Subject - AGRICULTURE BIOTECHNOLOGY

Unit- 1

Organic farming : biofertilizer and biopesticides

□ जैविक खेती (Organic Farming) —

जैविक खेती एक ऐसी कृषि-प्रणाली है जिसमें फसलों के उत्पादन के लिए **प्राकृतिक संसाधनों**, **प्राकृतिक खाद**, **जैव उर्वरकों**, **फायदे मंद कीटों**, और **पर्यावरण-अनुकूल तकनीकों** का उपयोग किया जाता है। इसमें **रासायनिक उर्वरक**, **कीटनाशक**, **घासनाशी**, **GM फसलें**, और **कृत्रिम हार्मोन** का प्रयोग नहीं किया जाता।

इसका मुख्य उद्देश्य
✔ मिट्टी, पानी और पर्यावरण को सुरक्षित रखना
✔ पौष्टिक व स्वास्थ्यकर भोजन उत्पादन
✔ टिकाऊ (सस्टेनेबल) कृषि विकसित करना है।

⭐ 1. जैविक खेती की परिभाषा

जैविक खेती वह प्राकृतिक कृषि पद्धति है जिसमें फसल उत्पादन के दौरान मिट्टी, पौधों, पशुओं और सूक्ष्मजीवों के बीच प्राकृतिक संतुलन बनाए रखते हुए खाद्य उत्पादन किया जाता है।

यह पद्धति "*शून्य विषाक्तता*" और "*पर्यावरण-अनुकूल उत्पादन*" पर आधारित है।

⭐ 2. जैविक खेती के मुख्य सिद्धांत (Principles of Organic Farming)

(1) स्वास्थ्य (Health)

- मिट्टी → पौधे → जानवर → मनुष्य → संपूर्ण पृथ्वी का स्वास्थ्य

(2) पारिस्थितिकी (Ecology)

- प्राकृतिक संसाधनों का संरक्षण
- जीव–जंतुओं का संतुलन

(3) निष्पक्षता (Fairness)

- किसान, उपभोक्ता, पर्यावरण सभी के हित सुरक्षित

(4) देखभाल (Care)

- तकनीक, खेती और उत्पादन सब पर्यावरण को नुकसान न पहुँचाएँ

⋆ 3. जैविक खेती में उपयोग होने वाले प्रमुख तत्व

(A) जैव उर्वरक (Biofertilizers)

- राइजोबियम
- एज़ोटोबैक्टर
- एज़ोस्पिरिलियम
- साइनोबैक्टीरिया (नील–हरित शैवाल)
- PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria)

(B) प्राकृतिक खाद

- गोबर खाद
- कंपोस्ट, वर्मीकंपोस्ट
- हरी खाद (Green Manuring – सन, ढैंचा)
- पत्तियों की खाद
- बोन मील, नीम खली

(C) जैविक कीटनाशक

- नीम का तेल (Azadirachtin)
- जीवामृत, घन–जीवामृत
- दशपर्णी अर्क
- ब्रह्मास्त्र, नीमास्त्र, अग्नि अस्त्र
- ट्राइकोडर्मा, पेसिलोमाइसेस

- बैसिलस थुरिंजिनेसिस (BT) — जैव-कीटनाशी

(D) भूमि सुधार तकनीकें

- मल्चिंग
- फसल चक्र (Crop rotation)
- मिश्रित खेती
- बहु-फसली पद्धति (Intercropping)

⭑ 4. जैविक खेती की प्रमुख विधियाँ (Methods of Organic Farming)

(1) Integrated Organic Farming System (IOFS)

– फसल + पशुपालन + मत्स्य + मधुमक्खी पालन का संयोजन
– खर्च कम, आय अधिक, संसाधन पुनर्चक्रण

(2) Zero Budget Natural Farming (ZBNF)

– मास्टर सुभाष पालेकर द्वारा विकसित
मुख्य तत्व :

- **जीवामृत**
- **घन-जीवामृत**
- **अग्नि अस्त्र**
- **नीमास्त्र**
- **वाफ़सा** (मिट्टी में नमी-संतुलन)

(3) Permaculture

– जमीन के प्राकृतिक स्वरूप के अनुसार खेती
– जंगल जैसी प्रणाली बनाना

(4) Biodynamic Farming

– रुडोल्फ़ स्टायनर की अवधारणा
– ब्रह्मांडीय ऊर्जा, चंद्र चक्र, BD प्रिपरेशन का उपयोग

(5) Natural Farming

– रसायनों का शून्य उपयोग
– प्रकृति को खेती की ज़िम्मेदारी देना

⭐ 5. जैविक खेती की प्रक्रिया (Step-by-Step Process)

1. मिट्टी की तैयारी

- गोबर खाद/कंपोस्ट का प्रयोग
- भूमि जुताई न्यूनतम
- हरी खाद डालना

2. जैविक बीज चयन

- स्थानीय किस्में
- रोग-प्रतिरोधी किस्में

3. बीजोपचार (Seed Treatment)

- ट्राइकोडर्मा
- पेसिलोमाइसिस
- गोमूत्र/नीम अर्क

4. पोषण प्रबंधन

- जीवामृत का छिड़काव
- वर्मीकंपोस्ट का प्रयोग
- हरी खाद

5. कीट एवं रोग प्रबंधन

- नीम तेल, दशपर्णी
- फेरोमोन ट्रैप
- प्रकाश ट्रैप
- परभक्षी कीटों का संरक्षण (Ladybird beetle, Chrysopa)

6. जल प्रबंधन

- ड्रिप सिंचाई
- मल्चिंग
- वर्षा जल संचयन

7. खरपतवार नियंत्रण

- मल्चिंग
- हाथ से निराई
- फसल चक्र

8. कटाई और भंडारण

- रसायन मुक्त संरक्षण
- सौर ड्रायर

⭑ 6. जैविक खेती के लाभ (Advantages)

(1) मिट्टी की गुणवत्ता बढ़ती है

- कार्बन बढ़ता है
- सूक्ष्मजीवों की संख्या बढ़ती है
- जल धारण क्षमता बढ़ती है

(2) स्वास्थ्यकर व पौष्टिक भोजन

- रसायन मुक्त
- एंटीऑक्सीडेंट अधिक

(3) पर्यावरण संरक्षण

- जल, मिट्टी व वायु प्रदूषण कम
- जैव विविधता सुरक्षित

(4) लागत कम

- उर्वरक/कीटनाशकों पर खर्च लगभग शून्य

(5) दीर्घकाल में उत्पादन स्थिर

⭐ 7. जैविक खेती की चुनौतियाँ (Challenges)

1. प्रारंभिक वर्षों में उत्पादन थोड़ा कम

– मिट्टी को जैविक बनने में 2–3 वर्ष लगते हैं

2. जैविक खाद/उर्वरकों की उपलब्धता सीमित

3. प्रमाणिकता (Certification)

– PGS, NPOP प्रमाणन महंगा/लंबा हो सकता है

4. बाज़ार मूल्य

– आम बाजार में जैविक उत्पादों की पहचान कठिन

⭐ 8. भारत में जैविक खेती की स्थिति

भारत में तेजी से विस्तार:

- सिक्किम — 100% जैविक राज्य
- जैविक क्षेत्रफल — लगातार बढ़ रहा
- NCOF, PKVY, MOVCDNER जैसी सरकारी योजनाएँ उपलब्ध

⭐ 9. जैविक खेती और प्राकृतिक खेती में अंतर (मुख्य अंतर)

प्राकृतिक खेती	जैविक खेती

प्राकृतिक खेती	जैविक खेती
जीवामृत आधारित	कंपोस्ट, वर्मीकंपोस्ट आधारित
इनपुट लागत लगभग शून्य	कुछ जैविक इनपुट की लागत
न्यूनतम जुताई	सामान्य जुताई
फसल संरक्षण प्राकृतिक घोलों से	जैविक कीटनाशक भी स्वीकार्य

जैविक नाइट्रोजन स्थिरीकरण (Biological Nitrogen Fixation – BNF)

जैविक नाइट्रोजन स्थिरीकरण वह प्राकृतिक प्रक्रिया है जिसमें कुछ सूक्ष्मजीव (microorganisms) वायुमंडलीय नाइट्रोजन (N_2) को पौधों द्वारा उपयोग योग्य रूप — मुख्यतः अमोनिया (NH_3) — में बदलते हैं। यह प्रक्रिया पृथ्वी के नाइट्रोजन चक्र का सबसे महत्वपूर्ण चरण है, क्योंकि वायुमंडल में मौजूद लगभग 78% नाइट्रोजन अपनी गैसीय अवस्था में पौधों और जानवरों के लिए उपयोगी नहीं होती।

---

1. वायुमंडलीय नाइट्रोजन (N_2) का महत्व और समस्या

वायुमंडलीय N_2 में *बहुत मजबूत त्रि-बंधन (triple bond)* होता है, जिसके कारण:

- पौधे इसे सीधे उपयोग नहीं कर सकते,
- इसे तोड़ने के लिए बहुत अधिक ऊर्जा की आवश्यकता होती है।

केवल कुछ विशेष जीवों में ही ऐसे एंज़ाइम होते हैं जो इस N≡N बंधन को तोड़ सकें।

---

2. जैविक N_2 स्थिरीकरण क्या है?

यह प्रक्रिया विशेष सूक्ष्मजीवों द्वारा नाइट्रोजनेज़ (nitrogenase) एंज़ाइम की मदद से N_2 गैस को अमोनिया (NH_3) में बदलने की है।

सामान्य प्रतिक्रिया:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16\ ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16\ ADP$$

इस अमोनिया को आगे पौधे अमीनो एसिड, प्रोटीन और न्यूक्लिक एसिड बनाने में उपयोग करते हैं।

---

3. जैविक नाइट्रोजन स्थिरीकरण करने वाले जीव (Nitrogen-fixing organisms)

(A) सहजीवी (Symbiotic) सूक्ष्मजीव

पौधों की जड़ों में रहने वाले बैक्टीरिया:

1. **राइजोबियम (Rhizobium)** – लेग्यूमिनस पौधों (राजमा, मूंग, चना, मटर इत्यादि) में
2. **ब्रैडीराइजोबियम (Bradyrhizobium)**
3. **एज़ोस्पिरिलियम (Azospirillum)** – घास और अनाज फसलों में
4. **फ्रैंकिया (Frankia)** – non-legume पेड़ों में (जैसे अल्डर)

ये बैक्टीरिया पौधों की जड़ों पर *गाठियाँ (root nodules)* बनाते हैं, जहाँ नाइट्रोजन स्थिरीकरण होता है।

(B) स्वतंत्र (Free-living) सूक्ष्मजीव

जो मिट्टी या जल में स्वतन्त्र रहते हैं:

- **एज़ोटोबैक्टर (Azotobacter)** – एरोबिक
- **क्लोस्ट्रिडियम (Clostridium)** – एनारोबिक
- **साइनोबैक्टीरिया (नील-हरित शैवाल)** – जैसे *Anabaena*, *Nostoc*

धान के खेतों में नील-हरित शैवाल नाइट्रोजन स्थिरीकरण के प्रमुख स्रोत होते हैं।

---

4. प्रक्रिया कैसे होती है? (Step-by-step)

(1) नाइट्रोजनेज़ एंज़ाइम की भूमिका

- यह मुख्य एंज़ाइम है जो N_2 के ट्रिपल बंधन को तोड़ता है।
- यह ऑक्सीजन-संवेदनशील होता है यानी ऑक्सीजन होने पर निष्क्रिय हो जाता है।

(2) ऊर्जा की आवश्यकता

- 1 अणु नाइट्रोजन को तोड़ने के लिए 16 ATP की आवश्यकता होती है।
- इसलिए यह ऊर्जा-खर्चीली प्रक्रिया है।

(3) लेग्यूम जड़ों में नोड्यूल कैसे बनते हैं?

1. राइजोबियम जड़ से *फ्लेवोनॉयड* सिगनल पहचानता है
2. बैक्टीरिया *Nod factors* बनाते हैं
3. जड़ की कोशिकाएँ बैक्टीरिया को अंदर प्रवेश करने देती हैं
4. *जड़ में गाठियाँ बनती हैं*
5. गाठी के अंदर **लेगहीमोग्लोबिन (Leghemoglobin)** मौजूद होता है जो कम ऑक्सीजन वातावरण बनाए रखता है, ताकि नाइट्रोजनेज़ सक्रिय रह सके।

---

5. जैविक N_2 स्थिरीकरण के प्रकार

1. सहजीवी (Symbiotic)

- सबसे प्रभावी
- लेग्यूम फसलों में 40–300 kg N/ha तक योगदान

2. असहजीवी (Non-symbiotic)

- स्वतंत्र बैक्टीरिया द्वारा
- 5–15 kg N/ha

3. सहयोगात्मक (Associative)

- जैसे Azospirillum और धान/गेहूं की जड़ों का संबंध

---

6. जैविक नाइट्रोजन स्थिरीकरण का कृषि में महत्व

- रासायनिक उर्वरकों की आवश्यकता कम होती है
- मिट्टी की उर्वरता बढ़ती है
- फसलों की पैदावार बढ़ती है

- पर्यावरण प्रदूषण कम होता है
- जैविक खेती (ऑर्गेनिक फार्मिंग) को बढ़ावा मिलता है

लेग्यूम फसलों के बाद बोई गई फसलें (गेहूं, धान) भी लाभ उठाती हैं।

---

7. नाइट्रोजन स्थिरीकरण को प्रभावित करने वाले कारक

1. मिट्टी का pH
2. तापमान
3. मिट्टी में ऑक्सीजन
4. मिट्टी में नमी
5. कार्बन स्रोत
6. पौधे की जड़ों का स्वास्थ्य

---

8. भारत में प्रमुख जैव उर्वरक (Biofertilizers)

- राइजोबियम
- एज़ोटोबैक्टर
- एज़ोस्पिरिलियम
- नील-हरित शैवाल (Cyanobacteria)
- PSB (फॉस्फेट घुलनशील बैक्टीरिया)

□ हाइड्रोजन (H_2) उत्पादन —

हाइड्रोजन पृथ्वी पर अधिकतर यौगिक रूप (जैसे पानी, मीथेन, हाइड्रोकार्बन) में पाया जाता है। मुक्त H_2 गैस प्रकृति में बहुत कम मिलती है, इसलिए इसे **उत्पादन (Production)** की आवश्यकता होती है।
वर्तमान में H_2 ऊर्जा, उर्वरक, पेट्रोकेमिकल, स्टील, फ्यूल सेल और भविष्य की ग्रीन एनर्जी के लिए महत्वपूर्ण भूमिका निभा रहा है।

□ हाइड्रोजन उत्पादन के प्रमुख औद्योगिक तरीके

□ 1. स्टीम मीथेन रिफॉर्मिंग (Steam Methane Reforming – SMR)

➡□ *विश्व में H_2 उत्पादन का सबसे बड़ा स्रोत (करीब 70%)*

प्रक्रिया का सिद्धांत

- मीथेन (CH_4) + भाप (H_2O) को उच्च तापमान (700–1,000°C) पर पास किया जाता है
- निकल (Ni) उत्प्रेरक की मदद से
- प्रतिक्रिया से H_2 + कार्बन-मोनोऑक्साइड (CO) बनता है

मुख्य प्रतिक्रिया:
$CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$
$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$

→ कुल H_2 प्राप्त होता है लेकिन CO_2 प्रदूषण भी होता है।
इससे बनने वाले H_2 को **ग्रे हाइड्रोजन** कहा जाता है।

□ 2. कोयला गैसीकरण (Coal Gasification)

➡□ *कोयला + भाप + ऑक्सीजन → Syngas ($CO + H_2$)*

प्रक्रिया

- कोयले को 1,000°C से अधिक तापमान पर
- सीमित (partial) ऑक्सीजन के साथ गर्म किया जाता है
- इससे CO, CO_2, H_2 और CH_4 का मिश्रण (syngas) बनता है

फिर इसमें वाटर-गैस शिफ्ट रिएक्शन करके H_2 बढ़ाया जाता है।

यह तरीका **कार्बन उत्सर्जन** अधिक पैदा करता है, इसलिए इसे **ब्राउन/ब्लैक हाइड्रोजन** कहा जाता है।

---

3. पानी का इलेक्ट्रोलिसिस (Water Electrolysis)

सिद्धांत

बिजली का उपयोग करके पानी को दो भागों में तोड़ा जाता है:
$2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$

प्रकार

✔ ग्रीन हाइड्रोजन

- बिजली का स्रोत → सौर/पवन/जल
- कार्बन उत्सर्जन = लगभग शून्य
- भविष्य के हाइड्रोजन का सबसे स्वच्छ रूप

✔ पिंक हाइड्रोजन

- ऊर्जा स्रोत → परमाणु विद्युत

✔ ब्लू हाइड्रोजन

- SMR या कोयला गैसीकरण + CO_2 की कार्बन कैप्चर स्टोरेज (CCS) तकनीक
- प्रदूषण कम

---

4. बायोमास गैसीकरण (Biomass Gasification)

➡ जैविक अवशेष (फसल अवशेष, लकड़ी, कृषि कचरा) से हाइड्रोजन उत्पादन

प्रक्रिया

- बायोमास को सीमित ऑक्सीजन के साथ गर्म किया जाता है
- Syngas ($CO + H_2$) बनता है
- फिर शिफ्ट रिएक्शन से H_2 बढ़ाया जाता है

यह तरीका **नवीकरणीय और पर्यावरण-अनुकूल** माना जाता है।

---

5. जैविक हाइड्रोजन उत्पादन (Biological Hydrogen Production)

➡ यह उभरती हुई तकनीक है (industrial scale पर सीमित)

तरीकों में शामिल:

(1) फोटोबायोलॉजिकल हाइड्रोजन

- शैवाल (Algae) सूर्य के प्रकाश से H_2 बनाते हैं
- Hydrogenase एंज़ाइम की मदद

(2) डार्क फर्मेंटेशन

- बैक्टीरिया कार्बनिक पदार्थ (जैसे ग्लूकोज) को तोड़कर H_2 बनाते हैं

यह भविष्य की स्वच्छ ऊर्जा का संभावित स्रोत है।

---

6. मीथेन पाइरोलिसिस (Methane Pyrolysis – Turquoise Hydrogen)

➡ *मीथेन → ठोस कार्बन + हाइड्रोजन*

प्रक्रिया

- बहुत उच्च तापमान
- कोई CO_2 उत्सर्जन नहीं
- उपउत्पाद = **ठोस कार्बन**, जिसे उद्योग में उपयोग किया जा सकता है

यह तकनीक अभी पायलट/विकास स्तर पर है।

---

7. थर्मो-केमिकल वाटर स्प्लिटिंग

➡ *बहुत उच्च तापमान* + *उत्प्रेरक चक्र* से पानी को $H_2 + O_2$ में तोड़ा जाता है।
यह हाई-टेम्परेचर न्यूक्लियर रिएक्टरों से जुड़ी तकनीक है।

हाइड्रोजन का वर्गीकरण (रंगों के आधार पर)

रंग	स्रोत	विशेषताएँ
Gray	SMR से	CO_2 उच्च
Blue	SMR + CCS	CO_2 कम
Green	इलेक्ट्रोलिसिस + नवीकरणीय ऊर्जा	सबसे स्वच्छ
Brown/Black	कोयला गैसीकरण	प्रदूषण अधिक
Pink	परमाणु ऊर्जा	कम उत्सर्जन
Turquoise	मीथेन पाइरोलिसिस	ठोस कार्बन बनता है

हाइड्रोजन के उपयोग (Applications)

✔ **उर्वरक उद्योग (Ammonia Production – Haber Process)**

✔ **पेट्रोकेमिकल रिफाइनिंग**

✔ **स्टील उत्पादन (Hydrogen-based DRI)**

✔ **फ्यूल सेल वाहन**

✔ **बिजली उत्पादन**

✔ **ऊर्जा भंडारण (Energy Storage)**

✔ रॉकेट ईंधन (Liquid Hydrogen)

□ BIOFERTILIZERS (जैव उर्वरक)

परिभाषा:
जैव उर्वरक वे जीवित सूक्ष्मजीव (बैक्टीरिया, फफूंद, शैवाल) हैं जो पौधों की वृद्धि बढ़ाने के लिए
✔ मिट्टी में पोषक तत्व उपलब्ध कराते हैं
✔ नाइट्रोजन स्थिरीकरण करते हैं
✔ फॉस्फोरस घुलनशील बनाते हैं
✔ पौधों की जड़ों की वृद्धि बढ़ाते हैं

जैव उर्वरक रासायनिक उर्वरकों का **स्वाभाविक विकल्प** हैं और मिट्टी की उर्वरता बढ़ाते हैं।

⋆ 1. जैव उर्वरकों के प्रमुख प्रकार

(A) नाइट्रोजन स्थिरीकरण करने वाले जैव उर्वरक

□ 1. राइजोबियम (Rhizobium)

- लेग्यूम फसलों (चना, मटर, अरहर, मूंग–मसूर) की जड़ों में गाठियाँ बनाता है
- सहजीवी (Symbiotic) नाइट्रोजन स्थिरीकरण
- 40–300 kg N/ha तक नाइट्रोजन दे सकता है

□ 2. एज़ोटोबैक्टर (Azotobacter)

- स्वतंत्र (free-living)
- गेहूं, मक्का, कपास इत्यादि में उपयोगी
- विटामिन, वृद्धि हार्मोन (IAA, GA) बनाता है

□ 3. एज़ोस्पिरिलियम (Azospirillum)

- घास व अनाज फसलों की जड़ों के आसपास रहता है (Associative)
- जड़ों की वृद्धि बढ़ाता है

4. नील-हरित शैवाल (Cyanobacteria – Nostoc, Anabaena)

- धान के खेतों में पानी के साथ H_2O पर तैरते हुए नाइट्रोजन स्थिरीकरण

5. ऐजोला–एनेबेना (Azolla–Anabaena)

- धान में बहुत उपयोगी
- 20–40 kg N/ha योगदान

(B) फॉस्फोरस घुलनशील बनाने वाले जैव उर्वरक (PSB)

Bacillus, Pseudomonas, Aspergillus

- फॉस्फेट घुलनशील बनाते हैं
- फॉस्फोरस की उपलब्धता बढ़ाते हैं

(C) पोटेशियम घुलनशील बैक्टीरिया (KSB)

Bacillus mucilaginosus

- मिट्टी के सिलिकेट खनिजों को घुला कर K उपलब्ध कराता है

(D) माइकोराइजा (Mycorrhiza)

(VAM – Vesicular Arbuscular Mycorrhiza)

- पौधों की जड़ों से सहजीवी संबंध
- **फॉस्फोरस अवशोषण 40% तक बढ़ता है**
- सूखा सहनशीलता बढ़ाता है

(E) सिलिकेट घुलनशील बैक्टीरिया

- धान और गन्ना में सिलिका उपलब्ध कराते हैं
- पौधों की मजबूती बढ़ाते हैं

⭑ 2. जैव उर्वरकों के लाभ

- मिट्टी का स्वास्थ्य सुधरता है
- कार्बनिक पदार्थों में वृद्धि
- रासायनिक उर्वरकों की निर्भरता कम
- लागत कम, पर्यावरण सुरक्षित
- पौधों की प्रतिरोधक क्षमता बढ़ती है

⭑ 3. जैव उर्वरकों का उपयोग कैसे किया जाता है (सुरक्षित तकनीक)

- बीज उपचार (Seed treatment)
- मृदा उपचार (Soil application)
- ड्रिप सिंचाई के साथ
- नर्सरी में जड़ उपचार

□ BIOPESTICIDES (जैव कीटनाशी)

परिभाषा:
जैव कीटनाशी वे प्राकृतिक जीव, जीव–उत्पाद या पादप–आधारित रसायन हैं जो
✔ कीट, रोग, कवक, बैक्टीरिया, और खरपतवार नियंत्रित करते हैं
✔ बिना रासायनिक विषाक्तता के
✔ पर्यावरण–अनुकूल तरीके से

इनका स्रोत —
□ सूक्ष्मजीव
□ पौधे
□ प्राकृतिक खनिज
□ जैव–सक्रिय पदार्थ

⭑ 1. जैव कीटनाशियों के प्रमुख प्रकार

(A) माइक्रोबियल बायोपेस्टिसाइड (Microbial Biopesticides)

□ 1. Bacillus thuringiensis (Bt)

- कीट का पेट नष्ट कर देता है
- कपास, सब्जियाँ, धान में उपयोग
- लेपीडोप्टेरा कीटों पर प्रभावी

□ 2. Trichoderma viride / harzianum

- फफूंद रोग नियंत्रक
- damping-off, wilt, root-rot रोकता है
- मिट्टी स्वास्थ्य बढ़ाता है

□ 3. Pseudomonas fluorescens

- रोग–प्रतिरोधक पदार्थ बनाता है
- ब्लास्ट व फफूंद रोगों में उपयोग
- पौधे की प्रतिरोधक क्षमता बढ़ाता है

□ 4. Beauveria bassiana

- कीटों में परजीवी फफूंद
- सफेद मक्खी, थ्रिप्स, सुंडी पर प्रभावी

□ 5. Metarhizium anisopliae

- दीमक, सुंडी, कपास और गन्ना के कीटों पर प्रभावी

□ 6. NPV (Nuclear Polyhedrosis Virus)

- Helicoverpa और Spodoptera सुंडियों पर प्रभावी
- अत्यंत सुरक्षित

(B) पादप-आधारित जैव कीटनाशी (Botanical Biopesticides)

1. नीम आधारित कीटनाशी (Azadirachtin)

- एंटी-फीडेंट, ओविपोज़िशन अवरोधक
- कीटों की प्रजनन क्षमता कम करता है

2. पायरिथ्रम

- Chrysanthemum flower से प्राप्त
- तेजी से असर दिखाता है

3. तंबाकू, लहसुन, अदरक, मिर्च अर्क

- कीटों को दूर भगाने वाले गुण

(C) बायोरिपेलेंट (कीट भगाने वाले)

- सिट्रोनेला तेल
- लेमनग्रास तेल

(D) बायोनेमैटिसाइड

- Paecilomyces lilacinus
- मेलॉयडोज़ीन (Root-knot nematode) पर प्रभावी

⭐ 2. जैव कीटनाशियों के उपयोग के तरीके

- बीज उपचार
- मृदा में मिलाना
- पत्तियों पर छिड़काव
- जड़ डुबोने की विधि
- ट्रेप्स (Pheromone/Light traps) के साथ समन्वय

⭐ 3. जैव कीटनाशियों के लाभ

✔ पर्यावरण सुरक्षित
✔ कोई अवशेष नहीं (Residue-free)
✔ मधुमक्खियों और लाभकारी कीटों को नुकसान नहीं
✔ रासायनिक कीटनाशकों का उपयोग कम
✔ खाद्य पदार्थों की गुणवत्ता बेहतर

⭐ 4. जैव कीटनाशियों की सीमाएँ

- रासायनिक कीटनाशियों की तुलना में धीमी क्रिया
- तापमान और आर्द्रता पर निर्भर
- सही स्टोरेज आवश्यक

□ BIOFERTILIZER और BIOPESTICIDE में अंतर

विशेषता	जैव उर्वरक	जैव कीटनाशी
उद्देश्य	पोषक तत्व उपलब्ध कराना	कीट/रोग नियंत्रण
स्रोत	बैक्टीरिया, फफूंद, शैवाल	बैक्टीरिया, फफूंद, वायरस, पौध सामग्री
लाभ	मिट्टी की उर्वरता बढ़ाता	कीट व रोग कम करता
उपयोग	बीज/मृदा में	छिड़काव/बीज/मृदा

□□ ठोस अपशिष्ट (Solid Waste)

ठोस अपशिष्ट का अर्थ है किसी भी ऐसी ठोस अवस्था वाली सामग्री जो मनुष्यों या उद्योगों द्वारा उपयोग के बाद **फेंक दी जाती है**, और जिसका आगे उपयोग नहीं किया जाता या जो केवल पुनर्चक्रण (Recycle) के बाद उपयोगी बन सकती है।

उदाहरण:

- घरेलू कचरा (रसोई कचरा, प्लास्टिक, कागज)
- औद्योगिक कचरा (राख, धातु, केमिकल अवशेष)
- इलेक्ट्रॉनिक कचरा (मोबाइल, कंप्यूटर)
- निर्माण मलबा
- कृषि अपशिष्ट
- अस्पताल कचरा
  इत्यादि।

---

1. ठोस अपशिष्ट के स्रोत (Sources of Solid Waste)

(A) घरेलू ठोस कचरा (Municipal Solid Waste – MSW)

- रसोई कचरा
- प्लास्टिक व पैकेजिंग
- कागज, गत्ता
- कपड़े, कांच
- टूटा सामान

(B) औद्योगिक अपशिष्ट (Industrial Waste)

- धातु स्क्रैप
- राख, रसायन
- प्लास्टिक व रबर के अवशेष

(C) जैव-चिकित्सा अपशिष्ट (Biomedical Waste)

- अस्पतालों से निकलने वाली सूई, पट्टियाँ, प्लास्टिक, दवाओं के अवशेष

(D) कृषि अपशिष्ट (Agricultural Waste)

- फसल अवशेष
- पशु कचरा
- पत्तियाँ, खरपतवार

(E) निर्माण व विध्वंस अपशिष्ट (C&D Waste)

- ईंट, सीमेंट, रेत
- लोहे, पत्थर, मलबा

(F) इलेक्ट्रॉनिक कचरा (E-waste)

- पुराने कंप्यूटर
- मोबाइल
- बैटरियाँ

---

2. ठोस अपशिष्ट के प्रकार (Types of Solid Waste)

1. बायोडिग्रेडेबल (Biodegradable Waste)

- वह कचरा जो सूक्ष्मजीवों द्वारा विघटित हो सकता है
  उदा. : रसोई कचरा, पत्तियाँ, कागज, फसल अवशेष

2. नॉन-बायोडिग्रेडेबल (Non-Biodegradable Waste)

- प्लास्टिक
- धातु
- कांच

3. खतरनाक कचरा (Hazardous Waste)

- रसायन
- बैटरियाँ
- मेडिकल व इलेक्ट्रॉनिक कचरा

4. जड़त्वी कचरा (Inert Waste)

- कंकड़, धूल, पत्थर

---

3) ठोस अपशिष्ट का प्रबंधन (Solid Waste Management – SWM) —

ठोस अपशिष्ट प्रबंधन का अर्थ है कचरे का **वैज्ञानिक, सुरक्षित और व्यवस्थित** तरीके से संभालना, जिससे पर्यावरण प्रदूषण न हो और संसाधनों का पुनः उपयोग हो सके।

⭐ 1. स्रोत पर पृथक्करण (Segregation at Source)

सबसे पहला और सबसे महत्वपूर्ण कदम।

कचरे को तीन भागों में विभाजित किया जाता है:

- **हरा डिब्बा:** बायोडिग्रेडेबल कचरा
- **नीला डिब्बा:** रीसायक्लेबल कचरा
- **लाल/पीला डिब्बा:** खतरनाक/मेडिकल कचरा

स्रोत पर पृथक्करण न होने पर पूरे SWM सिस्टम असफल हो जाता है।

⭐ 2. संग्रह (Collection)

- घर-घर से डोर-टू-डोर कलेक्शन
- नगर निगम वाहन
- कम्पेक्टर, मिनी ट्रक

⭐ 3. परिवहन (Transportation)

- अलग-अलग कचरे के लिए अलग वाहन
- बिना फैलाव के ढंके हुए वाहन
- GPS आधारित ट्रैकिंग

⭑ 4. प्रसंस्करण (Processing Techniques)

(A) कंपोस्टिंग (Composting)

जैविक कचरे → खाद

- पिट कंपोस्ट
- वर्मी कंपोस्ट
- मेकैनिकल कंपोस्टिंग

(B) बायोमेथनेशन (Biomethanation — Biogas Production)

सब्जी/रसोई कचरा → Biogas + Slurry (खाद)
एनेरोबिक प्रक्रिया पर आधारित।

(C) रीसाइक्लिंग (Recycling)

कागज, प्लास्टिक, कांच, धातु का पुनरुपयोग।

(D) रीयूज (Reuse)

पुरानी चीजों को पुनः उपयोग में लेना—सबसे सस्ता और पर्यावरण-हितैषी तरीका।

(E) Waste-to-Energy (WtE)

कचरे को जलाकर बिजली बनाना।
RDF (Refuse Derived Fuel) का उपयोग।

(F) इंसीनेरेशन (Incineration)

चिकित्सा और खतरनाक कचरे का उच्च तापमान पर दहन।

⋆ 5. अंतिम निपटान (Final Disposal)

(A) वैज्ञानिक लैंडफिल (Sanitary Landfill)

- कचरे को संकुचित कर ढंकना
- लीचेट नियंत्रण
- गैस संग्रह प्रणाली

(B) Secure Landfill (Hazardous Waste)

दोगुनी लाइनिंग, विशेष संरक्षण।

⋆ 6. ठोस अपशिष्ट प्रबंधन की आधुनिक तकनीकें

- मैकेनिकल बायोलॉजिकल ट्रीटमेंट (MBT)
- बायो रिमेडिएशन
- बायो माइनिंग
- प्लाज्मा गैसीफिकेशन (उन्नत)
- Pyrolysis (प्लास्टिक कचरे के लिए)

⋆ 7. ठोस अपशिष्ट से उत्पन्न समस्याएँ

- वायु, जल, मिट्टी प्रदूषण
- रोग फैलना (डेंगू, मलेरिया)
- दुर्गंध
- ग्रीनहाउस गैस उत्सर्जन
- शहरों की बदसूरत छवि

ठोस अपशिष्ट प्रबंधन के समाधान (Solutions)

✔ 3R सिद्धांत — Reduce, Reuse, Recycle

✔ सिंगल-यूज़ प्लास्टिक पर रोक

✔ सामुदायिक भागीदारी

✔ स्वच्छ भारत मिशन

✔ Waste-to-energy प्लांट

✔ बायोमाइनिंग और पुराने लैंडफिल की सफाई

□. ठोस अपशिष्ट के दुष्प्रभाव (Environmental Impacts)

यदि प्रबंधित नहीं किया गया तो:

✔ पर्यावरण प्रदूषण

- वायु, जल, मिट्टी प्रदूषण

✔ रोग फैलना

- मच्छर, मक्खी, चूहे की बढ़ोतरी

✔ भूजल प्रदूषण

- कचरे से निकलने वाला "लीचेट" जल को दूषित करता है

✔ ग्रीनहाउस गैस उत्सर्जन

- मीथेन
- CO_2

✔ शहरों का बदसूरत स्वरूप, दुर्गंध

□. ठोस अपशिष्ट प्रबंधन के समाधान (Solutions)

(1) 3R सिद्धांत: Reduce – Reuse – Recycle

कचरा उत्पादन कम करना सबसे महत्वपूर्ण।

(2) स्रोत पर पृथक्करण (Segregation at Source)

हर घर में 2–3 डिब्बे।

(3) प्लास्टिक उपयोग में कमी

- सिंगल-यूज़ प्लास्टिक प्रतिबंध

(4) सामुदायिक जागरूकता

साफ-सफाई, कचरा अलग करने की शिक्षा।

(5) वैज्ञानिक स्वच्छता केंद्र (MSW Plants)

रीसाइक्लिंग, कंपोस्ट, WtE प्लांट।

(6) Extended Producer Responsibility (EPR)

कंपनियों को अपने उत्पादों का कचरा वापस लेना चाहिए।

□. भारत में ठोस अपशिष्ट प्रबंधन की स्थिति

कानूनी प्रावधान:

✔ *Solid Waste Management Rules, 2016*
✔ *Plastic Waste Management Rules, 2016*
✔ *Bio-Medical Waste Rules, 1998 (Amended)*
✔ *E-waste Rules, 2016*

चुनौतियाँ :

- तेजी से बढ़ती शहरी जनसंख्या
- प्लास्टिक कचरे की अधिकता
- रीसाइक्लिंग प्रणाली कमजोर
- अनौपचारिक कबाड़ी प्रणाली

प्रयास :

- स्वच्छ भारत मिशन
- स्मार्ट सिटी मिशन
- Waste-to-Energy प्लांट
- Door-to-door कलेक्शन

□ Single Cell Protein (SCP) —

सिंगल सेल प्रोटीन (Single Cell Protein, SCP) उन प्रोटीन-समृद्ध बायोमास को कहते हैं जो **सूक्ष्मजीवों (Microorganisms)** जैसे—

- बैक्टीरिया (Bacteria)
- फफूंद (Fungi)
- यीस्ट (Yeast)
- शैवाल (Algae)

—द्वारा उत्पादित होते हैं।
इन सूक्ष्मजीवों को **विभिन्न अपशिष्ट सामग्री, कृषि अवशेष, औद्योगिक अवशिष्ट या सस्ते कार्बन स्रोतों** पर उगाकर बड़ी मात्रा में प्रोटीन प्राप्त किया जाता है।

इसे **सिंगल-सेल प्रोटीन** इसलिए कहते हैं क्योंकि सूक्ष्मजीव **एक-कोशिकीय** होते हैं।

□ SCP क्यों आवश्यक है? (Importance)

दुनिया में तेजी से बढ़ती जनसंख्या के कारण :

- प्रोटीन की कमी

- पशु-चारे की कमी
- कृषि भूमि सीमित
- जलवायु परिवर्तन

ऐसे में SCP एक **सस्ता, पोषक, तेज़ी से बनने वाला** और **पर्यावरण-हितैषी** प्रोटीन स्रोत है।

□ SCP के लिए उपयोग किए जाने वाले मुख्य सूक्ष्मजीव

1. बैक्टीरिया (Bacteria)

- *Methylophilus methylotrophus*
- *Bacillus* spp.
  तेज़ वृद्धि दर, उच्च प्रोटीन सामग्री।

2. यीस्ट (Yeast)

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Candida utilis*
  मानव व पशु आहार के लिए सुरक्षित।

3. फफूंद (Fungi / Moulds)

- *Aspergillus niger*
- *Fusarium venenatum* (Quorn बनाने में)

4. शैवाल (Algae)

- *Spirulina*
- *Chlorella*
  उच्च पोषण मूल्य, विटामिन, खनिज, एंटीऑक्सीडेंट भरपूर।

□ SCP उत्पादन के लिए उपयोग होने वाले सब्सट्रेट (Raw Materials)

SCP उत्पादन में सबसे अच्छी बात यह है कि यह **सस्ते, कचरा-आधारित, कम लागत वाले** स्रोतों पर उगाया जा सकता है।

✔ कृषि अवशेष

- गन्ने का शीरा (Molasses)
- भूसा
- फल-सब्जी कचरा

✔ औद्योगिक अपशिष्ट

- पेट्रोकेमिकल वेस्ट
- मीथेन, मिथेनॉल
- खाद्य उद्योग अपशिष्ट
- वेह (दूध उद्योग का अपशिष्ट)

✔ नगरपालिका जैविक कचरा

- सब्जी मंडी कचरा
- घरेलू खाद्य अपशिष्ट

✔ CO_2, प्रकाश (algae के लिए)

□ SCP उत्पादन की प्रक्रिया (Production Process — Deep Explanation)

SCP उत्पादन बायोटेक्नोलॉजी की औद्योगिक प्रक्रिया है। इसमें निम्न चरण शामिल हैं:

---

1. सूक्ष्मजीव का चयन (Microbe Selection)

मानदंड:

- उच्च प्रोटीन उत्पादक
- तेज़ी से वृद्धि
- सुरक्षित (Non-pathogenic)

- कम लागत वाले सब्सट्रेट का उपयोग करने में सक्षम

---

2. सब्सट्रेट तैयारी (Substrate Preparation)

- कच्चे पदार्थ को साफ करना
- पीसना/घोल बनाना
- पोषक तत्व (Nitrogen, Minerals) जोड़ना
- pH समायोजन

---

3. फर्मेंटेशन (Fermentation / Cultivation)

सूक्ष्मजीवों को बड़े **बायोरिएक्टरों** में उगाया जाता है।

फर्मेंटेशन के प्रकार:

1. **Batch Fermentation**
2. **Continuous Fermentation**
3. **Fed-Batch Fermentation**

फर्मेंटेशन की आवश्यक परिस्थितियाँ:

- तापमान नियंत्रण
- pH नियंत्रण
- ऑक्सीजन आपूर्ति (एयरोबिक SCP में)
- स्टिरर/एजिटेटर
- पोषक माध्यम

---

4. कोशिकाओं का संग्रह (Harvesting)

- Centrifugation
- Filtration
- Precipitation

इससे सूक्ष्मजीव बायोमास अलग किया जाता है।

---

5. कोशिकाओं का उपचार (Cell Processing)

क्यों आवश्यक?
कुछ सूक्ष्मजीवों में **कठोर कोशिका भित्ति** होती है, जिसे पचाना मुश्किल होता है।

इसलिए:

- गर्मी उपचार
- क्षारीय/एंजाइमेटिक उपचार
- कोशिका दीवार तोड़ना

---

6. सुखाना (Drying)

बायोमास को

- स्प्रे ड्राइंग
- फ्रीज ड्राइंग
- ड्रम ड्राइंग
  से सुखाया जाता है।

---

7. प्रोटीन पाउडर / फीड निर्माण (Formulation)

अंत में SCP को

- पाउडर
- पेलेट
- टैबलेट
  रूप में बदल दिया जाता है।

□ SCP की पोषण संरचना (Nutritional Composition)

औसतन SCP में:

घटक	प्रतिशत
प्रोटीन	40–80% (बहुत अधिक)
कार्बोहाइड्रेट	5–20%
वसा	3–12%
खनिज	2–7%
विटामिन	B-complex, A, E, K

Spirulina जैसे स्रोतों में :

- 60–70% प्रोटीन
- सभी आवश्यक अमीनो एसिड
- एंटीऑक्सीडेंट

⭐ SCP के लाभ (Advantages)

✔ बहुत तेज़ उत्पादन

सूक्ष्मजीव **हर 2–4 घंटे में बढ़ते हैं**, इसलिए कम समय में अधिक प्रोटीन।

✔ कम भूमि की आवश्यकता

पशुपालन की तरह बड़ी भूमि की जरूरत नहीं।

✔ सस्ता

सस्ते कचरे, अवशेषों पर बढ़ सकता है।

✔ पर्यावरण-हितैषी

कचरे का उपयोग → प्रदूषण घटता है।

✔ उच्च गुणवत्ता वाला प्रोटीन

अमीनो एसिड प्रोफाइल अच्छा।

✔ मानव और पशु दोनों के लिए उपयोगी

- मनुष्यों का पोषण
- पशु चारा
- फिशरी / पोल्ट्री

□ SCP की सीमाएँ (Limitations / Disadvantages)

✕कुछ सूक्ष्मजीवों में विषाक्तता की समस्या

उदा.: भारी धातुएँ जमा हो सकती हैं।

✕कोशिका दीवार कठोर

पाचन क्षमता कम (Fungi/Bacteria में अधिक)

✕स्वाद और गंध की समस्या

कुछ SCP उत्पादों में मिट्टी जैसी गंध।

✕शुद्धता आवश्यक

अच्छी गुणवत्ता न होने पर स्वास्थ्य जोखिम।

✕एलर्जी या इम्यून प्रतिक्रिया संभव

□ SCP के उपयोग (Applications)

✔ मानव पोषण

- Spirulina सप्लीमेंट

- Chlorella टैबलेट
- प्रोटीन पाउडर

✔ पशु आहार

- पोल्ट्री
- मछली पालन (Aquaculture)
- डेयरी पशु

✔ खाद्य उद्योग

- High-protein biscuits
- Health drinks
- Bakery products

✔ फीड का विकल्प

- Soybean meal को Replace कर सकता है।

□ SCP के प्रमुख उदाहरण

सूक्ष्मजीव	SCP उत्पाद
Spirulina	प्रोटीन पाउडर, सप्लीमेंट
Chlorella	टैबलेट
Fusarium venenatum	Quorn (मीट का विकल्प)
Candida utilis	पॉल्ट्री फीड
Methylophilus spp.	उच्च प्रोटीन बायोमास

□ भविष्य में SCP का महत्व

- जनसंख्या वृद्धि → भोजन की कमी

- जलवायु संकट → कृषि उत्पादन सीमित
- शाकाहारी/वीगन प्रोटीन की मांग बढ़ रही है
- SCP एक **sustainable**, **eco-friendly**, **low-cost** प्रोटीन स्रोत है

SCP भविष्य का "**Green Protein**" माना जा रहा है।

Single Cell Protein एक आधुनिक, उभरती हुई बायोटेक्नोलॉजी आधारित तकनीक है जो
✔ तेज़ी से बनने वाला
✔ सस्ता
✔ पौष्टिक
✔ कचरे को उपयोगी बनाने वाला
✔ मानव–पशु दोनों के लिए उपयुक्त
प्रोटीन स्रोत प्रदान करती है।

यह भविष्य की **खाद्य सुरक्षा (Food Security)** और **सतत विकास (Sustainability)** के लिए अत्यंत महत्वपूर्ण है।

Unit 2

1. सेंद्रिय खेती (ऑर्गेनिक फार्मिंग):

सेंद्रिय खेती वह कृषि पद्धति है जिसमें **रासायनिक उर्वरक, कीटनाशक और हार्मोन** का उपयोग नहीं किया जाता। इसके बजाय **जैविक खाद (गोबर, कम्पोस्ट), हरी खाद, प्राकृतिक कीट नियंत्रण और जैविक विधियों** का प्रयोग किया जाता है। इसका मुख्य उद्देश्य है:

- मिट्टी की उर्वरता बनाए रखना।
- पर्यावरण को सुरक्षित रखना।
- स्वास्थ्य को हानिकारक रसायनों से बचाना।
- स्थायी (sustainable) कृषि को बढ़ावा देना।

---

2. राष्ट्रीय स्थिति (भारत में)

2.1 क्षेत्रफल और लोकप्रियता

- भारत में सेंद्रिय खेती का क्षेत्रफल लगातार बढ़ रहा है।
- 2023 तक भारत में लगभग **3.34 मिलियन हेक्टेयर** भूमि सेंद्रिय खेती के अंतर्गत थी।
- प्रमुख राज्य: **सिक्किम, मणिपुर, उत्तराखंड, हिमाचल प्रदेश, राजस्थान।**
- सिक्किम भारत का पहला राज्य है जो **पूरी तरह सेंद्रिय खेती अपनाया**।

2.2 सरकारी पहल और योजनाएँ

- **राष्ट्रीय सेंद्रिय उत्पादन कार्यक्रम (NPOP)**: सेंद्रिय खेती के लिए मानक और प्रमाणीकरण।
- **प्रधानमंत्री किसान सम्मान निधि (PM-KISAN)** के तहत सेंद्रिय खेती को वित्तीय सहायता।
- **सेंद्रिय प्रमाणन और प्रशिक्षण**: किसानों को प्रशिक्षण, बीज और कम्पोस्ट उत्पादन में सहायता।
- **बाज़ार और निर्यात प्रोत्साहन**: किसानों को उत्पाद विपणन और निर्यात में सहयोग।

2.3 फायदे

- मिट्टी की उर्वरता और जैविक संतुलन बनाए रखना।
- खाद्य सुरक्षा और स्वास्थ्य सुरक्षा: रसायन मुक्त उत्पादन।
- स्थानीय और अंतर्राष्ट्रीय बाज़ार में उच्च मूल्य।

2.4 चुनौतियाँ

- उत्पादन की मात्रा पारंपरिक खेती से कम।
- कीट और रोग प्रबंधन कठिन।
- प्रमाणन प्रक्रिया और बाज़ार तक पहुँच में सीमाएँ।
- किसानों के लिए प्रारंभिक निवेश और प्रशिक्षण आवश्यक।

---

3. अंतर्राष्ट्रीय स्थिति

3.1 प्रमुख देश और क्षेत्र

- विश्व में सेंद्रिय खेती का क्षेत्रफल लगभग **70 मिलियन हेक्टेयर** है।
- प्रमुख देश: **ऑस्ट्रेलिया, अर्जेंटीना, चीन, अमेरिका, ब्राजील, स्पेन**।
- यूरोप में बड़े बाज़ार: **जर्मनी, फ्रांस, इटली, स्वीडन**।

3.2 अंतर्राष्ट्रीय संगठन और प्रमाणन

- **IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements)**: अंतर्राष्ट्रीय स्तर पर मानक।
- देश-विशेष प्रमाणपत्र: **USDA Organic (USA), EU Organic (Europe)**।
- उद्देश्य: उपभोक्ताओं को भरोसा देना कि उत्पाद 100% सेंद्रिय है।

3.3 वैश्विक बाज़ार

- 2023 में **विश्व सेंद्रिय बाजार लगभग 130 बिलियन अमेरिकी डॉलर**।
- स्वास्थ्य और पर्यावरण जागरूकता के कारण मांग बढ़ रही है।
- मुख्य निर्यातक देश: भारत, चीन, अर्जेंटीना, तुर्की।

3.4 चुनौतियाँ

- उत्पादन लागत अधिक।
- प्रमाणन प्रक्रिया महंगी और जटिल।
- जलवायु परिवर्तन और प्राकृतिक आपदाओं का प्रभाव।
- गरीब और विकासशील देशों में अपनाना कठिन।

---

4. राष्ट्रीय और अंतर्राष्ट्रीय तुलना

पहलू	भारत (National)	अंतर्राष्ट्रीय (International)
क्षेत्रफल	3.34 मिलियन हेक्टेयर	70 मिलियन हेक्टेयर+
प्रमुख राज्य/देश	सिक्किम, मणिपुर, राजस्थान	ऑस्ट्रेलिया, अर्जेंटीना, चीन, यूरोप
प्रमाणन	NPOP (भारत)	IFOAM, USDA Organic, EU Organic
बाज़ार	बढ़ रहा है, अभी विकासशील	विकसित और उच्च मांग वाला
चुनौतियाँ	उत्पादन कम, मार्केटिंग	उच्च लागत, प्रमाणन जटिल, जलवायु प्रभाव

सेंद्रिय कृषि(ऑर्गेनिक फार्मिंग) में एजेंसियाँ और संस्थान (Agencies & Institutions Related to Organic Agriculture)

सेंद्रिय कृषि(ऑर्गेनिक फार्मिंग) को बढ़ावा देने और नियंत्रित करने के लिए **राष्ट्रीय और अंतर्राष्ट्रीय स्तर पर कई एजेंसियाँ और संस्थान** काम कर रहे हैं। ये संस्थान **प्रमाणीकरण, प्रशिक्षण, अनुसंधान, विपणन और नीति निर्माण** में मदद करते हैं।

---

1. भारत में प्रमुख संस्थान और एजेंसियाँ (National Agencies and Institutions in India)

1.1 राष्ट्रीय सेंद्रिय उत्पादन कार्यक्रम (NPOP – National Programme for Organic Production)

- **स्थापना:** 2001
- **उद्देश्य:**
  - भारत में सेंद्रिय कृषि के **मानक और प्रमाणीकरण प्रणाली** का संचालन।
  - किसानों और निर्यातकों को **प्रमाणित सेंद्रिय उत्पाद** उपलब्ध कराना।
- **मुख्य कार्य:**
  - सेंद्रिय उत्पादकों और प्रसंस्कर्ताओं का **प्रमाणीकरण**।
  - **NPOP मानकों के अनुसार प्रशिक्षण**।
  - निर्यात को बढ़ावा देना।
- **प्रमाणपत्र:** NPOP प्रमाणन प्राप्त करने वाले उत्पाद को अंतर्राष्ट्रीय स्तर पर मान्यता प्राप्त होती है।

1.2 केंद्रीय सेंद्रिय कृषि संगठन (COA – Central Organic Agriculture Organization)

- यह संगठन **कृषि मंत्रालय के अंतर्गत** सेंद्रिय कृषि को बढ़ावा देता है।
- **मुख्य कार्य:**
  - किसानों के लिए प्रशिक्षण और तकनीकी मार्गदर्शन।
  - सेंद्रिय खेती के लिए **नीति और कार्यक्रमों की योजना बनाना**।

1.3 ICAR – भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद (Indian Council of Agricultural Research)

- ICAR के तहत कई **कृषि विश्वविद्यालय और शोध संस्थान** सेंद्रिय कृषि पर शोध करते हैं।
- **मुख्य कार्य:**
  - सेंद्रिय फसल उत्पादन तकनीक विकसित करना।
  - प्राकृतिक कीट नियंत्रण और जैविक उर्वरक पर शोध।
  - किसानों के लिए प्रशिक्षण और मार्गदर्शन।

1.4 राज्यों के सेंद्रिय कृषि विभाग और संस्थान

- कई राज्यों में **राज्य स्तर के सेंद्रिय कृषि मिशन और बोर्ड** कार्यरत हैं।
- **उदाहरण:**

    - सिक्किम ऑर्गेनिक मिशन
    - उत्तराखंड ऑर्गेनिक मिशन
- **मुख्य कार्य:**
    - राज्य में सेंद्रिय खेती को बढ़ावा देना।
    - स्थानीय किसानों को प्रशिक्षण और मार्केटिंग सहायता देना।

1.5 निजी संस्थान और NGOs

- **Organic India, Navdanya, BAIF Development Research Foundation** जैसी संस्थाएँ किसानों को **जैविक बीज, प्रशिक्षण और बाजार उपलब्धता** में सहायता करती हैं।
- **मुख्य कार्य:**
    - किसान प्रशिक्षण और जागरूकता।
    - कम्पोस्ट, जैविक उर्वरक और प्राकृतिक कीट नियंत्रण।
    - ग्रामीण स्तर पर सेंद्रिय उत्पाद का विपणन।

---

2. अंतर्राष्ट्रीय एजेंसियाँ और संस्थान (International Agencies and Institutions)

2.1 IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movements

- **स्थापना:** 1972, जर्मनी
- **उद्देश्य:**
    - **विश्व स्तर पर सेंद्रिय खेती के मानक विकसित करना।**
    - नीतियों और तकनीकों के आदान-प्रदान के लिए वैश्विक मंच प्रदान करना।
- **मुख्य कार्य:**
    - सेंद्रिय कृषि के लिए **ग्लोबल स्टैंडर्ड और गाइडलाइंस** बनाना।
    - अंतर्राष्ट्रीय सम्मेलन और प्रशिक्षण।

2.2 FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

- **FAO** किसानों को **सेंद्रिय और सतत कृषि तकनीक** अपनाने में मदद करता है।
- **मुख्य कार्य:**
    - नीतिगत सलाह और तकनीकी सहायता।
    - **सस्टेनेबल एग्रीकल्चर और जैविक खेती** पर प्रशिक्षण।
    - विकासशील देशों में **सेंद्रिय उत्पादन को बढ़ावा**।

2.3 EU Organic Certification

- **यूरोपीय संघ** में सेंद्रिय उत्पादों के लिए विशेष **प्रमाणीकरण मानक**।
- **मुख्य कार्य:**
  - उत्पाद की गुणवत्ता सुनिश्चित करना।
  - अंतर्राष्ट्रीय व्यापार में विश्वसनीयता बढ़ाना।

2.4 USDA Organic (USA)

- **United States Department of Agriculture (USDA)** के अंतर्गत सेंद्रिय उत्पादों के लिए प्रमाणन।
- **मुख्य कार्य:**
  - अमेरिका में सेंद्रिय खेती और उत्पादों का प्रमाणीकरण।
  - वैश्विक व्यापार में अंतर्राष्ट्रीय मानक प्रदान करना।

---

3. सेंद्रिय कृषि संस्थानों की भूमिकाएँ (Roles of Agencies & Institutions)

1. **प्रमाणीकरण (Certification):** उत्पाद की सच्चाई और गुणवत्ता सुनिश्चित करना।
2. **अनुसंधान (Research):** नई तकनीकें और प्राकृतिक उर्वरक विकसित करना।
3. **प्रशिक्षण (Training):** किसानों को जैविक खेती, कीट प्रबंधन और उत्पादन तकनीक में प्रशिक्षित करना।
4. **नीति और योजना (Policy & Planning):** सेंद्रिय कृषि को बढ़ावा देने वाली नीतियाँ बनाना।
5. **बाजार और निर्यात (Market & Export):** सेंद्रिय उत्पादों के लिए राष्ट्रीय और अंतर्राष्ट्रीय बाज़ार उपलब्ध कराना।

- भारत में **NPOP, ICAR और राज्य स्तर के मिशन** सेंद्रिय कृषि को मजबूत कर रहे हैं।
- अंतर्राष्ट्रीय स्तर पर **IFOAM, FAO, USDA Organic, EU Organic** वैश्विक मानक और प्रशिक्षण प्रदान करते हैं।
- इन संस्थानों का सहयोग **किसानों को जागरूक बनाने, उत्पादन बढ़ाने और विश्वसनीय बाजार उपलब्ध कराने** में महत्वपूर्ण है।

---

1. सेंद्रिय कृषि(Organic Agriculture) और उत्पाद: परिचय

सेंद्रिय कृषि (Organic Agriculture) एक ऐसी कृषि पद्धति है जिसमें **रासायनिक उर्वरक, कीटनाशक, हार्मोन या जेनेटिक रूप से संशोधित बीज (GM Seeds) का उपयोग नहीं किया जाता।**
सेंद्रिय उत्पादों (Organic Products) में शामिल हैं:

- खाद्य फसल (अनाज, दालें, फल, सब्जियाँ)
- डेयरी और मांस उत्पाद
- मसाले और हर्बल उत्पाद

सेंद्रिय उत्पादों की **गुणवत्ता, सुरक्षा और शुद्धता** सुनिश्चित करने के लिए **राष्ट्रीय और अंतर्राष्ट्रीय मानक बनाए गए हैं।**

---

2. भारत के राष्ट्रीय सेंद्रिय मानक (Indian National Standards for Organic Products)

भारत में सेंद्रिय उत्पादों के लिए मुख्य मानक **NPOP (National Programme for Organic Production) के तहत** बनाए गए हैं।

2.1 NPOP – राष्ट्रीय सेंद्रिय उत्पादन कार्यक्रम

- **स्थापना:** 2001
- **अधिकार:** भारत सरकार, कृषि मंत्रालय के अंतर्गत
- **उद्देश्य:**
    - भारत में सेंद्रिय उत्पादों का **मानकीकरण और प्रमाणीकरण**।
    - सेंद्रिय उत्पादों के **अंतर्राष्ट्रीय व्यापार में भरोसा** सुनिश्चित करना।

2.2 भारत के सेंद्रिय मानक (Indian Standards for Organic Products)

1. **उत्पादन मानक (Production Standards)**
    - रासायनिक उर्वरक, कीटनाशक, हार्मोन, जीएम फसलों का प्रयोग निषिद्ध।
    - केवल **जैविक खाद, कम्पोस्ट, हरी खाद, और प्राकृतिक कीट नियंत्रण**।
    - मिट्टी और जल स्रोत की गुणवत्ता बनाए रखना।
    - भूमि को **कम से कम 2 वर्ष जैविक तरीके से उगाई गई** फसल पर ही सेंद्रिय कहा जा सकता है।
2. **प्रसंस्करण मानक (Processing Standards)**
    - सेंद्रिय उत्पादों का प्रसंस्करण **प्राकृतिक और सुरक्षित तरीकों** से।
    - **रासायनिक संरक्षक, रंग, स्वाद बढ़ाने वाले तत्व** का उपयोग निषिद्ध।
    - प्रसंस्करण की प्रक्रिया में **सेंद्रिय उत्पाद की शुद्धता** बनाए रखना।

3. **प्रमाणीकरण और लेबलिंग (Certification & Labeling)**
    - सेंद्रिय उत्पाद पर **"India Organic" लोगो** और **NPOP प्रमाणपत्र संख्या** लगाना अनिवार्य।
    - उपभोक्ता को स्पष्ट जानकारी देना:
        - उत्पाद का स्रोत
        - उत्पादन विधि
        - प्रमाणन एजेंसी
4. **निषिद्ध तत्व (Prohibited Substances)**
    - रासायनिक उर्वरक: **Urea, DAP, NPK Chemical Fertilizers**
    - कीटनाशक: **DDT, Endosulfan**
    - हार्मोन और जीएम बीज
5. **जैविक प्रमाणीकरण (Organic Certification)**
    - भारत में प्रमाणीकरण **APEDA (Agricultural and Processed Food Products Export Development Authority)** के तहत किया जाता है।
    - प्रमाणन एजेंसियाँ:
        - Ecocert, IMO Control, OneCert, Control Union

2.3 भारत में सेंद्रिय लोगो (India Organic Logo)

- सर्कल के भीतर **"India Organic"** लिखा होता है।
- यह लोगो यह दर्शाता है कि उत्पाद **NPOP प्रमाणित** और 100% सेंद्रिय है।
- लोगो का उपयोग बिना प्रमाणीकरण के करना **अवैध** है।

---

3. सेंद्रिय उत्पादों के लिए अंतर्राष्ट्रीय मानक (International Standards)

भारत के NPOP मानक कई अंतर्राष्ट्रीय मानकों से मेल खाते हैं:

मानक	देश/संस्थान	मुख्य बिंदु
IFOAM	अंतर्राष्ट्रीय संघ	विश्व स्तर पर जैविक खेती के मानक और प्रशिक्षण
USDA Organic	USA	सेंद्रिय खेती और प्रसंस्करण पर मानक, लेबलिंग अनिवार्य
EU Organic	यूरोप	रासायनिक उर्वरक और कीटनाशक निषिद्ध, लेबलिंग नियम

नोट: भारत का NPOP प्रमाणन **IFOAM मानकों के अनुरूप** है, इसलिए भारतीय सेंद्रिय उत्पाद अंतर्राष्ट्रीय बाजार में आसानी से निर्यात किए जा सकते हैं।

---

4. राष्ट्रीय और अंतर्राष्ट्रीय मानक की तुलना

बिंदु	भारत (NPOP)	अंतर्राष्ट्रीय (IFOAM/USDA/EU)
उत्पादन	रासायनिक उर्वरक और हार्मोन निषिद्ध	समान नियम
प्रमाणीकरण	APEDA द्वारा NPOP प्रमाणपत्र	USDA Organic, EU Organic प्रमाणपत्र
लेबलिंग	India Organic लोगो अनिवार्य	USDA Organic या EU Organic लोगो
अंतर्राष्ट्रीय मान्यता	अधिकांश देशों में स्वीकार्य	विश्व स्तर पर मान्यता प्राप्त

- भारत में **सेंद्रिय उत्पादों के लिए NPOP मानक** हैं, जो उत्पादन, प्रसंस्करण, प्रमाणीकरण और लेबलिंग को नियंत्रित करते हैं।
- ये मानक **उत्पाद की गुणवत्ता, स्वास्थ्य सुरक्षा और अंतर्राष्ट्रीय व्यापार** सुनिश्चित करते हैं।
- भारतीय सेंद्रिय उत्पाद **विश्व स्तर पर मान्यता प्राप्त** हैं और निर्यात में प्रतिस्पर्धी बने हुए हैं।
- उपभोक्ताओं के लिए **India Organic लोगो और प्रमाणपत्र** देखना बहुत महत्वपूर्ण है।

---

1. सेंद्रिय खाद्य पदार्थ (Organic Food) क्या हैं?

सेंद्रिय खाद्य पदार्थ वे खाद्य उत्पाद हैं जो **रासायनिक उर्वरक, कीटनाशक, हार्मोन या GMO बीज** के बिना उगाए और संसाधित किए जाते हैं।

सेंद्रिय खाद्य उत्पादों में शामिल हैं:

- अनाज, दालें, फल और सब्ज़ियाँ
- दूध, दही और अन्य डेयरी उत्पाद
- मसाले और जड़ी-बूटियाँ
- जैविक प्रसंस्कृत उत्पाद (जैसे जूस, स्नैक्स)

सेंद्रिय उत्पादों की **खाद्य गुणवत्ता और स्वास्थ्य लाभ** पारंपरिक उत्पादों से अलग और अधिक होते हैं।

---

2. सेंद्रिय खाद्य की गुणवत्ता (Quality of Organic Food)

सेंद्रिय खाद्य पदार्थों की गुणवत्ता को निम्न पहलुओं से मापा जाता है:

2.1 रासायनिक शुद्धता (Chemical Purity)

- रासायनिक उर्वरक, कीटनाशक और हार्मोन का प्रयोग नहीं।
- भारी धातुओं और विषाक्त तत्वों की मात्रा न्यूनतम।
- मानव और पर्यावरण के लिए सुरक्षित।

2.2 पोषण मूल्य (Nutritional Value)

- शोध बताते हैं कि सेंद्रिय फल और सब्ज़ियाँ **एंटीऑक्सिडेंट, विटामिन और फिनोलिक यौगिक** में अधिक होती हैं।
- डेयरी उत्पादों में **ओमेगा-3 फैटी एसिड** की मात्रा बढ़ी होती है।
- फाइबर और मिनरल्स की गुणवत्ता बेहतर।

2.3 स्वाद और ताजगी (Taste & Freshness)

- सेंद्रिय उत्पाद अक्सर **स्वाद में बेहतर और ताजगी में अधिक** होते हैं।
- प्राकृतिक मिट्टी और जैविक उर्वरक के कारण स्वाद में संतुलन।

2.4 संरचना और स्थायित्व (Structure & Shelf Life)

- कम प्रसंस्करण और रसायन रहित होने के कारण **थोड़ी जल्दी खराब हो सकते हैं**, परन्तु पोषण की गुणवत्ता अधिक बनी रहती है।

---

3. सेंद्रिय खाद्य और मानव स्वास्थ्य (Human Health)

3.1 रसायनों से होने वाले नुकसान से सुरक्षा

- रासायनिक कीटनाशक और उर्वरक के नियमित सेवन से **कैंसर, न्यूरोलॉजिकल रोग, हार्मोन असंतुलन** और **प्रतिरक्षा प्रणाली में कमजोरि** हो सकती है।
- सेंद्रिय खाद्य इन रसायनों से मुक्त होते हैं, इसलिए **स्वास्थ्य पर सुरक्षित प्रभाव**।

3.2 रोग प्रतिरोधक क्षमता (Immune System Boost)

- विटामिन, मिनरल्स और एंटीऑक्सिडेंट्स की अधिकता **शरीर की रोग प्रतिरोधक क्षमता** बढ़ाती है।
- बच्चों और बुजुर्गों के लिए विशेष रूप से फायदेमंद।

3.3 वजन और जीवनशैली संबंधी लाभ (Weight & Lifestyle Benefits)

- सेंद्रिय भोजन में **प्राकृतिक फाइबर अधिक** और अतिरिक्त रसायन कम।

- इससे **मधुमेह, हृदय रोग और मोटापे** के जोखिम को कम करने में मदद।

3.4 मानसिक स्वास्थ्य और न्यूरोलॉजिकल लाभ (Mental & Neurological Health)

- शोध में पाया गया कि सेंद्रिय खाद्य पदार्थों में **भारी धातु और न्यूरोटॉक्सिन की मात्रा कम** होती है।
- इसका सकारात्मक प्रभाव **स्मृति, ध्यान और मानसिक संतुलन** पर पड़ता है।

3.5 बच्चों पर प्रभाव (Effect on Children)

- बच्चों के लिए सेंद्रिय भोजन में **रासायनिक अवशेष नहीं होते**, इसलिए उनका **संतुलित विकास और सुरक्षा** सुनिश्चित होती है।
- विशेष रूप से **प्रतिरक्षा प्रणाली और न्यूरोलॉजिकल विकास** पर सकारात्मक प्रभाव।

---

4. सेंद्रिय खाद्य के स्वास्थ्य लाभ का सारांश (Summary of Health Benefits)

स्वास्थ्य पहलू	लाभ
रासायनिक अवशेष	न्यूनतम/शून्य
पोषण	विटामिन, मिनरल्स, एंटीऑक्सिडेंट्स अधिक
प्रतिरक्षा	मजबूत
वजन नियंत्रण	मददगार (फाइबर अधिक)
न्यूरोलॉजिकल स्वास्थ्य	सकारात्मक प्रभाव
लंबी उम्र	जोखिम कम (कैंसर, हृदय रोग)

- **सेंद्रिय खाद्य पदार्थ** स्वास्थ्य और पर्यावरण के लिए सुरक्षित विकल्प हैं।
- नियमित सेवन से **रसायनजनित रोगों से बचाव, प्रतिरक्षा वृद्धि, बेहतर पोषण और स्वाद** मिलता है।
- भारत में **NPOP प्रमाणित सेंद्रिय उत्पाद** इस स्वास्थ्य लाभ को सुनिश्चित करते हैं।
- बच्चों, बुजुर्गों और स्वास्थ्य-सचेत व्यक्तियों के लिए सेंद्रिय भोजन **विशेष रूप से लाभकारी** है।

Unit 3

□ Agrobacterium–पौधा अंतर्क्रिया (Plant Interaction) :

★ परिचय

Agrobacterium एक मृदा-निवासी (soil-borne) बैक्टीरिया है, विशेषकर
Agrobacterium tumefaciens और Agrobacterium rhizogenes पौधों में रोग उत्पन्न करने के लिए प्रसिद्ध हैं।
नीचे **Agrobacterium–पौधा अंतर्क्रिया (Plant Interaction)** का **गहन, सरल और पूरी तरह हिन्दी में** वर्णन दिया गया है:

□ Agrobacterium–पौधा अंतर्क्रिया (Plant Interaction)

★ परिचय

Agrobacterium एक मृदा-निवासी (soil-borne) बैक्टीरिया है, विशेषकर
Agrobacterium tumefaciens और **Agrobacterium rhizogenes** पौधों में रोग उत्पन्न करने के लिए प्रसिद्ध हैं।
यह बैक्टीरिया पौधों में **आणविक सिरिंज (molecular syringe)** की तरह व्यवहार कर **अपना DNA पौधे में ट्रांसफ़र** करता है — इसे ही हम **Natural Genetic Engineer** कहते हैं।

□ 1. Agrobacterium क्या है?

प्रकार	रोग	विशेषता
A. tumefaciens	Crown gall disease	Ti plasmid (Tumor inducing)
A. rhizogenes	Hairy root disease	Ri plasmid (Root inducing)

यह बैक्टीरिया **घाव (wound)** वाली पौध कोशिकाओं को निशाना बनाता है।

□ 2. पौधों में प्रवेश कैसे करता है? (Mechanism of Infection)

➤ Step 1: Wound detection (घाव की पहचान)

जब पौधे की जड़/तना कटता है, पौधा **फिनॉलिक यौगिक (phenolic compounds)** जैसे **Acetosyringone** छोड़ता है।
Agrobacterium इन्हें पहचान कर उस स्थान पर पहुँच जाता है।

➤ Step 2: Vir genes का सक्रिय होना

Agrobacterium के Ti/Ri प्लाज़्मिड में **virulence genes (vir genes)** होते हैं।
Acetosyringone इन्हें ON कर देता है।

इन जीनों का काम—
✔ T-DNA को काटना
✔ T-DNA को कोशिका में भेजने की तैयारी करना
✔ Host recognition करना

➤ Step 3: T-DNA Cutting and Transfer

Ti plasmid का **T-DNA region** VirD2 एंज़ाइम द्वारा काटा जाता है।
फिर इसे **Type IV secretion system** के माध्यम से पौध कोशिका में भेजा जाता है।

यह ट्रांसफ़र एक **bacterial syringe** जैसा होता है।

➤ Step 4: Plant Cell Nucleus में प्रवेश

T-DNA, VirD2 और VirE2 प्रोटीन के साथ
➡ नाभिक (nucleus) तक जाता है
➡ और पौधे के genome में स्थायी रूप से जुड़ जाता है।

□ 3. पौधे में क्या परिवर्तन करता है?

A. Crown Gall Disease (A. tumefaciens)

T-DNA के जीन
✔ Auxin
✔ Cytokinin
✔ Opine synthesis
जैसे जीन एन्कोड करते हैं।

नतीजा :
➡ कोशिका विभाजन तेज होता है
➡ अनियंत्रित वृद्धि
➡ **ट्यूमर जैसी गांठ (galls)** बन जाती है।

B. Hairy Root Disease (A. rhizogenes)

T-DNA जड़-उत्तेजक जीन ले जाता है।
➡ पतली-लंबी, अत्यधिक शाखित जड़ें (hairy roots) बनती हैं।

□ 4. Agrobacterium को Biotechnology में क्यों उपयोग किया जाता है?

क्योंकि यह **प्राकृतिक रूप से पौध DNA में अपना जीन डाल सकता है**, इसलिए वैज्ञानिक इसके T-DNA क्षेत्र में
➡ वांछित (desired) gene डाल देते हैं
➡ tumor-causing genes हटा दिए जाते हैं।

इस प्रकार यह बन जाता है :
✔ **ट्रांसजेनिक पौधे बनाने का उपकरण**
✔ GMO फसलें (Bt cotton, Golden rice आदि) बनाने का साधन

यह विधि कहलाती है:
 Agrobacterium-mediated gene transfer

---

5. Agrobacterium–Plant Interaction के मुख्य बिन्दु

- द्विदिश संवाद (bipartite communication)
- पौधे का घाव → संकेत (signal) → बैक्टीरिया सक्रिय
- बैक्टीरिया → T-DNA भेजता है
- T-DNA → पौध genome में insert
- पौधा → ट्यूमर या hairy root बनाता है

Agrobacterium एक अनोखा बैक्टीरिया है जो
➡ पौधे की कोशिका में DNA डाल सकता है
➡ बीमारी भी पैदा करता है
➡ और वैज्ञानिकों के लिए प्राकृतिक genetic engineering tool भी है।

इसीलिए इसे कहते हैं:

"Nature's Genetic Engineer"

1. Agrobacterium क्या है?

प्रकार	रोग	विशेषता
A. tumefaciens	Crown gall disease	Ti plasmid (Tumor inducing)
A. rhizogenes	Hairy root disease	Ri plasmid (Root inducing)

यह बैक्टीरिया **घाव (wound)** वाली पौध कोशिकाओं को निशाना बनाता है।

□ 2. पौधों में प्रवेश कैसे करता है? (Mechanism of Infection)

➢ Step 1: Wound detection (घाव की पहचान)

जब पौधे की जड़/तना कटता है, पौधा **फिनॉलिक यौगिक (phenolic compounds)** जैसे **Acetosyringone** छोड़ता है।
Agrobacterium इन्हें पहचान कर उस स्थान पर पहुँच जाता है।

➢ Step 2: Vir genes का सक्रिय होना

Agrobacterium के Ti/Ri प्लाज़्मिड में **virulence genes (vir genes)** होते हैं।
Acetosyringone इन्हें ON कर देता है।

इन जीनों का काम—
✔ T-DNA को काटना
✔ T-DNA को कोशिका में भेजने की तैयारी करना
✔ Host recognition करना

➢ Step 3: T-DNA Cutting and Transfer

Ti plasmid का **T-DNA region** VirD2 एंज़ाइम द्वारा काटा जाता है।
फिर इसे **Type IV secretion system** के माध्यम से पौध कोशिका में भेजा जाता है।

यह ट्रांसफ़र एक **bacterial syringe** जैसा होता है।

➢ Step 4: Plant Cell Nucleus में प्रवेश

T-DNA, VirD2 और VirE2 प्रोटीन के साथ
➡ नाभिक (nucleus) तक जाता है
➡ और पौधे के genome में स्थायी रूप से जुड़ जाता है।

□ 3. पौधे में क्या परिवर्तन करता है?

A. Crown Gall Disease (A. tumefaciens)

T-DNA के जीन
✔ Auxin
✔ Cytokinin
✔ Opine synthesis
जैसे जीन एन्कोड करते हैं।

नतीजा:
➡ कोशिका विभाजन तेज होता है
➡ अनियंत्रित वृद्धि
➡ **ट्यूमर जैसी गांठ (galls)** बन जाती है।

B. Hairy Root Disease (A. rhizogenes)

T-DNA जड़-उत्तेजक जीन ले जाता है।
➡ पतली-लंबी, अत्यधिक शाखित जड़ें (hairy roots) बनती हैं।

□ 4. Agrobacterium को Biotechnology में क्यों उपयोग किया जाता है?

क्योंकि यह **प्राकृतिक रूप से पौध DNA में अपना जीन डाल सकता है**, इसलिए वैज्ञानिक इसके T-DNA क्षेत्र में
➡ वांछित (desired) gene डाल देते हैं
➡ tumor-causing genes हटा दिए जाते हैं।

इस प्रकार यह बन जाता है:
✔ **ट्रांसजेनिक पौधे बनाने का उपकरण**
✔ GMO फसलें (Bt cotton, Golden rice आदि) बनाने का साधन

यह विधि कहलाती है:
□ **Agrobacterium-mediated gene transfer**

नीचे **Agrobacterium–पौधा अंतर्क्रिया (Plant Interaction)** का **गहन, सरल और पूरी तरह हिन्दी में** वर्णन दिया गया है:

Agrobacterium–पौधा अंतर्क्रिया (Plant Interaction) : विस्तृत हिन्दी व्याख्या

★ परिचय

Agrobacterium एक मृदा-निवासी (soil-borne) बैक्टीरिया है, विशेषकर
Agrobacterium tumefaciens और **Agrobacterium rhizogenes** पौधों में रोग उत्पन्न करने के लिए प्रसिद्ध हैं।
यह बैक्टीरिया पौधों में **आणविक सिरिंज (molecular syringe)** की तरह व्यवहार कर **अपना DNA पौधे में ट्रांसफ़र** करता है — इसे ही हम **Natural Genetic Engineer** कहते हैं।

---

1. Agrobacterium क्या है?

प्रकार	रोग	विशेषता
A. tumefaciens	Crown gall disease	Ti plasmid (Tumor inducing)
A. rhizogenes	Hairy root disease	Ri plasmid (Root inducing)

यह बैक्टीरिया **घाव (wound)** वाली पौध कोशिकाओं को निशाना बनाता है।

---

2. पौधों में प्रवेश कैसे करता है? (Mechanism of Infection)

➤ Step 1: Wound detection (घाव की पहचान)

जब पौधे की जड़/तना कटता है, पौधा **फिनॉलिक यौगिक (phenolic compounds)** जैसे **Acetosyringone** छोड़ता है।
Agrobacterium इन्हें पहचान कर उस स्थान पर पहुँच जाता है।

➤ Step 2: Vir genes का सक्रिय होना

Agrobacterium के Ti/Ri प्लाज़्मिड में **virulence genes (vir genes)** होते हैं।
Acetosyringone इन्हें ON कर देता है।

इन जीनों का काम—
✔ T-DNA को काटना
✔ T-DNA को कोशिका में भेजने की तैयारी करना
✔ Host recognition करना

➤ Step 3: T-DNA Cutting and Transfer

Ti plasmid का **T-DNA region** VirD2 एंज़ाइम द्वारा काटा जाता है।
फिर इसे **Type IV secretion system** के माध्यम से पौध कोशिका में भेजा जाता है।

यह ट्रांसफ़र एक **bacterial syringe** जैसा होता है।

➤ Step 4: Plant Cell Nucleus में प्रवेश

T-DNA, VirD2 और VirE2 प्रोटीन के साथ
➡ नाभिक (nucleus) तक जाता है
➡ और पौधे के genome में स्थायी रूप से जुड़ जाता है।

□ 3. पौधे में क्या परिवर्तन करता है?

A. Crown Gall Disease (A. tumefaciens)

T-DNA के जीन
✔ Auxin
✔ Cytokinin
✔ Opine synthesis
जैसे जीन एन्कोड करते हैं।

नतीजा :
➡ कोशिका विभाजन तेज होता है
➡ अनियंत्रित वृद्धि
➡ **ट्यूमर जैसी गांठ (galls)** बन जाती है।

B. Hairy Root Disease (A. rhizogenes)

T-DNA जड़-उत्तेजक जीन ले जाता है।
➡ पतली-लंबी, अत्यधिक शाखित जड़ें (hairy roots) बनती हैं।

---

4. Agrobacterium को Biotechnology में क्यों उपयोग किया जाता है?

क्योंकि यह **प्राकृतिक रूप से पौध DNA में अपना जीन डाल सकता है**, इसलिए वैज्ञानिक इसके T-DNA क्षेत्र में
➡ वांछित (desired) gene डाल देते हैं
➡ tumor-causing genes हटा दिए जाते हैं।

इस प्रकार यह बन जाता है :
✔ **ट्रांसजेनिक पौधे बनाने का उपकरण**
✔ GMO फसलें (Bt cotton, Golden rice आदि) बनाने का साधन

यह विधि कहलाती है :
Agrobacterium-mediated gene transfer

---

5. Agrobacterium–Plant Interaction के मुख्य बिन्दु

- द्विदिश संवाद (bipartite communication)
- पौधे का घाव → संकेत (signal) → बैक्टीरिया सक्रिय
- बैक्टीरिया → T-DNA भेजता है
- T-DNA → पौध genome में insert
- पौधा → ट्यूमर या hairy root बनाता है

Agrobacterium एक अनोखा बैक्टीरिया है जो
➡ पौधे की कोशिका में DNA डाल सकता है
➡ बीमारी भी पैदा करता है
➡ और वैज्ञानिकों के लिए प्राकृतिक genetic engineering tool भी है।

इसीलिए इसे कहते हैं:

"Nature's Genetic Engineer"

T-DNA Transfer in Agrobacterium–Plant Interaction

T-DNA ट्रांसफ़र वह प्रक्रिया है जिसमें **Agrobacterium tumefaciens** अपने Ti plasmid का **T-DNA भाग काटकर पौधे की कोशिका (plant cell) के genome में स्थायी रूप से जोड़ देता है।**
यह प्रकृति में पाया जाने वाला **natural genetic engineering system** है।

पहले समझें: T-DNA क्या होता है?

T-DNA = **Transfer DNA**
यह **Ti plasmid** (Tumor-inducing plasmid) का एक विशेष *स्ट्रेच* है।

सीमाएँ (Borders):

- **Right Border (RB)** → मुख्य कटी होने वाली साइट
- **Left Border (LB)** → T-DNA का अंत

T-DNA के अंदर सामान्यतः पाए जाते हैं:
✔ Auxin synthesis genes
✔ Cytokinin synthesis genes
✔ Opine synthesis genes

ये जीन पौधे में **tumor (crown gall)** बनाते हैं।

T-DNA ट्रांसफ़र कैसे होता है?

□ Step 1: Plant Wounding → Signal Release

जब पौधा घायल होता है (कट, कीट हमला, mechanical injury), तब वह रासायनिक संकेत भेजता है:

- **Acetosyringone (phenolic compound)**
- शर्करा (sugars)

Agrobacterium इन signals को पहचानकर सक्रिय होता है।

□ Step 2: Vir Genes Activation

Ti plasmid पर मौजूद **virulence genes (vir genes)** सक्रिय हो जाते हैं।
इनमें शामिल हैं:

- **virA, virG** → signal sensing
- **virD** → T-DNA काटना
- **virE** → T-DNA सुरक्षा
- **virB** → secretion system (ट्रांसफ़र चैनल)

यह activation *phosphorylation cascade* के द्वारा होता है।

✂️ Step 3: T-DNA का कटना (Processing)

VirD1 + VirD2 मिलकर
✔ Right Border (RB) पर एक सटीक कट लगाते हैं
✔ T-DNA को plasmid से अलग कर देते हैं

यह T-DNA, VirD2 के साथ एक कॉम्प्लेक्स बनाता है:

🧬 **T-strand = Single-stranded T-DNA + VirD2**

VirD2 एक "पायलट प्रोटीन" की तरह कार्य करता है।

🛡️ Step 4: T-complex Formation (सुरक्षा आवरण बनना)

T-DNA सिंगल-स्ट्रैंड fragile होता है, इसलिए उस पर सुरक्षात्मक प्रोटीन चढ़ते हैं:

- **VirE2 protein** → T-DNA को कोट कर देता है
- इसे एक सुरक्षित संरचना मिलती है जिसे कहते हैं:

🧬 **T-complex**

यह कॉम्प्लेक्स न केवल DNA को नष्ट होने से बचाता है बल्कि plant nucleus तक पहुंचने में भी मदद करता है।

🚀 Step 5: Type IV Secretion System से T-DNA ट्रांसफ़र

VirB और VirD4 मिलकर एक **molecular syringe** बनाते हैं:

➡ इसे **Type IV secretion system (T4SS)** कहा जाता है।

यह बैक्टीरिया से पौधे की कोशिका में T-DNA को इंजेक्ट करता है।
यह इंसानों में पाए जाने वाले conjugation mechanism जैसा ही है।

□ Step 6: T-DNA का Cytoplasm में प्रवेश

अब T-DNA + कोटिंग प्रोटीन मिला हुआ कॉम्प्लेक्स
✔ पौध कोशिका के cytoplasm में उतरता है
✔ वहां इसे plant proteins भी सहारा देते हैं

□ Step 7: Nuclear Targeting (नाभिक तक पहुँच)

VirD2 और VirE2 में **Nuclear Localization Signals (NLS)** होते हैं।

इनकी मदद से T-complex nucleus तक पहुंचता है।

यह ऐसे है जैसे DNA पर "address tag" लगा हो।

□ Step 8: T-DNA का Plant Genome में Integration

नाभिक में पहुँचने के बाद
✔ T-DNA random तरीके से chromosome में integrate (जुड़) हो जाता है
✔ यह प्रक्रिया plant की own DNA repair machinery द्वारा होती है
जैसे :

- Non-homologous end joining (NHEJ)
- Microhomology

इस integration के बाद T-DNA **स्थायी plant gene बन जाता है**।

□ Step 9: Tumor Formation (यदि wild-type है)

यदि यह natural (wild) Agrobacterium है:
➡ Auxin + Cytokinin जीन activate
➡ uncontrolled cell division
➡ **Crown Gall tumor** बनता है।

□ T-DNA Transfer को क्यों Unique माना जाता है?

✔ यह दुनिया की इकलौती वजह है जिसकी वजह से *बैक्टीरिया पौधों को genetic engineer करते हैं!*
✔ वैज्ञानिक इसे exploit करके transgenic plants बनाते हैं।
✔ T-DNA borders में desired genes डालकर GM crops बनाए जाते हैं।

□ Disarming the Ti Plasmid (टीआई प्लाज़्मिड को निष्क्रिय करना) :

⋆ भूमिका

Agrobacterium tumefaciens का **Ti plasmid (Tumor-inducing plasmid)** प्राकृतिक रूप से पौधों में **ट्यूमर (crown gall)** बनाता है।
परंतु कृषि–बायोटेक्नोलॉजी में वैज्ञानिक चाहते हैं कि:

✔ Agrobacterium से **जीन ट्रांसफ़र तो रहे**
✘ लेकिन **ट्यूमर न बने**

इसलिए Ti plasmid को **disarm** यानी **tumor-causing genes हटाकर निष्क्रिय** किया जाता है।

इससे Agrobacterium एक **सुरक्षित DNA-delivery machine** बन जाता है।

□ Disarming Ti Plasmid का असली मतलब क्या है?

Disarming =
□ **T-DNA के अंदर मौजूद auxin, cytokinin और opine synthesis जीन हटाना / निष्क्रिय करना**
□ ताकि पौधा GM (transgenic) बने लेकिन tumor न बने

मूल संरचना में T-DNA के अंदर ये जीन tumor करवाते हैं:

- **Auxin biosynthesis genes**
- **Cytokinin biosynthesis genes**
- **Opine synthesis genes**

Disarmed Ti plasmid में:
✕ये सभी जीन हटा दिए जाते हैं
✔ उनकी जगह scientist "desired gene" डालते हैं

□ Ti Plasmid को Disarm कैसे किया जाता है? (Step-by-Step)

□ Step 1: Ti Plasmid की संरचना को समझना

Ti plasmid में दो मुख्य क्षेत्र (regions) होते हैं:

1. **T-DNA region** → tumor genes
2. **Vir genes region** → जीन ट्रांसफ़र machinery

□
vir genes को कभी नहीं हटाया जाता, क्योंकि इन्हीं की वजह से T-DNA पौधे में पहुँचता है।
Tumor-causing genes T-DNA के अंदर होते हैं → इन्हें हटाया जाता है।

□ Step 2: Tumorogeneic Genes को हटाना या निष्क्रिय करना

Disarming मुख्य रूप से दो तरीकों से होता है:

✔ Method 1: Deletion

T-DNA region से *auxin, cytokinin, opine* genes पूरी तरह हटा दिए जाते हैं।

✔ Method 2: Replacement

उन जीनों की जगह scientist "desirable gene" डाल देते हैं जैसे:

- pest resistance gene
- vitamin gene
- stress tolerance gene
- reporter genes (GUS, GFP)

इसकी वजह से अब T-DNA tumor नहीं बनाता।

□ Step 3: Binary Vector System का उपयोग (सबसे लोकप्रिय तरीका)

Disarming के बाद आधुनिक genetic engineering में **Ti plasmid को दो भागों में विभाजित किया जाता है:**

1) Binary vector (small plasmid)

इसके अंदर होता है:

- Disarmed T-DNA (no tumor genes)
- desired gene (scientist द्वारा डाला गया)
- selectable marker (जैसे nptII – kanamycin resistance)

2) Helper plasmid (वास्तविक बड़ा Ti plasmid)

इसके अंदर केवल vir genes रखे जाते हैं
→ क्योंकि vir genes plant में DNA भेजने के लिए आवश्यक हैं।

महत्व:

✔ T-DNA एक plasmid में
✔ Vir genes दूसरे plasmid में
✔ Tumor genes = absent

 पौधा transgenic बनता है
 लेकिन tumor नहीं बनता

यही असली *disarmed Ti plasmid system* है।

Step 4: Disarmed Plasmid को Agrobacterium में वापस डालना

Transformation द्वारा binary vector को Agrobacterium में ट्रांसफ़ॉर्म किया जाता है।
अब यह Agrobacterium:

✔ सुरक्षित है
✔ tumor नहीं बनाता
✔ केवल desired gene को पौधे में ट्रांसफ़र करता है

Step 5: पौधों में जीन ट्रांसफ़र

जब disarmed Agrobacterium plant tissue से संपर्क करता है:

- vir genes सक्रिय होते हैं
- T-DNA (जिसके अंदर desired gene है) पौधे में जाता है
- plant genome में integrate होकर stable gene बन जाता है

और पौधा एक **genetically modified (GM) plant** बन जाता है—
✘ tumor नहीं बनता
✔ केवल inserted gene की विशेषता व्यक्त होती है

□ Disarming क्यों किया जाता है? (महत्त्व)

✔ Tumor formation रोकने के लिए

✔ Agrobacterium को harmless DNA-delivery tool बनाने के लिए

✔ Transgenic plants बनाने में उपयोग करने के लिए

✔ GM crops जैसे Bt cotton, Golden rice, drought-resistant crops बनाने के लिए

- Natural Ti plasmid tumor बनाता है
- इसके T-DNA region में tumor genes होते हैं
- Disarming = tumor genes हटाना
- Vir genes को नहीं हटाया जाता
- Binary vector system बनाया जाता है
- Disarmed T-DNA में desired gene डाला जाता है
- Disarmed Agrobacterium अब GM plants बनाता है, tumor नहीं

□ Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation

(एग्रोबैक्टीरियम द्वारा मध्यस्थित जीन-परिवर्तन — गहन हिन्दी व्याख्या)

Agrobacterium tumefaciens एक ऐसा मृदा-बैक्टीरिया है जो *प्राकृतिक रूप से* पौधों में अपना DNA ट्रांसफ़र कर सकता है।
इसी प्राकृतिक क्षमता का उपयोग वैज्ञानिक **पौधों में वांछित जीन डालने (gene delivery)** के लिए करते हैं।

इस विधि को कहते हैं:

 Agrobacterium-mediated genetic transformation

यही तरीका आज GM crops, transgenic plants, और molecular farming की नींव है।

Transformation का मूल सिद्धांत (Basic Principle)

Agrobacterium अपने Ti plasmid के **T-DNA** को
➡ पौधे की कोशिका में
➡ नाभिक (nucleus) तक
➡ और plant chromosome में **स्थायी रूप से integrate** कर देता है।

वैज्ञानिक T-DNA के अंदर tumor genes हटा कर
✔ **desired gene** डाल देते हैं
इससे पौधा mutant या GM बन जाता है।

Transformation का पूरा Process: गहराई से चरण-दर-चरण

Step 1: Disarmed Agrobacterium तैयार करना

पहले Ti plasmid को disarm किया जाता है:
✔ vir genes — रखे जाते हैं
✕tumor genes — हटा दिए जाते हैं
✔ desired gene — T-DNA में डाला जाता है

इससे Agrobacterium केवल gene transfer कर सकता है, disease नहीं बनाता।

□ Step 2: Desired Gene को Binary Vector में डालना

Binary vector system उपयोग किया जाता है।
Binary vector में होता है:

- LB और RB borders (T-DNA सीमाएँ)
- desired gene (transgene)
- promoter (35S, Ubiquitin)
- selectable marker gene (kanamycin, hygromycin resistance)

यह plasmid Agrobacterium में डाल दिया जाता है।

□ Step 3: Plant Explant या Tissue का चयन

Transformation के लिए सामान्यतः ये explants उपयोग होते हैं:

- पत्ती (leaf disc)
- तना (stem section)
- हाइपोकोटाइल
- भ्रूण (embryo)
- callus culture

ये explants wounded होते हैं जिससे infection आसान होता है।

□ Step 4: Co-cultivation (Agrobacterium + Plant tissue संपर्क)

Explant को Agrobacterium suspension में डुबोया जाता है या उस पर culture फैलाया जाता है।

इस दौरान:

✔ पौधा acetosyringone रिलीज़ करता है
✔ यह vir genes को activate करता है
✔ T-DNA कटता है
✔ T-complex बनता है
✔ Type IV secretion system से T-DNA पौधे में भेजा जाता है

□ Step 5: T-DNA का Plant Genome में स्थायी संयोजन (Integration)

Agrobacterium द्वारा भेजा गया T-DNA:

- cytoplasm से नाभिक तक जाता है
- VirD2 और VirE2 उसे सुरक्षित रखते हैं
- plant DNA repair system उसे chromosome में integrate कर देता है

अब यह जीन plant genome का स्थायी हिस्सा बन चुका है।

□ Step 6: Selection of Transformed Cells

अब पूरा explant antibiotic वाले माध्यम पर रखा जाता है:

- अगर जीन सफलतापूर्वक inside हुआ है → वह कोशिका antibiotic-resistant है
- बाकी सभी non-transformed cells → मर जाते हैं

इस प्रकार **केवल transformed cells** select हो जाते हैं।

□ Step 7: Regeneration (नए पौधे बनाना)

Selected transformed cells को regeneration medium दिया जाता है।
हर species के लिए cytokinin/auxin ratio अलग होती है।

- उच्च cytokinin → शूट बने

- उच्च auxin → जड़ बने

अंत में पूरा GM plant विकसित हो जाता है।

□ Step 8: Hardening और Greenhouse Growth

Regenerated transgenic plants को soil mix में acclimatize किया जाता है।
फिर greenhouse में बढ़ाया जाता है।

□ Step 9: Molecular Confirmation

GM plant बनने के बाद scientist पुष्टि करते हैं कि जीन plant genome में मौजूद है:

- PCR
- Southern blot
- RT-PCR
- Protein assay (ELISA, Western)
- Reporter gene assay (GUS/GFP)

इसके बाद यह एक **stable transgenic line** बन जाती है।

□ Agrobacterium-Mediated Transformation के लाभ

✔ High efficiency
✔ Low copy integration (कम number of insertions)
✔ बड़े DNA fragments ट्रांसफ़र कर सकता है
✔ Monocots/dicots दोनों में काम कर सकता है
✔ Plant cells को कम damage करता है
✔ विश्व भर की प्रमुख GM फसलें इसी से बनी हैं

🌾 कौन-कौन सी GM फसलें Agrobacterium द्वारा बनीं?

- Bt cotton
- Golden rice
- Virus-resistant papaya
- Herbicide-resistant soybean
- Vitamin-enhanced banana
- High-yield tomato
- Drought-resistant maize

🧬 Co-integrate और Binary Vectors

(उनकी संरचना, कार्यप्रणाली और उपयोगिता)

Agrobacterium tumefaciens के Ti plasmid का उपयोग पौधों में जीन डालने के लिए किया जाता है।
लेकिन प्राकृतिक Ti plasmid बहुत बड़ा और tumor बनाने वाला होता है।
इसलिए वैज्ञानिकों ने दो प्रमुख प्रकार की cloning/transfer systems विकसित की:

🧬 1. Co-integrate Vector System

(को-इंटीग्रेट वेक्टर प्रणाली)

🔹 Co-integrate vector क्या होता है?

यह एक पुरानी (first-generation) transformation system है जिसमें
दो plasmids recombination द्वारा एक साथ fuse होकर एक बड़ा plasmid बनाते हैं,
जिसे **co-integrate plasmid** कहा जाता है।

इसमें शामिल होते हैं:

1️⃣ Modified Ti plasmid (disarmed)

– Tumor genes हटा दिए जाते हैं
– vir genes मौजूद रहते हैं
– यह Agrobacterium में पहले से मौजूद होता है

2 Intermediate (shuttle) cloning vector

– बहुत छोटा plasmid
– desired gene यहीं insert किया जाता है
– इसमें T-DNA border sequences मौजूद होते हैं

जब intermediate vector और disarmed Ti plasmid recombine होते हैं →
दोनों मिलकर एक बड़ा plasmid बनाते हैं जिसे कहते हैं:

Co-integrate vector

Co-integrate vector की Working (कैसे काम करता है?)

1. Desired gene intermediate vector में clone किया जाता है
2. यह vector Agrobacterium में transfer किया जाता है
3. Intermediate vector और Ti plasmid → homologous recombination से जुड़ जाते हैं
4. परिणामी को-इंटीग्रेट plasmid में होता है:
   ✔ vir region
   ✔ T-DNA region (जिसमें desired gene)
5. फिर Agrobacterium पौधे में T-DNA ट्रांसफ़र करता है और transformation होती है

Co-integrate vectors के लाभ

✔ Stable integration
✔ Large DNA inserts carry कर सकते हैं
✔ Vir genes उसी plasmid पर होते हैं → efficient T-DNA transfer

---

□ Co-integrate vectors की सीमाएँ (drawbacks)

✕बहुत complex और time-consuming
✕बहुत बड़ा plasmid बन जाता है → handling कठिन
✕Homologous recombination inefficient
✕दो plasmids को जोड़ना मुश्किल
✕Transformation efficiency कम

इसलिए आज यह system लगभग कम उपयोग होता है।

□ 2. Binary Vector System

(बाइनरी वेक्टर प्रणाली — आधुनिक और लोकप्रिय)

□ Binary vector क्या है?

Binary vectors आधुनिक genetic engineering में सबसे ज़्यादा उपयोग किए जाते हैं।
इसमें plasmid को दो स्वतंत्र भागों में बाँटा जाता है:

---

1 □ Binary vector (छोटा plasmid)

✔ Disarmed T-DNA region
✔ Left border (LB) और Right border (RB)
✔ Desired gene (transgene)
✔ Selectable marker (kanamycin/hygromycin resistance)
✔ Reporters (GUS/GFP)

➡ यह E. coli और Agrobacterium दोनों में replicate कर सकता है
➡ आसान cloning
➡ यह gene delivery unit है

---

2 Helper Ti plasmid (बड़ा plasmid)

✔ vir genes मौजूद
✖ Tumor genes हटाए/निष्क्रिय
➡ यह सिर्फ T-DNA transfer machinery प्रदान करता है
➡ इस plasmid में T-DNA नहीं होता

इसलिए इसे कहते हैं "Binary"—दो अलग plasmids काम करते हैं।

Binary vector की Working (कैसे काम करता है?)

1. Desired gene binary vector के T-DNA region में insert किया जाता है
2. यह binary vector Agrobacterium में ट्रांसफ़ॉर्म किया जाता है
3. Agrobacterium में :
   – एक plasmid: binary vector with T-DNA
   – दूसरा plasmid: helper plasmid with vir genes
4. vir genes → T-DNA को binary vector से plant cell में भेजते हैं
5. Plant cell → T-DNA integrate होता है
6. Transgenic plant बन जाता है

Binary vectors के लाभ (क्यों सबसे लोकप्रिय?)

✔ Handling easy (छोटा plasmid)
✔ Cloning आसान
✔ High transformation efficiency
✔ Modular design
✔ Broad host range
✔ Less complex than co-integrate
✔ Tumor genes absent → safe
✔ Monocots और dicots दोनों में उपयोग

Binary vector system आज plant biotechnology की रीढ़ है।

□ Co-integrate vs Binary Vector (Comparison Table –)

विशेषता	Co-integrate Vector	Binary Vector
संरचना	Ti plasmid + intermediate plasmid = बड़ा plasmid	दो स्वतंत्र plasmids (binary + helper)
T-DNA	बड़े co-integrate plasmid पर	केवल छोटे binary vector पर
vir genes	उसी plasmid पर	helper plasmid पर
DNA cloning	कठिन	आसान
Size	बहुत बड़ा	छोटा
Efficiency	कम	बहुत उच्च
उपयोग	पुरानी तकनीक	आधुनिक व्यापक उपयोग
Handling	जटिल	सरल
Transformation speed	धीमी	तेज

□ उनकी Utility (उपयोगिता)

⋆ Co-integrate vectors — उपयोग

✔ पुराने समय में transgenic plants बनाने
✔ dicots में early transformation work
✔ Ti plasmid structure studies

⋆ Binary vectors — उपयोग

✔ Modern GM crops (Bt cotton, Golden rice)
✔ Gene overexpression
✔ Gene silencing (RNAi vectors)
✔ CRISPR-Cas delivery into plants
✔ Reporter assays
✔ Molecular farming
✔ Metabolic engineering

□ Direct Gene Transfer: PEG-mediated Transformation

(पीईजी-मध्यस्थित प्रत्यक्ष जीन स्थानांतरण — गहन हिन्दी व्याख्या)

Direct gene transfer में DNA पौधे में **बिना किसी जैविक वाहक** (जैसे Agrobacterium) के सीधे पहुँचाया जाता है।
इसमें कई विधियाँ शामिल हैं:

- PEG-mediated method
- Electroporation
- Particle bombardment (gene gun)
- Microinjection
- Ultrasound mediated
  …आदि।

इनमें सबसे **पुरानी, विश्वसनीय और सरल** विधि है:

⋆ PEG-mediated gene transfer

यह मुख्य रूप से **plant protoplasts** में DNA डालने के लिए उपयोग की जाती है।

□ PEG-mediated Transformation क्या है?

PEG = Polyethylene Glycol
यह एक रासायनिक यौगिक है जिसका उपयोग protoplasts (दीवार-रहित पौध कोशिकाओं) में DNA uptake करवाने के लिए किया जाता है।

PEG:

✔ कोशिका की झिल्ली को अस्थायी रूप से permeable बनाता है
✔ DNA और प्रोटोप्लास्ट की सतह के बीच fusion करवाता है
✔ Calcium ions के साथ मिलकर DNA के प्रवेश को बढ़ाता है

इसलिए इसे कहते हैं:

 Chemical-mediated direct gene transfer

PEG-mediated Transformation क्यों protoplasts में ही होती है?

क्योंकि protoplast:

- दीवार (cell wall) से मुक्त होते हैं
- सीधे DNA uptake कर सकते हैं
- PEG द्वारा झिल्ली आसानी से permeabilize होती है
- fusion एवं uptake efficiency अधिक होती है

Cell wall होने पर DNA uptake कठिन होता है, इसलिए इसे पहले **enzyme treatment** से हटाया जाता है।

PEG-mediated Direct Gene Transfer: Step-by-Step (गहराई से)

Step 1: Protoplast Isolation (प्रोटोप्लास्ट तैयार करना)

Plant tissue काटकर एक enzyme mixture में रखा जाता है:

- Cellulase → सेलुलोज तोड़ता है
- Pectinase → पेक्टिन तोड़ता है

इसके बाद:

✔ Cell wall हट जाती है
✔ केवल plasma membrane से ढके protoplasts बचते हैं

ये DNA uptake के लिए उपयुक्त होते हैं।

□ Step 2: Protoplast Purification

Isolation के बाद protoplast:

- फ़िल्टर किए जाते हैं
- Wash buffer में धोए जाते हैं
- osmotic stabilizers (mannitol) में रखे जाते हैं
  ताकि वे फटें नहीं।

□ Step 3: DNA Solution जोड़ना

अब desired gene वाली plasmid DNA solution protoplasts के साथ मिलाई जाती है।

DNA घुला होता है:

- TE buffer
- Calcium chloride
- Mannitol

Calcium ions DNA को membrane पर bind करवाते हैं।

□ Step 4: PEG Treatment – मुख्य चरण

अब Polyethylene Glycol (PEG) जोड़ा जाता है।

PEG का कार्य :

1. **Membrane fusion**
2. **DNA–protoplast association बढ़ाना**
3. **Temporary pores बनाना**
4. DNA को protoplast के cytoplasm तक पहुँचाना

आमतौर पर इस्तेमाल होता है :
✔ 20–40% PEG
✔ साथ में Ca^{2+} ions

ये झिल्ली को reversible तरीके से permeable बनाते हैं।

□ Step 5: Washing and Recovery

कुछ मिनट बाद protoplasts को PEG solution से हटाकर washing medium में रखा जाता है ताकि :

✔ झिल्ली पुनः स्थिर हो जाए
✔ toxicity कम हो
✔ protoplast division शुरू हो सके

□ Step 6: Culture and Cell Wall Regeneration

अब transformed protoplasts:

- osmotic medium में रखे जाते हैं
- cell wall पुनः बनती है
- कोशिकाएँ divide करने लगती हैं
- callus बनता है

□ Step 7: Plant Regeneration

Callus को auxin/cytokinin ratio देकर :

✔ shoots बनते हैं
✔ roots बनते हैं
✔ पूरा नया GM plant विकसित होता है

यह transgenic plant inserted gene को व्यक्त करता है।

□ PEG-mediated Transformation के Mechanism का वैज्ञानिक आधार

PEG **dehydration और bridging effect** से protoplast membrane को बदलता है :

1. PEG एक polymer है जो पानी निकालता है → membrane contacts बढ़ते हैं
2. DNA और membrane करीब आते हैं
3. Ca^{2+} ions DNA–membrane bridges बनाते हैं
4. Transient pores खुलते हैं
5. DNA अंदर खींच लिया जाता है

यह एक **calcium-dependent DNA uptake** प्रणाली है।

□ PEG-mediated Gene Transfer का उपयोग (Utility)

⋆ 1. Transgenic plants बनाने में

- Tobacco
- Rice
- Maize
- Potato
- Tomato
- Soybean

⋆ 2. Genome editing

- CRISPR-Cas9 plasmid delivery
- RNP delivery

⋆ **3. Mutation studies**

⋆ **4. Protein expression**

⋆ **5. Metabolic engineering**

⋆ **6. Protoplast fusion experiments**

⋆ **7. Virus-induced gene silencing (VIGS)**

□ PEG-mediated Method के Advantages (लाभ)

✔ Simple और inexpensive
✔ High efficiency in protoplasts
✔ किसी biological vector (Agrobacterium) की जरूरत नहीं
✔ किसी भी species में लागू (monocots भी)
✔ DNA का आकार बड़ा हो सकता है
✔ CRISPR delivery के लिए उपयुक्त

□ Limitations (सीमाएँ)

✕केवल protoplast systems तक सीमित
✕protoplast culture कठिन
✕Regeneration हर species में आसान नहीं
✕कुछ plant tissues में कम efficiency

इसीलिए PEG-method अक्सर model plants में ज्यादा सफल होती है।

⚡Electroporation क्या है?

Electroporation एक **भौतिक (physical) direct gene transfer method** है जिसमें
electric pulse (विद्युत धक्का) देकर कोशिका झिल्ली में **अस्थायी pores (छिद्र)** बनाए जाते हैं।

इन pores से → **DNA, RNA, plasmid, CRISPR components या अन्य अणु** कोशिका में प्रवेश कर जाते हैं।

पल्स हटते ही झिल्ली के छिद्र **बंद हो जाते हैं**।
इससे cell जीवित रहती है और foreign DNA के साथ विकसित होने लगती है।

इसलिए इसे कहते हैं :

⋆ **"Electric field–mediated DNA uptake technology"**

□ Electroporation कहाँ उपयोग होती है?

✔ Plant cells
✔ Protoplast
✔ Animal cells
✔ Bacteria
✔ Yeast
✔ Embryos
✔ CRISPR-RNP delivery

यह **बहुत universal** तकनीक है।

□ Electroporation का मूल सिद्धांत (Basic Principle)

जब कोशिका को high-voltage electric pulse दिया जाता है, तब :

- Plasma membrane में
  transient (अस्थायी) nanopores बनते हैं
- These pores allow
  foreign DNA to enter into cytoplasm

यह pores कुछ milliseconds–seconds के लिए खुले रहते हैं।

□□ Electroporation का Mechanism:

□ Step 1: Cell Preparation

सबसे पहले cells तैयार किए जाते हैं:

- Plant protoplasts
- Suspension cells
- Embryonic cells
- Callus cells

Cells को osmotic stabilizers के साथ buffer में रखा जाता है ताकि shock से क्षति कम हो।

□ Step 2: DNA Mixing with Cells

Cells को एक electroporation cuvette में लिया जाता है।
इसमें मिलाया जाता है:

- Desired gene वाला plasmid DNA
- CRISPR-Cas components (कभी-कभी)
- mRNA / siRNA (अन्य प्रयोजनों में)

DNA पूरे मिश्रण में समान रूप से मौजूद रहता है।

□ Step 3: Application of Electric Pulse (मुख्य चरण)

Cuvette को electroporator में लगाया जाता है और high voltage pulse दिया जाता है:

- सामान्यतः **200–2500 volts**

- Pulse duration: **microseconds से milliseconds**
- Field strength: **1–10 kV/cm**

क्या होता है?

1. Electric field → membrane potential को बढ़ाता है
2. झिल्ली अस्थिर होती है
3. **Transient nanopores** बनते हैं
4. Cell एक non-equilibrium स्थिति में आता है
5. DNA इन pores से cell के अंदर खिंच जाता है

इसे कहते हैं:

 Electrophoretic DNA entry

Step 4: Membrane Resealing (छिद्र बंद होना)

Pulse रुकते ही:

- Cell membrane पुनः स्थिर हो जाती है
- Pores स्वतः बंद होने लगते हैं
- Cell सामान्य स्थिति में आ जाता है

यदि pulse बहुत अधिक हो जाए → cell burst (lysis) हो सकता है
इसलिए parameters बहुत carefully सेट किए जाते हैं।

Step 5: Cell Recovery and Culture

Electroporated cells को recovery medium में डालकर:

- उन्हें पोषक द्रव दिया जाता है
- division शुरू होता है
- cell wall regenerate होती है (protoplast के मामलों में)

□ Step 6: Plant Regeneration

Callus बनता है, फिर शूट और रूट बनाकर
➡ पूरा transgenic plant विकसित हो जाता है।

□ Electroporation के पीछे वैज्ञानिक आधार (Mechanism Detail)

Electric field induces:

1. Dielectric breakdown

Membrane का breakdown → pores खुलते हैं

2. Electrophoresis

Electric field DNA को cell interior की ओर खींचता है

3. Thermal effects

Heat membrane fluidity बढ़ाती है

4. Microsecond pore formation

Nanopores size:

- 0.5 nm to 1 μm (species dependent)

यह pores reversible होते हैं — यही electroporation का चमत्कार है।

□ Plant Biotechnology में Electroporation का उपयोग (Utility)

✔ **Protoplast transformation**

— Rice, wheat, tobacco, maize, potato, Arabidopsis आदि में

✔ **CRISPR-Cas9 delivery**

— RNPs या plasmids को सीधे लाने में

✔ **Transient gene expression**

— GUS, GFP जैसे reporter genes हेतु

✔ **Stable transformation**

— regenerated plants बनाने में

✔ **Metabolic engineering**

✔ **Virus resistance genes की delivery**

✔ **Gene silencing (RNAi plasmid delivery)**

Electroporation monocots में भी बहुत सफल है, जहाँ Agrobacterium द्वारा transformation कठिन होता है।

□ Electroporation के Advantages (लाभ)

✔ बहुत तेज़
✔ Universal method — किसी भी organism में लागू
✔ High transformation efficiency
✔ DNA का insertion size बड़ा हो सकता है
✔ No biological vector required (Agrobacterium-free)
✔ CRISPR delivery के लिए उपयुक्त
✔ कम लागत वाले electroporators उपलब्ध

□ Electroporation की Limitations (सीमाएँ)

✕Cells को damage का जोखिम
✕Protoplast regeneration मुश्किल हो सकती है
✕High voltage settings optimize करने पड़ते हैं
✕कुछ plant species में कम success
✕बहुत sensitive cells मर सकते हैं

□ Particle Bombardment (Biolistic / Gene Gun Method)

(पार्टिकल बमबार्डमेंट — गहन हिन्दी व्याख्या)

Particle bombardment एक **भौतिक (physical) direct gene transfer** तकनीक है।
इसमें DNA को **धातु के सूक्ष्म कणों (gold या tungsten particles)** पर coat करके पौध कोशिकाओं पर **तेज़ गति से दागा (bombard) जाता है**।

तेज़ गति से घुसने वाले कण cell wall और membrane को पार करके
➡ DNA को अंदर छोड़ देते हैं
➡ DNA nucleus तक पहुँचकर integrate हो जाता है

इसे **Biolistic gun / Gene gun / Microprojectile bombardment** भी कहते हैं।

□ Particle Bombardment का Purpose

यह विधि विशेष रूप से उपयोगी है जहाँ:

✔ Agrobacterium काम नहीं करता
✔ Monocots (चावल, गेहूँ, मक्का) को transform करना हो
✔ बड़े DNA fragments डाले जाने हों
✔ Callus, embryos, meristems, seeds को transform करना हो

□□ Particle Bombardment का Principle (मूल सिद्धांत)

1. Heavy metal microparticles (gold/tungsten) पर DNA coat किया जाता है
2. इन्हें high-pressure helium gas या gunpowder blast से accelerate किया जाता है
3. ये कण tissue के अंदर जाते हैं
4. DNA cell के अंदर release होता है
5. DNA genome में integrate हो जाता है

इसे **physical penetration method** कहा जाता है।

□ Particle Bombardment:

□ Step 1: DNA Coating on Microcarriers

धातु के सूक्ष्म कण (1 µm आकार):

- Gold particles (सर्वश्रेष्ठ)
- Tungsten particles (पुराने उपयोग)

इन पर plasmid DNA coat किया जाता है।
इसके लिए:

- $CaCl_2$ (DNA binding)
- Spermidine (DNA precipitation)

उपयोग किया जाता है।

□ Step 2: Loading on Macrocarrier

DNA-coated microparticles को एक **macrocarrier** पर फैलाया जाता है।
यह macrocarrier gene gun में लगाया जाता है।

? Step 3: Target Tissue Preparation

Transformation के लिए उपयुक्त पौध ऊतक लिये जाते हैं:

✔ Embryos
✔ Callus
✔ Leaf pieces
✔ Meristematic tissues
✔ Pollen
✔ Seeds

इन्हें एक गोल/पेट्री डिश में रखा जाता है।

? Step 4: Gene Gun Firing (मुख्य चरण)

Gene gun:

- Helium gas pressure (400–1100 psi)
- Vacuum chamber
- Rupture disk

का उपयोग करके macrocarrier को accelerate करता है।

Microcarriers high-speed से tissue की ओर जाते हैं।

कण (gold/tungsten) कोशिका की झिल्ली और cell wall को भेदकर अंदर प्रवेश करते हैं।

? Step 5: DNA Release Inside Cell

कण अंदर पहुंचते ही:

- DNA detach हो जाता है
- Cytoplasm में फैलता है
- कुछ DNA nucleus तक पहुँचता है
- Genome में integrate होता है

🔹 Step 6: Regeneration and Selection

Bombarded tissues को selection medium पर रखा जाता है:

✔ Selectable marker genes (Kanamycin, Hygromycin)
✔ Callus formation
✔ Shoot and root regeneration

आखिर में पूरा **transgenic plant** बनता है।

□ Particle Bombardment के फायदे (Advantages)

✔ Monocots (rice, wheat, maize) में highly efficient
✔ किसी भी plant species में उपयोग संभव
✔ Cell wall एक बाधा नहीं
✔ CRISPR-Cas plasmid या RNP delivery
✔ Vaccine genes, reporter genes delivery
✔ Multiple genes एक साथ insert किए जा सकते हैं

□ Limitations (सीमाएँ)

✖Equipment बहुत महँगा
✖Tissue damage हो सकता है
✖Random integration अधिक
✖Genome fragmentation की संभावना
✖Transgene copy number अधिक हो सकता है

फिर भी आज monocots में transformation के लिए यह top methods में है।

□ Particle Bombardment के Alternative Direct Gene Transfer Methods

(अन्य भौतिक / रासायनिक direct gene delivery तकनीकें)

नीचे particle bombardment को छोड़कर सभी alternatives का विस्तृत विवरण दिया गया है:

---

1 □ PEG-Mediated Transformation (Polyethylene glycol) — Chemical Method

✔ Protoplasts में DNA uptake
✔ PEG + Ca^{2+} → membrane permeabilization
✔ Simple और low cost
✔ Protoplast culture चुनौतीपूर्ण

---

2 □ Electroporation — Physical Method

✔ High-voltage electric pulse → membrane pores
✔ DNA अंदर प्रवेश
✔ Protoplasts, cells, embryos में उपयोग
✔ Universal method (plants + animals + bacteria)

---

3 □ Microinjection — Physical Method

✔ DNA को सीधे cell या nucleus में syringe से inject
✔ Precision high
✔ Time-consuming
✔ Individual cell manipulation

4️⃣ Ultrasonication (Sonoporation)

✔ Ultrasound waves → temporary pores
✔ DNA uptake possible
✔ Plant cells sensitive

5️⃣ Silicon Carbide Whisker-Mediated Transformation

✔ Needle-like whiskers + shaking
✔ Whiskers membrane को penetrate करते हैं
✔ DNA inside होता है
✔ सरल लेकिन cell damage high

6️⃣ Laser-Mediated Gene Delivery

✔ Laser pulses → membrane perforation
✔ DNA introduces
✔ High precision
✔ Cost high

7️⃣ Liposome-Mediated Gene Transfer

✔ Artificial vesicles (liposomes) DNA को deliver करते हैं
✔ Fusion with plant membrane possible
✔ Experimental but interesting

□ Comparison Table (Particle Bombardment vs Alternatives)

Method	Type	Main Use	Pros	Cons
Particle Bombardment	Physical	Monocots, embryos	Universal, efficient	Costly, tissue damage
PEG-mediated	Chemical	Protoplast	Cheap, simple	Protoplasts required
Electroporation	Physical	Most cells	High efficiency	Cell damage possible
Microinjection	Physical	Single cells	Precise	Very slow
Ultrasonication	Physical	Some tissues	Simple	Low efficiency
Silicon Carbide	Physical	Suspension cells	Cheap	High damage
Laser	Physical	High-tech	Precise	Expensive

□ Screenable और Selectable Markers

(ट्रांसफॉर्म्ड कोशिकाओं की पहचान के लिए मार्कर जीन)

जब कोई foreign gene पौधे की कोशिकाओं में डाला जाता है, तो सब कोशिकाएँ transformed नहीं होतीं। इसलिए scientist को ऐसी कोशिकाओं को **पहचानने (identify)** की आवश्यकता होती है जिनमें :

- **desired gene successfully insert हुआ हो**,
- और वे **stable तरीके से जीन व्यक्त कर रही हों**।

इसी उद्देश्य से transformation के दौरान **marker genes** उपयोग किए जाते हैं।

□ Marker Genes दो प्रकार के होते हैं :

1) Selectable Markers (चयन योग्य मार्कर)

2) Screenable Markers (दृश्य / पहचान योग्य मार्कर)

□ 1. Selectable Markers (चयन योग्य मार्कर)

Selectable markers वे जीन होते हैं जो **selective pressure** (जैसे antibiotic या herbicide) की उपस्थिति में
केवल transformed कोशिकाओं को जीवित रहने देते हैं, बाकी सभी non-transformed cells मर जाते हैं।

इसका अर्थ :

□ **इनका उपयोग survival-based selection के लिए होता है।**

यह सबसे महत्वपूर्ण और व्यापक मार्कर हैं।

□ Selectable Marker कैसे काम करते हैं?

1. Transformation के बाद सभी कोशिकाएँ mixed होती हैं
2. उन्हें selective medium पर रखा जाता है
3. जिस कोशिका में selectable marker gene मौजूद है → वह जीवित रहती है
4. बाकी सभी कोशिकाएँ मर जाती हैं

इससे transformed cells को आसानी से isolate किया जा सकता है।

□ Selectable Markers के प्रकार

⋆ **A. Antibiotic Resistance Markers**

Common genes:

- **nptII (neomycin phosphotransferase II)**
  → kanamycin, neomycin resistance
- **hpt (hygromycin phosphotransferase)**
  → hygromycin resistance
- **aadA**
  → streptomycin/spectinomycin resistance

कैसे काम करते हैं?
ये enzymes antibiotic molecules को modify कर देते हैं
→ जिससे cell पर antibiotic toxic नहीं रहता
→ cell survive कर जाती है।

⋆ B. Herbicide Resistance Markers

Common genes:

- **bar gene / pat gene**
  → phosphinothricin resistance (herbicide: Basta)
- **EPSPS gene (from Agrobacterium CP4)**
  → glyphosate resistance

कैसे काम करते हैं?
Bar/pat gene → phosphinothricin को detoxify करता है
EPSPS gene → glyphosate block को bypass कर देता है
→ cell herbicide के presence में भी जीवित रहती है।

⋆ C. Metabolic Selection Markers

कुछ genes पौधे को किसी आवश्यक पदार्थ synthesise करने में सक्षम बनाते हैं।

उदाहरण :

- **manA gene** → mannose selection
- **URA3 gene** (yeast systems)

ये marker antibiotic-free selection प्रदान करते हैं और biosafe माने जाते हैं।

□ Selectable Markers के Advantages

✔ Fast and highly efficient
✔ Clear separation between transformed & non-transformed
✔ Essential for stable transformation
✔ Useful in both monocots and dicots
✔ Ideal for regeneration-based systems

□□ Selectable Marker के Drawbacks

✕Antibiotic/herbicide residue concerns
✕Regulatory restrictions (GM crops)
✕कुछ लोग food safety को लेकर चिंतित

इसलिए alternative non-antibiotic markers विकसित किए जा रहे हैं।

□ 2. Screenable Markers (दृश्य पहचान मार्कर)

(जिनसे transformed कोशिकाओं को "देखकर" पहचाना जा सकता है)

Screenable markers कोशिका को **किसी दृश्य संकेत** के आधार पर transform होने का प्रमाण देते हैं।

इन markers से selective pressure नहीं दिया जाता
→ बल्कि transformed cells "रंग", "प्रकाश" या "जांच" द्वारा दिखते हैं।

इनका उपयोग screening (चयन) के लिए होता है, killing-based selection नहीं।

□ Screenable Marker कैसे काम करते हैं?

1. Transformed cells marker gene को express करती हैं

2. वे खास संकेत पैदा करती हैं:
    - रंग
    - fluorescence
    - एंज़ाइम प्रतिक्रियाएँ
3. Scientist transformed cells को visually पहचान लेता है
4. Non-transformed cells भी मौजूद रहते हैं, पर उनके पास संकेत नहीं होता

□ Screenable Markers के लोकप्रिय प्रकार

⋆ A. GUS Reporter (β-glucuronidase gene — uidA)

- Substrate X-Gluc देने पर नीला रंग (blue color) बनता है
- Transformed cells → blue
- Non-transformed → colorless

यह **सबसे लोकप्रिय histochemical marker** है।

⋆ B. GFP (Green Fluorescent Protein)

- Ultraviolet या blue light में यह हरा प्रकाश (fluorescence) देता है
- इसे microscopy द्वारा देखा जाता है
- Extremely useful in live-cell imaging

यह jellyfish (Aequorea victoria) से प्राप्त gene है।

⋆ C. RFP / YFP / CFP

- लाल (Red), पीला (Yellow), cyan (CFP) fluorescent proteins
- Multi-reporter analysis में उपयोग

⋆ D. Luciferase gene (luc)

- यह firefly luciferase enzyme है

- substrate luciferin देने पर पीली चमक (bioluminescence) पैदा होती है
- Gene expression को quantify किया जा सकता है

⋆ E. Anthocyanin biosynthesis genes

- transformed tissues में purple pigment बनता है

Non-destructive plant visual screening के लिए उपयोगी।

□ Screenable Markers के Advantages

✔ Non-destructive (fluorescent reporters)
✔ No need for antibiotics or herbicides
✔ Real-time gene expression study
✔ Useful for promoter analysis
✔ Safe for food crops (यदि non-toxic reporters प्रयोग हों)

□□ Screenable Markers के Drawbacks

✕Direct selection नहीं — non-transformed cells भी survive रहते हैं
✕कुछ reporters tissues को damage करते हैं
✕Fluorescence microscopes की आवश्यकता
✕Transient assays में अच्छा, stable selection में कम उपयोगी

□ Selectable vs Screenable Markers (Comparison Table in Hindi)

विशेषता	Selectable Markers	Screenable Markers
आधार	Survival या death	Visual signal

विशेषता	Selectable Markers	Screenable Markers
Medium में जरूरत	Antibiotic/herbicide	Substrate/light
Efficiency	बहुत उच्च	मध्यम
Transformed cell	केवल वही survive	survive + visual signal
Popular examples	nptII, hpt, bar, EPSPS	GUS, GFP, RFP, luc
उपयोग	Stable transgenics	Reporter studies
परिणाम	तेज़ isolation	visual screening
Safety issue	अधिक	बहुत कम

□ Chloroplast Transformation क्या है?

क्लोरोप्लास्ट ट्रांसफॉर्मेशन में foreign gene को **पौधे के nuclear genome के बजाय chloroplast genome (plastome)** में insert किया जाता है।

चूँकि chloroplast में कई advantages हैं, इसलिए यह technique विशेष रूप से **high-level protein expression, metabolic engineering और transgene containment** के लिए उपयोगी है।

□ क्लोरोप्लास्ट ट्रांसफॉर्मेशन का उद्देश्य

1. **High-level gene expression**
   - Chloroplast में हजारों copies of genome होते हैं → protein yield बहुत अधिक
2. **Transgene containment (Maternal inheritance)**
   - Chloroplast maternal inheritance होता है → pollen-mediated gene flow कम
3. **Multigene engineering**
   - Operons की तरह कई genes chloroplast में insert किए जा सकते हैं
4. **Herbicide or metabolic traits**
   - Direct chloroplast-based expression से stress tolerance या metabolic pathway enhance किया जा सकता है

□ Chloroplast Genome (Plastome) की विशेषताएँ

- Circular DNA, ~120–160 kb size
- लगभग 100–120 genes
- Genes mostly photosynthesis, ribosomal proteins, tRNA/rRNA
- High copy number → protein overexpression संभव
- Maternal inheritance → biosafety में लाभ

□□ Chloroplast Transformation का Principle

1. **Foreign DNA** को **vector/plasmid** में clone किया जाता है
2. Vector में होते हैं:
    - **Gene of interest (GOI)**
    - **Selectable marker gene (aadA, spectinomycin resistance)**
    - **Flanking sequences (homologous regions of plastome)**
3. Plant tissue या protoplast पर DNA **particle bombardment** द्वारा भेजा जाता है
4. DNA **homologous recombination** के द्वारा chloroplast genome में integrate होता है
5. Selective medium में transformed plastids survive करती हैं
6. Homoplasmy (सभी chloroplasts में transgene) achieve की जाती है

□ Chloroplast Transformation: Step-by-Step

1□ Vector Construction

- **GOI + selectable marker**
- **Flanking sequences (LTR, RHR)** → plastome recombination के लिए
- Optional: promoters (e.g., psbA promoter), UTRs, terminators

---

2□ Delivery of DNA

- **Particle bombardment / biolistic gun**
- Tissue: leaves, callus, protoplasts

- High-speed gold/tungsten particles DNA को chloroplast तक पहुँचाते हैं

3️⃣ Selection of Transformed Cells

- **Selectable marker (aadA)** → spectinomycin resistance
- Non-transformed plastids मर जाती हैं, transformed survive करती हैं
- Repeated selection → **homoplasmic plants** तैयार होते हैं

4️⃣ Confirmation of Transgene Integration

Molecular methods:

- **PCR** → Gene presence
- **Southern blot** → Integration pattern, copy number, homoplasmy
- **RT-PCR / qRT-PCR** → RNA expression
- **Western blot / ELISA** → Protein expression

5️⃣ Plant Regeneration

- Homoplasmic plastids वाले callus को shoot/root regeneration medium में रखकर
- पूर्ण transplastomic plant तैयार किया जाता है

🌟 Advantages of Chloroplast Transformation

1. **High-level protein expression**
   - Up to 70% of total leaf protein
2. **Maternal inheritance** → Biosafety
3. **Multigene stacking** possible (operons)
4. **No gene silencing** (nuclear transgenes में common)
5. **Expression of toxic proteins** feasible

⚠️ Limitations / Challenges

✕Only certain plant species (tobacco, lettuce) में successful
✕Homoplasmy achieve करना समय लेता है
✕Promoters tissue-specific हो सकते हैं
✕Regulatory issues और field trials अभी भी limited

□ Applications of Chloroplast Transformation

1. **High-value protein production**
   - Vaccine antigens, therapeutic proteins
2. **Metabolic engineering**
   - Carotenoids, amino acids, secondary metabolites
3. **Herbicide resistance**
4. **Stress tolerance**
   - Drought, salt, cold
5. **Pharmaceutical protein production**
   - Antibodies, industrial enzymes

□ Chloroplast Transformation की Key Points

Feature	Detail
Genome Target	Chloroplast (plastome)
Delivery Method	Particle bombardment
Selection	Spectinomycin, aadA marker
Integration	Homologous recombination
Expression	High-level, operon possible
Inheritance	Maternal (pollen rarely transmits)
Major Advantage	Biosafety, multigene expression, high yield

□ Marker-Free Transgenic Plants क्या हैं?

Marker-free transgenic plants वो पौधे होते हैं जिनमें **selectable या screenable marker gene नहीं होता**।

परंपरागत transformation में अक्सर **antibiotic (nptII, hpt)** या **herbicide (bar)** resistance genes का उपयोग किया जाता है।

- ये markers transformation के लिए आवश्यक थे।
- लेकिन **food safety, biosafety और regulatory approval** की दृष्टि से यह चुनौती बन गए।

इसलिए **marker-free technologies** विकसित की गईं ताकि:

1. **GM crops में कोई antibiotic/herbicide gene न रहे**
2. **Regulatory acceptance आसान हो**
3. **Biosafety high हो**
4. **Consumer acceptance बढ़े**

□ Marker-Free Methodologies के Advantages

✔ कोई antibiotic/herbicide gene नहीं → food safety high
✔ Biosafety और environmental safety बेहतर
✔ Gene stacking के लिए सुविधा
✔ Regulatory approval आसान
✔ Transgene expression प्रभावित नहीं

□ Marker-Free Methodologies: मुख्य तरीके

1□ Co-transformation and Segregation Method

Principle:

- दो अलग plasmids एक ही transformation में डाले जाते हैं:
  1. **GOI (gene of interest)**
  2. **Selectable marker**
- Transformation के बाद plants को **selection medium** पर grow किया जाता है
- F1/F2 generation में Mendelian segregation द्वारा:
  - Marker gene को हटाया जा सकता है
  - केवल GOI वाला plant बचता है

Steps:

1. Co-transformation with two plasmids
2. Select transgenic plants with selectable marker
3. Self-pollination / cross-pollination
4. Segregation of marker gene → marker-free progeny

Example: Tobacco, rice

---

2 Site-Specific Recombinase Systems (SSR)

यह advanced molecular tool है।

Principle:

- Transgene और marker gene को **recombinase recognition sites** (loxP, FRT) के बीच रखा जाता है
- Recombinase enzyme (Cre, FLP) marker gene को excise कर देता है
- केवल GOI बचता है

Popular Systems:

System	Recognition site	Enzyme	Example
Cre/loxP	loxP	Cre recombinase	Tobacco, Arabidopsis
FLP/FRT	FRT	FLP recombinase	Maize, Rice
R/RS	RS	R recombinase	Experimental

Advantages:
✔ Precise removal
✔ Stable marker-free plant
✔ Can be controlled temporally or spatially

---

3 Transposon-Based Marker Removal

Principle:

- Marker gene को transposon के अंदर रखा जाता है
- Transposase enzyme marker gene को genome से excise कर देती है

- GOI genome में stable रहता है

Example: Ac/Ds transposon system

Limitation:

- Random excision
- Requires screening

---

4 Intron-Based Marker Excision

- Marker gene के अंदर intron-embedded recombinase system
- Transgene expression के बाद **marker excision** हो जाता है
- Tissue-specific or inducible recombinase promoters use होते हैं

---

5 Chemical / Inducible Marker Removal

- Inducible systems (heat-shock, chemical like dexamethasone)
- Recombinase gene activate होती है
- Marker excision होती है

Advantages:
✔ Controlled removal
✔ No permanent recombinase expression

---

6 Marker-Less Transformation via Positive Selection

- Traditional selection → antibiotics/herbicides
- Positive selection → only transformed cells survive without harmful marker

Examples:

System	Principle	Plant Example
PMI (Phosphomannose isomerase)	Mannose metabolism	Rice, Maize
XYLOS1	Xylose selection	Tobacco

System	Principle	Plant Example
GALT	Galactose selection	Arabidopsis

Advantages:
✔ No antibiotic/herbicide gene
✔ Safe for regulatory approval

□ Comparison of Marker-Free Strategies

Method	Principle	Advantages	Limitation
Co-transformation & Segregation	Two plasmids, segregation	Simple, classical	Time-consuming, multiple generations
Recombinase Systems (Cre/lox, FLP/FRT)	Marker excision by site-specific recombination	Precise, stable	Requires recombinase expression, vector complexity
Transposon-Based	Marker excision by transposase	Random but effective	Screening intensive
Positive Selection	Metabolic advantage	No toxic markers	Limited plant species

---

□ Steps for Developing Marker-Free Transgenic Plants (Example: Cre/loxP)

1. Construct plasmid: GOI + selectable marker flanked by loxP sites
2. Transform plant cells → select with marker
3. Induce Cre expression (chemical / tissue-specific promoter)
4. Marker excised → marker-free GOI plant
5. Confirm by PCR/Southern blot
6. Regenerate plant → test transgene expression & stability

□ Applications of Marker-Free Plants

1. **Food crops** → Safe for human consumption
2. **Pharmaceutical protein production** → No antibiotic gene contamination
3. **Environmental safety** → Reduced gene flow risk
4. **Regulatory approval** → Easier for GM crops
5. **Stacking multiple genes** → No marker accumulation

□ 1. Gene Targeting (जीन टार्गेटिंग)

Definition (परिभाषा)

Gene targeting वह **molecular technique** है जिसमें किसी specific gene या genomic locus को **precisely modify, replace, delete या insert** किया जाता है।

यह **site-specific genetic modification** है, न कि random integration।

मुख्य उद्देश्य :

- Gene knockout (loss-of-function)
- Gene knock-in (new gene insertion)
- Precise mutation / correction
- Functional genomics और crop improvement

Principle (सिद्धांत)

Gene targeting में सबसे महत्वपूर्ण प्रक्रिया है :

Homologous Recombination (HR)

- Donor DNA sequence को **target gene sequence के homologous region** के साथ match कर दिया जाता है
- Cell machinery DNA को **precisely target site पर integrate** करती है
- Non-homologous end joining (NHEJ) random integration करती है, HR precise

---

Methods of Gene Targeting

1️⃣ Conventional Homologous Recombination

- Linear DNA fragments → target locus के साथ recombine
- Rare in plants, efficiency low

2️⃣ Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)

- Engineered proteins → DNA को site-specific cut
- Cell repair → precise mutation / insertion

3️⃣ TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

- DNA-binding proteins → target-specific cleavage
- Higher specificity than ZFNs

4️⃣ CRISPR-Cas9 System

- Guide RNA + Cas9 → DNA double-strand break at target site
- Repair by:
  - **NHEJ** → knockout
  - **HDR (homology-directed repair)** → knock-in / precise edit
- High efficiency, widely used in crop improvement

Applications of Gene Targeting in Plants

Application	Example
Disease resistance	Knockout susceptibility genes (e.g., MLO in wheat → powdery mildew resistance)
Herbicide resistance	Precise modification of EPSPS gene for glyphosate tolerance
Metabolic engineering	Carotenoid biosynthesis, vitamin enhancement (Golden Rice)
Functional genomics	Studying gene function by knockout / reporter insertion

---

🌾 2. Genetically Modified Crops (GM Crops)

Definition (परिभाषा)

GM crops वे पौधे हैं जिनमें **ek ya adhik foreign genes** (transgenes) को **genome में stable integrate** किया गया हो और
वे **desired trait expression** देते हों।

मुख्य उद्देश्य :

- Pest resistance
- Herbicide tolerance
- Abiotic stress tolerance
- Nutritional enhancement
- Industrial / pharmaceutical use

Techniques for Developing GM Crops

1. **Agrobacterium-mediated transformation** (dicots के लिए)
2. **Particle bombardment / Biolistic method** (monocots के लिए)
3. **Direct gene transfer** (PEG-mediated protoplast transformation)
4. **Chloroplast transformation** (high protein yield, maternal inheritance)
5. **Genome editing (CRISPR, TALENs, ZFNs)**

Common Traits in GM Crops

Trait	Gene / Mechanism	Crop Example
Insect resistance	Bt toxin gene (Cry proteins)	Cotton, Maize
Herbicide tolerance	EPSPS, bar gene	Soybean, Maize, Cotton
Virus resistance	RNAi / coat protein gene	Papaya, Squash
Nutritional enhancement	Beta-carotene (Golden Rice)	Rice
Abiotic stress tolerance	DREB / salt-tolerance genes	Wheat, Rice

---

Advantages of GM Crops

✔ Pest and disease resistance → pesticide use कम
✔ Herbicide tolerance → weed management आसान
✔ Abiotic stress tolerance → drought/salt resilience
✔ Nutritional enhancement → biofortification
✔ High yield → food security improvement
✔ Pharmaceutical production → edible vaccines, enzymes

Limitations / Concerns

✕Biosafety and allergenicity concerns
✕Gene flow to wild relatives → environmental risk
✕Resistance development in pests
✕Public acceptance and ethical issues
✕Regulatory hurdles

Characterization of GM Crops

1. **Molecular confirmation:** PCR, Southern blot, sequencing
2. **Expression analysis:** RT-PCR, qRT-PCR
3. **Protein detection:** Western blot, ELISA
4. **Trait analysis:** Phenotypic assays (Bt toxin, herbicide spray, yield)
5. **Stability & inheritance:** Segregation analysis, multi-generation testing

---

□ Gene Targeting + GM Crops (Connection)

Feature	Gene Targeting	Conventional GM
Integration	Site-specific	Random
Precision	High	Low
Marker gene requirement	Optional	Usually required
Off-target effects	Minimal (CRISPR optimized)	Possible
Trait stacking	Easy	Complex

Feature	Gene Targeting	Conventional GM
Regulatory advantage	Higher	Moderate

UNIT 3

जीन संपादन (Gene Editing)

परिभाषा

जीन संपादन (Gene Editing) वह आधुनिक जैव-प्रौद्योगिकी तकनीक है, जिसके द्वारा किसी जीव के **DNA के विशिष्ट भाग में सटीक परिवर्तन** किया जाता है। इसमें जीन को **काटना, जोड़ना, हटाना या बदलना** शामिल है, जिससे इच्छित गुण प्राप्त किए जा सकते हैं।

जीन संपादन का इतिहास

- पहले **ZFN (Zinc Finger Nucleases)** और **TALENs** तकनीकों का उपयोग हुआ
- वर्तमान में **CRISPR–Cas9** सबसे प्रभावी, सस्ती और सरल तकनीक है
- CRISPR तकनीक को 2020 में **नोबेल पुरस्कार** मिला

जीन संपादन की प्रमुख तकनीकें

1. Zinc Finger Nucleases (ZFN)

- DNA से जुड़ने वाले प्रोटीन + न्यूक्लिएज़ एंज़ाइम
- लक्ष्य जीन पर कट लगाते हैं
- जटिल, महंगी और कम प्रभावी

---

2. TALENs

- विशिष्ट DNA अनुक्रम को पहचानते हैं

- ZFN से अधिक सटीक
- फिर भी प्रयोग में कठिन

---

3. CRISPR–Cas9 (सबसे महत्वपूर्ण)

CRISPR का पूर्ण रूप

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

मुख्य घटक

1. **Guide RNA (gRNA)** – लक्ष्य DNA को पहचानता है
2. **Cas9 एंज़ाइम** – DNA को काटता है

CRISPR–Cas9 की कार्यप्रणाली (Mechanism)

1. gRNA लक्ष्य DNA अनुक्रम को पहचानता है
2. Cas9 एंज़ाइम उस स्थान पर **डबल स्ट्रैंड ब्रेक** करता है
3. कोशिका की मरम्मत प्रणाली सक्रिय होती है:
    - **NHEJ (Non-Homologous End Joining)** → जीन निष्क्रिय
    - **HDR (Homology Directed Repair)** → नया जीन जोड़ा जाता है

जीन संपादन के प्रकार

1. Somatic Gene Editing

- शरीर की कोशिकाओं में
- अगली पीढ़ी में नहीं जाता
- नैतिक रूप से स्वीकार्य

2. Germline Gene Editing

- अंडाणु/शुक्राणु में
- पीढ़ी दर पीढ़ी परिवर्तन
- अत्यंत विवादास्पद

जीन संपादन के उपयोग (Applications)

1. चिकित्सा क्षेत्र में

- आनुवंशिक रोगों का उपचार
    - सिकल सेल एनीमिया
    - थैलेसीमिया
    - कैंसर उपचार
- जीन थेरेपी

---

2. कृषि क्षेत्र में

- रोग-प्रतिरोधी फसलें
- अधिक उत्पादन
- सूखा व कीट प्रतिरोध

---

3. पशुपालन

- बेहतर नस्ल
- अधिक दूध/मांस उत्पादन

---

4. अनुसंधान में

- जीन फ़ंक्शन का अध्ययन
- मॉडल ऑर्गेनिज़्म निर्माण

जीन संपादन के लाभ

- अत्यधिक **सटीक और तेज़**
- कम लागत
- कम समय में परिणाम

- बहु-क्षेत्रीय उपयोग

जीन ट्रांसफर (Gene Transfer): भौतिक तकनीकें (Physical Techniques)

परिचय

जीन ट्रांसफर वह प्रक्रिया है जिसमें **विदेशी DNA को किसी लक्ष्य कोशिका में प्रविष्ट कराया जाता है**, ताकि उसमें वांछित आनुवंशिक गुण उत्पन्न किए जा सकें।
जीन ट्रांसफर की विभिन्न विधियाँ हैं:

- **भौतिक तकनीकें**
- रासायनिक तकनीकें
- जैविक (वेक्टर आधारित) तकनीकें

इस उत्तर में **भौतिक तकनीकों** का विस्तृत वर्णन किया गया है।

भौतिक तकनीकों की परिभाषा

भौतिक तकनीकें वे विधियाँ हैं जिनमें **भौतिक बल, ऊर्जा या उपकरणों** की सहायता से DNA को सीधे कोशिका के अंदर पहुँचाया जाता है।

भौतिक तकनीकों के प्रकार

1. माइक्रोइंजेक्शन (Microinjection)

सिद्धांत

सूक्ष्म सुई (micropipette) की सहायता से DNA को **सीधे कोशिका या नाभिक में इंजेक्ट** किया जाता है।

प्रक्रिया

1. कोशिका को माइक्रोस्कोप के नीचे स्थिर किया जाता है

2. DNA से भरी माइक्रोपिपेट कोशिका में प्रविष्ट कराई जाती है
3. DNA सीधे नाभिक में डाला जाता है

उपयोग

- पशु कोशिकाएँ
- ट्रांसजेनिक जानवर निर्माण

लाभ

- अत्यधिक सटीक
- DNA की सही डिलीवरी

हानियाँ

- महंगी तकनीक
- कुशल तकनीशियन की आवश्यकता
- बड़ी संख्या में कोशिकाओं हेतु अनुपयुक्त

---

2. इलेक्ट्रोपोरेशन (Electroporation)

सिद्धांत

उच्च वोल्टेज की **अल्पकालिक विद्युत पल्स** से कोशिका झिल्ली में अस्थायी छिद्र बनते हैं, जिनसे DNA अंदर प्रवेश करता है।

प्रक्रिया

1. कोशिकाओं को DNA के साथ घोल में रखा जाता है
2. विद्युत पल्स दिया जाता है
3. DNA कोशिका में प्रवेश कर जाता है

उपयोग

- बैक्टीरिया
- पौधों और पशु कोशिकाएँ

लाभ

- सरल और तेज़

- बड़े पैमाने पर उपयोगी

हानियाँ

- कोशिका मृत्यु की संभावना
- उपकरण महंगे

---

3. बायोलिस्टिक विधि / जीन गन (Biolistics / Gene Gun)

सिद्धांत

DNA से लेपित **सोने या टंगस्टन कणों** को उच्च वेग से कोशिका में दागा जाता है।

प्रक्रिया

1. DNA को सूक्ष्म धातु कणों पर चिपकाया जाता है
2. उच्च दबाव से कोशिकाओं पर दागा जाता है
3. DNA कोशिका में पहुँच जाता है

उपयोग

- पौधों की कोशिकाएँ
- मोटी कोशिका भित्ति वाले जीव

लाभ

- पौधों में अत्यंत प्रभावी
- वेक्टर की आवश्यकता नहीं

हानियाँ

- कोशिका क्षति
- उपकरण महंगा

---

4. लिपोफेक्शन (Lipofection)

(अर्ध-भौतिक तकनीक)

सिद्धांत

DNA को **लिपिड बबल्स (liposomes)** में बंद कर कोशिका में पहुँचाया जाता है।

उपयोग

- पशु कोशिकाएँ
- जीन थेरेपी

सीमा

- कुछ कोशिकाओं में कम प्रभावी

---

5. सोनिकेशन (Sonication)

सिद्धांत

अल्ट्रासोनिक तरंगें कोशिका झिल्ली में अस्थायी छिद्र बनाती हैं।

उपयोग

- प्रयोगशाला अनुसंधान

सीमाएँ

- कोशिका क्षति की संभावना

भौतिक तकनीकों के लाभ

- वेक्टर मुक्त जीन ट्रांसफर
- त्वरित परिणाम
- विभिन्न प्रकार की कोशिकाओं में उपयोग

भौतिक तकनीकों की सीमाएँ

- उपकरण महंगे

- कोशिका क्षति
- सीमित दक्षता

जीन ट्रांसफर (Gene Transfer): रासायनिक तकनीकें (Chemical Techniques)

परिचय

जीन ट्रांसफर वह प्रक्रिया है जिसमें **विदेशी DNA को लक्ष्य कोशिका में प्रविष्ट कराया जाता है**, ताकि कोशिका में वांछित आनुवंशिक गुण उत्पन्न किए जा सकें।
जीन ट्रांसफर की प्रमुख विधियाँ हैं:

- भौतिक तकनीकें
- **रासायनिक तकनीकें**
- जैविक (वेक्टर आधारित) तकनीकें

इस उत्तर में **रासायनिक तकनीकों** का विस्तृत विवरण दिया गया है।

रासायनिक तकनीकों की परिभाषा

रासायनिक तकनीकें वे विधियाँ हैं जिनमें **विशिष्ट रासायनिक पदार्थों** की सहायता से कोशिका झिल्ली की पारगम्यता बढ़ाकर DNA को कोशिका के अंदर प्रवेश कराया जाता है।

रासायनिक जीन ट्रांसफर की प्रमुख तकनीकें

---

1. कैल्शियम फॉस्फेट विधि (Calcium Phosphate Method)

सिद्धांत

DNA को **कैल्शियम फॉस्फेट के अवक्षेप (precipitate)** के रूप में कोशिका सतह पर चिपकाया जाता है, जिसे कोशिका **एंडोसाइटोसिस** द्वारा अंदर ले लेती है।

प्रक्रिया

1. DNA को $CaCl_2$ के साथ मिलाया जाता है
2. फॉस्फेट बफर मिलाकर अवक्षेप बनाया जाता है
3. यह अवक्षेप कोशिकाओं पर डाला जाता है
4. DNA कोशिका के अंदर प्रवेश करता है

उपयोग

- पशु कोशिकाएँ
- जीन अभिव्यक्ति अध्ययन

लाभ

- सरल और सस्ती
- बड़े पैमाने पर उपयोगी

हानियाँ

- कम दक्षता
- कोशिका प्रकार पर निर्भर

---

2. लिपोफेक्शन (Lipofection)

सिद्धांत

DNA को **लिपिड-आधारित वाहकों (liposomes)** में बंद कर कोशिका झिल्ली से फ्यूजन के माध्यम से अंदर पहुँचाया जाता है।

प्रक्रिया

1. DNA को लिपिड अभिकर्मकों से मिलाया जाता है
2. DNA–लिपिड कॉम्प्लेक्स बनता है
3. यह कोशिका झिल्ली से जुड़कर अंदर प्रवेश करता है

उपयोग

- पशु कोशिकाएँ
- जीन थेरेपी
- ट्रांसफेक्शन प्रयोग

लाभ

- उच्च दक्षता
- कम कोशिका क्षति

हानियाँ

- महंगे रसायन
- कुछ कोशिकाओं में अप्रभावी

---

3. PEG विधि (Polyethylene Glycol Method)

सिद्धांत

PEG कोशिका झिल्ली को अस्थायी रूप से अस्थिर कर DNA के प्रवेश को आसान बनाता है।

प्रक्रिया

1. कोशिकाओं को DNA और PEG के साथ मिलाया जाता है
2. झिल्ली की पारगम्यता बढ़ जाती है
3. DNA कोशिका में प्रवेश करता है

उपयोग

- पौधों की प्रोटोप्लास्ट
- कवक कोशिकाएँ

लाभ

- पौधों के लिए प्रभावी
- सरल तकनीक

हानियाँ

- कोशिका विषाक्तता

- सीमित कोशिका प्रकार

---

4. DEAE–Dextran विधि

सिद्धांत

DEAE–Dextran एक धनावेशित पॉलिमर है, जो ऋणावेशित DNA से जुड़कर कोशिका में प्रवेश को सरल बनाता है।

उपयोग

- पशु कोशिकाएँ
- अस्थायी जीन अभिव्यक्ति

लाभ

- सरल
- कम समय में परिणाम

हानियाँ

- अस्थायी अभिव्यक्ति
- विषाक्त प्रभाव

रासायनिक तकनीकों के लाभ

- कम लागत
- सरल प्रयोगशाला विधियाँ
- वेक्टर की आवश्यकता नहीं

रासायनिक तकनीकों की सीमाएँ

- कम ट्रांसफर दक्षता
- कोशिका विषाक्तता

- स्थायी जीन अभिव्यक्ति कठिन

भौतिक बनाम रासायनिक तकनीक (संक्षेप तुलना)

आधार	रासायनिक तकनीक	भौतिक तकनीक
लागत	कम	अधिक
उपकरण	सरल	जटिल
दक्षता	मध्यम	अधिक

जीन ट्रांसफर (Gene Transfer): जैविक तकनीकें (Biological Techniques)

परिचय

जीन ट्रांसफर वह प्रक्रिया है जिसमें **विदेशी DNA को लक्ष्य कोशिका में प्रविष्ट कराया जाता है**, जिससे उस कोशिका में नया या वांछित गुण उत्पन्न हो सके।
जैविक तकनीकों में जीन ट्रांसफर के लिए **प्राकृतिक जैविक वाहकों (vectors)** जैसे बैक्टीरिया, वायरस या प्लाज्मिड का उपयोग किया जाता है।

जैविक जीन ट्रांसफर की परिभाषा

जीन ट्रांसफर की वे विधियाँ जिनमें **जीवित जैविक वाहकों** की सहायता से DNA को कोशिका में पहुँचाया जाता है, **जैविक तकनीकें** कहलाती हैं।

जैविक जीन ट्रांसफर की प्रमुख तकनीकें

---

1. Agrobacterium-मध्यस्थ जीन ट्रांसफर

सिद्धांत

Agrobacterium tumefaciens एक मृदा बैक्टीरिया है, जो प्राकृतिक रूप से पौधों में **T-DNA** स्थानांतरित करता है और **Crown gall disease** उत्पन्न करता है।
इसी प्राकृतिक क्षमता का उपयोग करके वैज्ञानिक पौधों में इच्छित जीन प्रविष्ट कराते हैं।

वाहक (Vector)

- **Ti प्लाज्मिड (Tumor Inducing plasmid)**

कार्यविधि

1. इच्छित जीन को Ti प्लाज्मिड के T-DNA क्षेत्र में जोड़ा जाता है
2. संशोधित प्लाज्मिड को *Agrobacterium* में प्रविष्ट कराया जाता है
3. बैक्टीरिया पौधों की कोशिकाओं को संक्रमित करता है
4. T-DNA पौधे के जीनोम में समाहित हो जाता है
5. ट्रांसजेनिक पौधा प्राप्त होता है

उपयोग

- Bt कपास
- गोल्डन राइस
- रोग-प्रतिरोधी पौधे

लाभ

- अत्यधिक प्रभावी
- स्थायी जीन समावेशन
- प्राकृतिक विधि

सीमाएँ

- मुख्यतः द्विबीजपत्री पौधों तक सीमित
- जटिल प्रक्रिया

---

2. वायरस-मध्यस्थ जीन ट्रांसफर (Viral Vectors)

सिद्धांत

वायरस स्वाभाविक रूप से कोशिकाओं को संक्रमित कर अपना DNA/RNA अंदर पहुँचाते हैं। इन्हें संशोधित कर **जीन डिलीवरी वाहक** के रूप में प्रयोग किया जाता है।

प्रमुख वायरल वाहक

- रेट्रोवायरस
- एडेनोवायरस
- लेंटिवायरस
- एडेनो-असोसिएटेड वायरस (AAV)

कार्यविधि

1. वायरस के रोगजनक जीन हटाए जाते हैं
2. इच्छित जीन जोड़ा जाता है
3. संशोधित वायरस लक्ष्य कोशिका को संक्रमित करता है
4. जीन कोशिका में अभिव्यक्त होता है

उपयोग

- जीन थेरेपी
- कैंसर उपचार
- वैक्सीन विकास

लाभ

- अत्यधिक उच्च दक्षता
- लक्ष्य-विशिष्ट ट्रांसफर

सीमाएँ

- प्रतिरक्षा प्रतिक्रिया
- जैव-सुरक्षा जोखिम
- सीमित DNA क्षमता

---

3. प्लाज्मिड-मध्यस्थ जीन ट्रांसफर

सिद्धांत

प्लाज्मिड छोटे, वृत्ताकार DNA अणु होते हैं जो स्वतंत्र रूप से प्रतिकृति बनाते हैं और **जीन वाहक** के रूप में कार्य करते हैं।

कार्यविधि

1. इच्छित जीन को प्लाज्मिड में जोड़ा जाता है
2. पुनःसंयोजित प्लाज्मिड को बैक्टीरिया में प्रविष्ट कराया जाता है
3. जीन की प्रतिकृति और अभिव्यक्ति होती है

उपयोग

- इंसुलिन उत्पादन
- रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन निर्माण

लाभ

- सरल और स्थिर
- प्रयोगशाला में व्यापक उपयोग

सीमाएँ

- केवल कुछ जीवों तक सीमित

---

4. बैक्टीरियोफेज-मध्यस्थ जीन ट्रांसफर (Transduction)

सिद्धांत

बैक्टीरियोफेज एक बैक्टीरिया से दूसरे में DNA स्थानांतरित करते हैं।

प्रकार

1. सामान्य ट्रांसडक्शन
2. विशेष ट्रांसडक्शन

उपयोग

- बैक्टीरियल आनुवंशिकी
- जीन मैपिंग

सीमाएँ

- केवल बैक्टीरिया में सीमित

जैविक तकनीकों के लाभ

- उच्च दक्षता
- स्थायी जीन स्थानांतरण
- प्राकृतिक वाहकों का उपयोग

जैविक तकनीकों की सीमाएँ

- नैतिक और जैव-सुरक्षा समस्याएँ
- सीमित होस्ट रेंज
- वायरस से संबंधित जोखिम

संक्षिप्त तुलना

तकनीक	वाहक	लक्ष्य
Agrobacterium Ti	प्लाज्मिड	पौधे
वायरल	वायरस	पशु कोशिकाएँ
प्लाज्मिड	प्लाज्मिड	बैक्टीरिया
ट्रांसडक्शन	बैक्टीरियोफेज	बैक्टीरिया

जीन पृथक्करण (Gene Isolation)

परिचय

जीन पृथक्करण वह प्रक्रिया है जिसके द्वारा किसी जीव के **विशिष्ट जीन को अन्य DNA से अलग किया जाता है**, ताकि उसका अध्ययन, क्लोनिंग या अभिव्यक्ति किया जा सके।
यह आधुनिक **जीनोमिक और मोलेक्यूलर बायोलॉजी** की मूलभूत तकनीक है।

जीन पृथक्करण का उपयोग **जीन थेरेपी, ट्रांसजेनिक जीव, जैव प्रौद्योगिकी और आनुवंशिक अनुसंधान** में किया जाता है।

जीन पृथक्करण की परिभाषा

"Gene isolation is the process of extracting a specific gene from the total genomic DNA of an organism in a pure and intact form for further studies or manipulation."
हिंदी में: किसी जीव के कुल जीनोम से किसी विशिष्ट जीन को शुद्ध और पूर्ण रूप में अलग करना ही जीन पृथक्करण कहलाता है।

जीन पृथक्करण के उद्देश्य

1. किसी जीन के अनुक्रम का अध्ययन करना
2. जीन क्लोनिंग के लिए DNA तैयार करना
3. ट्रांसजेनिक जीव विकसित करना
4. जीन अभिव्यक्ति (protein expression)
5. आनुवंशिक रोगों के निदान और उपचार

जीन पृथक्करण की प्रमुख तकनीकें

1. DNA Extraction (DNA का निष्कर्षण)

सिद्धांत

कोशिका से कुल DNA (genomic DNA) निकालकर प्रयोग के लिए तैयार किया जाता है।

प्रक्रिया

1. कोशिकाओं को तोड़ना (Cell lysis) – Detergents या Enzymes के माध्यम से
2. प्रोटीन और अन्य अवशेष हटाना – Proteinase K, Phenol/Chloroform
3. DNA का पृथक्करण – Alcohol precipitation (Ethanol/Isopropanol)
4. शुद्ध DNA को भंडारण

---

2. Restriction Enzyme Digestion (प्रतिबंधक एंजाइम)

सिद्धांत

विशिष्ट **restriction endonucleases** DNA को **अच्छी तरह से नियंत्रित स्थानों पर काटते हैं**, जिससे इच्छित जीन का टुकड़ा अलग किया जा सके।

प्रक्रिया

1. चयनित restriction enzymes से DNA को काटा जाता है
2. विशिष्ट DNA अंश प्राप्त होता है

---

3. Gel Electrophoresis (जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस)

सिद्धांत

DNA अणु **आकार और चार्ज के आधार पर** जेल में अलग होते हैं।

प्रक्रिया

1. DNA को Agarose gel में रखा जाता है
2. विद्युत क्षेत्र लगाया जाता है
3. छोटे DNA टुकड़े तेजी से चलते हैं, बड़े धीमे
4. विशिष्ट DNA बैंड को UV के तहत पहचाना और काटा जाता है

---

4. DNA Purification (DNA शुद्धिकरण)

- जेल से DNA टुकड़े को निकाला जाता है
- शुद्ध DNA को Cloning या अन्य प्रयोगों के लिए तैयार किया जाता है

---

5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

सिद्धांत

PCR तकनीक किसी **विशिष्ट जीन को हजारों से लाखों बार अम्प्लीफाई** कर देती है।

प्रक्रिया

1. DNA टेम्पलेट
2. Primers (विशिष्ट जीन के लिए)
3. DNA Polymerase (Taq polymerase)
4. Thermal cycling – Denaturation, Annealing, Extension

उपयोग

- जीन की मात्रा बढ़ाने के लिए
- बाद में क्लोनिंग या अनुक्रमण

---

6. Cloning of Isolated Gene

- पृथक जीन को **वेक्टर (Plasmid/Phage)** में डाला जाता है
- होस्ट में प्रविष्ट किया जाता है
- जीन की अधिक मात्रा या प्रोटीन उत्पादन

जीन पृथक्करण के लाभ

1. विशिष्ट जीन का अध्ययन संभव
2. ट्रांसजेनिक और जीन थेरेपी में उपयोग
3. प्रोटीन उत्पादन (जैसे इंसुलिन)
4. आनुवंशिक रोगों के निदान और अनुसंधान

जीन पृथक्करण की सीमाएँ

1. उच्च कौशल और प्रयोगशाला संसाधन आवश्यक
2. DNA क्षति या अशुद्धि की संभावना
3. जटिल और समय-साध्य प्रक्रिया

जीन साइलेंसिंग (Gene Silencing)

परिचय

जीन साइलेंसिंग वह जैविक प्रक्रिया है जिसके द्वारा किसी जीव में **विशिष्ट जीन की अभिव्यक्ति (gene expression) को रोक दिया जाता है**, बिना कि DNA अनुक्रम में कोई स्थायी बदलाव हो।
यह **जीनोमिक नियमन** और **मोलेक्यूलर बायोलॉजी** में अत्यंत महत्वपूर्ण है और इसका उपयोग **जीन फंक्शन स्टडी, रोग चिकित्सा और कृषि सुधार** में किया जाता है।

अर्थात: जीन तो कोशिका में मौजूद रहता है, लेकिन उसका RNA या प्रोटीन उत्पादन बंद कर दिया जाता है।

जीन साइलेंसिंग के उद्देश्य

1. किसी जीन के कार्य का अध्ययन करना
2. रोगजनक जीन या आनुवंशिक दोषों को रोकना
3. फसल में रोग-प्रतिरोधी जीन विकसित करना
4. कैंसर और अन्य रोगों में जीन थेरेपी

जीन साइलेंसिंग के प्रकार

1. Transcriptional Gene Silencing (TGS)

सिद्धांत

- जीन की **RNA transcripts का निर्माण ही रोक दिया जाता है**
- आमतौर पर **DNA methylation** या **Histone modification** के माध्यम से

प्रक्रिया

1. DNA के प्रमोटर क्षेत्र में **मिथाइलेशन**
2. RNA polymerase का जीन पर बंधन कम हो जाता है
3. mRNA का उत्पादन बंद हो जाता है

उपयोग

- पौधों में वायरस प्रतिरोधी जीन
- जीन अभिव्यक्ति का नियंत्रण

---

2. Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) / RNA Interference (RNAi)

सिद्धांत

- जीन का **mRNA बनने के बाद ही उसका विनाश**
- आमतौर पर **small RNA molecules** (siRNA, miRNA) के माध्यम से

प्रमुख घटक

1. **dsRNA (Double-stranded RNA)** – लक्ष्य जीन का precursor
2. **Dicer enzyme** – dsRNA को छोटे टुकड़ों (siRNA) में काटता है
3. **RISC complex (RNA-induced silencing complex)** – mRNA को पहचान कर नष्ट करता है

प्रक्रिया

1. dsRNA → Dicer द्वारा छोटे siRNA में कटता है
2. siRNA RISC में जुड़ता है
3. RISC target mRNA को पहचानता है
4. mRNA कट जाता है और जीन अभिव्यक्ति रुक जाती है

उपयोग

- **कैंसर और वायरस जीन का उपचार**
- पौधों में रोग-प्रतिरोधी जीन निर्माण
- Functional genomics में जीन के कार्य का अध्ययन

जीन साइलेंसिंग के अन्य तरीके

1. **Antisense RNA** – mRNA के खिलाफ complementary RNA बनाकर उसका translation रोकना
2. **Ribozyme-mediated silencing** – RNA काटने वाले एंज़ाइम का उपयोग
3. **CRISPRi (CRISPR interference)** – dCas9 द्वारा जीन प्रमोटर पर बाधा डालकर transcription रोकना

जीन साइलेंसिंग के लाभ

1. किसी विशिष्ट जीन को **निशानदेही से रोकना**
2. रोग उपचार और जीन थेरपी में सहायक
3. ट्रांसजेनिक पौधों और जीवों के लिए उपयोगी
4. जीन फंक्शन स्टडी आसान

सीमाएँ

1. Off-target effects (अन्य जीन प्रभावित हो सकते हैं)
2. अस्थायी प्रभाव (कुछ तकनीकों में जीन फिर सक्रिय हो सकता है)
3. dsRNA या siRNA की स्थायित्व की समस्या
4. नैतिक और सुरक्षा चिंताएँ

जीन साइलेंसिंग और RNA Interference का महत्व

- RNAi को **2006 में नोबेल पुरस्कार** से सम्मानित किया गया
- यह **मोलेक्यूलर बायोलॉजी और जीनोमिक रिसर्च** की क्रांति है
- RNAi और जीन साइलेंसिंग का उपयोग **कैंसर, HIV, हर्पीज़, ट्यूमर और अन्य रोगों में** किया जा रहा है

रैंडम म्यूटैजेनिस (Random Mutagenesis)

परिचय

म्यूटैजेनिस (Mutagenesis) वह प्रक्रिया है जिसके द्वारा **DNA अनुक्रम में बदलाव (mutation) उत्पन्न किया जाता है।**
Random Mutagenesis में यह बदलाव **अनियंत्रित और यादृच्छिक (random) तरीके से** उत्पन्न होते हैं।

यह तकनीक **जीन कार्य का अध्ययन, प्रोटीन इंजीनियरिंग, और जीव विज्ञान अनुसंधान** में महत्वपूर्ण है।

उदाहरण: किसी एंज़ाइम की सक्रियता बढ़ाने के लिए या नई जैविक विशेषताओं वाले ट्रांसजेनिक पौधे विकसित करने के लिए।

रैंडम म्यूटैजेनिस की परिभाषा

“Random mutagenesis is the process of inducing mutations at random locations in the DNA sequence, without targeting any specific gene or nucleotide.”

हिंदी में: यादृच्छिक म्यूटैजेनिस वह प्रक्रिया है जिसमें DNA में बिना किसी विशेष लक्ष्य के यादृच्छिक रूप से उत्परिवर्तन (mutations) पैदा किए जाते हैं।

उद्देश्य

1. जीन के कार्य और प्रोटीन संरचना का अध्ययन करना
2. एंज़ाइम और प्रोटीन में नई विशेषताएँ उत्पन्न करना
3. जीवों में नए गुण (phenotype) विकसित करना
4. औद्योगिक और जैव प्रौद्योगिकी अनुप्रयोगों के लिए जीन सुधार

Random Mutagenesis के प्रकार / विधियाँ

1. रासायनिक म्यूटैजेनिस (Chemical Mutagenesis)

सिद्धांत

विशेष रासायनिक पदार्थ DNA में बदलाव उत्पन्न करते हैं।

प्रमुख रसायन

- **EMS (Ethyl methanesulfonate)** – गुआनिन को परिवर्तित कर देता है
- **Nitrosoguanidine (NTG)** – आधार परिवर्तन करता है
- **Hydroxylamine** – साइट-विशिष्ट परिवर्तन

प्रक्रिया

1. जीवाणु या कोशिकाओं को रसायन के संपर्क में लाया जाता है
2. DNA में यादृच्छिक उत्परिवर्तन उत्पन्न होता है
3. उत्परिवर्तित कोशिकाओं को चयनित किया जाता है

उपयोग

- एंज़ाइम विकास
- जीवाणु और पौधों में गुण परिवर्तन

---

2. भौतिक म्यूटैजेनिस (Physical Mutagenesis)

सिद्धांत

उच्च ऊर्जा किरणें DNA को क्षतिग्रस्त कर देती हैं, जिससे उत्परिवर्तन उत्पन्न होता है।

प्रमुख तरीके

- **UV विकिरण (Ultraviolet rays)** – थाइमिन डाइमर बनाता है
- **Gamma rays (γ-rays)** – डबल-स्ट्रैंड DNA ब्रेक उत्पन्न
- **X-rays** – बड़े पैमाने पर उत्परिवर्तन

उपयोग

- पौधों में नई किस्मों का विकास
- जीन कार्य अध्ययन

---

3. Biological Mutagenesis

सिद्धांत

कुछ जीवाणु और वायरस **प्राकृतिक रूप से उत्परिवर्तन** उत्पन्न करते हैं।

- DNA polymerase में एरर
- Transposons (जंपिंग जीन) की गतिविधि

उपयोग

- प्राकृतिक रूप से उत्परिवर्तित लाइब्रेरी तैयार करना

Random Mutagenesis की प्रक्रिया (संक्षेप में)

1. **स्रोत DNA या जीव का चयन**
2. **Mutagen का चयन और उपचार** (Chemical, Physical, Biological)
3. **उत्परिवर्तित कोशिकाओं का कल्चर / वृद्धि**
4. **Mutant screening / selection** – लाभकारी या वांछित phenotype का चयन
5. **अधिकृत अध्ययन या क्लोनिंग**

लाभ

1. सरल और तेज़
2. नई विशेषताओं वाले प्रोटीन और जीन विकसित करने में उपयोगी
3. बड़े पैमाने पर library तैयार करना संभव

सीमाएँ

1. उत्परिवर्तन यादृच्छिक होते हैं – वांछित जीन पर नियंत्रण नहीं
2. असफल mutations या हानिकारक mutations हो सकते हैं
3. Screening बहुत समय-साध्य और श्रमसाध्य
4. Safety और ethical concerns (high energy radiation या chemicals)

Random Mutagenesis का महत्व

- औद्योगिक एंज़ाइमों का विकास (जैसे अमाइलेज़, प्रोटीज़)
- पौधों में रोग-प्रतिरोधी या उच्च उपज वाली किस्में
- Functional genomics में जीन कार्य का अध्ययन
- Protein engineering और Drug discovery

साइट-निर्देशित म्यूटैजेनिस (Site-Directed Mutagenesis)

परिचय

Site-Directed Mutagenesis (SDM) वह तकनीक है जिसके द्वारा DNA अनुक्रम में **विशिष्ट स्थान पर जानबूझकर परिवर्तन (mutation) किया जाता है।**
यह **Random Mutagenesis** के विपरीत है, जिसमें उत्परिवर्तन यादृच्छिक होते हैं।

उद्देश्य:

- किसी विशिष्ट जीन या प्रोटीन की संरचना और कार्य को समझना

- एंज़ाइम के सक्रिय स्थल या प्रोटीन स्थिरता में सुधार
- जीन थेरेपी और औद्योगिक अनुप्रयोग

परिभाषा

"Site-directed mutagenesis is a molecular biology method used to make specific and intentional changes in the DNA sequence of a gene at a defined site."

हिंदी में: किसी जीन के DNA अनुक्रम में **पूर्वनिर्धारित स्थान पर जानबूझकर उत्परिवर्तन** करना ही साइट-निर्देशित म्यूटैजेनिस कहलाता है।

उद्देश्य / Applications

1. प्रोटीन संरचना और कार्य का अध्ययन
2. एंज़ाइम की सक्रियता और स्थिरता बढ़ाना
3. जीन की regulation और promoter region की जांच
4. Recombinant DNA technology में प्रयोग
5. औद्योगिक एंज़ाइम, दवा और जैव प्रौद्योगिकी अनुप्रयोग

साइट-निर्देशित म्यूटैजेनिस की प्रक्रिया

1. Mutagenic Primer Design (Mutant Primers बनाना)

- DNA अनुक्रम का विशिष्ट क्षेत्र चुना जाता है
- Mutation को encode करने वाला **oligonucleotide primer** डिज़ाइन किया जाता है
- Primer में बदलने वाला बेस या अनुक्रम जोड़ा जाता है

2. PCR या DNA Synthesis

- Mutagenic primers का उपयोग करके DNA अनुक्रम को amplify किया जाता है
- आमतौर पर **PCR-based SDM** विधि प्रयुक्त होती है

3. Template DNA की नष्टि (Digestion)

- Parent (मूल) DNA को **DpnI enzyme** द्वारा नष्ट किया जाता है

- केवल newly synthesized mutated DNA बचता है

4. Transformation

- Mutated DNA को होस्ट कोशिकाओं (जैसे *E. coli*) में प्रविष्ट कराया जाता है
- कोशिकाएँ mutated plasmid को ग्रहण करती हैं

5. Screening / Selection

- Mutated clones का चयन
- DNA sequencing द्वारा mutation की पुष्टि

मुख्य तकनीकें / विधियाँ

1. **PCR-Based Site-Directed Mutagenesis**
    - सबसे सामान्य और उच्च दक्षता वाली विधि
    - Short mutagenic primers के द्वारा desired mutation
2. **Oligonucleotide-Directed Mutagenesis**
    - Synthetic oligonucleotides द्वारा DNA में बदलाव
    - छोटी plasmids और जीनों के लिए उपयोगी
3. **In vitro Mutagenesis**
    - DNA polymerase और primers का उपयोग
    - Single base-pair या कई bases में mutation

साइट-निर्देशित म्यूटैजेनिस के लाभ

1. Mutation **पूर्वनिर्धारित और सटीक**
2. किसी विशिष्ट जीन / प्रोटीन फ़ंक्शन का अध्ययन संभव
3. Recombinant DNA और प्रोटीन इंजीनियरिंग में उपयोगी
4. औद्योगिक और चिकित्सा अनुप्रयोगों में सुरक्षित

सीमाएँ / Limitations

1. Complex और labor-intensive प्रक्रिया
2. Primers और enzymes महंगे

3. Screening और validation समय-साध्य
4. केवल छोटे DNA fragments या plasmids पर सरल

साइट-निर्देशित म्यूटैजेनिस का महत्व

- Functional genomics में जीन कार्य अध्ययन
- Protein engineering (enzyme specificity, stability)
- Gene therapy और recombinant protein production
- Structure-function relationship की समझ

Random vs Site-Directed Mutagenesis (संक्षेप तुलना)

आधार	Random Mutagenesis	Site-Directed Mutagenesis
स्थान	यादृच्छिक	पूर्वनिर्धारित
नियंत्रण	कम	उच्च
उद्देश्य	नए गुण खोजने के लिए	विशिष्ट गुण/जीन अध्ययन के लिए
Screening	समय-साध्य	कम समय में चयन संभव
अनुप्रयोग	Broad applications	Precision studies

राइबोज़ाइम्स (Ribozymes) की RNA संरचना

परिचय

Ribozymes विशेष प्रकार के **RNA अणु** हैं जो **कैंटालिटिक (catalytic) गतिविधि** रखते हैं।
यानी, ये RNA **स्वयं को या अन्य RNA को कटने, जोड़ने या संशोधित करने की क्षमता रखते हैं**, बिना किसी प्रोटीन एंज़ाइम की आवश्यकता के।

अर्थात: Ribozymes RNA-based catalysts हैं।
इनकी खोज **Thomas Cech और Sidney Altman** ने की थी, जिसके लिए उन्हें **1989 में नोबेल पुरस्कार** मिला।

Ribozymes की महत्वता

1. RNA world hypothesis के अनुसार जीवन की प्रारंभिक जैविक प्रतिक्रियाओं में सहायक
2. RNA splicing और processing में योगदान
3. Gene regulation और antiviral therapeutics में उपयोग
4. Molecular biology और synthetic biology में अनुसंधान

Ribozymes की संरचना (RNA Structure)

Ribozymes की संरचना **RNA की प्राथमिक, द्वितीयक और तृतीयक संरचना पर आधारित होती है।**

---

1. प्राथमिक संरचना (Primary Structure)

- **Nucleotide sequence** (A, U, G, C)
- RNA की लंबाई और अनुक्रम catalytic activity के लिए महत्वपूर्ण
- विशेष nucleotide motifs जैसे **GAAA tetraloop** catalytic sites में भूमिका निभाते हैं

---

2. द्वितीयक संरचना (Secondary Structure)

Ribozymes में RNA अक्सर **self-complementary regions** बनाता है, जिससे **stems (हेयरपिन loops), bulges और internal loops** बनते हैं।

- **Stem-loops (Hairpins):** Helical regions + loops
- **Bulges/Internal loops:** Catalytic sites की flexibility प्रदान करते हैं
- **Pseudoknots:** Base pairing के कारण complex folding

उदाहरण:

- **Hammerhead ribozyme:** तीन stem-loop संरचनाएँ + central catalytic core
- **Hairpin ribozyme:** दो stem-loops + flexible loops

---

3. तृतीयक संरचना (Tertiary Structure)

- RNA की **folding और 3D structure** catalytic activity निर्धारित करती है
- Stem-loops और bulges एक दूसरे के साथ **tertiary interactions** करते हैं
- **Metal ions (Mg^{2+})** stabilize tertiary folding
- Catalytic core में **active site**: scissile phosphate cleavage

मुख्य विशेषताएँ:

1. Catalytic core: Substrate RNA binding और cleavage
2. Recognition loops: Target RNA को पहचानना
3. Tertiary interactions: Folding stability

मुख्य प्रकार के Ribozymes और संरचना

Ribozymes प्रकार	संरचना विशेषताएँ	कार्य
Hammerhead	Three stem-loops, central catalytic core	Site-specific RNA cleavage
Hairpin	Two stem-loops, flexible loops	RNA splicing
Group I introns	Complex tertiary structure, pseudoknots	Self-splicing
Group II introns	Six domain structure, magnesium-dependent	Self-splicing & ligation
RNase P	RNA + protein, tRNA processing	tRNA 5’ end cleavage

Ribozymes में संरचना और कार्य का संबंध

1. **Primary structure** – Nucleotide sequence catalytic motif
2. **Secondary structure** – Stem-loop folding substrate recognition
3. **Tertiary structure** – Active site formation, proper folding, catalysis
4. **Metal ions** – Mg^{2+} stabilize folding and participate in catalysis

---

Ribozymes की गतिविधि

- **Cis-cleavage:** अपने ही RNA molecule को काटना
- **Trans-cleavage:** अन्य RNA molecule को काटना
- **Self-splicing:** Introns को हटाना और exons को जोड़ना
- **Ligase activity:** RNA fragments को जोड़ना

जीन संपादन का नियमन (Regulation of Gene Editing)

परिचय

Gene Editing वह तकनीक है जिसके द्वारा किसी जीव के DNA में **विशिष्ट बदलाव (modification, insertion, deletion या replacement)** किए जाते हैं।
इसमें **CRISPR-Cas9, TALENs, ZFNs** जैसी आधुनिक तकनीकों का उपयोग किया जाता है।

Regulation of Gene Editing का मतलब है – **इन तकनीकों द्वारा जीन में बदलाव को नियंत्रित करना**, ताकि जीन परिवर्तन **सटीक, सुरक्षित और वांछित उद्देश्य के अनुसार** हो।

जीन संपादन का नियमन आवश्यक है क्योंकि अनियंत्रित संपादन **अनावश्यक mutations, off-target effects और नैतिक समस्याएँ** पैदा कर सकता है।

जीन संपादन के उद्देश्य

1. Genetic diseases का इलाज (जीन थेरेपी)
2. Crop improvement और disease resistance
3. Protein engineering और functional genomics
4. Research में gene function का अध्ययन

Gene Editing Regulation के स्तर

1. Sequence-specific targeting (लक्ष्य DNA चयन)

- Editing केवल **target gene या locus** पर हो
- CRISPR-Cas9 में **sgRNA (single guide RNA)** द्वारा specific DNA region चुना जाता है
- TALENs और ZFNs में DNA-binding domains का उपयोग

महत्व: Off-target mutations कम करना

---

2. Temporal Regulation (समय का नियमन)

- Editing केवल **निर्धारित समय पर सक्रिय** हो
- Inducible promoters (e.g., Tet-On/Tet-Off system) का उपयोग
- RNA-guided nucleases को controlled expression

उद्देश्य: विकास या कोशिका चक्र के विशिष्ट चरण में editing

---

3. Spatial Regulation (स्थानिक नियमन)

- Editing केवल **निर्दिष्ट tissue या cell type** में हो
- Tissue-specific promoters का उपयोग
- In vivo applications में targeted delivery

उदाहरण: Liver-specific CRISPR-mediated gene therapy

---

4. Dosage/Expression Control (उत्पाद या Cas9 की मात्रा नियंत्रित करना)

- Editing protein (Cas9) की मात्रा नियंत्रित
- Overexpression से off-target effects बढ़ सकते हैं
- RNA delivery, protein delivery या transient expression उपयोग

---

5. Repair Pathway Regulation

- DNA cleavage के बाद **cellular repair pathways** को नियंत्रित करना आवश्यक
- **Non-homologous end joining (NHEJ)** – Indels उत्पन्न करता है
- **Homology-directed repair (HDR)** – precise editing
- HDR को बढ़ावा देना या NHEJ को कम करना

---

6. Off-target Effect Minimization

- sgRNA specificity बढ़ाना
- High-fidelity Cas9 variants (e.g., eSpCas9, HiFi Cas9)
- Computational prediction और screening

मॉलिक्यूलर और जैविक Regulation

1. **Promoter engineering** – tissue- or time-specific Cas9 expression
2. **Inducible systems** – small molecules (doxycycline) द्वारा control
3. **Ribonucleoprotein (RNP) delivery** – transient Cas9 activity
4. **Antisense oligonucleotides / inhibitors** – unwanted activity रोकना

नैतिक और कानूनी Regulation

- Human germline editing पर वैश्विक प्रतिबंध
- Animal और plant research में biosafety guidelines
- CRISPR-Cas9 का इस्तेमाल clinical trials में नियमन
- NIH, FDA, और WHO द्वारा gene editing की oversight

जीन संपादन उपकरण (Gene Editing Tools)

परिचय

Gene Editing Tools वे molecular उपकरण और तकनीकें हैं जिनके द्वारा **DNA अनुक्रम में विशिष्ट परिवर्तन (modification, insertion, deletion या replacement)** किया जाता है।
ये तकनीकें **precise, efficient और targeted genome manipulation** में उपयोग होती हैं।

मुख्य Gene Editing Tools

1. CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

परिचय

- सबसे आधुनिक और लोकप्रिय gene editing tool
- Bacterial immune system पर आधारित
- Cas9 protein एक **nuclease** है जो DNA को cleave करता है

सिद्धांत

1. **sgRNA (single guide RNA)** DNA के target sequence को पहचानता है

2. Cas9 nuclease double-strand break (DSB) करता है
3. Cellular repair pathways – NHEJ या HDR द्वारा genome edit होता है

विशेषताएँ

- High specificity
- Easy design of sgRNA
- Multiplexing (एक साथ कई genes edit करना)

उपयोग

- Gene knock-out / knock-in
- Disease modeling
- Gene therapy
- Crop improvement

---

2. TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

परिचय

- Plant pathogenic bacteria (Xanthomonas) के DNA-binding proteins पर आधारित
- DNA binding domain + FokI nuclease

सिद्धांत

1. TAL effector proteins DNA के specific sequence को पहचानते हैं
2. FokI nuclease DNA को cut करता है
3. Repair pathways से genome modification

विशेषताएँ

- Sequence-specific targeting
- Cas9 की तरह guide RNA नहीं चाहिए
- Off-target effects कम

उपयोग

- Precise genome editing
- Crop improvement
- Functional genomics

---

3. ZFNs (Zinc Finger Nucleases)

परिचय

- Zinc finger DNA-binding domain + FokI nuclease
- हर zinc finger 3 bp DNA sequence पहचानता है

सिद्धांत

1. Zinc finger proteins DNA के target site को bind करते हैं
2. FokI nuclease DNA cleavage करता है
3. Repair pathway से mutation या insertion होती है

विशेषताएँ

- High specificity
- Expensive and design complex

उपयोग

- Gene knock-out / knock-in
- Functional genomics
- Therapeutic applications

---

4. Meganucleases (Homing Endonucleases)

परिचय

- Sequence-specific endonucleases
- Long recognition sequences (12–40 bp)

विशेषताएँ

- High specificity
- Rare-cutting enzymes

उपयोग

- Targeted gene disruption
- Genome editing in microorganisms

---

5. Base Editors

परिचय

- Cas9 nickase + deaminase enzyme
- DNA की **specific base को बदलता है** बिना double-strand break के

उपयोग

- Point mutations
- Genetic disease correction

---

6. Prime Editing

परिचय

- Cas9 nickase + reverse transcriptase
- Precise insertion, deletion, base substitution

विशेषताएँ

- Less off-target
- HDR की आवश्यकता नहीं

उपयोग

- Precise gene correction
- Therapeutic genome editing

Gene Editing Tool Comparison (संक्षिप्त तालिका)

Tool	DNA Recognition	Cleavage	Precision	Key Feature
CRISPR-Cas9	sgRNA	Cas9 nuclease	High	Easy design, multiplexing
TALENs	Protein-DNA	FokI	High	No guide RNA, less off-target
ZFNs	Protein-DNA	FokI	High	Expensive, complex design
Meganucleases	Protein-DNA	Endonuclease	Very high	Rare-cutting

Tool	DNA Recognition	Cleavage	Precision	Key Feature
Base Editors	sgRNA	Cas9 nickase + deaminase	High	Single base changes
Prime Editors	sgRNA	Cas9 nickase + RT	Very high	Precise edits, versatile

CRISPR-Cas System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Cas)

परिचय

CRISPR-Cas system एक **मूलतः बैक्टीरिया और आर्किया में पाए जाने वाला adaptive immune system** है, जो वायरस या प्लास्मिड DNA से सुरक्षा प्रदान करता है।
इसका उपयोग **modern gene editing, genome engineering और functional genomics** में किया जाता है।

साधारण शब्दों में: CRISPR-Cas एक RNA-guided DNA cleavage system है, जो **targeted genome modification** के लिए उपयोग किया जाता है।

CRISPR-Cas का Discovery

- 1987: Japanese researchers ने E. coli में CRISPR sequences पाए
- 2005: यह समझा गया कि यह bacterial immunity system है
- 2012: **Jennifer Doudna और Emmanuelle Charpentier** ने Cas9-mediated targeted DNA cleavage दिखाया
- 2020: इसके लिए नोबेल पुरस्कार

CRISPR-Cas System की संरचना और Components

1. CRISPR Locus

- **Repeats**: छोटे palindromic sequences

- **Spacers**: पिछली viral infections से derived sequences
- यह locus RNA transcript बनाता है जिसे **crRNA** में process किया जाता है

2. Cas Proteins

- Cas9 (Class 2) सबसे common
- Nuclease activity: DNA cleavage
- Domains:
  - RuvC – nontarget strand cleavage
  - HNH – target strand cleavage

3. Guide RNA (gRNA / sgRNA)

- Single guide RNA = crRNA + tracrRNA fusion
- DNA target को recognize कर Cas9 को direct करता है

4. PAM Sequence (Protospacer Adjacent Motif)

- Short DNA sequence (5'-NGG-3') adjacent to target
- Cas9 केवल PAM के presence में target को cleave करता है

CRISPR-Cas9 की कार्यप्रणाली (Mechanism)

1. **Target Recognition**
   - sgRNA target DNA sequence को base-pairing द्वारा पहचानता है
2. **DNA Binding**
   - Cas9-sgRNA complex target DNA को bind करता है
3. **Cleavage**
   - Cas9 nuclease double-strand break (DSB) करता है
   - HNH domain: target strand cleavage
   - RuvC domain: nontarget strand cleavage
4. **DNA Repair**
   - **Non-homologous end joining (NHEJ)** → insertions/deletions (gene knock-out)
   - **Homology-directed repair (HDR)** → precise insertion/repair (gene knock-in)

CRISPR-Cas9 की विशेषताएँ

1. **High specificity** – sgRNA द्वारा target DNA select
2. **Efficiency** – कई genes एक साथ edit करना संभव (multiplexing)

3. **Simplicity** – sgRNA design आसान
4. **Versatility** – Knock-out, Knock-in, Base editing, Epigenetic modulation
5. **Cost-effective** – TALENs/ZFNs की तुलना में सस्ता

Applications of CRISPR-Cas9

1. **Gene Knock-out / Knock-in**
   - किसी gene का function study करना
2. **Gene Therapy**
   - Genetic diseases (Sickle cell anemia, β-thalassemia) treatment
3. **Functional Genomics**
   - Gene regulation और interactions study करना
4. **Agricultural Biotechnology**
   - Disease-resistant, high-yield crops
5. **Base Editing / Prime Editing**
   - Point mutation correction बिना double-strand break

CRISPR-Cas9 के लाभ

- Targeted और precise
- High efficiency, low cost
- Multiplex genome editing
- Rapid development of genetically modified organisms

सीमाएँ और Challenges

1. **Off-target effects** – unintended DNA cleavage
2. **PAM dependency** – target site selection restricted
3. **Delivery challenges** – in vivo delivery in humans
4. **Ethical concerns** – germline editing, human embryos

CRISPR-Cas vs Traditional Gene Editing Tools

Tool	DNA Recognition	Cleavage	Ease	Cost	Notes

Tool	DNA Recognition	Cleavage	Ease	Cost	Notes
CRISPR-Cas9	sgRNA (RNA-DNA)	Cas9 nuclease	Easy	Low	Multiplexing, precise
TALENs	Protein-DNA	FokI	Moderate	High	High specificity
ZFNs	Protein-DNA	FokI	Difficult	Very High	Expensive design

TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

परिचय

TALENs एक आधुनिक **gene editing tool** है, जो DNA को **site-specific cleavage** के लिए उपयोग किया जाता है।
यह **plant pathogenic bacteria Xanthomonas** के transcription activator-like (TAL) proteins पर आधारित है।

साधारण शब्दों में: TALENs DNA को precisely edit करने के लिए **protein-based recognition और nuclease cleavage** का combination है।

TALENs की संरचना (Structure)

TALENs दो मुख्य भागों से बने होते हैं:

1. **DNA-Binding Domain (TAL effector proteins)**
    - Bacterial TAL proteins DNA के **specific sequence** को पहचानते हैं
    - 33–35 amino acid repeat units
    - प्रत्येक repeat unit **एक nucleotide** से जुड़ा होता है
    - Repeat variable di-residues (RVDs) nucleotide specificity तय करते हैं
2. **FokI Nuclease Domain**
    - Non-specific nuclease
    - DNA cleavage करता है
    - Active cleavage के लिए **dimerization** जरूरी (दो TALEN molecules)

Overall:

- Left TALEN + Right TALEN → FokI domains dimerize → DNA double-strand break (DSB)

TALENs का कार्यप्रणाली (Mechanism)

1. **Target DNA Sequence चयन**
   - Desired locus पर DNA sequence identify
   - Two TALENs design: Left and Right arms flanking target
2. **DNA Binding**
   - TAL effector repeats specific nucleotides से base pairing के बिना bind होते हैं
3. **FokI Dimerization**
   - Left और Right TALENs का FokI domain एक-दूसरे के पास आने पर active dimer बनाता है
4. **DNA Cleavage**
   - Double-strand break (DSB) DNA में उत्पन्न
   - Cleavage site पर **repair pathways** DNA modification करते हैं
5. **DNA Repair**
   - **NHEJ (Non-Homologous End Joining)** → insertions/deletions (gene knock-out)
   - **HDR (Homology-Directed Repair)** → precise insertion / gene knock-in

---

TALENs की विशेषताएँ (Characteristics)

1. **High specificity** – Protein-based DNA recognition
2. **Programmable** – TAL repeats customize करके sequence select किया जा सकता है
3. **Requires dimerization** – Only when two TALENs close → cleavage
4. **Flexible targeting** – Cas9 की तरह PAM dependency नहीं
5. **Off-target effects कम** – Protein-DNA interaction अधिक precise

---

TALENs vs Other Gene Editing Tools

Feature	TALENs	CRISPR-Cas9	ZFNs
DNA recognition	Protein-DNA	RNA-DNA	Protein-DNA
Cleavage	FokI dimer	Cas9 nuclease	FokI dimer
PAM requirement	No	Yes	No
Off-target effects	Low	Moderate	Low
Design complexity	Moderate	Easy	High
Multiplexing	Difficult	Easy	Moderate

TALENs के Applications

1. **Gene Knock-out / Knock-in** – Targeted genome modification
2. **Functional genomics** – Gene function study
3. **Agricultural biotechnology** – Disease-resistant crops, trait improvement
4. **Therapeutic applications** – Genetic diseases correction
5. **Stem cell research** – Precise gene editing in pluripotent cells

---

लाभ (Advantages)

- High specificity, low off-target effects
- PAM independent targeting (Cas9 से बेहतर)
- Customizable DNA-binding domain
- Suitable for plants, animals और human cells

फसल सुधार में R का उपयोग (R Application in Crop Improvement)

परिचय

R एक open-source statistical programming language है, जो **data analysis, visualization और modeling** के लिए व्यापक रूप से उपयोग होती है।
Crop improvement (फसल सुधार) में R का उपयोग आधुनिक **plant breeding, genomics और phenomics** डेटा के विश्लेषण में किया जाता है।

R के माध्यम से किसान और वैज्ञानिक **high-yield, disease-resistant और climate-resilient crops** विकसित कर सकते हैं।

फसल सुधार में R के प्रमुख उपयोग

1. Genomic Selection (जीनोमिक चयन)

- Plant breeding में **genomic selection** के लिए R का उपयोग
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism) और molecular markers data का analysis
- Statistical models: **RR-BLUP, GBLUP, Bayesian models**

- Outcome: High-performing genotypes का prediction

उदाहरण:

- Wheat, Rice और Maize के breeding programs में yield prediction

---

2. QTL Mapping (Quantitative Trait Loci Mapping)

- Quantitative traits जैसे yield, drought tolerance, disease resistance का mapping
- R packages जैसे **qtl, R/qtl2** का उपयोग
- Phenotype और genotype data integrate करके traits के responsible loci identify करना

---

3. GWAS (Genome-Wide Association Studies)

- Complex traits और disease resistance genes खोजने के लिए
- R packages: **GAPIT, GenABEL**
- Marker-trait association का statistical analysis
- Breeding में superior genotypes select करने में मदद

---

4. Phenotypic Data Analysis

- Growth, yield, stress tolerance, flowering time का statistical analysis
- R packages: **agricolae, lme4, nlme**
- ANOVA, mixed models, regression models से traits का evaluation
- Multi-environment trials में genotype × environment interaction analysis

---

5. Bioinformatics and Molecular Breeding

- Sequence data analysis, alignment और gene expression study
- R packages: **Bioconductor, DESeq2, edgeR**
- Differential gene expression analysis for stress resistance, nutrient efficiency

---

6. Data Visualization

- Complex crop data को graphical रूप में समझना आसान
- R packages: **ggplot2, lattice, plotly**
- Heatmaps, boxplots, PCA plots, correlation plots
- Breeders को genotype-phenotype relationships आसानी से interpret करने में मदद

---

7. Predictive Modeling and Machine Learning

- Yield prediction, disease outbreak prediction, climate impact modeling
- R packages: **caret, randomForest, xgboost**
- Plant breeders को decision-making में support

R के उपयोग के लाभ (Advantages)

1. Open-source और free
2. Statistical and graphical analysis में शक्तिशाली
3. High-throughput genomic और phenotypic data analysis में सक्षम
4. Flexible, reproducible और community support strong
5. Crop improvement programs में accelerated breeding possible

बीज उद्योग और पोषण सुरक्षा (Seed Industries and Nutrition Security)

परिचय

Seed industry (बीज उद्योग) कृषि उत्पादन का आधार है।
Nutrition security (पोषण सुरक्षा) का मतलब है कि हर व्यक्ति को पर्याप्त, सुरक्षित और पौष्टिक आहार मिले।

बीज उद्योग और पोषण सुरक्षा में गहरा संबंध है क्योंकि **उन्नत बीज (High-yield and nutrient-rich seeds)** फसल उत्पादन बढ़ाते हैं और पोषण स्तर सुधारते हैं।

---

1. Seed Industry (बीज उद्योग)

परिभाषा

- बीज उद्योग वह क्षेत्र है जो **उन्नत, गुणवत्ता पूर्ण और रोग-प्रतिरोधी बीज** का उत्पादन, प्रसंस्करण और वितरण करता है।

मुख्य घटक

1. **Seed Breeding (बीज सुधार)**
    - Hybrid seeds, high-yield varieties (HYVs) का निर्माण
    - Disease-resistant और climate-resilient varieties
2. **Seed Production (बीज उत्पादन)**
    - Foundation seeds → Certified seeds → Commercial seeds
    - Quality control और certification महत्वपूर्ण
3. **Seed Processing and Storage (प्रसंस्करण और भंडारण)**
    - Cleaning, drying, treatment, packaging
    - Long-term viability बनाए रखना
4. **Distribution and Marketing (वितरण और विपणन)**
    - Farmers तक timely और quality seeds पहुँचना

प्रमुख प्रकार के बीज

- **Open-pollinated varieties (OPV)** – Natural pollination, low cost
- **Hybrid seeds** – High-yield, heterosis effect
- **Genetically modified seeds (GM seeds)** – Pest-resistant, drought-tolerant

Seed Industry की भूमिका

- कृषि उत्पादन बढ़ाना
- Disease-resistant और stress-tolerant crops विकसित करना
- Food security और farmer income बढ़ाना

---

2. Nutrition Security (पोषण सुरक्षा)

परिभाषा

Nutrition security तब सुनिश्चित होती है जब सभी लोगों को **calorie, protein, vitamins और minerals** की पर्याप्त मात्रा मिले।

- यह सिर्फ food availability पर नहीं, बल्कि **nutrient adequacy और food quality** पर निर्भर है।

पोषण सुरक्षा के प्रमुख घटक

1. **Calorie adequacy** – पर्याप्त ऊर्जा
2. **Protein sufficiency** – Growth और immunity के लिए
3. **Micronutrient adequacy** – Iron, Vitamin A, Iodine, Zinc
4. **Safe food** – Contaminant-free और hygienic

---

3. Seed Industry और Nutrition Security का संबंध

1. **Biofortified crops**
   - Zinc-rich wheat, Vitamin A-rich Golden Rice, Iron-rich pearl millet
   - बीज उद्योग इन nutrient-rich varieties का production और distribution सुनिश्चित करता है
2. **High-yield varieties (HYVs)**
   - Food availability बढ़ाते हैं
   - Hunger और malnutrition कम करने में मदद करते हैं
3. **Climate-resilient seeds**
   - Drought-tolerant और flood-resistant crops
   - Nutritional yield को stable रखते हैं
4. **Seed diversity और diet diversification**
   - Pulses, millets, vegetables, fruits के high-quality seeds
   - Balanced diet और micronutrient adequacy सुनिश्चित करते हैं
5. **Farmer empowerment**
   - Timely access to quality seeds → better harvest → affordability of nutritious food

---

4. Challenges in Seed Industry for Nutrition Security

1. Limited access to biofortified seeds in rural areas
2. High cost of hybrid and GM seeds
3. Climate change affecting seed quality and availability
4. Seed quality control and certification issues
5. Farmer awareness and training की कमी

---

5. Solutions / Strategies

1. Promote **biofortified seeds** (Vitamin A rice, iron pearl millet, zinc wheat)

2. Strengthen **seed certification and quality control**
3. Subsidies और awareness programs for farmers
4. Climate-smart agriculture → stress-tolerant seeds
5. Public-private partnerships for seed production and distribution

---

उपसंहार

Seed industry और **nutrition security** दोनों एक-दूसरे पर निर्भर हैं।

- High-quality, nutrient-rich, climate-resilient बीज → High yield + Balanced nutrition
- Seed production, biofortification, quality control और distribution का समन्वय पोषण सुरक्षा सुनिश्चित करता है।
- इससे **malnutrition, hidden hunger और food insecurity** कम होती है।

UNIT 5

TECHNIQUES AND APPLICATION

बायोटेक्नोलॉजी में तकनीकें और उनके अनुप्रयोग (Techniques and Applications in Biotechnology)

परिचय

Biotechnology (जैव प्रौद्योगिकी) में विभिन्न **techniques (तकनीकें)** विकसित की गई हैं ताकि **जीवों के genetic, molecular और cellular स्तर पर नियंत्रण** किया जा सके।
इन तकनीकों का **उद्देश्य** है:

1. मानव स्वास्थ्य सुधारना
2. फसल सुधार (Crop improvement)
3. औद्योगिक उत्पादकता बढ़ाना
4. पर्यावरण संरक्षण

---

1. Recombinant DNA Technology (जीन संयोजन तकनीक)

तकनीक (Techniques)

- **Restriction enzymes** – DNA को specific site पर काटना
- **Ligase enzymes** – DNA fragments जोड़ना
- **Plasmid vectors** – Gene cloning के लिए
- **Transformation** – Gene को host में insert करना
- **Selection and Screening** – Recombinant organisms की पहचान

अनुप्रयोग (Applications)

1. Human insulin का उत्पादन
2. Hepatitis B और अन्य recombinant vaccines
3. Transgenic crops – Bt cotton, pest-resistant varieties
4. Gene therapy – Genetic disorders का इलाज

---

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

तकनीक

- DNA amplification के लिए प्रयोग
- Steps: Denaturation → Annealing → Extension
- Primers, Taq polymerase और dNTPs की जरूरत

अनुप्रयोग

1. Genetic disease diagnosis
2. Forensic science – Crime scene DNA analysis
3. Pathogen detection (Viral और bacterial)
4. Cloning और sequencing के लिए DNA amplification

---

3. Gel Electrophoresis

तकनीक

- DNA, RNA या protein fragments को **size और charge** के आधार पर अलग करना

- Agarose gel for DNA/RNA, SDS-PAGE for proteins

अनुप्रयोग

1. DNA fingerprinting
2. Restriction fragment analysis
3. Protein profiling
4. PCR product verification

---

4. Gene Editing Techniques

तकनीक

1. **CRISPR-Cas9** – RNA-guided DNA cleavage
2. **TALENs** – Protein-DNA interaction mediated cleavage
3. **ZFNs (Zinc Finger Nucleases)** – DNA-targeted cleavage
4. **Base editing / Prime editing** – Point mutations

अनुप्रयोग

1. Genetic disease treatment – Sickle cell anemia, β-thalassemia
2. Crop improvement – Drought-resistant, high-yield varieties
3. Functional genomics – Gene function study
4. Livestock improvement

---

5. Cell and Tissue Culture Techniques

तकनीक

- Plant tissue culture – Callus culture, Micropropagation
- Animal cell culture – Stem cells, organoids
- Somatic hybridization – Protoplast fusion

अनुप्रयोग

1. Mass propagation of plants
2. Secondary metabolites का production (Taxol, Vincristine)
3. Genetic transformation in plants
4. Conservation of endangered species

---

6. Bioinformatics Techniques

तकनीक

- Sequence alignment – BLAST, ClustalW
- Phylogenetic analysis – MEGA, PhyML
- Protein structure prediction – SWISS-MODEL, PyMOL
- Genomic data mining – R, Python tools

अनुप्रयोग

1. Gene discovery और annotation
2. Drug design और protein modeling
3. Evolutionary studies
4. Crop improvement और genomics

---

7. Industrial and Environmental Biotechnology Techniques

तकनीक

- Fermentation technology – Microbial enzyme production
- Bioreactors और downstream processing
- Bioremediation – Pollutant degradation by microbes

अनुप्रयोग

1. Antibiotics, enzymes और biofuels का production
2. Wastewater treatment
3. Soil fertility improvement
4. Pollution control और plastic degradation

---

8. Nanobiotechnology Techniques

तकनीक

- Nanoparticles synthesis

- Nano-biosensors
- Targeted drug delivery

अनुप्रयोग

1. Targeted cancer therapy
2. Diagnostic biosensors
3. Drug delivery
4. Pathogen detection

निष्कर्ष

Biotechnology techniques आधुनिक जीवन विज्ञान और उद्योग में क्रांति ला रही हैं।

- Recombinant DNA, PCR, Gene editing, Tissue culture, Bioinformatics और Nanobiotechnology से **human health, agriculture, industry और environment** में सुधार संभव हुआ है।

एंजाइम डिटेक्शन (Enzyme Detection)

परिचय

एंजाइम (Enzyme) जैविक उत्प्रेरक (Biological Catalyst) होते हैं, जो **रासायनिक प्रतिक्रियाओं को तेजी से** और **विशेष रूप से** नियंत्रित करते हैं।
Enzyme detection का उद्देश्य:

1. किसी sample में एंजाइम की उपस्थिति की पहचान करना
2. एंजाइम की मात्रा (Activity) और गुणात्मक परीक्षण करना
3. Diagnostic, Industrial और Research applications में उपयोग करना

एंजाइम डिटेक्शन के प्रकार

1. Qualitative Detection (गुणात्मक परीक्षण)

- यह केवल **एंजाइम की उपस्थिति** को दिखाता है।
- Methods:

1. **Colorimetric assay (रंगीन प्रतिक्रिया)**
    - Substrate के एंजाइम द्वारा breakdown पर रंग बदलता है।
    - उदाहरण:
        - **Amylase**: Starch + iodine → रंगीन complex; अमाइलेज के होने पर color fade
        - **Peroxidase**: H_2O_2 + substrate → रंगीन product
2. **Precipitation method (निक्षेप विधि)**
    - एंजाइम द्वारा substrate की cleavage → precipitate बनता है
    - उदाहरण: Protease → casein digestion → clearing zones
3. **Zone of Clearance (प्लेट assay)**
    - Agar plates पर substrate embed करके एंजाइम active zones दिखाना
    - उदाहरण: Lipase → Tributyrin agar → clear halo zones

---

2. Quantitative Detection (मात्रात्मक परीक्षण)

- यह **एंजाइम की activity या concentration** को मापता है।
- Methods:

1. **Spectrophotometric assay**
    - Substrate → Product conversion के दौरान absorbance change को UV/Visible spectrophotometer में measure करना
    - Example:
        - β-galactosidase → ONPG substrate → yellow product → Absorbance at 420 nm
2. **Fluorometric assay**
    - Fluorescent substrates के breakdown पर fluorescence emission detect करना
    - High sensitivity, low concentration में भी detectable
3. **Electrophoretic detection (Zymography)**
    - Polyacrylamide gel में एंजाइम activity के आधार पर bands दिखाना
    - Example: Gelatin zymography for proteases
4. **ELISA-based enzyme detection**
    - Antibody-enzyme conjugates का उपयोग
    - Specific enzyme detection in biological samples

---

3. Biosensor-based Detection

- Enzyme immobilization on electrodes → substrate interaction → measurable electrical signal
- Example: Glucose oxidase biosensor → Glucose detection in blood

---

एंजाइम डिटेक्शन के चरण (Steps for Enzyme Detection)

1. **Sample preparation**
   - Tissue, blood, microbial culture या plant extract से enzyme extract करना
2. **Substrate selection**
   - एंजाइम-specific substrate का चुनाव
   - Must produce detectable signal (color, fluorescence, precipitate, electrical change)
3. **Reaction incubation**
   - उपयुक्त pH, temperature और cofactors के साथ reaction set करना
4. **Detection / Measurement**
   - Color change, fluorescence, absorbance या clearing zone के माध्यम से
5. **Quantification (यदि आवश्यक हो)**
   - Standard curve या spectrophotometer readings के माध्यम से enzyme activity मापना

Applications of Enzyme Detection

1. **Medical diagnostics**
   - Serum enzymes जैसे AST, ALT → liver function
   - Amylase, lipase → pancreatic disorders
2. **Food industry**
   - Lactase detection → lactose-free products
   - Protease detection → cheese and dairy processing
3. **Biotechnology and Research**
   - Microbial enzyme screening → industrial enzyme production
   - Enzyme kinetics studies
4. **Environmental monitoring**
   - Soil enzyme activity → soil fertility
   - Pollutant-degrading enzymes detection

Advantages of Enzyme Detection Techniques

- High specificity (substrate-specific)
- Sensitive and rapid methods available
- Quantitative and qualitative दोनों प्रकार संभव
- Diagnostic और industrial applications में उपयोगी

Limitation

- Some assays require purified enzyme
- Interference by other substances in crude extracts
- Environmental conditions (pH, temperature) affect activity
- Biosensor and fluorometric methods costly

एंजाइम हाइब्रिडाइजेशन (Enzyme Hybridization)

परिचय

Enzyme Hybridization एक **biochemical/molecular biology तकनीक** है जिसका उपयोग **एंजाइमों के अध्ययन और पहचान** के लिए किया जाता है।

- यह **एंजाइम की संरचना, कार्य और विशिष्टता** को समझने में मदद करता है।
- Molecular biology में इसका मुख्य उद्देश्य **specific enzyme sequences या isoenzymes की पहचान** करना है।

नोट: कभी-कभी इसे DNA/RNA hybridization के रूप में भी प्रयोग किया जाता है जब एंजाइम genes का अध्ययन किया जाता है।

परिभाषा (Definition)

Enzyme Hybridization वह प्रक्रिया है जिसमें:

1. किसी known enzyme (probe) का उपयोग करके unknown enzyme या enzyme gene की पहचान की जाती है।
2. यह **enzyme specificity, isoenzymes और gene expression patterns** का पता लगाने में उपयोगी है।

सिद्धांत (Principle)

- **Hybridization** का मतलब है: दो complementary biological molecules (जैसे DNA-DNA, DNA-RNA, Protein-protein) का **specific binding**।
- Enzyme hybridization में:
    1. Known enzyme या उसके gene का labeled probe बनाया जाता है।

2. Unknown enzyme sample के साथ incubate किया जाता है।
3. Probe और target enzyme के बीच **specific binding** होती है।
4. Binding का detection किया जाता है (radioactive, fluorescent या colorimetric signal के माध्यम से)।

सिद्धांत:

यदि probe और target complementary हैं तो **stable hybrid formation** होती है, जिससे enzyme की पहचान संभव होती है।

तकनीक (Techniques)

1. DNA/RNA Probe-based Enzyme Detection

- Enzyme gene का **specific DNA/RNA probe** तैयार करना
- Agarose gel, blotting (Southern/Northern) पर hybridization
- Detection via fluorescence या radioactivity

2. Isoenzyme Hybridization

- अलग-अलग isoenzymes की पहचान
- Electrophoresis के बाद blotting → labeled antibody या substrate probe का उपयोग

3. Antibody-mediated Enzyme Hybridization

- Known antibody को enzyme से hybridize करना
- Antibody-enzyme complex detect करना (Western blot या ELISA में)

Steps of Enzyme Hybridization

1. **Sample Preparation**
   - Tissue extract, purified enzyme या microbial culture से enzyme निकालना
2. **Probe Preparation**
   - Known enzyme gene या isoenzyme के लिए labeled probe तैयार करना
   - Labels: Radioactive (^32P), Fluorescent, Biotin, DIG
3. **Hybridization**
   - Probe को target enzyme या enzyme gene के साथ incubate करना
   - Stringent conditions (temperature, salt) में specific binding सुनिश्चित करना

4. **Washing**
    - Non-specific binding को हटाना
5. **Detection**
    - Autoradiography (radioactive), Fluorescence imaging या Colorimetric methods
6. **Analysis**
    - Band intensity, position और pattern का विश्लेषण करना
    - Isoenzyme identification, gene expression या enzyme quantification

---

Applications of Enzyme Hybridization

1. **Isoenzyme Detection**
    - Liver, heart या tissue-specific isoenzymes की पहचान
2. **Genetic Studies**
    - Enzyme-coding gene का mapping और expression analysis
3. **Medical Diagnostics**
    - Pathogen-specific enzymes का detection
    - Disease biomarkers की पहचान
4. **Molecular Biology Research**
    - Enzyme evolution और functional analysis
    - Protein engineering और recombinant enzyme studies
5. **Agricultural Applications**
    - Plant enzyme genes का study
    - Stress-responsive enzyme expression analysis

Advantages

- High specificity (probe-target complementarity)
- Sensitive detection of low-abundance enzymes
- Isoenzymes और mutant enzymes की पहचान संभव
- Quantitative और qualitative दोनों अध्ययन संभव

Limitations

- Expensive (labeled probes और detection equipment)
- Requires purified enzyme or nucleic acid probe
- Time-consuming process

- Non-specific hybridization की संभावना

PCR (Polymerase Chain Reaction) – डीप नोट्स

परिचय

PCR एक molecular biology तकनीक है जिसका उद्देश्य **DNA के specific fragment को in vitro में लाखों-करोड़ों बार amplify करना** है।

- Developed by **Kary Mullis (1983)**
- Rapid, sensitive और highly specific technique
- Molecular cloning, diagnostics और forensic science में उपयोगी

परिभाषा

PCR वह प्रक्रिया है जिसमें **विशेष DNA sequence की प्रतिलिपि (copy) in vitro** conditions में बनाई जाती है, जिससे उसका **detection और analysis** आसान हो जाता है।

सिद्धांत (Principle)

PCR की मुख्य आधारभूत अवधारणा है **DNA replication in vitro**।

- DNA template, primers, nucleotides और DNA polymerase का उपयोग
- DNA fragment का **exponential amplification**

मुख्य components:

1. **Template DNA** – Target DNA जो amplify करना है
2. **Primers** – Short DNA sequences (Forward & Reverse) complementary to target
3. **dNTPs (deoxynucleotide triphosphates)** – Building blocks for new DNA
4. **DNA Polymerase** – Taq polymerase (thermostable)
5. **Buffer solution** – Optimal pH और ion conditions

PCR की प्रक्रिया (Steps of PCR)

PCR में तीन मुख्य चरण होते हैं, जिसे **Thermal cycling** के माध्यम से कई बार repeat किया जाता है:

1. Denaturation (डीनेचर)

- Temperature: 94–98°C
- DNA double helix को separate कर single strands में convert करना

2. Annealing (एनीलिंग)

- Temperature: 50–65°C (Primer-specific)
- Forward और Reverse primers अपने complementary DNA strands के साथ hybridize करते हैं

3. Extension / Elongation (एक्सटेंशन)

- Temperature: 72°C
- DNA polymerase primers से जोड़ते हुए new DNA strand बनाता है
- DNA synthesis occurs in 5’ → 3’ direction

4. Thermal cycling

- यह तीन steps 25–35 cycles तक repeat होती हैं
- Exponential amplification: 2^n copies (n = cycle number)

Types of PCR (PCR के प्रकार)

1. **Conventional PCR** – Basic amplification of DNA fragment
2. **Real-Time PCR (qPCR)** – DNA quantity real-time में measure करना
3. **Reverse Transcription PCR (RT-PCR)** – RNA → cDNA → Amplification
4. **Multiplex PCR** – एक ही reaction में multiple DNA targets
5. **Nested PCR** – Two-step PCR for higher specificity
6. **Digital PCR** – Absolute quantification of DNA molecules

---

Applications of PCR (PCR के उपयोग)

1. Medical Diagnostics

- Genetic disorders का detection (Sickle cell, Thalassemia)
- Viral infections (HIV, SARS-CoV-2)

2. Forensic Science

- Crime scene DNA analysis
- Paternity testing

3. Molecular Biology Research

- Gene cloning
- Sequencing
- Mutation detection

4. Agriculture

- GMO detection
- Plant and animal breeding programs

5. Environmental Studies

- Microbial diversity analysis
- Pathogen detection in water/soil

Advantages of PCR

- Highly sensitive → Single DNA molecule detect possible
- Rapid → Few hours में results
- Specific → Primers के माध्यम से target sequence ही amplify होता है
- Can amplify DNA from degraded or minimal samples

Limitations of PCR

- Requires thermal cycler and skilled personnel
- Contamination की संभावना → False positive
- Requires prior knowledge of target sequence for primer design
- Cannot detect very long DNA fragments easily

Gene Probe Technology (जीन प्रोब तकनीक)

परिचय

Gene Probe Technology एक molecular biology technique है जिसका उद्देश्य **specific DNA या RNA sequences की पहचान और अध्ययन** करना है।

- Gene probes को **labeled DNA या RNA fragments** के रूप में प्रयोग किया जाता है।
- यह **diagnostics, research और genetic engineering** में महत्वपूर्ण है।

परिभाषा (Definition)

Gene probe वह **labeled nucleic acid fragment** है जो **target DNA या RNA sequence** के complementary sequence से **specific hybridization** करता है।

उद्देश्य:

1. किसी specific gene या DNA fragment की पहचान
2. Gene mapping और cloning
3. Genetic disorders का diagnostic

सिद्धांत (Principle)

1. Gene probe **complementary sequence** के साथ hybridize करता है।
2. Probe को detect करने के लिए इसे **label** किया जाता है:
    - Radioactive (^32P, ^35S)
    - Fluorescent dye
    - Enzyme (e.g., alkaline phosphatase, horseradish peroxidase)
3. Hybridization होने पर **signal detection** से पता चलता है कि target gene sample में उपस्थित है।

सिद्धांत:

अगर probe और target complementary हैं, तो stable hybrid बनता है और signal detect होता है।

तकनीक (Method / Steps)

1. Probe Preparation

- Target gene के complementary DNA या RNA fragment को तैयार करना
- Labeling: Radioactive, Fluorescent, Enzyme

2. Sample Preparation

- Tissue, blood, microbial culture या genomic DNA extract करना

3. Hybridization

- Probe को target DNA/RNA के साथ incubate करना
- Stringent conditions (pH, temperature, salt) → Specific binding

4. Washing

- Non-specific binding को हटाना

5. Detection

- Autoradiography (Radioactive probe)
- Fluorescence imaging (Fluorescent probe)
- Colorimetric assay (Enzyme-labeled probe)

6. Analysis

- Hybridization signal का interpretation
- Gene presence/absence, copy number, expression study

प्रकार (Types of Gene Probes)

1. **Radioactive probes**
    - सबसे sensitive
    - Autoradiography से detection
2. **Non-radioactive probes**
    - Fluorescent probe → Fluorescence microscopy
    - Enzyme-labeled probe → Colorimetric detection
3. **cDNA probes**
    - mRNA complementary
    - Gene expression study में उपयोग
4. **Oligonucleotide probes**
    - Short synthetic DNA sequences
    - Point mutation और SNP detection

Applications (अनुप्रयोग)

1. Medical Diagnostics

- Genetic disorder detection (Sickle cell anemia, Thalassemia)
- Viral and bacterial infections का rapid detection

2. Molecular Biology and Research

- Gene mapping और cloning
- DNA fingerprinting
- Mutation analysis

3. Agriculture

- GMO detection
- Plant pathogen identification
- Crop improvement programs

4. Forensic Science

- Crime scene DNA analysis
- Paternity testing

5. Environmental Monitoring

- Microbial diversity analysis
- Detection of pollutant-degrading genes

Advantages

- High specificity → Target gene की exact पहचान
- Sensitive → Low quantity DNA/RNA detect possible
- Diagnostic और research दोनों में उपयोगी
- Rapid and reliable results

Limitations

- Probe design requires prior knowledge of target sequence
- Contamination → False positive results
- Radioactive probes → Health hazards
- Costly instruments और reagents की आवश्यकता

रोगजनक संचरण नियंत्रण की रणनीतियाँ (Strategies for Controlling Pathogen Transfer)

परिचय

रोगजनक (Pathogens) जैसे **बैक्टीरिया, वायरस, फंगस और परजीवी** इंसानों, जानवरों और पौधों में बीमारियाँ फैलाते हैं।
रोगजनक **संचरण (Transfer)** विभिन्न माध्यमों से होता है:

- व्यक्ति से व्यक्ति (सीधा संपर्क)
- हवा (Airborne)
- पानी या भोजन (Water/foodborne)
- कीट/वेक्टर (जैसे मच्छर, मक्खी)

उद्देश्य: रोगजनक के फैलाव को रोकना और स्वास्थ्य सुरक्षित रखना।

---

1. व्यक्तिगत स्वच्छता (Personal Hygiene)

उपाय:

- नियमित रूप से हाथ धोना (साबुन और पानी से)
- शारीरिक सफाई बनाए रखना
- अपने कपड़े साफ रखना
- खांसते या छींकते समय मुँह ढकना (Mask या हाथ से)

महत्व:

- रोगजनक का सीधा संपर्क रोकता है।
- उदाहरण: COVID-19, Influenza, Hepatitis A

---

2. पर्यावरणीय स्वच्छता (Environmental Hygiene)

उपाय:

- पीने के पानी को साफ और सुरक्षित रखना (उबालना, फिल्टर करना या क्लोरीन डालना)
- कचरा और गंदगी का सही निपटान
- सतहों की सफाई और कीटाणुनाशन
- कमरे में अच्छा वेंटिलेशन और हवा का आवागमन

महत्व:

- पानी और भोजन से फैलने वाले रोगों को कम करता है।
- अस्पतालों में संक्रमण को रोकता है।

---

3. कीट नियंत्रण (Vector Control)

उपाय:

- मच्छरदानी और कीट repellents का इस्तेमाल
- पानी के जमाव को हटाना (मच्छर की breeding रोकने के लिए)
- कीटनाशकों का नियंत्रित उपयोग
- चूहों और अन्य rodents का नियंत्रण

महत्व:

- Malaria, Dengue, Chikungunya जैसी बीमारियों को रोकता है।

---

4. टीकाकरण (Vaccination)

उपाय:

- बच्चों का नियमित टीकाकरण (Polio, Measles, Hepatitis B)
- मौसमी टीके (Influenza)
- यात्रा से पहले टीके (Yellow Fever, Typhoid)

महत्व:

- शरीर में रोगजनक के खिलाफ immunity बनाता है।
- Epidemic और महामारी को रोकने में मदद करता है।

---

5. अलगाव और क्वारंटाइन (Isolation and Quarantine)

उपाय:

- संक्रमित व्यक्ति को दूसरों से अलग रखना (Isolation)
- संदेहास्पद व्यक्ति को क्वारंटाइन करना
- यात्रा और सार्वजनिक कार्यक्रमों में रोकथाम

महत्व:

- रोग फैलाव को रोकता है।
- महामारी को नियंत्रण में रखने में महत्वपूर्ण।

---

6. कीटाणुनाशन और निष्फलन (Sterilization and Disinfection)

उपाय:

- मेडिकल उपकरणों और प्रयोगशाला उपकरणों को ऑटोक्लेव करना
- रासायनिक कीटाणुनाशक (Bleach, Alcohol) का इस्तेमाल
- UV रोशनी से हवा और सतहों का कीटाणुनाशन

महत्व:

- रोगजनकों की संख्या कम करता है।
- अस्पताल और खाद्य उद्योग में आवश्यक।

---

7. सुरक्षित भोजन और पानी (Safe Food and Water Practices)

उपाय:

- भोजन को अच्छी तरह पकाना और सुरक्षित रूप से रखना
- गंदा या कच्चा पानी पीने से बचना
- खाने से पहले हाथ धोना
- दूध और अन्य उत्पादों को pasteurize करना

महत्व:

- Salmonella, E. coli जैसे खाद्यजनित रोगों को रोकता है।
- Cholera और Typhoid से बचाव।

---

8. सार्वजनिक स्वास्थ्य शिक्षा (Public Health Education)

उपाय:

- Hygiene, vaccination, vector control के बारे में जागरूकता
- सामुदायिक स्वच्छता कार्यक्रमों में भागीदारी
- व्यवहार में बदलाव (Mask पहनना, हाथ धोना, सुरक्षित भोजन)

महत्व:

- रोगजनक संचरण को स्थायी रूप से रोकने में मदद करता है।

---

9. दवा आधारित नियंत्रण (Antibiotics and Antivirals)

उपाय:

- दवाओं का सही और नियंत्रित इस्तेमाल
- जल्दी निदान और उपचार
- वायरल रोगों के लिए एंटीवायरल दवाएँ

महत्व:

- संक्रमण की गंभीरता कम करता है।
- Resistant pathogens के फैलाव को रोकता है।

---

10. आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी उपाय (Modern Biotechnological Approaches)

उपाय:

- Genetic engineering – रोग प्रतिरोधक पौधे विकसित करना
- Rapid diagnostic kits – PCR, ELISA, Gene probes
- Monoclonal antibodies – रोगजनक पहचान और उपचार

महत्व:

- Targeted और precise pathogen control
- Epidemic और खाद्य सुरक्षा में मददगार

बायोपेस्टिसाइड्स और इंटीग्रेटेड पेस्ट मैनेजमेंट (IPM)

परिचय

पेस्टिसाइड्स का प्रयोग फसलों में कीटों, रोगजनकों और खरपतवार को नियंत्रित करने के लिए किया जाता है। परंपरागत **chemical pesticides** के कई नुकसान हैं:

- पर्यावरण प्रदूषण
- मृदा और जल का नुकसान
- कीटों में प्रतिरोध (Resistance)
- मानव और पशु स्वास्थ्य पर प्रभाव

इसीलिए **Biopesticides (जैविक कीटनाशक)** का प्रयोग बढ़ रहा है।

Integrated Pest Management (IPM) – एक **समेकित कीट प्रबंधन प्रणाली** है जिसमें **कई उपायों को मिलाकर** कीट नियंत्रण किया जाता है, ताकि पर्यावरण और मानव स्वास्थ्य सुरक्षित रहे।

Biopesticides क्या हैं?

Biopesticides ऐसे **जैविक एजेंट** हैं जो पौधों को कीटों और रोगजनकों से बचाते हैं।

- ये **कीटों, फफूंद, बैक्टीरिया और वायरस** पर प्रभाव डालते हैं।
- Chemical pesticides की तुलना में **सुरक्षित, पर्यावरण-अनुकूल और biodegradable** होते हैं।

Types of Biopesticides:

1. **Microbial Biopesticides**
    - Bacteria, fungi, virus या protozoa आधारित
    - उदाहरण:
        - *Bacillus thuringiensis (Bt)* → Lepidopteran कीटों के लिए
        - *Beauveria bassiana* → Aphids और Whiteflies के लिए
2. **Plant-Incorporated Protectants (PIPs)**
    - पौधों में genes डालकर कीट प्रतिरोधक बनाना
    - उदाहरण: Bt Cotton
3. **Biochemical Biopesticides**
    - Natural substances जैसे pheromones, neem extract, plant oils
    - कीटों के growth और reproduction को प्रभावित करता है
    - उदाहरण: Neem oil, Azadirachtin

Integrated Pest Management (IPM) में Biopesticides का महत्व

IPM का उद्देश्य:

- कीटों की आबादी को **Economic Threshold Level** से नीचे रखना
- पर्यावरण और मानव स्वास्थ्य की रक्षा करना
- Chemical pesticide का उपयोग कम करना

IPM के मुख्य घटक:

1. **Cultural Control**
    - Crop rotation, intercropping, planting time adjustment
2. **Mechanical/Physical Control**
    - Traps, light traps, hand picking of pests
3. **Biological Control (Biopesticides)**
    - Predators, parasitoids और microbial biopesticides का उपयोग
4. **Chemical Control**
    - जब ज़रूरी हो तब select chemical pesticides

Biopesticides के लाभ (Advantages in IPM)

1. Environment-friendly → Chemical residues कम
2. Target-specific → केवल कीटों या रोगजनकों पर प्रभाव

3. Human और animal safe → Toxicity कम
4. Resistance development कम होता है
5. Soil fertility और biodiversity सुरक्षित

Biopesticides के सीमाएँ (Limitations)

1. Slow action → कीट तुरंत नहीं मरते
2. Specificity → सभी कीटों पर असर नहीं
3. Storage और Shelf-life समस्या
4. Environmental conditions (temperature, humidity) पर निर्भर

IPM में Biopesticides का उपयोग (Examples)

Pest/Problem	Biopesticide	Application
Lepidopteran larvae	*Bacillus thuringiensis*	Spraying on crops
Aphids, Whiteflies	*Beauveria bassiana*	Soil or foliar application
Termites	*Metarhizium anisopliae*	Soil treatment
Fungal diseases	Trichoderma spp.	Seed treatment or soil amendment
Neem-sensitive pests	Azadirachtin/Neem oil	Foliar spray