता है जबकि अनुपयोगी खरपतवार को नष्ट किया जा सकता है ।

(ii) DNA के प्रत्यक्ष स्थानान्तरण द्वारा (Through direct introduction of DNA)

अधिकतर पादपों में विशेषकर द्विबीजपत्री पादपों में ऐग्रोबैक्टीरियम द्वारा जीन स्थानान्तरण उपयोगी सिद्ध हुआ है । परन्तु कुछ पौधों जैसे एकबीजपत्री पौधों में ऐग्रोबैक्टीरियम का प्लाज्मिड वाहक के रुप में प्रभावी सिद्ध नहीं हो सका है । इन पौधों में वांछित जीनों को सीधे ही प्रविष्ट करवा दिया जाता है । इस प्रकार DNA की मध्यस्थता से जीन स्थानान्तरण की विधियाँ निम्नलिखित हैं -

(1) वैद्युत छिद्रण (Electroporation)
(2) सूक्ष्म अन्त:क्षेपण (Microinjection)
(3) रासायनिक पदार्थों से प्रेरित एन्डोसाइटोसिस (Chemically induced endocytosis)
(4) प्राक्षेपक (Ballistics)
(5) लेसर सूक्ष्म पुंज (Laser microbeam)
(6) सोनीकेशन (sonication)

(1) वैद्युत छिद्रण (Electroporation)

इस विधि में पादप कोशिका निलंबन को कुछ समय के लिए उच्च वोल्टता के विद्युत क्षेत्र में रखते है जिसके कारण जीवद्रव्यको की प्लाज्मा झिल्ली की पारगम्यता में कई गुना वृद्धि हो जाती है । इस प्रकार वे वांछित जीन जो जीवद्रव्यक के सीधे संपर्क में आते हैं प्लाज्मा झिल्ली से प्रवेश करके जीवद्रव्यक के भीतर पहुँच जाते हैं और उसके DNA से जुड़ जाते हैं । यह तकनीक कई पादपों में रुपान्तरण के लिए सफल रही है । रुपान्तरित जीवद्रव्यको को उचित संवर्धन माध्यम पर विकसित कर पराजीनी पादप प्राप्त कर लेते हैं ।

(2) सूक्ष्म अन्त:क्षेपण (Microinjection)

इस विधि में एक सूक्ष्म इंजेक्शन का प्रयोग करते हैं जिसकी सहायता से DNA घोल को कोशिका में सीधा प्रवेश करा देते हैं । जीवद्रव्यक को पहले निश्चलित कर दिया जाता है । यह क्रिया **लिचेन्स्टीन** (Lichtenstein, 1987) ने विकसित की थी । अन्त:क्षेपित DNA युक्त जीवद्रव्यको को उचित संवर्धन माध्यम पर विकसित कर पराजीनी पादप का निर्माण कर लेते हैं ।

(3) रासायनिक पदार्थो से प्रेरित एन्डोसाइटोसिस (Chemically induced endocytosis)

अनेक रसायन जैसे पोलीइथाइलीन ग्लाइकोल (PEG), पॉलीविनाइल ऐल्कोहॉल (Polvyinyl alcohol), कैत्यियम फॉस्फेट (Calcium phosphate) आदि प्लाज्मा झिल्ली की पारगम्यता को भी परिवर्तित कर देते हैं तथा कोशिका में DNA प्रवेश को बढ़ाते हैं ।

पौधों की कोशिकाओं को सेल्यूलोज (cellulase) एन्जाइम से उपचारित कराते हैं तथा जीवद्रव्यक तैयार हो जाता है (जीवद्रव्यक में कोशिका भित्ति नहीं होती) । इन जीवद्रव्यकों का उपरोक्त रसायनों में से किसी एक को तथा साथ में वांछित जीनों को उष्मायित (incubate)करा दिया जाता है । जीवद्रव्यक एंडोसाइटोसिस की क्रिया से इन जीनों को ग्रहण करता है एवं इसका DNA तथा वांछित जीन जुड़ जाते हैं । फलत: DNA का रुपान्तरण हो जाता है । बाद में कोशिका भित्ति के निर्माण से कोशिकाएँ विकसित होती हैं जो उचित माध्यम पर विभाजित होकर पराजीनी पौधा बनाती है ।

इन रसायनों के अलावा लिपोसोम (liposome) जो कृत्रिम रुप से बनी वसा की पुटिकाएँ होती हैं, उनमें DNA भर कर पौधों के जीवद्रव्य में पहुँचाते हैं । यह क्रिया लिपोफैमान कहलाती है । इसे PEG द्वारा प्रेषित किया जाता है । लिपोसोम की सहायता से मक्का में जीन स्थानान्तरण किया गया है ।

(4) प्राक्षेपक अथवा कण बन्दूक (Ballistics)

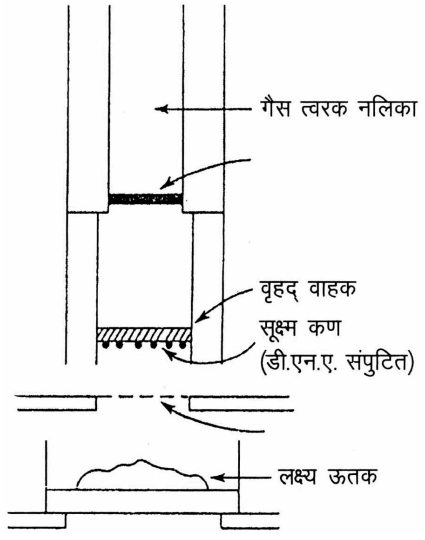
प्राक्षेपक उन अस्त्रों को कहा जाता है जो दूरी से लक्ष्य को भेदने की क्षमता रखते हैं तथा गोलियों को उसकी ओर दागते हैं । यही प्राक्षेपक विधि का सिद्धान्त भी है । वांछित जीनों को सोना या टंग्स्टन जैसी भारी धातु के खोल में लपेट कर गोलियाँ बनाते हैं फिर इनसे कोशिकाओं पर वार किया जाता है । इस प्रक्रिया के फलस्वरूप कोशिका भित्ति को भेदती हुई वांछित जीन मुख्य DNA से जुड जाती है । उपरोक्त विधि के प्रयोग से तम्बाकू चावल, मक्का, सोयाबीन व गेहूँ आदि में पराजीनी पौधे प्राप्त कर लिए गये है (चित्र 15.7) ।

(5) लेसर सूक्ष्मपुंज (Laser microbeam)

वेबर तथा सहयोगियों (Weber *et al.*, 1988) ने पौधों में रुपान्तरण के लिए इस विधि का प्रयोग किया । लेसर सूक्ष्मपुंज कोशिका झिल्ली को भेदते हैं और पुनर्योगज प्लाज़्मिड कोशिका में प्रविष्ट हो जाता है ।

(6) सोनीकेशन (Sonication)

चूंकि इस विधि से रुपान्तरित पौधों का उत्पादन अथवा विकास सफलतापूर्वक नहीं देखा गया है इसलिए इसके बारे में और अधिक खोज आवश्यक है । तम्बाकू व चुकन्दर के जीवद्रव्यक में क्लोरमफेनिकोल एसिटाइल ट्रान्सफरेज जीन को पराध्वनि से सोनीकेशन के द्वारा प्रवेश कराने में इसका उपयोग किया गया है ।



चित्र 15.7 : हीलियम दाब द्वारा चालित एक कण बंदूक (particle gun) के महत्वपूर्ण अवयवों का सरल रेखाचित्र । यहाँ केवल वही अवयव प्रदर्शित हैं, जिनकी DNA स्थानांतरण में महत्वपूर्ण एवं सीधी भूमिका होती है । सूक्ष्मकणों पर उस DNA, जिसका स्थानांतरण किया जाना है, का लेप हुआ रहता है

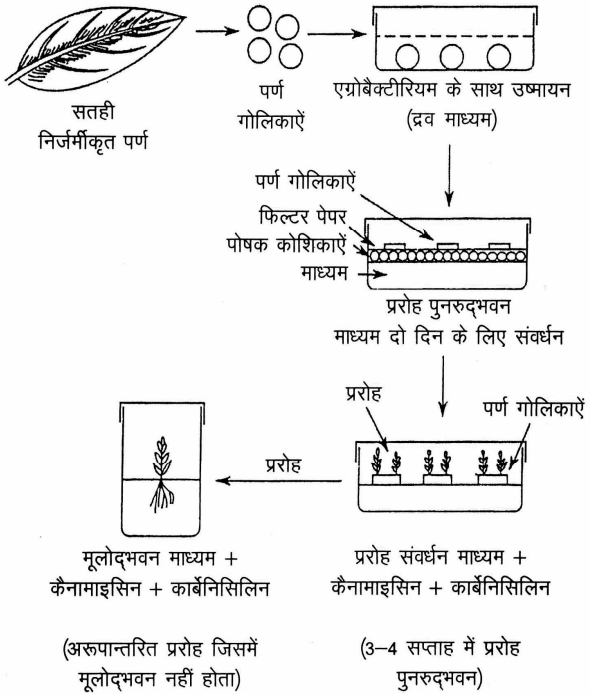
(5) वांछित क्लोन्ड जीनों की पहचान तथा अन्य पादप कोशिका में स्थानान्तरण (Recognition of desired cloned and their transfer in other plant cell)

क्लोनिंग द्वारा प्राप्त जीन प्रतिलिपियों में से उपयोगी जीनों को पहचान कर उपयुक्त माध्यम पर इनका बहुगुणन करवाया जाता है । अत: पुनर्योगज Ti प्लाज़्मिड युक्त ऐग्रोबैक्टीरियम का प्रभेद (strain) तैयार होने के पश्चात् इससे उपयुक्त पादप ऊतकों को संक्रमित करवा दिया जाता है । इस क्रिया के सम्पादन के लिए ऐग्रोबैक्टीरियम तथा ग्राही पादप ऊतक को सह संवर्धित (co-culture) किया जाता है (चित्र 15.8) । दूसरे तरीके में पादपों को क्षति पहुँचा कर रुपान्तरित ऐग्रोबैक्टीरियम द्वारा संक्रमित करवा देते है ।

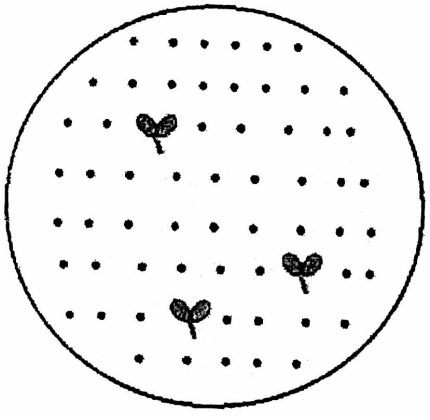
(6) चयन तथा पुनर्जनन (Selection and Regeneration)

जैसा हमे ज्ञात है कि पौधों में जीन अथवा DNA के रुपान्तरण के लिए ऐग्रोबैक्टीरियम जीवाणु का उपयोग किया जाता है अथवा DNA का जीवद्रव्यक में सीधे ही किसी एक विधि द्वारा प्रवेश करवा

दिया जाता है । जब वांछित जीन मुख्य DNA के साथ जुड जाते हैं, तब मुख्य DNA का रुपान्तरण सफलतापूर्वक हो जाता है । इसके बाद पादप ऊतकों को ऐसे वरणीय (selective) माध्यम पर विकसित किया जाता है जिसमें चिन्हक जीन मौजूद हो जैसे कोई एंटीबायोटिक अथवा शाकानाशी (herbicide) । इस प्रकार विकसित पौधे वांछित जीन लिए होंगे तथा वही इस संवर्धन माध्यम पर जीवित भी रहेंगे (चित्र 15.9) । इस प्रकार उत्पन्न पराजीनी पादपों का फिर उचित विश्लेषण किया जाता है ।



चित्र 15.8 : सहकल्चर विधि से ऐग्रोबैक्टीरियम द्वारा जीन स्थानांतरण का सरल रेखाचित्र



चित्र 15.9 वरणीय माध्यम पर वांछित जीन युक्त पादपों की वृद्धि

(7) पादप प्रजनन तथा परीक्षण (Plant breeding and testing)

उपरोक्त प्रकार से तैयार किये पराजीनी पादपों को पूरी तरह परखा जाता है कि क्या वांछित अथवा जोड़ी गई जीन सचमुच पादप के मुख्य DNA में सुदृढ़ रुप से समाकलित (intergrate) हो गई है

अथवा नहीं । साथ ही कहीं इसका अन्य पादप क्रियाओं पर कोई कुप्रभाव तो नहीं पडा ?' इसके लिए पादप प्रजनन की तकनीक काम में ली जाती है ।

उच्चवर्गीय पौधों में निवेशित जीन द्वारा उत्पन्न लक्षणों को परखा जाता है व जीन की अभिव्यक्ति को पूर्णतया अवलोकित किया जाता है । आनुवंशिक रुपान्तरित पौधों में यह स्थानान्तरित जीन किस सीमा तक स्वयं को अभिव्यक्त कर पाती है यह आकलन अति आवश्यक होता है । तभी हम यह कह सकते हैं कि कार्य उचित दिशा में किया गया तथा प्रयास समुचित रुप से सार्थक हुआ है । आगामी पीढ़ियों में भी यदि यह जीन अभिव्यक्त हो पाती है, तभी हम यह कह सकते हैं कि पराजीनी पौधा सफलतापूर्वक प्राप्त कर लिया गया है ।

बोध प्रश्न

1. विशिष्ट DNA अनुक्रम की पहचान.....करते है।
   .....
2. DNA के खण्ड को अन्य कोशिका में.....पहुँचाता है।
   .....
3. जीन स्थानान्तरण द्वारा प्राप्त पौधे.....कहलाते है।
   .....
4. पादपों में जीन स्थानान्तरण के लिए समान्यतः.....का प्रयोग किया जाता है।
   .....

15.5 अभाव प्रतिरोधकता (Stress Resistance) :

जीन स्थानान्तरण तकनीक से विभिन्न लक्षणों वाली कुछ पराजीनी पादप किस्मों का अब तक निर्माण कर लिया गया है जैसे कीटरोधी कपास, जल्दी न गलने वाले टमाटर, विषाणु प्रतिरोधी मक्का, पपीता, तम्बाकू द्रुतशीतन रोधी ऐरेबिडोप्सिस आदि । कुछ अन्य पौधों में प्राकृतिक रुप से कई प्रकार के प्रतिबल (stresses) जैसे बहुत अधिक अथवा बहुत कम तापक्रम, पाला आदि के प्रति प्रतिरोधक क्षमता पाई जाती है । इसके अलावा अन्य प्रतिबल जैसे मृदा की शुष्कता (drought conditions of soil), मृदा में लवणों की उपस्थिति (salinity of soil) के लिए भी कुछ पादप प्रतिरोधक क्षमता रखते हैं । इसका क्या कारण हो सकता है ? हमने पहले पढ़ा कि सिर्फ प्रोटीन प्रत्येक क्रिया का निर्धारण कर सकती है । अत: यह संभव है कि इन पौधों में यह विशेष गुण कुछ विशेष एन्जाइमों अथवा प्रोटीनों की उपस्थिति के कारण हो । ऐसे कुछ एन्जाइम हैं - प्रोलीन्स (Prolins) तथा बीटेन्स (Betains) ।

यदि इस प्रकार के विशेष प्रतिरोधी जीनों को हम दूसरी आर्थिक महत्व की फसलों में स्थानान्तरित कर सकें तो अनेक प्रकार की विषम परिस्थितियों में भी फसलों को कोई नुकसान नहीं पहुँचेगा । ऐसे प्रयास किए जा रहे है तथा कुछ हद तक इसमें सफलता भी मिल रही है । जैसे द्रुतशीतन से बचाव के लिए तम्बाकू के पौधों में *ऐरेबिडोप्सिस* (*Arabidopsis*) के एक एन्जाइम, ग्लिसरॉल-1-फॉस्फेट एसिटाइल ट्रान्सफरेज के जीनों को सफलतापूर्वक स्थानान्तरित किया जा चुका है । इसी प्रकार अति शुल्क (dry) आवासों में पाये जाने पौधों मे शर्करा व्यूत्पन्न पदार्थ जिन्हें पॉलीऑल्स (polyols) कहा

जाता है पाये जाते हैं । ये पौधे इन पदार्थों के उत्पादन से स्वयं को विषम परिस्थितियों से बचाते हैं । अर्थात् ऐसे पौधे जिनमें पॉलिऑल्स (जैसे मेनिटॉल सौरबिटॉल आदि) अधिक मात्रा में उपस्थित हों, शुष्कता के प्रति प्रतिरोधी होते हैं । इन पॉलिऑल्स के निर्माण के जीनों को यदि आर्थिक महत्व के पौधों में स्थानान्तरित कर सकें तो सफलतापूर्वक शुष्कता प्रतिरोधी पराजीनी पादपों का निर्माण किया जा सकता है । परम्परागत प्रजनन के तरीकों से आज तक इन जटिल लक्षणों को दूर नहीं किया जा सका है । प्रकृति में हर समय उपस्थित ये जैविक तथा अजैविक प्रतिबल कार्य करते रहते है । कहीं शुष्क मृदा तो कहीं बाढ़ का प्रकोप रहता है, कहीं बहुत शीत तो कहीं भीषण रुप से गर्मी रहती है । इनके अलावा जो एक और बहुत बड़ी समस्या है, वह है मृदा में भारी धातुओं अथवा लवणों की उपस्थिति । इन सब परिस्थितियों में हमारी सभी महत्वपूर्ण फसलें यदि सुरक्षित रह सकें व अच्छी उपज दे सकें तो सभी को फायदा होगा । इससे गरीबी व भूख दोनों का निदान हो सकेगा । जीन अभियान्त्रिकी की तकनीक से टमाटर व *ब्रैसिका नेपस* (*Brassica napus*) में मृदा की लवणीयता तथा अति न्यून तापमान के प्रति प्रतिरोधकता उत्पन्न कर ली गई है । ऐसी रिपोर्ट से इस सोच को ओर बल मिलता है कि वह दिन दूर नहीं जब इस दिशा में हमें और अधिक सफलता मिल सकेगी ।

कृषि तिभाग से जारी विवरण में अकेले राजस्थान में फसली आवश्यकता का केवल आधा बीज ही पैदा हो पाता है बाकी इन प्रतिबलों के कारण नष्ट हो जाता है । यह कितनी गंभीर समस्या है कि बाजरा, ज्वार, मक्का, उड़द, मोठ, मूँगफली, तिल, सोयाबीन आदि मुख्य फसलों में पैदावार निरन्तर घट रही है । यदि जीन स्थानान्तरण तकनीक का प्रयोग करके प्रतिबल प्रतिरोधी जीन इन पौधों में डाली जा सके तो कितना लाभ होगा यह सोचने का विषय है ।

इन सबके अलावा एक और समस्या उच्च तापक्रम की वजह से देखने को मिलती है । सब्जियों तथा फलों की निदानी आयु में कमी उच्च ताप, परिवहन एवं क्रय विक्रय के दौरान एवं बिजली संकट के कारण होती है प्रशीतन गृह के उपलब्ध न होने के कारण भी फल तथा सब्जियाँ जल्दी सड़ जाते हैं तथा खाने योग्य नहीं रहते । जीन अभियान्त्रिकी के प्रयोग से ऐसे फल-सब्जियों का उत्पादन करने की कोशिश की जा रही है जो धीरे धीरे पकते हों (slow ripening) । इस क्रम में जल्दी न गलने वाले पराजीनी टमाटर सफलतापूर्वक विकसित किए जा चुके हैं ।

15.6 उत्पादन वृद्धि तथा पोषण गुणवत्ता हेतु पराजीनी पादप (Transgenic Plants for Increase in Productivity and Nutrient Quality) :

उत्तम गुणवत्ता की दृष्टि से निम्न पराजीनी पादपों का विकास सफलतापूर्वक कर लिया गया है -

15.6.1 शाकनाशी प्रतिरोधी (Herbicide Resistant)

शाकनाशी का प्रयोग खेतों में खरपतवार को रोकने के लिए किया जाता है । यह किसान के लिए एक सबसे बड़ी चुनौती होती है क्योंकि फसलों का उत्पादन इनकी वजह से गंभीर रुप से कम होता है तथा पौधों की गुणवत्ता भी प्रभावित होती है । इसलिए खरपतवारों के समूल उन्मूलन के लिए रसायनों का छिड़काव किया जाता है जैसे 2-4-D या 2,4,5-T आदि । ये विषैले पदार्थ हैं जो पर्यावरण तथा मृदा

को भी दूषित कर देते हैं । साथ ही अविघटनशील होने के कारण ये मृदा में पड़े रहते हैं तथा पादप शरीरों से होते हुए खाद्य श्रृंखला का हिस्सा बन कर हानि पहुँचाते हैं ।

इन्हीं कारणों को ध्यान में रखते हुए वैज्ञानिक पौधों में जीन स्थानान्तरण तकनीक के उपयोग का प्रयास कर रहे हैं । इससे यदि शाकनाशी प्रतिरोधी पौधे विकसित कर लिए जाएँ तो फसल उत्पादन तो बढ़ेगा ही परन्तु अन्य कोई नुकसान नहीं हो सकेगा । ऐसी ही खोज के अन्तर्गत एक पदार्थ ग्लाइफोसेट (glyphosate) का पता चला जो जल्दी अपघटित हो जाता है व पर्यावरण व मृदा को हानि भी नहीं पहुँचाता । लेकिन एक बड़ी समस्या यह है कि यह खरपतवार के साथ-साथ मुख्य फसल को भी नष्ट कर देता है । अत: जीन अभियान्त्रिकी का प्रयोग करके रुपान्तरण के द्वारा पौधों को ग्लाइफोसेट रोधी बनाने का प्रयास किया गया । इसके लिए दो विधियाँ उपयोग में ली गई हैं -

(क) उत्परिवर्ती चयन,

(ख) जीन स्थानान्तरण

जीन स्थानान्तरण द्वारा शाकनाशी पौधे विकसित करने के निम्न प्रयास किये गये हैं -

(1) वे पौधे जो शाकनाशी पदार्थ के उपयोग से नष्ट हो जाते थे, उनमें एन्जाइमों का बहुत अधिक मात्रा में उत्पादन अभिप्रेरित किया गया । इससे शाकनाशी के प्रभाव से इनकी कुछ मात्रा नष्ट होने पर भी इतनी मात्रा बची रहेगी कि पौधा नष्ट नहीं होगा ।

(2) पौधों में शाकनाशी पदार्थ को विघटित करने के लिये जीनों को स्थानान्तरित करने का प्रयास किया गया ।

शाकनाशी रसायन पौधों में प्रकाश संश्लेषण की प्रक्रिया को नुकसान पहुँचाते हैं तथा कुछ विशेष अमीनो अम्लों का संश्लेषण कम कर देते हैं । इन दोनों बातों को ध्यान में रख कर कुछ पराजीनी पादप विकसित कर लिए गये हैं

1) टमाटर, तम्बाकू - इनमें aro-A जीन को स्थापित किया गया जो ग्लाइफोसेट से प्रभावित न होने वाले EPSP एन्जाइम बनाता है ।

2) पिटूनिया - इसमें भी EPSP एन्जाइम का अधिक उत्पादन करने वाला जीन स्थापित किया गया है जो ग्लाइफोसेट से प्रभावित नहीं होता ।

3) मक्का - इसमें एक जीन GST ऐट्रेजाइन को विष रहित बनाता है ।

4) ब्रेसिका, आलू - स्ट्रेप्टोमाइसिस की एक प्रजाति में PAT एन्जाइम को कोड करने वाली bar जीन एक शाकनाशी रसायन L-फोस्फिनोनोइरिथ्रिन को विष रहित बनाती है । यह जीन ब्रेसिका व आलू में स्थानान्तरित की जा चुकी है ।

ये सभी पराजीनी पादप शाकनाशियों के प्रति प्रतिरोधकता दर्शाते हैं । ये शाकनाशी, राउंड अप (रासायनिक नाम. ग्लाइफोसेट) अथवा लिबर्टी (रासायनिक नाम ग्लूफोसिनेट) सभी प्रकार के पौधों को नष्ट करने में सक्षम होते हैं । सिर्फ वही पौधे जिनमें प्रतिरोधक जीन उपस्थित होती है, इनसे प्रभावित नहीं होते।

15.6.2 रोग प्रतिरोधी

(क) वाइरस प्रतिरोधकता

वाइरस के प्रति प्रतिरोधक क्षमता वाले पादपों का उत्पादन करने के लिए निम्न बिन्दुओं पर कार्य चल रहा है -

(i) आवरण प्रोटीन जीन का निवेश

इस विधि में वाइरस के आवरण प्रोटीन के जीन (Cp = Coat protein) को पृथक कर आर्थिक महत्व के पौधों में निवेशित कराते हैं । अत: ये पादप वाइरस प्रतिरोधी हो जाते हैं । कई पौधे जैसे तम्बाकू चुकन्दर, टमाटर, आलू में यह कार्य सफलतापूर्वक किया गया है । ऐसा माना जाता है कि आवरण प्रोटीन वाइरस जीनोम को आवरणयुक्त नहीं होने देता जिससे प्रतिकृति तथा अनुवाद (Replication and translation) नहीं हो पाते । साथ ही वाइरस का प्रसार भी प्रभावित होता है (सारणी 4) ।

सारणी 4 : विषाणु के आवरण जीन प्राप्त विषाणुरोधी पराजीनी पादप

क्र.स	विषाणु आवरण जीन का स्त्रोत	पराजिनी पादप
1.	PVX (पोटेटो वाइरस X)	तम्बाकू, आलू
2.	TMV (तम्बाकू मोजेक वाइरस)	टमाटर, तम्बाकू

(ii) क्रॉस बचाव

यदि किसी सुग्राह्य पौधे में वाइरस के मंद (mild) प्रभेद से संक्रमण करवा दें तो वह पौधा वाइरस के उग्र (virulent) प्रभेद के लिए भी प्रतिरोधक हो जाता है । इसे क्रास बचाव (cross protection) की क्रिया कहते हैं । यह वही प्रक्रिया है जैसी टीकाकरण में होती है । इस विधि का उपयोग टमाटर में PSTV (Potato Spindle Tuber Virus) तथा तम्बाकू में TMV (Tobacco Mosaic Virus) से बचाव के लिए किया गया है ।

(iii) ऐन्टीसेन्स RNA द्वारा

इसमें वाइरस की जीन को ऐन्टीसेन्स अभिविन्यास कर पादप जीनोम में निवेशित कराते हैं । इसके लिए जीन द्वारा बने mRNA की cDNA प्रति को अभिव्यक्ति वाहक में जीन प्रमोटर के सापेक्ष प्रतिलोम स्थिति में समाकलित किया जाता है । ऐंटीसेंस RNA, mRNA से जुड़ कर दो स्ट्रैंड वाला RNA अणु बना लेता है जिसका अनुवाद नहीं किया जा सकता है ।

(iv) सैटलाइट RNA dwara

कुछ RNA वाइरसों में मुख्य RNA अणु के साथ एक विशिष्ट प्रकार का RNA भाग जुड़ा रहता है जो सैटेलाइट अथवा सैट- RNA (Sat RNA) कहलाता है । सैट-RNA के cDNA का स्थानान्तरण परपोषी कोशिका में करने पर इसका प्रतिकृतिकरण वाइरस जीनोम द्वारा कर दिया जाता है तथा यह आवरणयुक्त हो जाता है । सैट- RNA की उपस्थिति बाहरी संक्रमण को कम कर देती है क्योंकि सैट-RNA वाइरस के प्रभावों को निष्क्रिय कर देते हैं । उदाहरण के तौर पर CMV (Ccumber Mosale Virus) के सैट- RNA द्वारा संश्लेषित cDNAको तम्बाकू के पौधे में स्थानान्तरित करने पर CMV तथा अन्य वाइरसों का संक्रमण कम हो जाता है ।

(v) अन्य

इसी प्रकार वाइरस प्रतिकृतिकरण (replication) के लिए आवश्यक संरचनात्मक प्रोटीन विकर रेप्लीकेज (replicase) के लिए कोड करते है। इनमें कुछ रेप्लीकेज पराजीनी पादपों में अभिव्यक्त होने पर वाइरस के लिए प्रतिरोधकता प्रदान करते है (सारणी 5)।

सारणी 5 : विषाणु जीनों के उपयोग द्वारा प्राप्त विषाणुरोधी पराजीनी पादप

क्र.स	पादप	विषाणु जीन	विषाणु जिसके प्रति प्रतिरोधकता है
1.	तम्बाकू	वाहक प्रोटीन	तम्बाकू मोजेक वाइरस (TMV)
2.	टमाटर	राइबोजाइम	सिट्रस एक्जोकोर्टिस वाइरोईड (CEVd)
3.	आलू	रेप्लीकेज प्रोटीन	पोटेटो वाइरस Y (PVY)
4.	चावल	रेप्लीकेज प्रोटीन	राइस यैलोमोजैक वाइरस (RYMY)

(ख) .रोगकारी जीवाणु प्रतिरोधकता

जीन अभियान्त्रिकी तकनीक के प्रयोग से आज ऐसे पराजीनी पादप तैयार कर लिए गये हैं जो जीवाणुओं के लिए पूरी तरह प्रतिरोधक हैं । जैसे तम्बाकू में जीवाणु *स्यूडोमोनस सिरिंजी* (*Pseudomonas syringae*) एक रोग पैदा करता है जिसे वन्य आग रोग कहते हैं । इसके लिए इन पादपों में ऐसिटाइल ट्रान्सफरेज एन्जाइम को कोड करने वाले जीन का स्थानान्तरण करके पराजीनी पादप प्राप्त कर लिए गये हैं ।

(ग) रोगकारी कवक प्रतिरोधकता

ऐसे कई पौधे हैं जिनमें कवकों से होने वाले गंभीर रोगों को दूर कर दिया गया है । जैसे तम्बाकू के पौधे में काइटिनेज जीन का स्थानान्तरण *आलटरनेरिया लौंगिपस* (*Alternaria longipus*) के लिए प्रतिरोधकता उत्पन्न करता है । यह कवक तम्बाकू में भूरा धब्बा रोग उत्पन्न करती है और फसल को बहुत नुकसान पहुँचाती है । इसी प्रकार ओस्मोटीन जीन आलू में कवक *फाइटोफ्थोरा इनफेस्टेन्स* (*Phytophthora infestens*) के प्रति प्रतिरोधकता प्रदान करती है। काइटिनेज जीन तम्बाकू में *राइजोक्टोनिया सोलेनाई* (*Rhizoctonia solani*) के लिए प्रतिरोधकता प्रदान करती है।

15.6.3 कीट-पीड़क प्रतिरोधी

यह बात सर्वविदित है कि ऐसे बहुत प्रकार के कीट तथा अन्य प्राणी हैं जो फसलों को गंभीर रुप से नुकसान पहुँचाते हैं । इन्हें पीड़क अर्थात पीड़ा पहुँचाने वाला (Pest) नाम दिया गया है । यहाँ तक कि इनके लार्वा भी फसलों को हानि पहुँचाते है । इन्हें नष्ट करने के लिए कीटनाशकों का प्रयोग किया जाता है । परन्तु ये अविघटनकारी होते हैं (उदा. D.D.T) । ये खाद्य श्रृंखला में प्रविष्ट होकर भारी नुकसान पहुँचाते हैं । साथ ही ये लाभदायक कीटों और सूक्ष्मजीवों को भी नष्ट कर देते हैं । इनका एक सबसे बड़ा नुकसान पर्यावरण को प्रदूषित करना भी है।

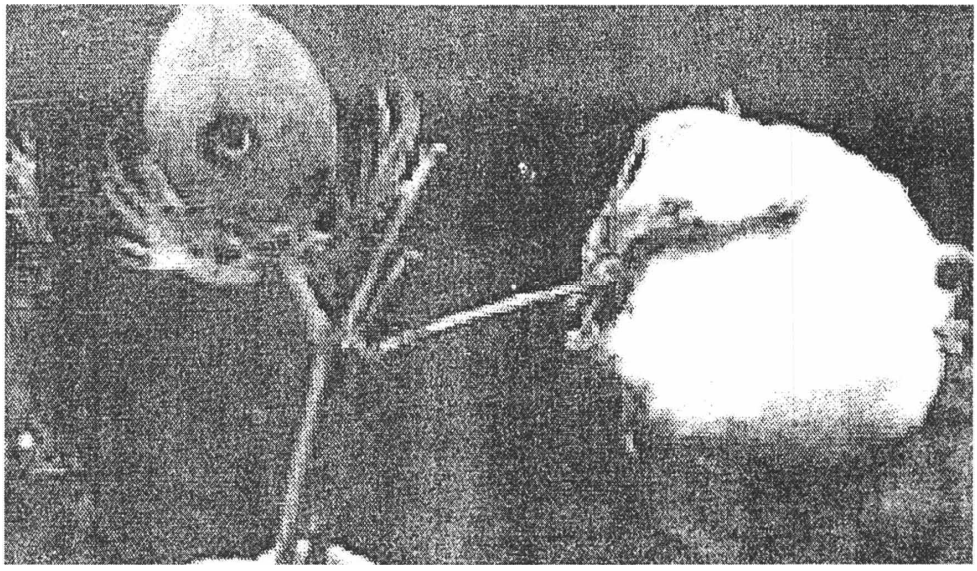
ऐसी विषम परिस्थितियों के निराकरण के लिए जीन स्थानान्तरण तकनीक का उपयोग कर ऐसे पराजीनी पादपों का निर्माण किया जा रहा है जिनमें प्राकृतिक रुप से इन कीटों के प्रति प्रतिरोधी क्षमता हो । इनके उदहारण निम्न है -

(i) बेसिलस थूरिंजिएन्सिस (Bacillus thuringiensts) के cry (crystal protein) जीन का निवेशन

बेसिलस थूरिंजिएन्सिस एक छड़ाकार जीवाणु है । यह मृदा में बीजाणुजनन के समय पराबीजाणीय क्रिस्लीय प्रोटीन विष का निर्माण करता है । इस विष के प्रोटीन को डेल्टा एन्डोटौक्सिन अथवा क्राई प्रोटीन (cry protein) कहा जाता है।

यह विष या क्रिस्टल प्रोटीन एक जीन से कोड होता है । यह **लैपीडोप्टेरा** (Lepidoptera), **डिप्टेरा** (Diptera) आदि समूह के कीटों को नष्ट करता है । इसकी जीन cry I,II,III,IV अथवा हा जीन कहलाती है । जब कीट बीजाणुओं को खाते हैं तब यह क्रिस्टल प्रोटीन उनकी आहार नाल में जाकर मुख उपांगों तथा आहार नाल में पक्षाघात कर देता है । ऐसे कीट फिर आहार लेने में सक्षम नहीं हो पाते तथा नष्ट हो जाते हैं । इनके नष्ट होने पर इनके मृत शरीर से असंख्य बीजाणु मुक्त हो जाते हैं जो अन्य कीटों को भी नष्ट करते हैं ।

अब बैज्ञानिकों ने **ऐग्रोबैक्टीरियम प्लाज्मिड** (Ti plasmid) का उपयोग वाहक के रुप में करके इसकी bt_2 जीन को तम्बाकू कपास, टमाटर आदि में निवेशित करवा दिया है । इससे इन पादपों में **लिपिडोप्टेरा, डिप्टेरा** तथा **कोलियोप्टेरा** आदि वर्गों के कीटों के प्रति प्रतिरोधकता उत्पन्न की गई है । यह स्थानान्तरण कपास में बहुत प्रभावी सिद्ध हुआ है । ऐसी कपास की पत्तियाँ खाने से कीट मर जाते हैं अत: इसे किलर कपास (Killer Cotton) भी कहते है (चित्र 15.10)।



चित्र 15.10 : Bt (दाँयी) व साधारण (बाँयी) कपास में अन्तर । Bt कपास को किलर कपास भी कहते हैं ।

इस प्रक्रिया का व्यवसायिक स्तर पर कम ही उपयोग हुआ है । यह विधि बहुत श्रमसाध्य होने के सग्थ खर्चीली भी है । फिर भी भविष्य में कीटों से बचाव के लिए यह प्रभावी सिद्ध हो सकेगी ऐसा माना जा सकता है । कुछ ऐसे कीटनाशक जिनमें Bt तथा उसके विष मौजूद हैं कई वर्षों से बिक रहे हैं, जैसे डीपेल (Dipel), थूरीसाइड (Thuricide) तथा वेक्टोबैक (vectobac) आदि । यह कीटनाशक पशु-पक्षी तथा स्तनधारियों के लिए पूर्णत: सुरक्षित माने जाते हैं । साथ ही ये अन्य नुकसान न पहुँचाने वाले कीटों के लिए भी सुरक्षित हैं । किन्तु सबसे अच्छा साधन यही है कि इस जीन को पौधे के DNA में ही स्थानान्तरित कर दिया जाये जिससे वह स्वयं ही इस विष का निर्माण कर सकें । कुफरी स्थित क्रेन्दीय आलू अनुसन्धान संस्थान में bt जीन को आलू के पौधों में स्थानान्तरित करने के प्रयास किए जा रहे हैं । इसके अलावा अरहर, अन्य दलहन, मक्का, सोयाबीन आदि में भी प्रयास जारी हैं । ऐसे

ही चावल की एक किस्म इंडिका को भी इसी तरीके से विकसित किया गया है । सारणी 6 में **बेसिलस थूरिजिंएंसिस** के cry जीन तथा उनके लक्ष्य कीट दर्शाये गये हैं ।

सारणी 6: बैसिलस थूरिंजिएंसिस के cry जीन व उनके लक्ष्य कीट

क्र.स	जीन	कीट
1.	cry IA (a)	लेपिडोप्टेरा
2.	cry IA (b)	लेपिडोप्टेरा
3.	cry IA (c)	लेपिडोप्टेरा
4.	cry IB	लेपिडोप्टेरा
5.	cry IC	लेपिडोप्टेरा
6.	cry ID	लेपिडोप्टेरा
7.	cry IE	लेपिडोप्टेरा
8.	cry IIA	लेपिडोप्टेरा एवं डिप्टेरा
9.	cry IIIA	कोलिओप्टेरा
10.	cry IIIB	कोलिओप्टेरा
11.	cry IIIC	कोलिओप्टेरा
12.	cry IVA	डिप्टेरा
13.	cry IVB	डिप्टेरा
14.	cry IVC	डिप्टेरा
15.	cry IVD	डिप्टेरा
16.	cry V	निमैटोड
17.	cry VI	निमैटोड

(iii) लोबिया में ट्रिप्सिन निरोधी जीन का निवेशन (Insertion of trypsin inhibitor gene in Lobia)

लोबिया (*Vigna unguiculata*) में जीन CPTi पाई जाती है । यह ऐसे एन्जाइम उत्पन्न करती है जो हानिकारक कीटों को नष्ट करता है । वैज्ञानिकों ने इस जीन को विलगित करके प्लाज़्मिड वाहक (plasmid vector) की सहायता से तम्बाकू के पौधे में निवेशित किया है । इस प्रकार के पराजीनी पौधे **हीलियोथिस ट्राइबोलियम** आदि कीट वर्गों के प्रति प्रतिरोधी क्षमता दर्शाते हैं ।

15.6.4 नरबन्धता तथा संकर बीज उत्पादन हेतु पराजीनी पादप

जीवाणु *बेसिलस ऐमाइलोलिक्विफेशिऐन्स* (*Bacillus amyloliquifasciens*) के एक जीन, बार्नेज जीन को **मैरियानी व सहयोगियों** (Mariani *et al.*) ने तम्बाकू व तोरिया के पौधों में निवेशित करवाया । इस प्रकार इन पौधों में नर बन्ध्यता उत्पन्न कराई गई । इस जीन को एक टैपीटम (Tapetum) विशिष्ट प्रमोटर जीन TA-29 से प्रचलित कराने पर यह सिर्फ परागकोषों की टैपीटम कोशिकाओं में

ही अभिव्यक्त होता है । इस प्रकार प्राप्त नरबन्ध्य पौधे विषमयुग्मनज होते हैं । प्रत्येक पीढ़ी में इन पौधों का सामान्य पौधों से संकरण (hybridization) करवाया जाता है ।

बेसिलस ऐमाइलोलिक्विफेशिऐन्स जीवाणु में एक और जीन बारस्टार होता है जो विशेष प्रोटीन कोड करता है । यह बारस्टार एन्जाइम पौधों में बार्नेज एन्जाइम द्वारा उत्पन्न कुप्रभावों को नष्ट करता है । यहाँ जिन पौधों के बारस्टार एन्जाइम TA-29 को कोडित करने वाले जीनों की स्थापना की जाती है वे जनन योग्य होते हैं । TA-29 प्रमोटर जीन है । वह नरबन्ध्य पौधा जिसमें TA-29 बानेज जीन होता है जब TA-29 बारस्टार युक्त पौधे से क्रॉस करता है तो संतति का जीन प्रारुप TA-29 बारस्टार होता है । ये पौधे जनन योग्य अर्थात् नरउर्वर होते हैं । असल में बारस्टार एन्जाइम बर्नेज से जुड़कर उसे निक्रिय कर देता है । इस प्रकार नरबन्ध्य पौधों में फिर से जनन क्षमता लाई जा सकती है ।

15.6.5 खाद्य प्रसंस्करण हेतु पराजीनी पादप

जीन अभियान्त्रिकी के प्रयोग से आज यह संभव हो पाया है कि अनेक खाने योग्य फल व सब्जियाँ लम्बे समय तक सुरक्षित रखी जा सकती है । इसके कुछ उदाहरण निम्न हैं -

(i) फलों को पकाने में इथिलीन (ethylene) सहायक होती है । यदि इसे उत्पन्न करने वाले जीनों की क्रियाशीलता कम कर सकें तो फल लम्बे समय में पकेंगे । इसे विलम्बित पकाव (delayed ripening) कहा जाता है ।

(ii) टमाटर के पौधों में सुक्रोज फॉरफेट सिन्थेटेज (Sucrose phosphate synthetase) जीन के स्थानान्तरण द्वारा फलों में सुक्रोज शर्करा को बढ़ाया जा सकता है ।

(iii) टमाटर के फलों में एन्जाइम पॉलीगैलेक्ट्यूरोनेज (polygalacturonase) होता है । यह पेक्टिन का पाचन कर देता है जिससे टमाटर शीघ्र ही नरम पड़ जाते हैं । पराजीनी टमाटरों में इस एन्जाइम की क्रियाशीलता कम कर दी जाती है ताकि टमाटर लम्बी अवधि तक ताजा रह पाते है । पराजीनी टमाटर "फ्लेवर सेवर" (flavr shavr) की निदानी आयु (self life) अधिक होती है । इनमें ACC डीअमीनेज (ACC deamenase) जीन का स्थानान्तरण किया गया । यह एन्नाइम इथिलीन के संश्लेषण के पूर्ववर्ती (precursor) को नष्ट कर देता है । अत: टमाटर देर में परिपक्व होते हैं । व्यापारिक कृषि के लिए अनुमति प्राप्त कुछ पराजीनी पादप किस्में सारणी 7 में दर्शायी गई हैं ।

सारणी 7 : व्यापारिक कृषि के लिए अनुमति प्राप्त कुछ फसलों की पराजीनी किस्में

क्र.स.	फसलें	पराजीनी किस्म
1.	मक्का	यील्दगार्ड
2.	पपीता	सनअप, रेनबो
3.	कैनोला	लारिकाल, राउण्डअप रेडी
4.	कपास	बोलगार्ड, BXN कपास
5.	आलू	न्यूलीफ, न्यूलीफ Y
6.	सोयाबीन	फ्रीडम
7.	टमाटर	एन्डलेस समर, फ्लेवर सेवर

15.6.6 पौधों में नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता बढ़ाने हेतु पराजीनी पादप

नाइट्रोजन स्थिरीकरण के लिए उत्तरदायी जीन nif कहलाती है । इसे *साल्मोनेला टाइफीम्यूरियम, अरवीनिया हर्बिकोला सिरेटिया* आदि में स्थानान्तरित करके इनमें नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता का विकास सफलतापूर्वक किया गया है ।

15.6.7 चिकित्सा के क्षेत्र में पराजीनी पादप

यदि विभिन्न प्रतिजन (antigen) तथा प्रतिरक्षी (antibody) से संबंधित जीन युक्त पादप प्राप्त कर लिए जाऐं तो टीकाकरण की समस्या से छुटकारा मिल सकता है । इससे खर्चे में कमी के साथ दर्द, बुखार आदि परेशानियों से भी बचा जा सकेगा । भारतीय वैज्ञानिकों ने तम्बाकू व मक्का में r-इन्टरफेरोन (r-interferon) जीन युक्त पराजीनी पादप विकसित कर लिए हैं । ये विभिन्न इम्यूनोग्लोब्यूलिन का संश्लेषण करते हैं । साथ ही मानव सीरम एल्ब्यूलिन जीन को भी आलू व तम्बाकू में स्थानान्तरित किया जा चुका है । इंसुलिन के जीन युक्त आलू भी सफलतापूर्वक बनाया गया है । इन क्षेत्रों में अभी व्यापक अनुसन्धान की आवश्यकता है ।

यहाँ सबसे महत्वपूर्ण बात यह है कि पादप उत्पादित टीके (vaccines) बनाए जा रहे हैं । पराजीनी पौधों के कंद, फल तथा अन्य भागों से खाद्य टीकों का विकास किया जा रहा है । ऐसे पराजीनी पौधे जिनमें किसी भी रोगकारक (pathogen) के लिए प्रतिजनी (antigenic) प्रोटीन बनता तथा संग्रहित होता हो, खाद्य टीकों के निर्माण के लिए प्रयुक्त होते हैं । इन प्रोटीनों को कोडित करने वाले जीनों को पौधों मे उचित रुप से अभिव्यक्त करवाया जाता है । इनके कंद, फल आदि को जंतुओं तथा मानवादि को खिलाने पर उनमें प्रतिजन के लिए प्रतिरक्षी उत्पन्न होगा और वे प्राणी संबंधित रोगकारक के प्रतिरोधक्षम हो जाएंगे । इस ओर शोध कार्य तेजी के साथ चल रहे हैं तथा आशा की जा सकती है कि निकट भविष्य में हमें पूर्ण रुप से सफलता भी मिल जाएगी।

इस विधि के समान ही एक दूसरी तकनीक भी टीकों के उत्पादन में उपयोगी है तथा वह है शोधित पुनर्योगज टीकों का प्रयोग । इसमें प्रतिजनी प्रोटीनों का उत्पादन पौधों में किया जाता है फिर इन्हें शोधित करके टीकों के रुप में प्रयोग किया जाता है । इस विधि से यकृतशोथ B (Hepatitis B) के सतह प्रतिजन (surface antigen, HBsAG) को खमीर में व्यक्त करवाकर उत्पादित किए गये टीके आज बाजार में भी उपलब्ध हैं ।

15.7 पराजीनी पादपों के कुछ उदाहरण (Few Examples of Transgenic Plants) :

निरन्तर खोजों व अनुसंधानों के फलस्वरूप बीसवीं सदी के अंत तक कई पराजीनी पादप व्यवसायिक स्तर पर भी बाजार में उतारे गऐ है । कुछ महत्वपूर्ण तथा आर्थिक दृष्टि से उपयोगी पादप निम्न हैं-

15.7.1 द्विबीजपत्री पराजीनी पादप

(1) कपास (2) टमाटर (3) आलू (4) तम्बाकू (5) पिटूनिया (6) सूरजमुखी (7) पपीता (8) गोभी (9) तोरिया (10) सोयाबीन (11) मटर (12) गाजर (13) कार्नेशन (14) कैनोला (15) बैंगन (16)

ऐरेबिडोप्सिस (17) कमल (18) ककड़ी (19) शकरकन्द (20) स्ट्रौबेरी (21) कीवी (22) अंगूर (23) गुलदाउदी (24) गुलाब (25) सेब (26) नीम (27) अखरोट

15.7.2 एकबीजपत्री पराजीनी पादप

(1) गेहूँ (2) चावल (3) मक्का (4) जई (5) राई (6) केला (7) शतावर

बोध प्रश्न

5. दो ट्रासजीनी पौधों के नाम बताइऐ ।
   .....
6 कीट प्रतिरोधी जीन.....में पाया जाता हैं ।
   .....
7. एग्रोबैक्टीरियम.....का वाहक होता है ।
   .....
8. एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमीफेशीन्स से होने वाला रोग.....है।
   .....
9. बी.टी. विष (Bt toxin) में.....होता है ।
   .....

15.8 भारत में पराजीनी पादप - संभावनाएँ एवं विकास (Transgenic Plants in India : Scope and Development) :

1990 के आसपास पराजीनी पादपों पर कई शोध किए गये तथा 1994 में पहली बार व्यवसायिक स्तर पर इन्हें बाजार में लाया गया । आज स्थिति यह है कि लगभग 16 देशों में इन पर निरन्तर कार्य चल रहा है । सन् 2003 तक लगभग 67.7 मि. है. क्षेत्रफल इन फसलों के उत्पादन के लिए काम में लाया गया ।

हमने प्रस्तुत इकाई में पढ़ा कि कैसे पराजीनी पादप उत्पन्न कर कई समस्याओं का निदान किया जा सकता है । किन्तु इन पादपों को व्यवसायिक स्तर पर बनाने के पहले कुछ आवश्यक बातों का ध्यान रखना जरूरी है जैसे

कहीं ये पादप प्रत्यक्ष या परोक्ष रुप से पर्यावरण अथवा हमे नुकसान तो नहीं पहुँचा रहे है? कहीं ये एलर्जी अथवा कोई, दूसरे विष (toxins) तो नहीं पैदा कर रहे ? अत: पराजीनी पादप हमारी राष्ट्रीय कृषि नीति (National Agriculture Policy) का हिस्सा होने चाहिए तथा भविष्य के लिए फायदेमंद होने चाहिए । इसमें निम्न बातों का समावेश होना आवश्यक है -

(1) उत्पन्न किए गये पराजीनी पादप देश की उन्नति में सहायक हों । जैसे भारत के लिए बासमती चावल विदेशी मुद्रा का एक मुख्य स्रोत हैं । अत: जहाँ भी बासमती चावल उगाया जाता है वह सम्पूर्ण क्षेत्र पराजीनी चावल रहित हो ताकि जीनों को सुरक्षित रखा जा सकें ।

(2) कई पौधे जैसे आलू गेहूँ मूँगफली, गन्ना, मक्का, चावल आदि पर अधिक शोध की आवश्यकता है क्योंकि एक तो यह भारत में मुख्य भोज्य पदार्थों में गिने जाते हैं, साथ ही इनमें जीन स्थानान्तरण से कई समस्याओं का आसानी से निराकरण किया जा सकता है ।

(3) कपास जैसे कई पौधे जिनमें कीट प्रतिरोधकता कम होती है, उनमें जीन स्थानान्तरण की तकनीक से प्रतिरोधक क्षमता विकसित की जा रही है । इसका एक उदाहरण Bt-पराजीनी पादप हैं । इसके अलावा दूसरी जीने जैसे लैक्टिन अथवा प्रोटिएस इनहिबिटर आदि के भी अच्छे परिणाम देखने को मिले हैं ।

(4) भारत में हो रहे विभिन्न शोधकार्यों से यह निष्कर्ष निकाला जा चुका है कि कुछ पादपों जैसे टमाटर व **ब्रैसिका नेपस** में जीन स्थानान्तरण द्वारा लवण एवं शीत के लिए प्रतिरोधकता उत्पन्न की जा सकती है । इस प्रकार अन्य पादपों में और अधिक शोधकार्यों की आवश्यकता है ।

(5) जीन स्थानान्तरण के प्रयोगों द्वारा भुखमरी की समस्या को दूर करने के प्रयास भी चल रहे हैं । चावल कैनोला व टमाटर के गुणों में कई गुना वृद्धि सफलतापूर्वक की जा चुकी है तथा इसका उत्पादन भी बढ़ाया गया है । इस तकनीक द्वारा विटामिन तथा खनिज, खाद्य पदार्थों में कई गुना बढ़ जाते हैं जो पोषण प्रदान करने में सहायक सिद्ध हो सकते हैं ।

(6) हमारे देश में आलू लगभग हर प्रदेश में बहुतायत से खाया जाता है । इसकी जगंली प्रजाति से एक रोग प्रतिरोधक जीन संवर्धित प्रजाति में सफलतापूर्वक स्थानान्तरित की जा चुकी है । यह जीन आलू में होने वाले लेट ब्लाइट (Late Blight) रोग के लिए प्रतिरोधकता प्रदान करती है । अत: इस रोग के कारण प्रतिवर्ष होने वाले जैव प्रौद्योगिकी नुकसान से बचा जा सकता है ।

भारत सरकार ने जैव प्रौद्योगिकी के महत्व को देखते हुये राष्ट्रीय बायोटैक्मोलॉजी बोर्ड (National Biotechnoogy) का गठन किया है । इस प्रकार 1988 में एक अलग विभाग स्थापित किया गया जिसे बायोटैक्मोलॉजी विभाग (Department of Biotechnology, DBT) नाम दिया गया । यह विभाग विज्ञान एवं टैक्मोलॉजी मंत्रालय के अन्तर्गत आता है । भारत में बायोटैक्मोलॉजी क्षेत्र में शोध कार्य कई संस्थानों में चल रहा है जिनमें भारतीय कृषि अनुसंधान संस्थान, नई दिल्ली, राष्ट्रीय दुग्ध शोध संस्थान, करनाल तथा भारतीय वेटरनरी शोध संस्थान, उ.प्र. प्रमुख हैं । इनके अलावा भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद् (CSIR), नई दिल्ली एवं वैज्ञानिक तथा औद्योगिक अनुसंधान परिषद् (ICAR), नई दिल्ली भी इस क्षेत्र में काफी कार्य कर रहे हैं । इन सभी संस्थानों में फसल सुधार संबंधी शोध चल रहे हैं । संयुक्त राष्ट्र संघ (UNO) ने भी एक) अंतर्राष्ट्रीय आनुवंशिक इंजीनियरी व बॉयोटैक्मोलॉजी केन्द्र (ICGEB) की स्थापना की है जिसकी एक शाखा नई दिल्ली में 1987 में स्थापित की गई । इसका दूसरा केन्द्र इटली में है । इसी प्रकार केन्द्रीय औषधीय व शोध पादप संस्थान, लखनऊ, उष्णकटिबंधीय वानस्पतिक उद्यान व अनुसंधान संपदा ब्यूरो, नई दिल्ली में जीन बैंकों की स्थापना की गई है । इनमें G-15 के सदस्य राष्ट्रों के वैज्ञानिकों को प्रशिक्षण भी दिया जायेगा । भारत सहित विभिन्न देशों में पराजीनी पादपों के उत्पादन के क्षेत्रफल व फसलें सारणी 8; में दर्शाई गई है ।

सारणी 8 : विभिन्न देशों में पराजीनी पादप उत्पादन के क्षेत्रफल

क्र.स.	देश	कुल क्षेत्रफल (मिलियन हेक्टेयर में)	फसल
1.	अमेरिका	74.8	सोयाबीन, मक्का, कपास, केनोल
2.	अर्जेन्टीना	24.7	सोयाबीन, मक्का, कपास
3.	कनाडा	7.4	सोयाबीन, मक्का, केनोला
4.	चीन	1.2	कपास
5.	मैक्सिको	0.1	कपास
6.	दक्षिण अफ्रीका	0.5	मक्का, कपास
7.	भारत	0.5	किटरोधी B_1- कपास

15.9 आणविक खेती (Molecular Farming) :

जीन अभियान्त्रिकी तकनीक द्वारा जीनों के स्थानान्तरण से औषध रसायनों को उत्पन्न करने वाले पराजीनी पादप विकसित किए जाते हैं । यह तकनीक अथवा प्रक्रिया ही आणविक खेती कहलाती है । इसमें विभिन्न उच्चवर्गीय पादपों को जैव कारखानों अथवा रिएक्टरों में परिवर्तित किया जाता है तथा इनसे औषध रसायनों का बहुतायत में संश्लेषण किया जाता है ।

इस तकनीक द्वारा विकसित पादप खाद्य पदार्थों के लिए नहीं बल्कि औषध रसायनों को उत्पन्न करने के काम आते हैं । वे औषधियाँ जो अन्य तरीकों से उत्पन्न करने में अत्यधिक महंगी पड़ती हैं, इस तकनीक के प्रयोग से कम लागत में उत्पन्न की जा सकती हैं । किसी भी अन्य स्त्रोत जैसे सूक्ष्मजीवों में से जीन पादप में स्थानान्तरित की जा सकती है तथा पराजीनी पादप विकसित किए जा सकते हैं। इन पादपों में वृद्धि के समय औषधीय महत्व वाले रसायनों का निर्माण व संचय सामान्य पादपों की तुलना में कई गुना अधिक होता है । इस तकनीक का प्रयोग कुछ जन्तु रोगों में पहले से ही किया जा रहा है, जैसे मिन्क एन्टराइटिस वाइरस रोग । इसी प्रकार नवजात शिशुओं में होने वाली डाइबिटीज के निवारण में भी प्रयोग जारी है ।

आश्चर्यजनक रुप से तम्बाकू के पौधों को कई महत्वपूर्ण उत्पादों के उत्पादन में काम आने के कारण आदर्श जैव कारखाना कहा जा सकता है । यह हरी पत्तियों का उत्पादन बहुतायत में करता है तथा कार्य करने की दृष्टि से काफी सुलभ भी है । वे सभी उत्पाद जो पत्तियों में बनते हैं, उनके लिए तम्बाकू के पौधों का प्रयोग आसानी से किया जा सकता है । यह कहना अतिश्योक्ति नहीं होगी कि एक दिन तम्बाकू उत्पादन के स्थान पर इसे विभिन्न औषधीय रसायनों की प्राप्ति के लिए काम में लिया जायेगा । तम्बाकू के पौधे में एक जीवाणु ई. कोलाई (E. Coli) का जीन स्थानान्तरित किया गया है जो मैनिटॉल डीहाइड्रोजिनेस (Mannitol dehydrogenase) एन्जाइम का संश्लेषण करता है । इस जीन के कारण तम्बाकू के पौधें में मैनिटॉल का उत्पादन बढ़ जाता है ।

इसी प्रकार आलू के पौधे में जीवाणुओं से लिए गये जीन को स्थानान्तरित किया गया है जो साइक्लोडेक्सट्रिनस रसायन का संश्लेषण करता है । इस प्रकार आलू में यह रसायन उत्पन्न होता रहता है । वे औषधीय रसायन जो पत्तियों से प्राप्त किए जाते हैं, उनके लिए तम्बाकू का पौधा उचित रहता

है । परन्तु कुछ रसायन बीजों में उत्पन्न होते हैं । उनके लिए अन्य पादप जैसे मक्का, सोयाबीन अथवा कैनोला उपयोगी रहते हैं, तम्बाकू नहीं क्योंकि तम्बाकू के बीज बहुत छोटे होते हैं । इस प्रकार से विभिन्न औषधीय रसायनों के लिए विभिन्न पादप काम में लिए जा सकते हैं । इसी क्रम में कुछ ऐसे पराजीनी पादपों का विकास भी कर लिया गया है जिनसे मानव सीरम एल्ब्यूमिन तथा पॉलीहाइड्रोक्सीब्यूटाइरेट का सफलतापूर्वक उत्पादन किया जा सकता है।

15.10 सारांश (Summary) :

पुनर्योजन DNA तकनीक ने यह संभव कर दिखाया है कि किसी पादप के जीनोम में सुधार किया जा सकता है । इससे फसलों का उत्पादन बढ़ाया जा सकता है, साथ ही उनकी गुणवत्ता में भी कई गुना सुधार किया जा सकता है । इच्छित जीनों की पहचान करके उन्हें पादपों में विभिन्न तरीकों से स्थानान्तरित करवा दिया जाता है । इस तकनीक की खोज ने फसल सुधार में असीम सम्भावनाओं के आयाम प्रस्तुत किए हैं । यह एक शक्तिशाली तकनीक है जिसके द्वारा फसलों की प्रजातियों में इच्छित परिवर्तन करके गुणों को सुधारा जा सकता है । इसी के कारण आज हम आलू व टमाटर एक पौधे पोमैटो (pomato) पर एक साथ प्राप्त कर सकते हैं । मानव कल्याण के लिए विभिन्न पौधों की हानिकारक जीनों को हटा कर लाभकारी जीनों को प्रतिस्थापित किया जा रहा है । ऐसे पौधे जिनमें अन्य बाहरी जीनों को प्रवेश कराकर मुख्य DNA से जोड़ दिया जाता है पराजीनी पादप कहलाते हैं । यह पादप नयी समाकलित जीनों के अनुरुप ही लक्षणों की अभिव्यक्ति करता है ।

पराजीनी पौधों के विकास व उन पर किए जाने वाले अनुसंधान कार्य अभी प्रारम्भिक अवस्था में ही है लेकिन निकट भविष्य में हम अत्यधिक सफलता प्राप्त करेंगे, यह कहना अतिश्योक्ति नहीं होगी । फसल सुधार के लिए किए गये प्रयोग बहुत हद तक सफल रहे हैं जिनमें शाकनाशी प्रतिरोधी, विभिन्न कीट, प्रतिबल, वाइरस, रोगकारक जीवाणु व कवक प्रतिरोधी पादप विकसित कर लिए गये हैं । आज के समय की माँग के अनुसार आणविक कृषि के क्षेत्र में भी पराजीनी पादपों का योगदान महत्वपूर्ण माना जा रहा है तथा इन पर अनेक शोधकार्य चल रहे हैं ।

15.11 बोध प्रश्नों के उत्तर :

1. प्रतिबन्धन एन्जाइम (Restriction enzymes)
2. वाहक (Vector)
3. पराजीनी (Transgenic)
4. अग्रोबैक्टीरियम का Ti प्लाज़्मिड
5. बी.टी. कपास (Bt Cotton) तथा फ्लेवर सेवर टमाटर (Flavr Savr Tomato)
6. *बेसीलस थुरिंजिएन्सिस* (*Bacillus thuringiensis*)
7. Ti प्लाज़्मिड
8. क्राउन गॉल
9. क्राई प्रोटीन

15.12 अभ्यासार्थ प्रश्न (Exercise Question) :

1. पराजीनी पादप क्या होते हैं? प्रतिबल प्रतिरोधी पौधों का वर्णन कीजिए ।
2. आणविक खेती से आप क्या समझते हैं ? पराजीनी पादपों का आणविक खेती में क्या महत्व है समझाइए।
3. रोगकारी कवक प्रतिरोधी व रोगकारी जीकणु प्रतिरोधी पराजीनी पादपों पर टिप्पणी कीजिए ।
4. ऐग्रोबैक्टीरियम द्वारा जीन स्थानान्तरण की विधियों का वर्णन कीजिए ।
5. पादप कोशिकाओं में रुपान्तरण की विधियाँ समझाइए । इन विधियों के गुण व दोषों की विवेचना कीजिए ।
6. पादपों में उपयोगी जीन रुपान्तरण की विधियों का वर्णन कीजिए ।
7. चिकित्सा के क्षेत्र में पराजीनी पादपों के महत्व पर प्रकाश डालिए ।

15.13 शब्दावली (Glossary) :

जीनोमिकी	Genomics
ऊर्ध्वप्रवाह क्रम	Upstream sequence
Ti प्लाज़्मिड	Ti-plasmid
रुपान्तरण	Transformation
जीन रचना	Gene Construct
विपाटित जीन	Split gene

15.14 संदर्भ ग्रन्थ (Referecne Books) :

1. लेविन, जीन IV, ऑक्सफोर्ड यूनिवर्सिटी प्रेस, न्यूयार्क ।
2. लेविन, जीन V, ऑक्सफोर्ड यूनिवर्सिटी प्रेस, न्यूयार्क ।
3. ओल्ड एण्ड प्रिमरोज, प्रिसिपल्स ऑफ जीन मेनुपुलेशन : एन इण्ट्रोडक्शन टू जेनेटिक इंजीनियरिग, ब्लैकवेल साइन्स पब्लि लंदन ।
4. सिंह, बॉयोटेक्मोलॉजी, कल्याणी पब्लिशर्स, नई दिल्ली ।
5. गुप्ता, मोलीक्यूलर बॉयोलोजी एण्ड जेनीटिक इंजीनियरिंग, रस्तोगी पब्लिकेशन्स, मेरठ ।