फसल सुधार के लिए नई प्रजनन तकनीक ''जीनोम एडिटिंग'': अनुप्रयोग, क्षमता और चुनौतियाँ

संगीता श्रीवास्तव
भाकृअनुप–भारतीय गन्ना अनुसंधान संस्थान, लखनऊ (उत्तर प्रदेश)
*संवादी लेखक का ई–मेल: sangeeta.srivastava@icar.gov.in

कृषि में फसल सुधार एक सतत प्रक्रिया है जो दुनिया की आबादी के लिए भोजन, चारा और फाइबर की पर्याप्त आपूर्ति सुनिश्चित करती है। उपज से संबंधित लक्षणों को पादप प्रजनन और द्वारा सुधारा जाता है। परन्तु आनुवंशिक संशोधनों की अपनी सीमाएं हैं। इस कारण नई प्रजनन तकनीक द्वारा फसल सुधार दुनिया भर में लोकप्रिय हो रहा है। आणविक आनुवंशिक में नवाचार तथा जीनोम–संपादन और जीनोम में सटीक बदलाव ने फसल सुधार में क्रांति ला दी है। जीनोम या जीन एडिटिंग (जीईया जीनोम संशोधन/संपादन) एक प्रकार का आनुवांशिक संशोधन है, जिसमें डीएनए को सम्मिलित किया जाता है, हटा दिया जाता है या फिर इंजीनियर न्यूक्लियेस का उपयोग करके किसी जीव के जीनोम में बदलाव किया जाता है। जीनोम में एक विशिष्ट साइट पर डबल स्ट्रेन्डेड ब्रेक (डीएसबी) बनाने के लिए, ब्रेक साइट पर या उसके निकट वांछित डीएनए संशोधन को प्रेरित करने के लिए इंजीनियर न्यूक्एिज का उपयोग किया जाता है। ये इंजीनियर न्यूक्लियेस नाभिक जीनोम में वांछित स्थानों पर साइट–विशिष्ट डबल–स्ट्रैंड ब्रेक (डीएसबी) बनाते हैं। पिछले एक दशक में, पौधों की प्रजातियों की एक विस्तृत श्रृंखला में विभिन्न न्यूक्एिज लक्षित डीएसबी उत्पन्न करने में सक्षम प्रभावकारिता को सिद्ध किया है। इन डीएसबी की मरम्मत गैर–सजातीय अंत को जोड़ना (नॉन–होमोलॉगस एंड जॉइनिंग) या सजातीय पुनर्संयोजन (होमोलॉगसरी कोम्बिनेशन) के माध्यम से की जाती है, जिसके परिणाम स्वरूप जीनोम में लक्षित उत्परिवर्तन होते हैं।

जीनोम–संपादन तकनीक में चार मुख्य प्रकार के साइट–विशिष्ट न्यूक्लियेस (SSN) जो जीनोम संपादन संयंत्र के लिए इंजीनियर हैं शामिल हैं–मैगान्यूक्लियेस (MNs), जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस (ZFNs), प्रतिलेखन उत्प्रेरक–जैसे प्रभावक (TALENs), और नियमित रूप से छोटा पैलिंड्रोम दोहराता संकुल/CRISPRassociated प्रोटीन 9 (CRISPR@Cas9)।

मैगान्यूक्लियेस (एमएन)

मैगान्यूक्लियेस (एमएन)या होमिंग एंडोन्यूक्लियेज (HÈ) बड़े क्लीवेज साइट्स (>14–40 बीपी) के साथ अत्यधिक विशिष्ट एंडोन्यूक्लिगेज हैं। इन साइट स्पेसिफिक न्यूक्एिज का यूकेरियोट्स में विशिष्ट लोसाई पर लक्षित डीएसबी का उत्पादन करने के लिए उपयोग किया जाता है। एमएन द्वारा उत्पादित डीएसबी को नॉनहोमोलोजिक एंड जॉइनिंग या होमोलोजी द्वारा निर्देशित रिपेयर किया जा सकता है। चूहे, बैक्टीरिया, मच्छरों, पौधों और मक्खियों मेंयह तकनीक जीनोम–एडिटिंग टूल के रूप में कार्य करती है लेकिन लक्ष्य–अनुक्रम विशिष्टता के कारण मैगान्यूक्लियेस (meganucleases) प्रौद्योगिकी का आमतौर पर उपयोग नहीं किया जाता है।

जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस् (ZFN)

जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस जो कि काईमेरिक फ्यूजन प्रोटीन हैं, डीएनए पहचान मॉड्यूल और डीएनए क्लीवेज डोमेन के साथ एक डीएनए बाइंडिंग डोमेन से युक्त होते हैं। डीएनए–बाइंडिंग डोमेन Cys2-His2 जिंक–फिंगर के एक सेट का बना होता है तथा प्रत्येक 3 से 6 बीपी डीएनए को पहचानता है। जिंक–फिंगर के डाइमर्स डीएनए में डीएसबी बना सकते है। जिंक–फिंगर (जेडएफएन)–मध्यस्थता जीनोम संशोधन की प्रमुख बाधा है इसका अधिक समय लेना, रोगाणु कोशिकाओं में कम दक्षता और कम प्रजनन क्षमता हालांकि दैहिक कोशिकाओं में आम तौर पर उच्च दक्षता पाई जाती है।

ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़ (TALENs)

रोगज़नक़ जीवाणु ज़ैंथोमोनास कई फसल को संक्रमित करता है जिसमें धान, खट्टे फल, टमाटर और सोयाबीन आदि शामिल है। ज़ैंथोमोनास द्वारा पौधों को वितरित प्रोटीन की बैटरी को ट्रांसक्रिप्शनल एक्टिवेटर–जैसे इफ़ेक्टर्स (टेल्स) कहा जाता है। एक प्राथमिक प्रयोग में टेल डीएनए बंधन डोमेन को Fok। एंडोन्यूक्लाइज के उत्प्रेरक डोमेन के साथ फ्यूज किया गया जिस के परिणामस्वरूप TALENs- **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** की उत्पत्ति हुई। बड़ी लक्ष्य साइट **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** को विशिष्ट बनाती है। अन्य न्यूक्लिएज़ की तुलना में कई जीवों में **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** का उपयोग लक्षित संशोधन उत्पन्न करने के लिए किया गया है। **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** का फायदा यह है कि वे औसतन हर 10 बीपी में एक डीएनए स्थान पर लक्ष्यीकरण की अनुमति देते हैं। **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** के डीएनए बाध्यकारी डोमेन को आसानी से वस्तुतः किसी भी डीएनए अनुक्रम को पहचान करने के लिए इंजीनियर किया जा सकता है। जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस और ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़ दोनों में एक बड़ी बाधा है। प्रत्येक नए लक्ष्य के लिए एक नया प्रोटीन इंजीनियरिंग जटिल और समय लेने वाली प्रक्रिया है जो संभव नहीं है। **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** आकार में बहुत बड़ा है, ~950 से ~1900 एए प्रति जोड़ी, अतः पौधों कीकोशिका में लगाने के लिए टैलेन की डिलीवरी भी चुनौतीपूर्ण है। **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज़** के अतिरिक्त, एक नया डिनोवो इंजीनियर प्रतिलेखन उत्प्रेरक जैसे प्रभावकारक (dTALEs) विकसित किया गया है जो पौधों में जीन अभिव्यक्ति को सक्रिय करने या दबाने में मदद करता है।

क्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस 9)

जीनोम–एडिटिंग टूलबॉक्स की सबसे नवीन साधन "नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन प्रणाली" ने जीनोम संपादन में क्रांति ला दी है। सक्षम और कुशल लक्षित जीनोम संपादन, के अतिरिक्त इसमें अंतर्जात जीन अभिव्यक्ति या विशिष्ट गुणसूत्र LOCI लेबल करने के लिए जीव या कोशिका को विनियमित करने की क्षमता है। इस प्रणाली की सादगी और मजबूती ने इसे दुनिया भर में उपयोग करने में आसान और आकर्षक जीनोम संपादन संयंत्र बना दिया है। इसमें एक काइमरिक आरएनए और एक एकल मोनोमेरिक प्रोटीन, कैस 9 शामिल है। कैस 9 में दो हिस्से होते हैं। एक बड़े गोलाकार मान्यता (आरईसी) और एक छोटा न्यूक्लिएज़ (NUC)। क्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस 9) प्रणाली का दूसरा घटक है एकल गाइड आरएनए (sgRNA) जो कैस 9 न्यूक्लिएज के साथ एक जटिल संरचना बनाता है।

जीनोम–संपादन तकनीकों का अनुप्रयोग

फसलों के आनुवंशिक सुधार का मुख्य उद्देश्य है खाद्य उत्पादन में वृद्धि। प्रमुख खाद्य, फाइबर और औद्योगिक फसलें जैसे कि सरसों, गेहूं, आलू, कपास, सेब, मूंगफली, गन्ना, और साइट्रस आदि में उनकी जीनोम जटिलता बाधक बन जाती है हालांकि, साइट–विशिष्ट न्यूक्लियेस की मध्यस्थता वाली जीनोम–संपादन प्रणाली के अनुप्रयोग द्वारा फसल आनुवंशिक सुधार प्रक्रिया को बहुत तेज किया गया है। बैक्टीरिया पौधों में रोग पैदा कर सकते हैं और कई विषाक्त पदार्थ, पॉलीसेकेराइड, पेक्टिक एंजाइम और हार्मोन सहित मेटाबोलाइट्स पैदा कर सकते हैं। जब साइट्रस CsLOB1 जीन को नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस 9) तकनीक का उपयोग करके लक्षित किया गया, तब संपादित पौधों ने जीवाणु ज़ैंथोमोनास के खिलाफ उच्च प्रतिरोध दिखाया इसके अलावा, संपूर्ण प्रभाव–बंधन तत्व (EBEPthA4) अनुक्रम के विलोपन से उत्पन्न होमोजीगस म्यूटेंट में दोनों CsLOB1 एलील्स ने सिट्रस पौधे को बैक्टीरिया प्रतिरोध की एक उच्च डिग्री प्रदान की।

फंगल रोग के कारण आधुनिक कृषि घाटे से बचने के लिए रसायनों पर निर्भर है जो मानव स्वास्थ्य और पर्यावरण को प्रभावित करते हैं। कवक प्रतिरोधी गेहूं की खेती का

विकास गेहूं प्रजनन का एक प्रमुख उद्देश्य रहा है। गेहूं में TaMLO-A1, TaMLO-B1,TaMLO-D1 जीन का एक साथ लक्ष्यीकरण नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस 9) प्रणाली और ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज के साथ पार्टिकिल बमबारी का उपयोग कर फफूंदी प्रतिरोध उत्पन्न किया गया। गेहूं में फ्यूसेरियम हेड ब्लाइट (एफएचबी) प्रतिरोध भी तीन गेहूं जीन को लक्षित करके प्राप्त किया गया। ये तीन जीन 42.2% म्यूटेशन दक्षता के साथ संपादित किये गये और एफएचबी के खिलाफ प्रति रक्षा में शामिल पाये गये। कृषि क्षति में कीटनाशक पारिस्थितिकी तंत्र को अस्थिर करता है। कृषि फसल कीटों के प्रतिरोध के लिए जैविक नियंत्रण का उपयोग बढ़ रहा है। कपास में एक जटिल जीनोम होता है जो जीनोम अनुक्रम जानकारी अपूर्ण होने के कारण प्रयोग करना बहुत कठिन है। कपास में एक फिर से इंजीनियर किये गये मेगानुक्लिज़ का उपयोग एक ट्रांसजेनिक कीट नियंत्रण लोकस से सटे एक अंतर्जात लक्ष्य अनुक्रम की विशिष्ट दरार के लिए किया गया था। लक्षित डीएनए की दरार और सजातीय पुनर्संयोजन की मरम्मत ने कपास में अतिरिक्त जीन की प्रविष्टी को संभव बनाया। cry2Aelbar जीन के फ्लैंकिग हिस्से में उत्परिवर्तन और हर्बिसाइड के साथ मरम्मत के क्षेत्र सहिष्णुता जीन के परिणामस्वरूप हर्बिसाइड–टॉलरेंस और कीट–प्रतिरोध की स्टैकिंग सम्भव हो पाई।

वायरस फूल, बीज जड़ें, तना और पत्तियां सहित पौधों के सभी हिस्सों को नुकसान पहुंचा सकते हैं, वायरस को रासायनिक रूप से नियंत्रित करना कठिन है। रोगाणुरोधी उपायों से संक्रमित पौधों को नुकसान होता है और वायरस वाहक आबादी को सीमित करने के लिए अत्यधिक कीटनाशक प्रयोग की आवश्यकता होती है। पारंपरिक प्रजनन ने कुछ उदाहरण प्रस्तुत किए हैं। पॉलीप्लाइड फसलों में वायरस की चरम आनुवंशिक प्लास्टिसिटी की जरूरत है। वायरस प्रतिरोधी निकोटियाना बेंथैमिना पौधों विकसित करने के प्रयास में कोडिंग और गैर–कोडिंग अनुक्रमों को लक्षित करके एक sgRNAs विशेष रूप से डिजाइन किए गए थे। टमाटर की पीला पत्ती कर्ल वायरस (TYLCV) क्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस 9) ने लक्ष्य क्षेत्र में उत्परिवर्तन उत्प्रेरण द्वारा TYLCV को निशाना बनाया जिस के परिणामस्वरूप पौधों में वायरल डीएनए का संक्रमण कम हुआ।

किसान जुताई, हाथ की निराई, और शाकनाशी प्रयोग द्व ारा खेतों रो अवांछित पौधों को हटाने की कोशिश करते हैं। जुताई द्वारा शीर्ष परत को उजागर करने से कई समस्याओं जैसे मिट्टी से हवा और पानी का क्षरण, साथ ही साथ श्रम में वृद्धि आदि होता है। जीनोम संपादन द्वारा एसिटोलैक्टेट सिंथेज़ जीन (SuRAऔर SuRB) को तंबाकू के पौधों में इमिडाज़ोलिनोन और सल्फोनीलयूरिया के खिलाफ प्रतिरोध हेतु लक्षित किया गया। प्रोटोप्लास्ट के विद्युतीकरण के साथ जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस तकनीक का उपयोग किया गया। हर्बीसाइड–रेसिस्टेंस म्यूटेशन को सफलतापूर्वक एसआरआर लोकी और >40% पुनः संयोजक पौधों में पेश किया गया। अरैबिडोप्सिस थालियाना में, 5–enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSPS) जीन को एकल स्टैंड ऑलिगोन्यूक्लियोटाइड्स (ssODN) **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज**, और क्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन **(क्रिस्पर–कैस 9)** का उपयोग करके सफलतापूर्वक संपादित किया गया जिसमें उच्च लक्षित जीनोम–संपादन आवृत्ति प्राप्त की गई। एक मॉडल पौधे में प्रयोग के बाद, ssODN और **क्रिस्पर–कैस** 9 में EPSPS जीन का सफल संपादन करके उसे सन (फ्लैक्स) के पौधों में पहुंचाया गया। इन पौधों ने ग्लाइफोसेट के प्रति उच्च सहिष्णुता दिखाई। आलू में, एक जेमिनीवायरस प्रतिकृति का उपयोग एसिटोलैक्टेट सिंथेज़ 1 (ALS1) जीन के लक्ष्य स्थल पर क्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन **(क्रिस्पर–कैस 9)** घटकों को बदलने के लिए किया गया था और उत्परिवर्तित ट्रांसजेनिक पौधों ने हर्बिसाइड्स के लिए कम संवेदन वाष्पशीलता प्रदर्शित की।

निष्कर्ष और दृष्टिकोण

विश्व की चुनौतियों का सामना करने के लिए पादप प्रजनन और आनुवंशिक में, नवोन्मेषी दृष्टिकोण आवश्यक है। फसल में सुधार के लिए नए एलील वैरिएंट्स के निरंतर निर्माण और प्रतिस्थापन की आवश्यकता है। जीनोम–संपादन तकनीक, विशेष रूप सेक्लस्टर किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन **(क्रिस्पर–कैस 9)**

प्रणाली, फसलों में उच्च आवृत्ति के साथ उत्परिवर्तन उत्पन्न करने के लिए एक मूल्यवान मंच प्रदान करती है। जीनोम एडिटिंग से फसलों में सुधार की आशा है। इस तकनीक द्वारा फसल की उपज, गुणवत्ता, जीवन क्षमता और तनाव प्रतिरोध सहित कृषि संबंधी लक्षणों में सुधार की काफी संभावनाएं हैं। विभिन्न स्थन–विशेष न्यूक्लियेस–मध्यस्थता वाले जीनोम–संपादन संयंत्रों की अपनी–अपनी विशेषताएं हैं। **जिंक–फिंगर न्यूक्लियेस** और **ट्रांसक्रिप्शन एक्टीवेटर जैसे इफ़ेक्टर न्यूक्लियेज** दोनों को एक विशिष्ट स्थान पर एक जीनोम को उत्परिवर्तित करने के लिए उपयोग किया जाता है। इन सिस्टम को दो अलग–अलग डीएनए बाइंडिंग प्रोटीन की आवश्यकता होती है। ये विधियां व्यापक रूप से नहीं हुई हैं, और केवल कुछ फसलों में उपयोग किया गया है। एमएन का उपयोग भी आमतौर पर पौधों में नहीं किया जाता है। लेकिन इन्होंने एक लॉन्चिंग पैड के रूप में कार्य किया जिस पर वैज्ञानिक समुदाय नई तकनीकों को विकसित करने में सक्षम है।

समूह किए गए नियमित रूप से छोटे पैलिंड्रोमिक रिपीट प्रतिच्छेदन (क्रिस्पर–कैस) आधारित जीनोम संशोधन प्रणाली फसल आनुवंशिक सुधार के लिए एक प्रभावी रणनीति के रूप में उभरी है। कई फसल जीनोम में **क्रिस्पर–कैस 9** जैसे जीनोम संपादन उपकरण लगाए गए हैं। ये दोहरे फंसे हुए डीएनए ब्रेक के सटीक लक्ष्यीकरण और परिचय को सक्षम करते हैं। बाद में सेलुलर मरम्मत तंत्र, मुख्य रूप से गैर–समरूप अंत में शामिल होने (NHEJ), अंतर्जात जीन संपादन या सुधार के लिए महत्वपूर्ण कदम के रूप में कार्य करते हैं। हालांकि हल की जाने वाली चुनौतियां कई हैं, लेकिन निकट भविष्य में सटीक फसल प्रजनन और जैव प्रौद्योगिकी के लिए क्रिस्पर–कैस 9 प्रणाली निःसंदेह एक अजेय रणनीति के रूप में विकसित होगी। इसके अलावा, उन्नत जैव सूचनात्मक उपकरणों की उपलब्धता जो म्यूटेंट (उत्परिवर्तक) की पहचान करने के लिए विशेषता विशिष्ट gRN। डिजाइन और उच्च थ्रूपुट स्क्रीनिंग तकनीकों मे सहायता करती हैं,निःसंदेह जीई मंच को नए क्षितिज के लिए नेतृत्व करेगी, जो मानव आबादी को लाभान्वित करेगा। एक उचित नियामक नीति जो जीएमओ और जीई जीवों के बीच अंतर करती है, हमें इन तकनीकों का कुशल तरीके से दोहन करने में सक्षम बनाएगी।

फल के आने से वृक्ष झुक जाते हैं, वर्षा के समय बादल झुक जाते हैं, संपत्ति के समय सज्जन भी नम्र होते हैं। परोपकारियों का स्वभाव ही ऐसा है।

– तुलसीदास