अध्याय-16
पादप ऊतक संवर्धन
(Plant Tissue Culture)

रॉबर्ट हुक (Robert Hooke) द्वारा सन् 1665 में पादप कोशिका की खोज के पश्चात् सन् 1839 में **मैथियास जैकब श्लाईडेन** (Matthias Jacob Schleiden) तथा **थियोडोर श्वान** (Theodor Schwann) ने कोशिका सिद्धान्त का प्रतिपादन किया। कोशिका सिद्धान्त के अनुसार **कोशिका शरीर की संरचनात्मक एवं क्रियात्मक इकाई है।** कोशिका सिद्धान्त को आगे बढ़ाते हुए सन् 1855 में **रूडोल्फ विरच्यू** (Rudolf Virchow) ने बताया कि नई कोशिका का निर्माण पूर्ववर्ती कोशिका से होता है। **रूडोल्फ विरच्यू** द्वारा बताये गये इस तथ्य के आधार पर कोशिका सिद्धान्त जीवविज्ञान के क्षेत्र में मील का पत्थर सिद्ध हुआ है।

आधुनिक कोशिका सिद्धान्त के अनुसार –

(1) कोशिका शरीर की संरचनात्मक एवं क्रियात्मक इकाई है।

(2) नई कोशिका का निर्माण पूर्ववर्ती कोशिका से होता है।

(3) समस्त प्रकार की उपापचयी क्रियाएं कोशिका में सम्पन्न होती हैं, तथा

(4) सजीवों में आनुवंशिक सूचनाओं का एक पीढ़ी से दूसरी पीढ़ी में स्थानान्तरण कोशिका के माध्यम से ही होता है।

कोशिका सिद्धान्त के अनुसार पादप की प्रत्येक कोशिका में जिस पादप की यह कोशिका है, के सभी लक्षण विद्यमान होते हैं तथा इसमें उस सम्पूर्ण पादप को विकसित करने की क्षमता होती है। पादप कोशिका की यह क्षमता **पूर्णशक्तता** (Totipotency) कहलाती है। टोटिपोटेन्सी (पूर्णशक्तता) शब्द का सर्वप्रथम प्रयोग सन् 1909 में सम्भवतः **मोर्गन** द्वारा किया गया था। लेकिन पूर्णशक्तता के कारण पादप कोशिका के संवर्धन से सम्पूर्ण पादप को विकसित किया जा सकता है, इस संकल्पना का प्रतिपादन जर्मन वैज्ञानिक **हैबरलैण्ड** Haberlandt, 1902 द्वारा किया गया। अधिकांश जन्तुओं में पूर्णशक्तता की क्षमता नहीं पायी जाती है। अतः पादप जीवद्रव्यक, कोशिका, ऊतक, अंग अथवा सम्पूर्ण तंत्र को निर्जर्मीकृत (Sterile) एवं नियन्त्रित (Controlled) अवस्थाओं में रासायनिक रूप से ज्ञात संवर्धन माध्यम पर संवर्धित करने की प्रक्रिया **ऊतक संवर्धन** (Tissue Culture) कहलाती है। पादप ऊतक संवर्धन का प्रथम प्रयास जर्मन वैज्ञानिक **गोटलिब हेबरलैण्ड** द्वारा 1902 में किया गया। पादप ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में विभिन्न वैज्ञानिकों के महत्वपूर्ण योगदान को सारणी 16.1 में दर्शाया गया है।

ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त होने वाली महत्वपूर्ण पारिभाषिक शब्दावली

संवर्धन माध्यम (Culture medium) – रासायनिक रूप से ज्ञात अवयवों युक्त पोषक माध्यम जिसका उपयोग संवर्धन स्थापन व गुणन हेतु किया जाता है।

कर्त्तोतक (Explant) – पौधे के वे भाग जिनका उपयोग ऊतक संवर्धन हेतु किया जाता है, जैसे विभज्योतक ऊतक, जड़, तना पत्ती, पुष्प व पुष्पीय भाग इत्यादि।

किण या कैलस (Callus) – नवसंवर्धित विभज्योतकी कोशिकाओं का असंगठित समूह।

सारणी 16.1 पादप ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में विभिन्न वैज्ञानिकों का योगदान

वर्ष	वैज्ञानिक का नाम	खोज
1902	गोटलिब हैबरलैण्ड (Gottlieb Haberlandt)	कृत्रिम संवर्धन माध्यम पर पादप कोशिका संवर्धन का प्रथम प्रयास
1922	डब्लु. जे. रॉबिन्स (W.J. Robbins) तथा डब्लू कोटे (W. Kotte)	प्ररोह तथा मूल शीर्ष का सफलतापूर्वक संवर्धन किया (अंग संवर्धन)
1926	एफ. डब्लु. वेन्ट (F.W. Went)	वृद्धि हॉर्मोन ऑक्सिन (इण्डोल ऐसीटिक अम्ल) की खोज।
1939	आर. जे. गोथेर्ट, (R.J. Gautheret) पी. आर. व्हाइट (P.R.White) पी. नोबेकोर्ट (P. Nobecourt)	दीर्घकालिक वृद्धिशील संवर्धनों की स्थापना।
1941	वॉन ओवरबीक (Van Overbeek)	प्रथम बार कोशिका विभाजन हेतु संवर्धन माध्यम में नारियल पानी (Coconut milk) का प्रयोग किया ।
1946	ई. बॉल (E. Ball)	प्ररोह शीर्ष संवर्धनों के द्वारा संपूर्ण पादप का विकास (क्लोनिंग) किया।
1954	डब्लू. एच. मूर (W.H. Muir)	पृथक्कृत एकल कोशिका संवर्धन की तकनीक का विकास किया।
1955	एफ. स्कूग तथा मिलर (F. Skoog and Miller)	काइनेटिन-(कोशिका विभाजन हेतु हॉर्मोन) की ऊतक संवर्धन में आवश्यकता को स्थापित किया।
1959	जे. रेनर्ट (J.Rennert)	गाजर के निलम्बन संवर्धनों से भ्रूणों का विकास।
1959	आर. जे. गोथर्ट (R.J. Gautheret)	पुस्तक हैण्ड बुक ऑन प्लांट टिस्यूकल्चर का प्रकाशन
1960	ई.सी. कोकिंग (E.C. Cocking)	पादप कोशिका भित्ति को एन्जाइमी अपघटन द्वारा नष्ट कर जीवद्रव्यकों को पृथक्ककृत किया।
1962	टी. मुराशिगे तथा एफ.स्कूग (T. Murashige and F. Skoog)	ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में सर्वाधिक उपयोग लिए जाने वाले संवर्धन माध्यम (MS medium) का विकास किया।
1964	एस.गुहा मुखर्जी व एस.सी महेश्वरी (S. Guha Mukherjee and S.C. Maheshwari))	धतूरे के परागकणों के संवर्धन द्वारा सर्वप्रथम अगुणित पादप विकसित किए।
1970	जे. बी. पॉवर व सहयोगी (J.B. Power)	जीवद्रव्यक संलयन का प्रथम बार सफल प्रदर्शन किया।
1978	जी. मेल्चर्स व सहयोगी (G. Melchers et.al)	आलू व टमाटर के जीवद्रव्यक संलयन द्वारा कायिक संकर पोमेटो का विकास।
1983	एम.डी. चिल्टन (M.D. Chilton)	तम्बाकू के ट्रांसजीनी पादप का प्रवर्धन।

जीवद्रव्यक (Protoplast)- कोशिका भित्ति रहित पादप कोशिका।

निर्जर्मीकरण (Sterilization) - सूक्ष्मजीवों के समूल उन्मूलन या उनको नष्ट करने की प्रक्रिया।

सतही निर्जर्मीकरण (Surface sterilization) - ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त होने वाले कर्तोतकों की सतह से सूक्ष्मजीवों का उन्मूलन।

संरोपण या निवेशन (Inoculation) - सतही निर्जर्मीकृत कर्त्तोतकों के संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरण करने की प्रक्रिया।

पात्रे (*Invitro*) - परखनली, फ्लास्क, बोतल आदि काँच अथवा प्लास्टिक के पात्रों में संवर्धन करने की प्रक्रिया।

क्लोन (Clone) - अलैंगिक जनन की विधियों द्वारा मातृ पादप के समान विकसित संततियां क्लोन कहलाती है।

कायिक भ्रूण (Somatic embryo) - कायिक कोशिकाओं

से विकसित भ्रूण।

कृत्रिम बीज (Artificial/ Synthetic seed) – संपूटिकृत कायिक भ्रूण।

भ्रूणाभ (Embryoids) – पात्रे विधि द्वारा कायिक कोशिकाओं से विकसित भ्रूण सदृश्य संरचनाएँ।

सूक्ष्म प्रवर्धन (Micropropation) – ऊतक संवर्धन विधि से पादप जनन।

पादप ऊतक संवर्धन कार्य हेतु आवश्यक संसाधन

ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला आधुनिक उपकरणों से सुसज्जित होनी चाहिए। यथासंभव इस प्रयोगशाला का निर्माण सूक्ष्मजीवों, कीट पतंगों एवं पादपों के बीज अथवा अन्य भागों के संग्रहण से संबंधित कार्य करने वाली प्रयोगशालाओं के पास नहीं करना चाहिए।

ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला का निर्माण करते समय उसकी बनावट तथा कार्य क्षेत्रों की स्थिति का विशेष ध्यान रखना चाहिए। ऊतक संवर्धन कार्य हेतु प्रयोगशाला में काँच के सामान का प्रक्षालन कक्ष (Glassware washing room), संवर्धन माध्यम निर्माण कक्ष (Culture media preparation room), अभिलेख (Record) कक्ष, निर्जर्मीकृत स्थानान्तरण क्षेत्र व संवर्धन कक्ष (Culture room) होने चाहिए। ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा विकसित पादपकों (Plantlets) के दृढ़ीकरण (Hardening), दशानुकूलन या पर्यनुकूलन (Acclimatization) एंव संग्रहण हेतु ग्रीनहाऊस व पौधशाला (Nursery) का निर्माण भी आवश्यक है।

एक आदर्श ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला के विभिन्न कार्य क्षेत्रों में आवश्यक सुविधाओं एवं उपकरणों को सारणी 16.2 में दर्शाया गया है।

संवर्धन माध्यम
(Culture Medium)

वह कृत्रिम माध्यम जिसमें पादप कोशिकाओं, ऊतकों, अंगों तथा सम्पूर्ण तन्त्र को संवर्धित करते हैं, **संवर्धन माध्यम** कहलाता है। प्रायोगिक आवश्यकताओं के आधार पर संवर्धन माध्यम तरल अथवा अर्ध ठोस (Semi solid) हो सकता है। ऊतक संवर्धन तकनीक के प्रारम्भ काल से ही उपयुक्त संवर्धन माध्यम विकसित करने हेतु अनेक वैज्ञानिकों ने प्रयास किए। जिनमें से व्हाइट् (White, 1953) बी$_5$ (B_5 Gamborg et al, 1968) तथा एम.एस. (M.S. - Murashige and Skoog, 1962) के द्वारा विकसित संवर्धन माध्यम उल्लेखनीय हैं। इनमें से सामान्य प्रयोगों के लिए एम.एस. माध्यम का सर्वाधिक प्रयोग किया जाता है। उपयुक्त विधि द्वारा निर्मित तथा निर्जर्मीकृत माध्यम का ठण्डा होने पर ऊतक संवर्धन कार्यों हेतु उपयोग किया जाता है।

सूक्ष्म प्रवर्धन (Micro propagation) के चरण – ऊतक संवर्धन द्वारा कर्त्तोतकों के चयन से लेकर पूर्ण विकसित पादप निम्नलिखित चरणों द्वारा प्राप्त किए जाते हैं।

शून्य चरण :- इस चरण को दो भागों में विभाजित किया जा सकता है :-

(i) कर्त्तोतकों का चयन एवं पूर्व उपचार:- कर्त्तोतकों का चयन प्रायोगिक आवश्यकताओं व उद्देश्यों को ध्यान में रखकर किया जाता है। विभिन्न उद्देश्यों हेतु आवश्यक कर्त्तोतकों को सारणी 16.3 में दर्शाया गया है। चयनित कर्त्तोतकों को सतही निर्जर्मीकरण से पूर्व नल के नीचे बहते हुए जल में ट्वीन-20 (Tween-20) की सहायता से प्रक्षालित किया जाता है, जिससे उनकी सतह पर उपस्थित मिट्टी के कणों एवं सूक्ष्मजीवों को हटाया जा सके। यह प्रक्रिया कर्त्तोतकों का पूर्व उपचार कहलाती है।

सारणी 16.2 ऊतक संवर्धन प्रयोगशाला के कार्यक्षेत्र एवं सुविधाएं

क्र.सं.	कार्यक्षेत्र	आवश्यक सुविधाएँ तथा उपकरण
1.	काँच के सामान का पक्षालन	पर्याप्त जल की सुविधा, डिशवाशर, ऑवन, इत्यादि।
2.	संवर्धन माध्यम निर्माण	गैस कनेक्शन, हॉट प्लेट्स, हीटिंग मेटल्स, भौतिक व डिजिटल तुला, जल शुद्धिकरण यंत्र कांच व प्लास्टिक के बर्तन, माइक्रो पिपेट, फ्यूम हुड, रसायन व स्टॉक विलयन, ओटोक्लेव, रेफ्रिजरेटर, सेन्ट्रीफ्यूज, मैग्नेटिक स्टीयरर, pH मीटर, कल्चर ट्रॉली, कल्चर ट्रेज इत्यादि।
3.	अभिलेख सम्बन्धित कार्य	मेज, कुर्सी, अलमारी, रजिस्टर इत्यादि।

सारणी 16.3 उद्देश्य के अनुसार प्रयुक्त कर्त्तोतक

क्र.सं.	उद्देश्य	प्रयुक्त कर्त्तोतक
(1)	क्लोनिंग	प्ररोह शीर्ष, कक्षस्थ कलिकाएं
(2)	वाइरस मुक्त पादप	शीर्षस्थ विभज्योतक
(3)	कायिक क्लोनीय प्रवर्धन	विभज्योतक को छोड़कर पौधे का कोई भी कायिक भाग
(4)	अगुणित पादप संवर्धन	परागकण, परागकोष, अनिषेचित अण्ड कोशिका
(5)	जीवद्रव्यक संवर्धन	सामान्यत: पत्ती
(6)	त्रिगुणित पादप संवर्धन	भ्रूणपोष
(7)	कायिक भ्रूणोदभवन	पादप के नवनिर्मित अंग
(8)	कैलस संवर्धन	पादप का कोई भी भाग

(ii) कर्त्तोतकों का सतही निर्जर्मीकरण:– विभिन्न प्रकार के सतही निर्जर्मीकारकों जैसे– मरक्यूरिक क्लोराइड ($HgCl_2$) इथेनॉल, सिल्वर नाइट्रेट ($AgNO_3$), ब्रोमीन व क्लोरीन जल आदि द्वारा चयनित कर्त्तोतकों को लेमिनार एयर फ्लो बैंच में उपचारित किया जाता है, जिससे उनकी सतह पर उपस्थित सूक्ष्मजीवों को समूल नष्ट किया जा सके।

प्रथम चरण :– संवर्धन आरम्भन:– इस चरण में सतही निर्जर्मीकृत कर्त्तोतकों को संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरित कर संवर्धन कक्ष में रखा जाता है। संवर्धन कक्ष में इनसे कैलस अथवा अंग जनन प्रारम्भ होता है।

द्वितीय चरण :– प्रथम चरण में स्थापित संवर्धनों को नये पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर उनका गुणन करना।

तृतीय चरण :– संपूर्ण पादप का पुन:रूद्भवन।

चतुर्थ चरण :– ऊतक संवर्धन द्वारा विकसित पादपों का दृढ़ीकरण एवं वातानुकूलन।

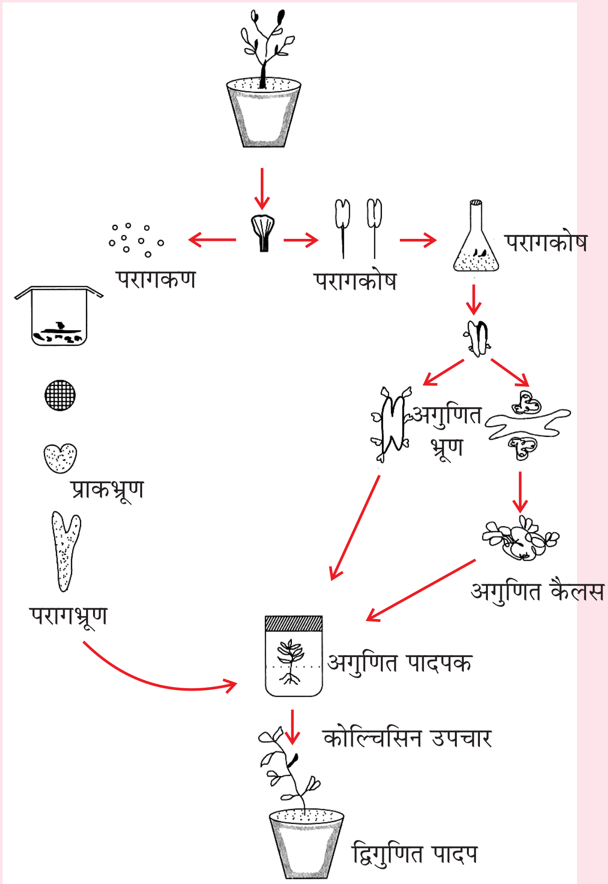
संवर्धन के प्रकार (Types of Culture):– प्रायोगिक उद्देश्यों के आधार पर संवर्धन निम्नलिखित प्रकार के होते हैं:–

1. कैलस संवर्धन (Callus Culture) – जैसा कि पूर्व में बताया गया है कैलस संवर्धन हेतु पौधे के किसी भी भाग का कर्त्तोतक के रूप में उपयोग किया जा सकता है। इस प्रकार के संवर्धन में पादप कोशिकाएँ अनियन्त्रित विभाजनों द्वारा अविभेदित कोशिकाओं के समूह अर्थात् कैलस (Callus) का निर्माण करती हैं। पादप वृद्धि नियंत्रकों की उचित मात्रा व ऑक्सिन तथा साइटोकाइनिन्स के संयोगों द्वारा कैलस से जड़, प्ररोह, भ्रूणाभ व संपूर्ण पादपक (Plantlet) विकसित किए जा सकते हैं। कैलस से पादपों का पुनर्जनन निम्नलिखित विधियों द्वारा सम्पन्न होता है–

(i) अंगोदभवन (Organogenesis)

(ii) कायिक भ्रूणोदभवन (Somatic embrogenesis))

(i) अंगोदभवन (Organogenesis):– कोशिकाओं के असंगठित समूह कैलस से विभेदन की प्रक्रिया द्वारा पादप अंग जैसे जड़, प्ररोह, कलिका आदि का विकास होना **अंगजनन** अथवा **अंगोदभवन** कहलाता है। कैलस से जड़ों का विकास **राइजोजेनेसिस** या **जड़जनन** (Rhizogenesis) तथा प्ररोह का विकास **प्ररोहजनन** (Caulogenesis) कहलाता है। जड़ व प्ररोह जनन ऑक्सीन साइटोकानिन अनुपात, संवर्धन माध्यम की भौतिक अवस्थाओं रासायनिक संगठन तथा कर्त्तोतक की प्रकृति पर निर्भर करता है। सामान्यत: आक्सिन– साइटोकाइनिन के उच्च अनुपात पर जड़ जनन व निम्न अनुपात पर प्ररोहजनन की प्रक्रियाएं सम्पन्न होती है।



चित्र 16.1 परागकोष (परागकणों से अगुणित पादप का संवर्धन)

(ii) कायिक भ्रूणोदभवन (Somatic embryogenesis) :– जब भ्रूण का निर्माण कायिक ऊतकों की कोशिकाओं से होता है तब भ्रूण जनन की प्रक्रिया **कायिक भ्रूणोदभवन** कहलाती है। कायिक भ्रूण अगुणित अथवा द्विगुणित हो सकते हैं। भ्रूण का अगुणित अथवा द्विगुणित होना उन कोशिकाओं की प्रकृति पर निर्भर करता है जिनसे इनका विकास हुआ है। कायिक भ्रूणोदभवन की प्रक्रिया का सर्वप्रथम

प्रदर्शन **रीनर्ट व स्टीवर्ड** (Reinert and Steward) द्वारा सन् 1958 में किया गया, जब इन्होंने गाजर (*डॉकस कैरोटा*) के कैलस व निलम्बन संवर्धन द्वारा कायिक भ्रूणों का संवर्धन किया।

(2) अंग संवर्धन (Organ Culture) :- किसी पादप के विभिन्न अंगों जैसे मूल, अण्डाशय आदि को संवर्धन माध्यम पर संवर्धित कर सम्पूर्ण पादप को विकसित करना अंग संवर्धन कहलाता है।

(3) भ्रूण संवर्धन (Embryo Culture) :- पौधों के अपरिपक्व अथवा पूर्ण परिपक्व भ्रूण के संवर्धन को भ्रूण संवर्धन कहते हैं। भ्रूण संवर्धन का उपयोग अपरिपक्व भ्रूण के विकास तथा परिपक्व भ्रूण की वृद्धि एवम् अंकुरण को प्रेरित करने हेतु किया जाता है। अपरिपक्व भ्रूण संवर्धन को **भ्रूण बचाव या भ्रूण रक्षा** (Embryo rescue) भी कहा जाता है। भ्रूण बचाव तकनीक का उपयोग दूरस्थ संकरण में अल्पविकसित भ्रूण को बचाने में किया जाता है, जिससे संकरण से प्राप्त होने वाले दुर्लभ जननक्षम पादप विकसित किए जा सकें।

(4) पराग कोष तथा परागकण संवर्धन (Anther and Pollen grain culture) :- अर्धसूत्री विभाजन के अध्ययन हेतु पराग कोष का पात्रे संवर्धन (*Invitro* culture) सर्वप्रथम जापानी वैज्ञानिक **शिमाकुरे** (Shimakure) द्वारा सन् 1943 में किया गया था। सन् 1964 में भारतीय वैज्ञानिक **शिप्रा गुहा मुखर्जी** तथा **सतीश चन्द्र महेश्वरी** ने धतूरे के पौधे के परागकोष व पराग कण संवर्धन से अगुणित पादप प्राप्त करने में सफलता प्राप्त की। अगुणित पादप प्राप्त करने की तकनीक का उपयोग पादप प्रजनन में **शुद्धवंश क्रम** (Pure line) प्राप्त करने में किया जाता है। सोलेनेसी कुल के पादपों से सबसे अधिक अगुणित पादप विकसित किए गए हैं।

(5) कोशिका निलम्बन संवर्धन (Cell Suspension Culture) - तरल माध्यम में कोशिकाओं के संवर्धन को **निलम्बन संवर्धन** कहते हैं। निलम्बन संवर्धन का उपयोग व्यावसायिक स्तर पर जैव सक्रिय अणुओं (Bioactive molecules) तथा द्वितीयक उपापचयजों के संश्लेषण व उत्पादन में किया जाता है। विगलित या एकल पादप कोशिकाओं को सामान्यत: वातित (Aerated) तरल संवर्धन माध्यम पर संवर्धित किया जाता है। इन कोशिकाओं को पृथक रखने एवं संवर्धन माध्यम में ऑक्सीजन की आपूर्ति बनाए रखने हेतु संवर्धनों को घूर्णी हल्तिंत्र पर रखा जाता है।

(6) जीवद्रव्यक संवर्धन (Protoplast Culture):- जीवद्रव्यक संवर्धन की प्रक्रिया में सर्वप्रथम निर्जर्मीकृत चयनित कर्त्तोतकों को सेल्यूलेज, हेमीसेल्यूलेज व पैक्टीनेज एन्जाइमों से उपचारित कर इन्हें भित्ति रहित किया जाता है। इन भित्तिरहित पादप कोशिकाओं जिनको जीवद्रव्यक (Protoplast) कहते हैं, को पहले तरल संवर्धन माध्यम पर, तत्पश्चात अर्धठोस माध्यम पर संवर्धित कर पादपकों का निर्माण, अगंजनन, कायिक भ्रूण जनन की विधियों द्वारा किया जाता है। जीवद्रव्यक संवर्धन की प्रक्रिया का उपयोग साइब्रिड निर्माण में किया जाता है।

पादप ऊतक संवर्धन के अनुप्रयोग एवं उपलब्धियां

(Applications and Achievements of Plant Tissue Culture)

ऊतक संवर्धन तकनीक के वानिकी, कृषि, बागवानी तथा औषधी निर्माण के क्षेत्रों में कई अनुप्रयोग हैं जिनमें से कुछ महत्वपूर्ण निम्नलिखित हैं:-

(1) सूक्ष्मप्रवर्धन (Micropropagation):- ऊतक संवर्धन तकनीक के द्वारा पादपों के पुनर्जनन को **सूक्ष्म प्रवर्धन** कहते हैं। इस तकनीक के द्वारा प्राकृतिक रूप से कायिक जनन करने वाले आर्थिक रूप से महत्वपूर्ण पौधों व चयनित **'नोबल प्लान्ट्स'** के शीघ्र गुणन के लिए इस तकनीक का उपयोग किया जाता है। इस तकनीक के द्वारा बहुत ही कम समय व कम स्थान में अधिक संख्या में पौधों का उत्पादन किया जा सकता है। इस तकनीक के उपयोग द्वारा आर्किड्स की कई जातियों जैसे ***कटेलीया (Cattleya), सिम्बिडियम (Cymbidium), डेन्ड्रोबियम (Dendrobium), वाण्डा (Vanda)*** तथा कई शोभाकारी पादपों जैसे, **जरबेरा,** गुलदाऊदी, कार्नेशन, बिगोनिया आदि का व्यावसायिक स्तर पर बहुगुणन किया जा चुका है। भारत वर्ष में कई संस्थाओं व विश्वविद्यालयों में वानिकी व बागवानी महत्व के अनेकों पादपों का इस विधि द्वारा सफलता पूर्वक गुणन किया जा चुका है।

(2) विषाणु मुक्त पादप पुनर्जनन (Regeneration of virus free plant) :- अनेक पादप वाइरसों अथवा फाइटोप्लाज्मा से संक्रमित होते हैं। अत: कायिक प्रवर्धन के समय वाइरसों का नवपादपों में आसानी से संचरण हो जाता है। ऐसी परिस्थिति में परम्परागत जनन की विधियों द्वारा इस प्रकार के पादपों में वाइरस अथवा फाइटोप्लाज्मा से छुटकारा पाना संभव नहीं है। सामान्यत: पादपों के प्ररोह शीर्ष विषाणु अथवा फाइटोप्लाज्मा मुक्त होते हैं। अत: ऐसे पादपों के प्ररोह के शीर्ष विभज्योतक संवर्धन द्वारा वाइरस, फाइटोप्लाज्मा मुक्त पादप तैयार किए जा सकते हैं। विषाणु मुक्त पादप पुनर्जनन तकनीक से आलू के पोटेटो वाइरस एस (PVS) तथा पोटेटो वाइरस एक्स (DVX) मुक्त पौधे तैयार किए जा चुके हैं।

(3) कृत्रिम या संपुटिकृत बीज उत्पादन (Production of artificial or encapsulated seed):- भ्रूणजनन द्वारा विकसित कायिक भ्रूणों के संपुटिकरण से कृत्रिम बीजों का निर्माण

किया जाता है। ऊतक संवर्धन की परंपरागत विधियों के द्वारा विकसित पादपों के दृढ़ीकरण, वातानुकूलन, भण्डारण व परिवहन की समस्या रहती है। इन समस्याओं से बचने के लिए कायिक भ्रूणों व प्ररोह कलिकाओं को सोडियम अथवा कैल्सियम ऐल्जीनेट के मनके (Beads) में संपुटित किया जाता है। इस मनके में भ्रूण व प्ररोह कलिका के अतिरिक्त पोषक पदार्थ, पादप वृद्धि नियामक, पीड़कनाशी व प्रतिजैविक पदार्थ विद्यमान होते हैं। इन कृत्रिम बीजों का अंकुरण सामान्य बीजों के जैसे ही होता है। इस प्रकार का प्रयोग सर्वप्रथम **मुराशिगे** द्वारा 1977 में किया गया था।

(4) भ्रूण बचाव (Embryo rescue)- अन्तर जातीय संकरण से बनने वाले दुर्लभ भ्रूणों के बचाव में इस तकनीक का उपयोग किया जाता है।

(5) पुंजनीय अगुणितों का उत्पादन (Production of androgenic haploids)- जैसा कि पूर्व में बताया जा चुका है परागकोषों व परागकणों के संवर्धन द्वारा पुंजनीय अगुणित पादप प्राप्त किए जा सकते हैं, जिनका उपयोग पादप प्रजनन के क्षेत्र में शुद्ध वंशक्रम विकसित करने में किया जाता है।

(6) त्रिगुणित पादप उत्पादन (Production of triploid plants):- त्रिगुणित पादप सामान्यत: बीज रहित होते हैं। फलविज्ञान क्षेत्र के अनेक महत्वपूर्ण पौधे जैसे- सेब, केला, संतरा, अनार आदि के बीज रहित होने से इनका आर्थिक महत्व बढ़ जाता है। ऊतक संवर्धन तकनीक की भ्रूणपोष संवर्धन विधि द्वारा त्रिगुणित पादप आसानी से तैयार किए जा सकते हैं।

उपरोक्त अनुप्रयोगों के अतिरिक्त ऊतक संवर्धन तकनीक का उपयोग निम्नलिखित क्षेत्रों में भी किया जाता है-

(1) कायिक संकरण में

(2) कायिक क्लोनीय विविधता उत्पादन में

(3) जननद्रव्य संरक्षण में

पौधों में जीन स्थानान्तरण की विधियाँ
(Methods of Gene Transfer in Plants)

कृषि के क्षेत्र में संभावित लाभों के लिए जीन स्थानान्तरण एवं स्थानान्तरित जीनों की पादप कोशिकाओं में अभिव्यक्ति (Expression) पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का आधुनिक अनुप्रयोग है। आनुवंशिक रूपान्तरण के द्वारा किसी वांछित बाहरी जीन (डी.एन.ए.) का समावेश परपोषी के जिनोम में अनिश्चित अथवा वांछित स्थिति पर किया जा सकता है। उच्च वर्ग के कृषि, वानिकी व औषधीय महत्व के पादपों की कोशिकाओं में बाहरी (Foreign) जीनों के स्थानान्तरण एवं इनकी अभिव्यक्ति से प्रकट होने वाले लक्षणों का अध्ययन हम निम्नलिखित शीर्षकों के अन्तर्गत करेंगे:-

I. पादपों में जीन स्थानान्तरण की विधियाँ (Methods of gene transfer in plants)

II. आनुवंशिकत: रूपान्तरित पादप (Genetically modified plants)

I. पादपों में जीन स्थानान्तरण की विधियाँ:- पादपों में जीन स्थानान्तरण कई विधियों द्वारा किया जा सकता है। इनमें से निम्नांकित दो विधियाँ अधिक प्रभावी व प्रचलित हैं।

(अ) वाहक निर्देशित अथवा अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण (Vector mediated or Indirect gene transfer)

(ब) प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण (Direct gene transfer)

(अ) वाहक निर्देशित या अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण :- इस विधि में स्थानान्तरित किए जाने वाले DNA का स्थानान्तरण किसी वाहक के द्वारा किया जाता है। इसकी तीन विधियाँ है-

1. *एग्रोबैक्टीरियम* निर्देशित जीन स्थानान्तरण - इस प्रकार का जीन स्थानान्तरण ट्यूमर प्रेरक प्लाज्मिड (Tumour inducing plasmid; Ti Plasmid) पर आधारित है। Ti प्लाज्मिड मृदा में पाये जाने वाले तथा द्विबीजपत्री पादपों को संक्रमित करने वाले जीवाणु ***एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफेसिएंस*** (***Agrobacterium tumefaciens***) में पाया जाता है।

यह जीवाणु संक्रमित पादपों में अनियंत्रित कोशिका विभाजन को प्रेरित करता है जिसके कारण उनमें पीटिका या अर्बुद (Gall) का निर्माण हो जाता है। इस पीटिका को **किरीट पिटिका** या **क्राऊन गॉल** (Crown gall) कहते हैं। पादपों में अनियंत्रित कोशिका विभाजन व इसके कारण होने वाला **क्राऊन गॉल** का निर्माण ***एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफेसिएंस*** जीवाणु में उपस्थित **टी.आई** (Ti=Tumour inducing) प्लाज्मिड के कारण होता है। पादप कोशिकाओं में ***ए. ट्यूमेफेसिएंस*** के संक्रमण की प्रक्रिया के दौरान टी.आई.प्लाज्मिड की एक प्रति का समाकलन (Integration) परपोषी के संजीन (Genome) में हो जाता है। परपोषी के संजीन में समाकलित होने वाले Ti के डी.एन.ए का खण्ड T-DNA(Transfer-DNA = स्थानान्तरित डी.एन.ए.) कहलाता है। पादपों में ***ए. ट्यूमेफेसिएन्स*** के संक्रमण की प्रक्रिया Ti प्लाज्मिड तथा ***एग्रोबैक्टीरियम*** के गुणसूत्र पर (सह संयोजी रूप से बन्द वृत्ताकार डी.एन.ए - Covalently closed circular-DNA; CCC-DNA) स्थित जीनों द्वारा नियंत्रित रहती है। ट्रांसफर डी.एन.ए. के दोनों सिरों पर 25 क्षारक युग्मों या न्यूक्लियोटाइडों का सीधे दोहराया (Direct repeats) गया क्रम होता है, जो T-DNA का बायाँ व दायाँ सिरा कहलाते हैं। पादप कोशिका में जिस जीन का स्थानान्तरण करना होता है उसे इन दोनों सिरों के मध्य

समायोजित या समाकलित किया जाता है। पादपों में ***एग्रोबैक्टीरियम*** के संक्रमण के कारण या तो पिटिका का निर्माण होता है अथवा रोमिल मूल (Hairy roots) विकसित होती है। ये दोनों प्रक्रियायें ***एग्रोबैक्टीरियम*** की प्रजातियों पर निर्भर करती है। परन्तु ***एग्रोबैक्टीरियम*** के संक्रमण द्वारा परपोषी की कोशिकाएँ रूपान्तरित हो जाती है।

20 वीं शताब्दी के आरम्भ में ***एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफेसिएन्स*** तथा इसकी संबंधित जातियों को पादप रोग जनक के रूप में ही जाना जाता था परन्तु पिछले 3 दशकों से इसकी पादप कोशिकाओं में डी.एन.ए. स्थानान्तरण की क्षमताओं के कारण इसका उपयोग पादप आनुवंशिक अभियान्त्रिकी के क्षेत्र में किया जाने लगा। आनुवंशिक अभियांत्रिकी के क्षेत्र में इसके उपयोग के कारण इसे **प्राकृतिक आनुवंशिक अभियन्ता** (Natural genetic engineer) कहा जाता है।

इस जीवाणु के प्लाज्मिड पर उपस्थित जीनो द्वारा उत्पादित एमीनो अम्लों के आधार पर पादपों में जीन रूपान्तरण का पता लगाया जा सकता है। आनुवंशिकी रूप से रूपान्तरित कोशिकाओं में 'ओपीन' (Opines) का निर्माण होता है। ये ओपीन विभिन्न प्रकार के होते हैं जो ***एग्रोबैक्टीरियम*** के विभेदों पर निर्भर करते हैं। ***ए. ट्यूमेफेसिएन्स*** के विभेदों द्वारा ***ऑक्टोपीन व नोपालीन*** (Octapine and nopaline) जबकि ***ऐ. राइजोजिन्स*** (*A. rhizogenes*) के विभेद **एग्रोपीन व मैनोपीन** (Agropine and Manopine) नामक ओपीन का निर्माण करते हैं।

एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमीफेसियन्स के Ti प्लाज्मिड के द्वारा पादपों में ट्यूमर होने का खतरा बना रहता है। अत: ट्रांसजैनिक पादप विकसित करने हेतु ट्यूमर प्रेरित करने वाले जीन (T-DNA) को पृथक कर उसके स्थान पर वांछित जीन को संयोजित कर इस रूपान्तरित Ti प्लाज्मिड को ***एग्रोबैक्टीरियम*** में स्थापित कर दिया जाता है। अब इस वांछित जीन युक्त ***एग्रोबैक्टीरियम*** का उस पादप के ऊतकों अथवा संवर्धनों के साथ सह संवर्धन किया जाता है, जिसमें इस वांछित जीन का स्थानान्तरण करना है। सामान्यत: टमाटर, तम्बाकू, पिटुनिया, गुलाब आदि की पत्तियों की बिम्बों या वलयों (Discs=वृत्ताकार टुकड़े) का सहसंवर्धन हेतु उपयोग किया जाता है, क्योंकि पत्ती के कटे हुए वलयों या डिस्कों द्वारा उत्पादित ऐसीटोसिरोंगोन (Acetosyringone) Ti प्लाज्मिड के ओपेरोन्स को सक्रिय करता है। इन आपेरोन्स के सक्रियण द्वारा वांछित DNA युक्त Ti-प्लाज्मिड अनेक कोशिकाओं में प्रवेश कर पादप संजीन में समाकलित हो जाता है। दो-तीन दिनों के सहसंवर्धन के पश्चात् रूपान्तरित पादप कोशिकाओं को उपयुक्त संवर्धन माध्यम पर संवर्धित कर रूपान्तरित पादप कोशिकाओं का चयन करते हैं। जीन स्थानान्तरण की इस तकनीक का उपयोग द्विबीजपत्री पादपों के लिए ही किया जा सकता है। कई अनुसंधान संस्थानों में कार्यरत् वैज्ञानिकों द्वारा Ti प्लाज्मिड को जीन वाहक के रूप में प्रयोग किया जाता है। T-DNA में वांछित व उपयोगी जीनों को निवेशित कर अनेकों पादपों में लाभदायक लक्षणों जैसे शाकनाशियों (Herbicides), रोगाणुओं (Pathogens) तथा प्रतिकूल परिस्थितियों के प्रति प्रतिरोधकता, पोषक मान में वृद्धि (गोल्डन राइस, विटामिन 'ए' की पूर्ति) नाइट्रोजन यौगिकीकरण क्षमता में सुधार आदि विकसित किये जा चुके हैं।

एग्रोबैक्टीरियम जीवाणु प्राकृतिक रूप से एकबीजपत्री पादपों को संक्रमित नहीं करते परन्तु 1994 में जापान के वैज्ञानिक चावल के पौधे में Ti प्लाज्मिड द्वारा रूपान्तरण को प्रेरित करने में सफल रहे हैं।

2. विषाणु निर्देशित जीन स्थानान्तरण (Virus mediated gene transfer):- डी.एन.ए. तथा आर.एन.ए. वाइरस दोनों ही वांछित जीनों के उत्तम वाहकों की तरह कार्य करते हैं। डी.एन.ए. संजीन (Genome) वाले दो वाइरस समूहों **कॉलिमों वाइरस** (Calulimo viruses) तथा **जेमिनी वाइरस** (Gemini viruses) के द्वारा सर्वाधिक जीन स्थानान्तरण किए गये है। रिट्रोवाइरस, लेन्टीवाइरस, एडिनोवाइरस आदि का भी आनुवंशिक अभियान्त्रिकी के क्षेत्र में जीन स्थानान्तरण हेतु उपयोग किया जाता हैं।

3. *इन-प्लान्टा* तकनीक (*In-planta* method) - जीन स्थानान्तरण की इस तकनीक में **फेल्जडमेन तथा मार्कक्स** (1987) ने आनुवंशिकत: रूपान्तरित ***एग्रोबैक्टीरियम*** को ***ऐरेबीडोपसिस*** के बीजों के साथ रखा तथा इन बीजों को उगाकर पादप विकसित किए। इस प्रकार विकसित पादपों से प्राप्त बीजों को प्रतिजैविक मुक्त माध्यम पर अंकुरित करवाकर रूपान्तरित पादपों की पहचान की। इसी प्रकार अंकुरित बीजों के विभेदित भ्रूण के शीर्ष विभज्योतक को ***एग्रोबैक्टीरियम*** से संक्रमित करवाकर भी आनुवंशिकत: रूपान्तरित पादप प्राप्त किए जा सकते हैं। जीन स्थानान्तरण की इस विधि में वांछित जीन सीधे ही पादप में प्रवेशित किए जाते हैं। इस लिए इसे **इन प्लांटा तकनीक** के नाम से जाना जाता है।

(ब) जीन स्थानान्तरण की प्रत्यक्ष विधियां (Direct Methods of gene transfer) :- इन विधियों में DNA का स्थानान्तरण सीधे ही किसी तकनीक के द्वारा किया जाता है। इसमें वाहकों का उपयोग नहीं किया जाता है। ***एग्रोबैक्टीरियम*** द्वारा जीन रूपान्तरण सामान्यत: द्विबीजपत्री पादपों में ही संभव है। एकबीजपत्री पादप जो कि मुख्य धान्य है, में सामान्यत: एग्रो-संक्रमण (Agroinfection) के द्वारा जीन स्थानान्तरण संभव नहीं हैं। इन पादपों में गुणवत्ता सुधार व अन्य वांछित लक्षणों के स्थानान्तरण हेतु जीन स्थानान्तरण की अन्य विधियां विकसित की गई हैं, जिनमें किसी प्रकार

के जैविक कारक की आवश्यकता नहीं होती है। अत: जीन स्थानान्तरण की वे विधियां जिनमें जैविक कारकों जैसे ***एग्रोबैक्टीरियम,*** वाइरस इत्यादि की आवश्यकता नहीं होती प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण कहलाती है।

पादपों में प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण निम्नलिखित विधियों से किया जा सकता है:-

(क) रासायनिक विधियाँ (Chemical Methods)

कुछ रसायन जैसे पॉलिईथाइलिन ग्लाइकोल (PEG), पॉलिविनाइल ऐल्कोहल, कैल्सियम फॉस्फेट आदि रासायनिक पदार्थ पादप जीवद्रव्यकों में DNA के प्रवेश को प्रेरित करते हैं। रासायनिक विधियों में PEG का उपयोग बहुतायत से हुआ है। इस विधि में जीवद्रव्यकों में पहले प्लाज्मिड DNA तथा कुछ समय पश्चात 15-25 प्रतिशत PEG मिलाया जाता है। PEG की यह मात्रा जीवद्रव्यकों में DNA अन्तर्ग्रहण को प्रेरित करती है। PEG निर्देशित जीन स्थानान्तरण में जीवद्रव्यकों को किसी भी प्रकार की हानि नहीं होती है। इस प्रकार रूपान्तरित जीवद्रव्यकों को चयनित माध्यम (Selected medium) पर संवर्धित कर मार्कर जीनों की सहायता से रूपान्तरित जीवद्रव्यकों का चयन कर लिया जाता है। लिपोसोम्स डाई ईथाइल अमीनो ईथाइल (DEAE)-डेक्सट्रॉन प्रोटीन्स आदि के द्वारा भी पादपों एवं जन्तुओं में जीन स्थानान्तरण किया जा सकता है।

(ख) जीन स्थानान्तरण की भौतिक विधियाँ (Physical methods of gene transfer)

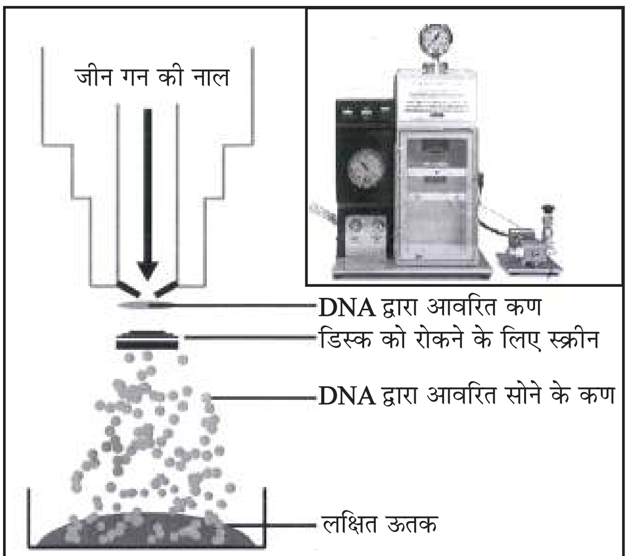
पादपों में प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण कई भौतिक विधियों द्वारा भी प्रभावी रूप से किया जाता है। कुछ प्रमुख भौतिक विधियाँ निम्नलिखित हैं:-

(1) जीन गन (Gene Gun) :- जीन गन को **कणिका बंदूक** (Particle gun), **शॉट गन** (Shot gun), **माइक्रोप्रोजेक्टाइल** (Micro projectile) आदि नामों से भी जाना जाता है। इस युक्ति से भित्ति युक्त पादप कोशिकाओं में जीन स्थानान्तरण संभव है। जीन स्थानान्तरण की इस तकनीक का सर्वप्रथम प्रयोग सन् 1987 में **क्लीन** (Klein) व साथियों द्वारा प्याज की कोशिकाओं में DNA तथा वाइरस RNA स्थानान्तरण हेतु किया गया था।

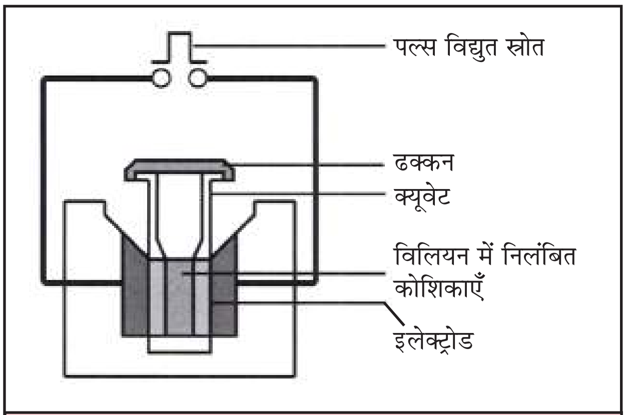
इस प्रक्रिया में वांछित DNA से विलोपित स्वर्ण अथवा टंगस्टन के 1-3 माइक्रो मीटर व्यास के कणों को जिन्हें माइक्रोपार्टिकल्स अथवा सूक्ष्मकणिकाऐं भी कहते हैं, को मेक्रोप्रोजेक्टाइल की सहायता से उच्च वेग से लक्ष्य कोशिकाओं में दाग दिया जाता है। ये वांछित DNA से विलोपित स्वर्ण अथवा टंगस्टन के कण कोशिका भित्ति को भेदकर कोशिका के अन्दर प्रविष्ट हो जाते हैं जहाँ वांछित DNA पादप कोशिका के DNA से समाकलित होकर ट्रांसजैनिक DNA का निर्माण करता है। इस विधि के उपयोग द्वारा सोयाबीन, गेहूँ, धान, मक्का, तम्बाकू आदि में सफलतापूर्वक जीन स्थानान्तरित किए जा चुके हैं। इस विधि का प्रयोग विश्व स्तर पर सभी प्रकार के पादपों के लिए किया जा रहा है।

(2) वैद्युत छिद्रण (Electroporation):- जीन स्थानान्तरण की इस विधि में लक्ष्य प्रोटोप्लास्ट (जीवद्रव्यक), पादप कोशिकाओं अथवा ऊतकों को उच्च वोल्टता (High voltage) के स्पन्द (Pulse) दिए जाते हैं जिससे प्लाज्माकला में क्षणिक अस्थायी छिद्र बन जाते हैं। इन क्षणिक बनने वाले छिद्रों के द्वारा वांछित DNA कोशिकाओं में प्रवेश कर जाता है। लक्ष्य कोशिकाओं अथवा ऊतकों को वांछित DNA युक्त घोल में रखकर उच्च वाल्टता के स्पंद दिए जाते हैं जिससे यह DNA पहले कोशिका तथा बाद में केन्द्रक में प्रवेश कर कोशिका के DNA में समाकलित हो जाता है। एकबीजपत्री पादपों में जीनस्थानान्तरण हेतु इस विधि का वृहत्तस्तर पर उपयोग किया जा रहा है।

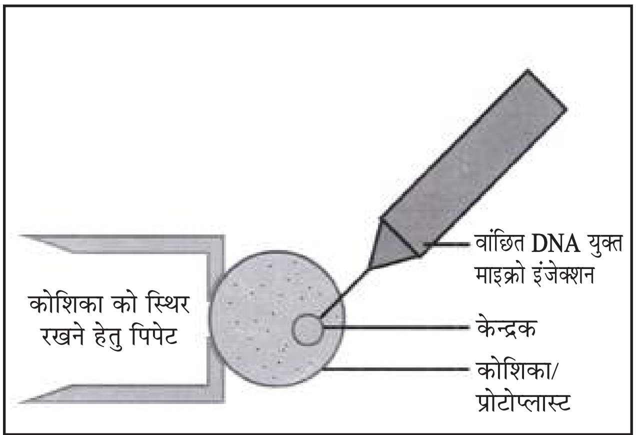
(3) लिपोसोम की मध्यस्थता द्वारा जीन स्थानान्तरण (Liposome mediated gene transfer) :- जीन स्थानान्तरण की इस विधि में गोलाकार वसीय अणुओं (Lipid molecules) का उपयोग किया जाता है, जिनके भीतर जल के साथ वांछित DNA भरा रहता है। ये DNA युक्त लिपिड केप्स्यूल पहले कोशिका कला से चिपक जाते हैं तत्पश्चात उससे संयुग्मित हो जाते हैं। इनमें उपस्थित वांछित DNA पहले कोशिका में तथा बाद में केन्द्रक में प्रवेश कर पोषक संजीन से समाकलित हो जाता है।



(अ) जीन गन एवं इसकी क्रियाविधि



(ब) विद्युत छिद्रण विधि



(स) सूक्ष्म इंजेक्शन विधि

लिपोसोम निर्देशित जीन स्थानान्तरण की तकनीक जिसे लिपोफेक्सन (Lipofection) भी कहते हैं, जीवाणुओं, जन्तुओं व पादप कोशिकाओं में जीन स्थानान्तरण की अत्यधिक प्रभावी तकनीक है।

(4) सूक्ष्म इंजेक्शन (Micro injection):- इस विधि के द्वारा वांछित DNA को सीधे ही पादप जीवद्रव्यकों अथवा कोशिकाओं में 0.5-1.0 माइक्रोमीटर व्यास की काँच की सूई अथवा माइक्रोपिपेट की सहायता से कोशिकाद्रव्य अथवा केन्द्रक में अन्त: क्षेपित (Inject) किया जाता है। पृथक्कृत जीवद्रव्यकों में जीन स्थानान्तरण की यह उपयुक्त विधि है।

उपरोक्त जीन स्थानान्तरण की विधियों के अतिरिक्त निम्नलिखित विधियों का भी जीन स्थानान्तरण में उपयोग किया जाता है।

(5) लेडर निर्धारित जीन स्थानान्तरण।

(6) सिलिकोन कार्बाइड तन्तु निर्धारित जीन स्थानान्तरण ।

आनुवंशिकत: रूपान्तरित कोशिकाओं का चयन (Selection of genetically transformed cells):- उपरोक्त विधियों द्वारा आनुवंशिकत: रूपान्तरित कोशिकाओं का चयन करना आनुवंशिक अभियान्त्रिकी क्षेत्र में एक महत्वपूर्ण प्रक्रिया है। इस प्रक्रिया में वांछित जीन के साथ चिह्नक जीन (Marker gene) भी पादप संजीन में प्रवेशित करवा दिया जाता है (जैसे एन्टीबायोटिक प्रतिरोधक जीन)। तत्पश्चात् इन्हें उपयुक्त एन्टीबायोटिक युक्त संवर्धन माध्यम पर संवर्धित कर रूपान्तरित ऊतकों को पृथक कर लिया जाता है।

आनुवंशिकत: रूपान्तरित पौधे, ट्रांसजैनिक पौधे, पराजीनी पादप

(Genetically Modified Plants, Transgenic Plants)

ट्रॉसजैनिक पादप आनुवंशिकत: अभियान्त्रित (Engineered) पादप हैं जिन्हें पादप प्रजनन उपगमन (Approch) में पुनर्योगज डी.एन.ए. तकनीक (Recombinant DNA Technique) द्वारा नई विशेषताओं का समावेश कर विकसित किया जाता है। ये नवीन गुण उनकी सन्ततियों में पीढ़ी - दर- पीढ़ी बने रहते हैं। आनुवंशिकत: अभियान्त्रित जीवों को ही आनुवंशिकत: रूपान्तरित जीव (Genetically Modified Organism-GMOs) कहते हैं। इस प्रकार के पादपों से प्राप्त खाद्य उत्पादों को आनुवंशिकत: रूपान्तरित खाद्य कहते हैं।

जीन अभियान्त्रिकी तकनीक की सहायता से एकबीजपत्री व द्विबीजपत्री की कई पादप जातियों के ट्रांसजैनिक पौधे तैयार कर इनका प्रयोगशाला से बाहर कृषि क्षेत्रों में परीक्षण किए जा चुके हैं।

पादप जातियों के पराजीनी (ट्रांसजैनिक) पादप निम्नलिखित चरणों में विकसित किए जा सकते हैं-

(1) वाहक (Vector) का चयन एवं स्थानान्तरित किए जाने वाले जीन को पृथक करना।

(2) पुनर्योगज प्लाज्मिड का निर्माण एवं ***एग्रोबैक्टीरियम*** का रूपान्तरण।

(3) रूपान्तरित ***एग्रोबैक्टीरियम*** का पादप कोशिकाओं में स्थानान्तरण।

(4) रूपान्तरित पादप कोशिकाओं का चयन, संवर्धन एवं पुनर्जनन।

(5) विकसित पराजीनी पादपों में वांछित जीन की अभिव्यक्ति

पराजीनी पादपों से सम्बन्धित कृषि एवं औषधि विज्ञान में महत्वपूर्ण उपलब्धियाँ

(1) कीट-प्रतिरोधकता (Insect resistance) :- ***बैसीलस थुरेनजिएंसिस*** *(Bacillus thuringiensis)* नामक जीवाणु जिसे संक्षेप में Bt के नाम से जाना जाता है, प्राकृतिक रूप से मृदा में पाया जाता है। इस जीवाणु की सबसे पहले सन् 1911 में पहचान की गयी, उस समय यह खोज की गयी कि इसके द्वारा 4 शलभ जातियों के लार्वा की मौत हो गयी। 1961 में अमेरिका में इसका जैव कीटनाशी (Biopesticide) के रूप में पंजीयन किया गया। इस जीवाणु में Bt जीन पाया जाता है जो कीटनाशी प्रोटीन का संकेतन करता है। इस जीन को क्राई (Cry) जीन भी कहा जाता है। इस जीन को Bt जीवाणु से पृथक कर इसे कपास में स्थानान्तरित किया गया तथा इस प्रकार विकसित कपास की किस्म **Bt कपास** अथवा **किलर कपास** (Killer Cotton) कहलाती है। यह कपास गोलक शलभ (Boll worm) के प्रति प्रतिरोधी होती है।

(2) शाकनाशी प्रतिरोधकता (Herbicide resistance):- सामान्यत: अधिकांश शाकनाशी, पौधों को इनमें आवश्यक अमीनो अम्लों के संश्लेषण को निरोधित कर मारते हैं। जैसे **ग्लाइफोसेट** (Glyphosate) शाकनाशी एक एन्जाइम 5-इनोल पाइरूविल शिकीमेट-3-फॉस्फो सिन्थेज (EPSPs) की क्रियाशीलता का दमन करता है, जो एरोमेटिक अमीनो अम्लों के संश्लेषण में उपयोग में आता है। कई पादपों में EPSPs एन्जाइम के अधिक उत्पादन से सम्बन्धित जीन को स्थानान्तरित करके ग्लाइफोसेट के प्रभाव को कम किया गया है। टमाटर, पिटुनिया आदि में इस प्रकार के पराजीनी पादप विकसित किए जा चुके हैं। आनुवंशिकी अभियान्त्रिकी तकनीक द्वारा फसलों व आर्थिक रूप से महत्वपूर्ण प्रतिबल प्रतिरोधकता वाले पराजीनी पादप विकसित किए जा चुके हैं।

(3) नरबंध्यता उत्पन्न करना (Development of male sterility):- पादप प्रजनन में संकरण हेतु प्रयोगों में बन्ध्य नर (Sterile male) पादप अत्यधिक महत्वपूर्ण होते हैं। बन्ध्य नर विकसित होने पर विपुंसन (Emasculation) जैसी क्रियाओं पर समय, श्रम व धन व्यय करने की आवश्यकता नहीं रहती है। ***बैसिलस एमाइलोलिक्वेफेसिएन्ज*** *(Bacillus amyloliquefaciens)* से प्राप्त **बारनेज जीन** (Barnase gene) को ***एग्रोबैक्टीरियम*** की सहायता से **तोरिया** (Rape seed) के संजीन से समाकलित कर नर बन्ध्य पादप प्राप्त किए जा सकते हैं। बारनेज जीन द्वारा परागकोषों में टेपिटल आर.एन.ए. नष्ट हो जाता है जिससे बन्ध्य नर पादप विकसित होते हैं।

(4) फलों में विलम्बित परिपक्वन (Delayed fruit ripening) :- अमेरिका में विकसित पराजीनी टमाटर-**फ्लेवर सावर** (Flavr savr) टमाटर की एक आनुवंशिकत: अभियांत्रित किस्म है। इस किस्म के टमाटर सामान्य टमाटरों की अपेक्षा अधिक समय तक सुस्वादिष्ट अवस्था में रह सकते हैं। टमाटर की इस किस्म का विकास कोशिका भित्ति को अपघटित करने वाले एन्जाइम पौलीगेलेक्टुरोनेज (Polygalacturonase) की मात्रा को कम कर के किया गया। यह एन्जाइम फलों के पकने के लिए उत्तरदायी होता है।

(5) पराजीनी पादप जैव किण्वणक (Transgenic plant bioreactor):- आनुवंशिकत: रूपान्तरित पादपों को जैवकिण्वणकों की तरह उपयोग में लिया जाता है। इस प्रकार के ट्रांसजैनिक पादपों में विभिन्न प्रकार के रसायनों का निर्माण होता है इस कारण जैव प्रौद्योगिकी के इस क्षेत्र को **आण्विक कृषि** (Molecular farming)के नाम से भी जाना जाता है।

इस प्रकार आण्विक कृषि हेतु विकसित पादपों के प्रमुख उदाहरण निम्न लिखित हैं-

1. गोल्डन राइस (विटामिन - A)
2. सुपर पोटेटो
3. बीज प्रोटीन गुणवत्ता
4. खाद्य टीके
5. महत्वपूर्ण औषधियाँ
6. जैव अपघटनीय प्लास्टिक
7. उपापचयी अभियांत्रिकी

रूपान्तरित पुष्परंगों युक्त पराजीनी पौधे

नीदरलैण्ड में पुष्पों का कारोबार महत्वपूर्ण है। पिटुनिया के पुष्पों का रंग केसरिया नहीं होता परन्तु नीदरलैण्ड के वैज्ञानिकों द्वारा मक्के से जीन पृथक कर इसका स्थानान्तरण पिटुनिया में करके केसरिया रंग के फूलों वाले पिटुनिया की किस्म विकसित की है। इसी प्रकार आनुवंशिक अभियांत्रिकी की सहायता से नीला गुलाब, नीला कार्नेशन व नीला ट्यूलिप भी विकसित किए जा चुके हैं।

पर्यावरण पारिस्थितिकी और मानवों पर पराजीनी पादपों के दुष्प्रभाव (Adverse effect of transgenic plants on environment, ecology and human beings):- पराजीनी पादपों व आनुवंशिक अभियांत्रिकी द्वारा विकसित पादपों से निम्नलिखित संभावित खतरे हो सकते हैं-

- स्थानान्तरित जीन का समान जाति की फसलों व निकटस्थ जाति के जंगली पौधों में प्राकृतिक रूप से स्थानान्तरण।

-अत्यधिक प्रतिरोधक क्षमता युक्त फसलों से नई महामारियों व बीमारियों के उत्पन्न होने की संभावनाएँ।

-पराजीनी फसलों के उत्पादों के उपयोग से उपयोगकर्ताओं में एलर्जी की सम्भावनाएँ।

–जन्तुओं, सूक्ष्मजीवों, वाइरसों आदि के जीनों का अन्य महत्वपूर्ण पादपों में समावेशित होने की सम्भावना।

–प्राकृतिक पादप जैव विविधताओं के नष्ट होने का खतरा व नई किस्मों का प्रकृति द्वारा वरण।

–कृषि के तरीकों पर प्रभाव व पारिस्थितिकीय तंत्र में असन्तुलन आदि।

पराजीनी पौधों की भावी संभावनाएँ (Future prospects of transgenic plants) – उपरोक्त दुष्प्रभावों के साथ-साथ महत्वपूर्ण लक्षणों को पादपों में स्थानान्तरित कर वैज्ञानिकों द्वारा बढ़ती हुई जनसंख्या की आवश्यकताओं की पूर्ति हेतु आनुवंशिक अभियांत्रिकी तकनीक द्वारा मानव संस्कृति व समाज हेतु पाराजीनी पौधों का विकास किया जा रहा है। जिसमें से कुछ महत्वपूर्ण संभावनाएँ है:-

(i) धान्य पादपों जैसे गेहूँ, चावल आदि में नाइट्रोजन स्थिरीकरण जीन (Nitrogen fixing gene-nif gene) के स्थानान्तरण द्वारा वायुमण्डलीय नाइट्रोजन का स्थिरीकरण ।

(ii) प्रकाश संश्लेषण की बढ़ोत्तरी के लिए सर्वोत्तम स्रोतों से केन्द्रकीय तथा क्लोरोप्लास्ट जीनों का पुनर्संयोजन करना तथा C_3 पादपों को C_4 में बदलना (C_4 प्रकाश संश्लेषण दक्ष पादप होते हैं।)

(iii) पारिस्थितिक मित्र पादप विकसित करना। ऐसे पादप जो हवा, मृदा, जल आदि के प्रदूषकों (Pollutants) को स्वयं ही अपघटित करने की क्षमता रखते हैं, पारिस्थितिक मित्र पादप कहलाते हैं।

(iv) सब्जियों व फलों के पकने के समय में इच्छित परिवर्तन कर इनकी मौसम पर निर्भरता को समाप्त किया जा सकता है।

महत्वपूर्ण बिन्दु

(1) पादप कोशिका की वह क्षमता जिससे यह विभाजित एवं विभेदित होकर उस संपूर्ण पादप को विकसित कर सकती है जिसका वह अंश है, पूर्णशक्तता कहलाती है।

(2) पादप ऊतक संवर्धन का प्रथम प्रयास सन् 1902 में गोटलिब हैबरलेण्ड द्वारा किया गया।

(3) रासायनिक रूप से ज्ञात माध्यम जिसका उपयोग ऊतक संवर्धन हेतु किया जाता है **संवर्धन माध्यम** कहलाता है।

(4) कोशिका भित्ति रहित पादप कोशिका **जीवद्रव्यक** कहलाती है।

(5) शिप्रा गुहा मुखर्जी व सतीशचन्द्र माहेश्वरी ने सबसे पहले धतूरे के अगुणित पादप विकसित किए।

(6) सूक्ष्मप्रवर्धन की संपूर्ण प्रक्रिया 5 चरणों में संपन्न होती है:- शून्य चरण, प्रथम चरण, द्वितीय चरण, तृतीय चरण एवं चतुर्थ चरण।

(7) पादप की कायिक कोशिका से विकसित भ्रूण, कायिक भ्रूण तथा सम्पुटिकृत कायिक भ्रूण को कृत्रिम बीज कहते हैं।

(8) प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा विषाणु मुक्त पौधे विकसित किए जाते हैं।

(9) भ्रूणपोष संवर्धन द्वारा त्रिगुणित पादप विकसित किए जाते हैं।

(10) पादपों में अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण *एग्रोबैक्टीरियम* द्वारा किया जाता है।

(11) टमाटर के फलों के विलम्बित परिपक्वन हेतु 'फ्लेवर सावर' तथा विटामिन A- युक्त गोल्डन राइस नामक पराजीनी किस्में विकसित हो गयी है।

अभ्यासार्थ प्रश्न

बहुवैकल्पिक प्रश्न

1. सर्वप्रथम परागकोश संवर्धन द्वारा अगुणित पादप विकसित करने का श्रेय किसे प्राप्त हैं–

(अ) जौहरी एवं महेश्वरी (ब) हैबरलैण्ड

(स) पी.आर.व्हाइट (द) गुहा एवं महेश्वरी

2. संक्रमित पादप से रोगरहित पादप विकसित किए जाते हैं–

(अ) भ्रूण संवर्धन द्वारा (ब) जड़ संवर्धन द्वारा

(स) परागकण संवर्धन द्वारा (द) प्ररोह शीर्ष संवर्धन द्वारा

3. पादप ऊतक संवर्धन का जनक कहलाते हैं–

(अ) रॉबर्ट हुक (ब) हैबरलैण्ड

(स) स्टीवर्ड (द) कोकिंग

4. Ti प्लाज्मिड पाया जाता है–

(अ) ***ए. ट्यूमेफेसिएन्स*** में

(ब) ***ए. राइजोजिन्स*** में

(स) ***ई.कोली*** में

(द) ***बैसिलस थूरिजिएन्सिस*** में

5. पादप कोशिका भित्ति के एन्जाइमी अपघटन से प्रोटोप्लास्ट प्राप्त करने का श्रेय है–

(अ) टी.मुरासिगे को (ब) ई.बॉल को

(स) एफ.डब्लू बेन्ट को (द) ई.सी.कोकिंग को

6. त्रिगुणित पादप संवर्धन हेतु निम्नलिखित में से कौनसा कर्त्तोतक प्रयुक्त होता है–

(अ) प्ररोह शीर्ष (ब) भ्रूण

(स) भ्रूणपोष (द) परागकोष

7. पादपों में अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण किया जाता है–

(अ) जीन गन द्वारा (ब) वैद्युत छिद्रण द्वारा

(स) सूक्ष्म इन्जेक्शन द्वारा (द) ***एग्रोबैक्टीरियम*** द्वारा

8. कीट प्रतिरोधी Bt जीन निम्नलिखित में से किसमें पाया जाता है–

(अ) ***बैसीलस सबटिलिस***

(ब) ***बैसिलस थूरिन्जिएन्सिस***

(स) ***बैसीलस एन्थ्रेसिस***

(द) ***स्यूडोमोनास सिट्राई***

9. 'गोल्डन राइस' में निम्नलिखित में से किसकी पूर्ति हेतु जीन स्थानान्तरित किया गया?

(अ) विटामिन A (ब) विटामिन C

(स) विटामिन D (द) विटामिन B

10. 'फ्लैवर सावर' टमाटर की विशेषता है–

(अ) सूखारोधी

(ब) उच्च लवण सान्द्रता प्रतिरोधी

(स) कठोर फलभित्ति

(द) उपरोक्त सभी

11. बीटी (Bt) जीन युक्त कपास कहलाती है–

(अ) एसेप्टिक कॉटन (ब) रोमिल कॉटन

(स) गोल्डन कॉटन (द) किलर कॉटन

अतिलघूत्तरात्मक प्रश्न

(1) पूर्णशक्तता को परिभाषित कीजिए।

(2) कृत्रिम बीज क्या है?

(3) कैलस किसे कहते है?

(4) अगुणित पादप संवर्धन का क्या महत्व है?

(5) ऊतक संवर्धन में प्रयुक्त संवर्धन माध्यम कौन-कौनसे हैं?

(6) सूक्ष्मप्रवर्धन से आप क्या समझते है?

(7) प्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण की किन्हीं तीन विधियों के नाम लिखिए।

(8) अप्रत्यक्ष जीन स्थानान्तरण से क्या अभिप्राय है?

(9) कृत्रिम (संपूटिकृत) बीज के मुख्य घटक क्या हैं?

(10) निम्नलिखित को परिभाषित कीजिए–

(अ) संवर्धन माध्यम (ब) प्रोटोप्लास्ट

(स) कर्त्तोतक (द) पराजीनी पादप

लघूत्तरात्मक प्रश्न

(1) जीन स्थानान्तरण की माइक्रोइन्जेक्शन विधि को समझाइये।

(2) किन्हीं दो कीटपीड़क प्रतिरोधी पादपों का वर्णन कीजिए।

(3) ऊतक संवर्धन के विभिन्न चरणों के नाम लिखिए।

(4) सामान्य भ्रूण व कायिक भ्रूण में क्या अंतर है?

(5) सूक्ष्मप्रवर्धन की विधियों के नाम व उनकी उपयोगिता बताइये।

(6) भ्रूण बचाव तकनीक क्या है? इसकी उपयोगिता लिखिए।

(7) Ti प्लाज्मिड पर टिप्पणी लिखिए।

(8) ऊतक संवर्धन से आप क्या समझते हैं?

निबन्धात्मक प्रश्न

(1) ऊतक संवर्धन के इतिहास पर संक्षिप्त लेख लिखिए।

(2) पराजीनी पादप क्या हैं? इनके विकास व उपयोगिता का वर्णन कीजिए।

(3) जीन स्थानान्तरण की अप्रत्यक्ष (वाहक निर्देशित) विधियों का वर्णन कीजिए।

(4) ऊतक संवर्धन के विभिन्न चरणों का संक्षेप में वर्णन कीजिए।

(5) जीन स्थानान्तरण की विधियों का सचित्र वर्णन कीजिए।

(6) सूक्ष्मप्रवर्धन की विभिन्न विधियों का वर्णन कीजिए।

(7) संवर्धन माध्यम के विभिन्न घटक कौन-कौनसे है? बताइये।

उत्तरमाला:- 1. (द) 2. (द) 3. (ब) 4. (अ) 5. (द) 6. (स) 7. (द) 8. (ब) 9. (अ) 10. (स) 11.(द)

❑❑❑