



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 16, Issue 1, No. 59, spring 2024
Document Type: Research Paper
Received: 19/01/2025 Accepted: 15/02/2025

Investigation of Some Strategies to Overcome Hyperhydration in Cucumber Regenerated Plants from Anthers

Abouzar Asadi ¹ ^{2*}, Alireza Zebarjadi ³

1. Department of Plant Genetic and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Plant Improvement and Seed Production Center, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

Abstract

Hyperhydration is one of the most common physiological disorders *in vitro* conditions, leading to specific anatomical, morphological, physiological, and metabolic alterations. This study examines various methods to combat hyperhydration in regenerated plants derived from cucumber anthers cultures. The experiments included reducing relative humidity in culture vessels, decreasing the frequency of subculturing, lowering cytokinin concentrations, inducing root formation, increasing light intensity, bottom cooling, and altering the concentration of culture medium components. All experiments were conducted in a completely randomized design with three replications. Results indicated significant differences among treatments at the 1% level ($P \leq 0.01$). Root induction reduced hyperhydration by 70%, decreased cytokinin concentrations by 35%, increased light intensity by 30%, reduced subculture frequency to every 21 days by 25%, lowered relative humidity in culture vessels by 20%, bottom cooling by 2%, and altering the concentration of culture medium components by 1%. The findings suggested that the impact of one or multiple methods in mitigating hyperhydration may not always be consistent and depends on the genotype and plant species.

Keywords: Cucumber, Hyperhydration, Plant Growth Regulators, Regeneration

*Corresponding author: asadi.abzr@gmail.com



Introduction

Cucumber, an important plant in horticulture, is widely studied for its biological processes, including sex determination and gene transfer. Tissue culture techniques are crucial for various biotechnological studies but face challenges like hyperhydration, a prevalent physiological disorder *in vitro* cultivation. Hyperhydration leads to anatomical, morphological, physiological, and metabolic disruptions, affecting plant quality and acclimatization. Symptoms include altered cell structures, reduced chlorophyll, and compromised enzymatic activity. Mitigating hyperhydration involves adjusting environmental conditions and hormonal treatments, although not all methods are universally effective, highlighting the need for species-specific approaches in addressing this issue.

Materials and Methods

The preliminary stages of the experiment and cucumber plant regeneration from anther culture were carried out based on Asadi et al. (2018). After inducing regeneration, samples affected by hyperhydricity were separated from the other explants and placed in MS with 30 g/l sucrose and a pH of 5.75, according to Table 1.

The experiment used a completely randomized design with three replications (each culture flask as one replication). In this study, eight treatments reported in Table 1 were investigated. After applying the treatments, the number of plants with altered status was counted and recorded. Analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis, and the least significant difference (LSD) test was applied for comparing means. Excel 2016 and SPSS 26 software were used for data analysis.

Table 1- Different treatments to overcome the hyperhydricity in cucumbers regenerated plants by anther culture

Nu.	treatments	notes
1	Reducing humidity in the culture containers	The agar concentration increased to 9%, and filter containers ventilated the area.
2	Reducing the number of subcultures	Explants were sub-cultured every ten days, which changed to every 17 days.
3	Reducing cytokinin concentration	The plants regenerated on MS supplemented with 3 mg/L BAP and were then sub-cultured on MS without any plant growth regulators.
4	Root induction	For root induction, MS was supplemented with 0.2 mg/L IAA.
5	Increasing light intensity	The regenerated plants were exposed to 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ light
6	Cooling from the bottom of culture containers	Metal sheets were used under the cultivation containers.
7	Reducing the concentration of culture medium components	Substituting 1/2 MS macroelements instead of full-strength MS was implemented.
8	control	No treatments

Results and Discussion

The experiment demonstrated significant differences among treatments used to control and improve hyperhydricity in regenerated cucumber plantlets at a 1% significance level ($P \leq 0.01$). The comparison of means indicated that rooting was the most effective method for significantly improving plant health. Increasing light intensity and reducing subculture frequency also played important roles in enhancing plant growth conditions. Decreasing BAP concentration and relative humidity inside the culture vessels also had positive effects. Conversely, treatments such as bottom ventilation and altering other growth medium components did not show significant effects.

Two methods were employed to reduce relative humidity: increasing agar concentration and using containers with filter lids. These methods reduced hyperhydricity by approximately 10%, although no significant difference was observed from the control group. Increasing the subculture frequency increased hyperhydricity, while reducing the frequency decreased hyperhydricity rates. High concentrations of BAP contributed to increased hyperhydricity. Regenerated plants from combinations of 3 and 4 mg/L BAP with 0.05 mg/L NAA showed a 30% improvement when transferred to the plant growth regulator-free medium. Rooting with 0.2 mg/L IAA significantly reduced hyperhydricity by about 70%. Increasing the light intensity to 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ reduced hyperhydricity in 30% of regenerated plants. However, bottom ventilation, while showing improvement in 2% of samples, did not significantly differ from the control.

Conclusion

Overall, the results indicate that inducing rooting, precise regulation of growth regulators' type and concentration, increasing light intensity, reducing subculture frequency, and lowering relative humidity inside the culture vessels can significantly improve hyperhydricity. However, bottom ventilation and altering other growth medium components did not significantly impact. These findings suggest that achieving complete elimination of hyperhydricity may require additional methods depending on the genotype and species of the plant, necessitating further research in this area.

بررسی راهکارهای غلبه بر شیشه‌ای شدن در گیاهان باززا شده از کشت بساک‌های خیار

ابوذر اسدی^{۱*} و علیرضا زیرجدی^۲

۱. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذور، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

چکیده

شیشه‌ای شدن یکی از شایع‌ترین اختلالات فیزیولوژیکی در کشت درون شیشه‌ای است که در شرایط خاصی مانند رطوبت بالا، نور ناکافی، قند اضافی و نیترات ایجاد می‌شود. این اختلال سبب تغییرات آناتومیکی، ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان می‌شود. در پژوهشی جهت تولید گیاهان هاپلوئیدی با کشت بساک‌های خیار، تعداد زیادی از گیاهان باززا شده به شیشه‌ای شدن دچار شدند و شرایط طبیعی خود را از دست دادند. پژوهش حاضر در مورد بررسی روش‌های مختلف مقابله با شیشه‌ای شدن در گیاهان باززا شده حاصل از کشت بساک‌های خیار است. هشت تیمار شامل کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت، کاهش تعداد دفعات واکشت، کاهش غلظت سیتوکینین‌ها، القاء ریشه در ریزنمونه‌های باززا شده، افزایش شدت نور، سرمادهی از کف و کاهش غلظت اجزای محیط کشت در سه تکرار در قالب طرح کامل تصادفی روی گیاهان باززا شده انجام شد. نتایج نشان دادند بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. ریشه‌دار کردن گیاهان به میزان ۷۰٪، کاهش غلظت سیتوکینین‌ها ۳۵٪، افزایش شدت نور ۳۰٪، کاهش دفعات واکشت به هر ۲۱ روز ۲۵٪، کاهش رطوبت نسبی ۲۰٪، سرمادهی از کف ۲٪ و تغییر غلظت اجزای محیط کشت ۱٪ منجر به کاهش شیشه‌ای شدن شد. بنابراین به نظر می‌رسد که ممکن است استفاده از یک یا چند روش مذکور برای از بین بردن کامل شیشه‌ای شدن همیشه مؤثر نباشد و انتخاب روش مناسب به ژنوتیپ و گونه گیاهی وابسته است.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، شیشه‌ای شدن، خیار.

*Corresponding author: asadi.abzr@gmail.com



مقدمه

خیار بومی جنوب آسیا، گیاهی یکساله از گیاهان عالی گلدار، رده دولپه‌ای‌ها و از تیره کدوئیان است (Whitaker & Davis, 1962). این گیاه از سبزی‌های مهم اقتصادی در سراسر جهان و سیستم مناسبی برای بررسی بسیاری از فرآیندهای مهم زیستی مانند تعیین جنسیت (Tanurdzic & Banks, 2004) و انتقال ژن به هسته و اندامک‌ها (Alverson et al., 2011) است.

همچنین استفاده از تکنیک کشت بافت جهت ریز ازدیادی، تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئیدی و پرورش ریز نمونه‌های گیاهان جهت انجام پژوهش‌های مختلف بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن (Jesmin & Mian, 2016)، دستیابی به تنوع سوماکلونال (Jeyakumar & Kamaraj, 2015)، تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید (Asadi et al., 2018) در شرایط درون شیشه‌ای اجتناب‌ناپذیر است. با وجود این، عارضه شیشه‌ای شدن (Hyperhydricity, Vitricification, Glassiness) یکی از رایج‌ترین چالش‌های است که درباره کشت درون شیشه‌ای گیاهان وجود دارد. در واقع علی‌رغم کنترل نسبی بسیاری از عوامل مؤثر در شرایط درون شیشه‌ای، باز هم شرایط تنش وجود دارد و شیشه‌ای شدن یکی از نتایج این تنش‌ها است (Kharrazi et al., 2017; Polivanova & Bedarev, 2022).

شیشه‌ای شدن شایع‌ترین اختلال فیزیولوژیکی در کشت درون شیشه‌ای است. زمانی که گیاهان در معرض شرایط خاصی از جمله رطوبت بالا، نور ناکافی، قند اضافی و نیترا ت قرار می‌گیرند، می‌توانند منجر به ایجاد اختلالات آناتومیکی، ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و متابولیکی مشخص شوند (Hazarika, 2006) که شیشه‌ای شدن نام دارد. شیشه‌ای شدن استفاده از کشت سلولی و بافتی را در پژوهش‌ها به طور قابل توجهی پیچیده می‌کند، کارایی ریزازدیادی کلونال و کیفیت گیاهچه‌ها را کاهش می‌دهد، از سازگاری گیاهان در محیط بیرون جلوگیری می‌کند و

می‌تواند منجر به تلفات قابل توجهی در مواد گیاهی شود (Polivanova & Bedarev, 2022).

شیشه‌ای شدن با ساقه‌های ضخیم، میانگره‌های کوتاه و برگ‌های نیمه شفاف، شکننده، کشیده و پیچ خورده مشخص می‌شوند (Gaspar et al., 1995). سایر علائم شیشه‌ای شدن شامل کاهش کلروفیل، تجمع دانه‌های نشاسته بزرگ در پلاستیدها، هیدراتاسیون سلولی به علت وجود مایع اضافی در فضاهای بین سلولی، کاهش چسبندگی سلولی و تشکیل فضاهای بین سلولی بزرگ در مزوفیل، کاهش چوبی شدن دیواره سلولی (Hypolignification)، کاهش تشکیل لایه اپی کوتیکولی روی سطوح برگ، تغییر در فعالیت آنزیم و تغییر در سنتز پروتئین به علت اختلال در فرآیندهای متابولیک طبیعی است (Polivanova & Bedarev, 2022). همچنین گیاهان شیشه‌ای شده در مقایسه با گیاهان معمولی دارای غشاءها و ساختار سلولی آسیب دیده، ضخامت دیواره سلولی کاهش یافته، تعداد میتوکندری کاهش یافته، فضاهای بین سلولی بیشتر، واکوئلاسیون سلولی بالاتر و فروپاشی بافت‌های آوندی هستند (Gao et al., 2018).

در گیاهان شیشه‌ای شده تعداد سلول‌های روزنه و سلول‌های کوتیکول برگ کاهش یافته و سلول‌های مزوفیل برگ دارای واکوئل حجیمی می‌شوند. در این گیاهان برگ‌ها پهن، ترد و شکننده هستند و ظرفیت فتوسنتزی آن‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه احتمال زنده‌مانی این گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی طبیعی کاهش می‌یابد. شیشه‌ای شدن می‌تواند در شدت‌های مختلف اتفاق افتد (Hazarika & Bora, 2008; Leshem, 1983). اختلال در تبادلات گازی محیط کشت (Park et al., 2004) و فتوسنتز دو فرآیند فیزیولوژیکی اصلی هستند که سبب اختلالات ساختار بافت و تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان شیشه‌ای می‌شوند. سایر عوامل مؤثر در ایجاد این عارضه شامل استرس اکسیداتیو، اختلال در متابولیسم نیتروژن، عدم

تکمیل شده با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و اسیدیت ۵.۷۵ بر اساس جدول ۱ قرار گرفتند.

طرح آزمایشی مورد استفاده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار (هر شیشه کشت به عنوان یک تکرار) اجرا شد. در این پژوهش، هشت تیمار که در جدول ۱ ارائه شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفتند. حدود دو ماه پس از اعمال تیمارها، تعداد گیاهان تبدیل وضعیت یافته شمارش و ثبت شدند. لازم به ذکر است که ریزنمونه‌ها به جز در تیمار شماره ۲ (جدول ۱)، هر دو هفته یکبار واکشت شدند. پس از حدود سه هفته از آغاز آزمایش، بهبودی در وضعیت گیاهان در برخی تیمارها مشاهده شد. در زمان واکشت‌های بعدی، گیاهان بهبود یافته که دارای ریشه بودند، ثبت و فرآیند سازگاری روی آن‌ها انجام شد، در حالی که سایر گیاهان در همان وضعیت باقی ماندند. در نهایت، پس از حدود دو ماه از شروع آزمایش، تعداد کل گیاهان بهبود یافته شمارش شدند. برگ‌های جدید در گیاهان بهبود یافته، شرایط طبیعی داشتند، در حالی که گیاهان شیشه‌ای شده رفتارهای متفاوتی از خود نشان دادند که شامل باقی ماندن در همان وضعیت حتی پس از دو ماه از کشت، نکروزه شدن، رشد بسیار کند و شیشه‌ای بودن اندام‌های جدید بودند. در نهایت درصد گیاهان بهبود یافته محاسبه و مورد تجزیه آماری قرار گرفتند.

تعادل هورمون‌های درون‌زا، ترکیبات معدنی (Ziv et al., 1987) و هورمونی محیط (Kataeva et al., 1991; Pasqualetto et al., 1988) و شرایط کشت هستند (Polivanova & Bedarev, 2022).

بر اساس پژوهش‌ها، رویکردهای مختلفی جهت از بین بردن آب بیش از حد یا کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت از جمله تغییر ترکیبات معدنی و هورمونی محیط، استفاده از افزودنی‌های برون‌زا، سیستم‌های هوادهی و روشنایی خاص، افزایش فاصله واکشت‌ها و القاء ریشه در ریزنمونه‌های باززا شده پیشنهاد شده است. با وجود این، همه روش‌های مورد استفاده در از بین بردن علائم شیشه‌ای شدن کارایی لازم را در همه گیاهان ندارند. بنابراین، پژوهش شیشه‌ای شدن نیاز به یک رویکرد جامع دارد و اقداماتی که در جهت حذف آن انجام می‌شود باید خاص گونه باشد.

مواد و روش‌ها کشت بساک‌ها

مراحل مقدماتی آزمایش و باززایی گیاهان از کشت بساک‌ها شامل روش کار، مواد گیاهی، محیط‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر اساس دستورالعمل پیشنهادی توسط (Asadi & Seguí-Simarro, 2021) انجام شده است. بعد از القاء باززایی، نمونه‌های که شیشه‌ای شدند (شکل ۱)، از سایر ریزنمونه‌ها جدا شده و در محیط MS

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای غلبه بر عارضه شیشه‌ای در گیاهان باززا شده حاصل از کشت درون شیشه‌ای بساک‌های خیار

Nu.	treatments	notes
1	Reducing the amount of humidity in the culture containers	The agar concentration was increased to 8% and for better ventilation filter containers were used.
2	Reducing the number of subcultures	Explants were sub cultured every 14 days, which changed to every 21 days.
3	Reducing cytokinin concentrate ion	The plants regenerated on MS supplemented with 3 mg/l BAP and were then subcultured on MS without any plant growth regulators.
4	Root induction	For root induction MS supplemented with 0.2 mg/l IAA was used.
5	Increasing light intensity	The regenerated plants were exposed to 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ light instead of 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
6	Cooling from the bottom of culture containers	For cooling, metal sheets were used under the cultivation containers.
7	Reducing the concentration of culture medium components	The substitution of 1/2 MS macroelements instead of full-strength MS was implemented.
8	control	without treatments-based Asadi and Seguí-Simarro (2021)



شکل ۱ - نمونه‌ای از بافت‌های نشان‌دهنده عارضه شیشه‌ای شدن خیار

Figure 1. Hyperhydricity in regenerated plants from cucumber anther culture

روش‌های مؤثر بودند که به بهبودی گیاهان کمک کردند. در مقابل، برخی تیمارها مانند سرمادهی از کف و تغییر غلظت سایر اجزاء محیط کشت نتوانستند تأثیر معنی‌داری بر بهبود وضعیت گیاهان نسبت به شاهد داشته باشند. این نتایج نشان دادند هر یک از تیمارهای مختلف می‌توانند آثار متفاوتی بر کاهش شیشه‌ای شدن و بهبود سلامت ریزنمونه‌ها داشته باشند و انتخاب صحیح تیمارها می‌تواند به‌طور قابل توجهی عملکرد و سلامت آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد.

جدول ۲- تجزیه واریانس روش‌های مختلف غلبه بر عارضه شیشه‌ای شدن در خیارهای باززا شده حاصل از کشت بساک‌های خیار در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- ANOVA of different treatments to overcome the hyperhydricity in cucumbers regenerated plants by anther culture

S.O. V	df	میانگین مربعات
treatments	7	1638.7**
error	16	10.88
CV%	-	12.58

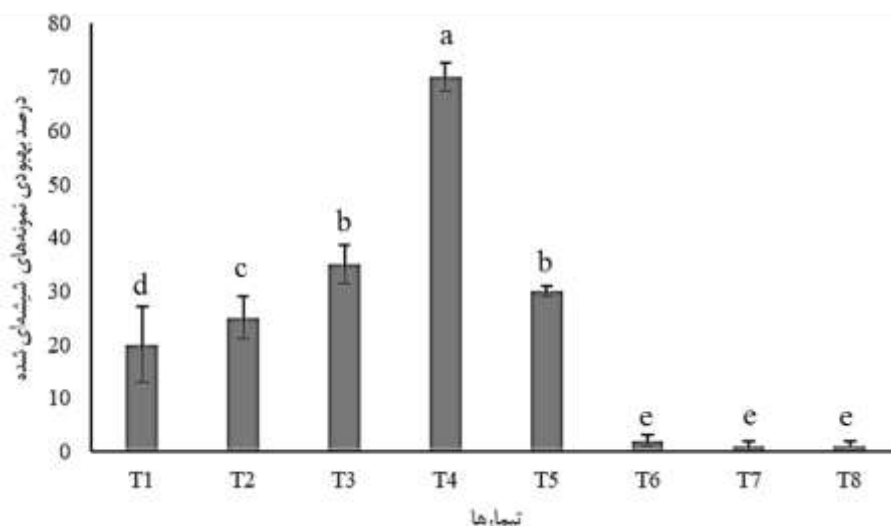
** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**Significant at %1 probability level

برای تجزیه و تحلیل آماری، از آزمون تجزیه واریانس و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) استفاده شد. همچنین از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ و SPSS v 26 برای ورود و تجزیه داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج گزارش شده در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) مشخص شد بین تیمارهای مورد استفاده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد که نشان دهنده مؤثر بودن تیمارها در کنترل و بهبود شیشه‌ای شدن ریز نمونه‌ها است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۲) نیز نشان دادند تیمارهای مختلف آثار متفاوتی در بهبود گیاهان شیشه‌ای شده داشتند. همچنین با توجه به شکل ۲، ریشه‌دار کردن ریز نمونه‌ها سبب افزایش سلامت گیاهان شیشه‌ای شده است و به‌طور قابل توجهی سلامت گیاهان را بهبود بخشید. از سوی دیگر، افزایش شدت نور و کاهش تعداد دفعات واکشت به‌عنوان دو روش مؤثر دیگر شناسایی شدند که نقش مهمی در بهبود وضعیت گیاهان داشتند. کاهش غلظت BAP و کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت نیز از دیگر



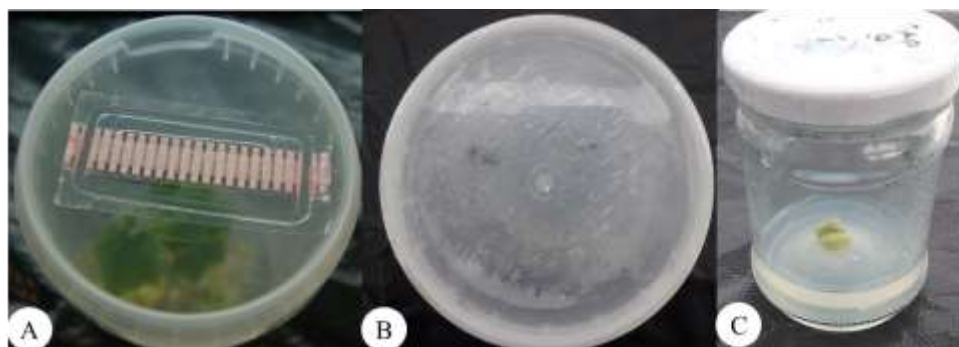
شکل ۲- مقایسه میانگین روش‌های مختلف غلبه بر عارضه شیشه‌ای شدن در خیارهای باززا شده حاصل از کشت بساک در شرایط درون شیشه‌ای؛ T₁ کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت، T₂ کاهش تعداد دفعات واکشت، T₃ کاهش غلظت سیتوکینین‌ها، T₄ القاء ریشه، T₅ شدت نور، T₆ سرمادهی از کف، T₇ تغییر غلظت سایر اجزاء محیط کشت و T₈ شاهد

Figure 2- Comparison of means of different methods to overcome the hyperhydricity in regenerated plants from cucumbers anther culture; T₁ decreases the relative humidity inside the culture containers, T₂ reduces the number of times of cultivation, T₃ reduces the concentration of cytokinin, T₄ root induction, T₅ light intensity, T₆ cooling from the floor, T₇ changing the concentration of other components of the culture medium and T₈ control

سلول‌ها می‌شود. از سوی دیگر، کاهش رطوبت نسبی سبب کاهش فشار آبی در بافت‌ها شده که مانع از تورم بیش از حد بافت‌ها و شیشه‌ای شدن آن‌ها می‌شود. همچنین کاهش رطوبت نسبی می‌تواند بر عملکرد روزنه‌ها و در نتیجه تبادلات گازی تأثیر گذاشته و مانع از تجمع بیش از حد آب در بافت‌ها شود. بطور کلی کاهش رطوبت نسبی محیط می‌تواند توسط همه یا برخی از این سازوکارها به کاهش شیشه‌ای شدن و بهبود شرایط رشد گیاهان کمک کند. در پژوهشی (Weathers & Correll 2001) گزارش کردند کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت از ۹۴٪ به ۷۰٪ منجر به کاهش میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها از ۷۰٪ به ۹٪ و افزایش وزن خشک بافت سالم از ۱۱٪ به ۲۵٪ شده است. هر چند این نتایج با نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری دارند ولی به نوعی آن‌ها را تأیید می‌کنند.

میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت

در پژوهش حاضر، جهت کاهش رطوبت نسبی دو اقدام انجام شد. در قدم اول غلظت آگار از ۷٪ به ۸٪ افزایش پیدا کرد و سپس از ظروف پلاستیکی با درب‌های فیلتردار که قابلیت تهویه دارند به جای ظروف شیشه‌ای بدون فیلتر استفاده شد (شکل ۳). کاهش رطوبت نسبی توانست منجر به کاهش حدود ۱۰٪ شیشه‌ای شدن شود، هر چند که با شاهد تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداد و بهبود قابل توجهی حاصل نشد. کاهش رطوبت نسبی می‌تواند با افزایش تعرق همراه باشد که در نتیجه آن، گیاهان آب بیشتری از دست می‌دهند و بنابراین کمتر دچار انباشت آب می‌شوند. کاهش فشار بخار آب در محیط سبب کاهش ورود آب به بافت‌های گیاهی می‌شود، که این امر می‌تواند تجمع آب در بافت‌ها را کاهش دهد. در شرایط رطوبت پائین‌تر، گیاهان به سازوکارهای تنظیم اسمزی بهتری دست پیدا می‌کنند که موجب بهبود تعادل آب و مواد معدنی در



شکل ۳- A- ظرف کشت پلاستیکی فیلتردار، B- ظرف پلاستیکی بدون فیلتر و C- ظرف شیشه‌ای بدون فیلتر

Figure 3- A- Plastic container with filter, B- Plastic container without filter and C- Glass container without filter

تعداد دفعات واکشت

با افزایش تعداد دفعات واکشت، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد و هنگامی که واکشت گیاهان در محیط کشت MS بیش از دو بار متوالی صورت گیرد، میزان رخداد این عارضه تشدید می‌شود (Vieitez et al., 1985). این پدیده احتمالاً ناشی از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درون سلول‌ها به علت استرس مکانیکی، تغییرات هورمونی، و برهم‌کنش‌های متابولیکی ناشی از محیط کشت است. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند واکشت مکرر می‌تواند منجر به کاهش سطوح فیتوهورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید (ABA) و افزایش سطوح سیتوکینین‌ها شود که به نوبه خود سبب افزایش محتوای آب در سلول‌ها و کاهش تشکیل دیواره سلولی مناسب می‌شود (Ziv, 1991). همچنین، انتقال متوالی به محیط‌های تازه می‌تواند ترکیب یونی و تعادل تغذیه‌ای ریزنمونه‌ها را تغییر داده و رشد غیرطبیعی و آبکی شدن بافت‌ها را تشدید کند.

در پژوهش حاضر، ریزنمونه‌ها هر ۱۲ تا ۱۴ روز واکشت می‌شدند، اما پس از مشاهده علائم شیشه‌ای شدن، مدت زمان واکشت به ۱۹ تا ۲۱ روز افزایش یافت. این تغییر احتمالاً به علت کاهش دفعات استرس ناشی از جابجایی و سازگاری بهتر ریزنمونه‌ها با محیط کشت بوده است. علاوه بر این، در واکشت‌های جدید، بافت‌های شیشه‌ای شده جدا شدند و فقط بخش‌های سالم به محیط جدید منتقل شدند.

این رویکرد نشان داد شیشه‌ای شدن در صورت حذف بافت‌های آسیب‌دیده و تعدیل شرایط کشت قابل پیشگیری است، زیرا برگ‌های جدید کاملاً سالم بودند. با این حال، هنگامی که کل بافت‌های شیشه‌ای واکشت شدند، حدود ۲۵٪ از آن‌ها بهبود یافتند. افزایش فاصله زمانی بین واکشت‌ها احتمالاً منجر به بهبود سازگاری فیزیولوژیکی گیاهان و کاهش تغییرات ناگهانی در محیط رشد می‌شود. این نتایج می‌توانند نشان‌دهنده پتانسیل بازیابی برخی از سلول‌های شیشه‌ای شده در شرایط کنترل‌شده، به علت تنظیم مجدد تعادل اسمزی و بهبود رشد در محیطی با ترکیب هورمونی و مواد مغذی بهینه باشند.

نوع تنظیم‌کننده رشد

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در وقوع یا کاهش پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند سیتوکینین‌ها مانند BAP سبب افزایش شیشه‌ای شدن می‌شوند، در حالی که اسید جیبرلیک (GA_3) به کاهش این پدیده کمک می‌کند (Ashnayi et al., 2012). علت افزایش شیشه‌ای شدن در اثر کاربرد سیتوکینین‌ها احتمالاً به علت افزایش تقسیم سلولی، افزایش محتوای آب در سلول‌ها، و کاهش لیگنینی شدن دیواره سلولی است که سبب تشکیل بافت‌های نرم و آبکی می‌شود (Ziv, 1991). در میان انواع مختلف سیتوکینین‌ها، BAP بیشترین تأثیر را در تشدید این پدیده نشان داد، به‌ویژه در زمانی که در غلظت‌های بالا (بیش از ۳

با توجه به اینکه شیشه‌ای شدن معمولاً به علت شرایط نامناسب محیط کشت مانند رطوبت زیاد، نور کم یا سطح بالای برخی هورمون‌ها رخ می‌دهد، این مشکل منجر به تغییرات فیزیولوژیکی در گیاهان می‌شود. این تغییرات شامل افزایش رطوبت در بافت‌های گیاهی، کاهش رشد سلولی طبیعی و به هم ریختن ساختار سلولی گیاه است (Kharrazi et al, 2017). با این حال، در پژوهش حاضر، ریشه‌دار کردن گیاهان سبب بهبود شرایط گیاهان شیشه‌ای شده است. به نظر می‌رسد که ریشه‌دار کردن گیاهان موجب افزایش فعالیت هورمون‌های خاص مانند اکسین‌ها، که در فرآیند ریشه‌زایی نقش دارند، و سیتوکینین‌ها می‌شود. این هورمون‌ها می‌توانند تعادل هورمونی گیاه را بهبود بخشیده و از تجمع بیش از حد هورمون‌هایی که سبب شیشه‌ای شدن می‌شوند، جلوگیری کنند. همچنین، ریشه‌دار شدن منجر به بهبود جذب آب و مواد معدنی توسط ریشه‌ها می‌شود. این امر می‌تواند به تنظیم بهتر تعادل آب در گیاه کمک کند و از افزایش غیرطبیعی رطوبت در بافت‌های برگ و ساقه جلوگیری نماید. ریشه‌دار شدن می‌تواند تحریک رشد سلول‌های جدید در گیاه را به همراه داشته باشد که موجب بهبود ساختار بافت‌ها و کاهش اثرات شیشه‌ای شدن می‌شود. ریشه‌ها به عنوان مسیر اصلی جذب مواد غذایی و آب عمل کرده و موجب تقویت رشد طبیعی گیاه می‌شوند، در نتیجه می‌تواند گیاه را به شرایط طبیعی‌تر و متعادل‌تری بازگرداند و از شرایط تنش‌زا دور کند. این فرآیند از نظر متابولیکی و فیزیولوژیکی به گیاه کمک می‌کند تا از شرایط شیشه‌ای شدن خارج شود و به رشد طبیعی خود ادامه دهد. در نهایت، ریشه‌دار شدن گیاه ممکن است موجب افزایش فعالیت سیستم تنفسی گیاه شود که این امر می‌تواند به بهبود تنفس سلولی و کاهش مشکلات متابولیکی ناشی از شیشه‌ای شدن کمک کند.

میلی گرم در لیتر) استفاده شود. در پژوهش حاضر، گیاهان باززا شده در محیط حاوی BAP با غلظت‌های ۳ و ۴ میلی گرم بر لیتر، به همراه ۰.۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA القا شدند. این ترکیب هورمونی احتمالاً یکی از دلایل اصلی شیشه‌ای شدن در نمونه‌ها بوده است، زیرا نسبت بالای سیتوکینین به اکسین تعادل رشد را به نفع تقسیم سلولی شدید و افزایش آب‌دوستی سلول‌ها تغییر می‌دهد.

برای کاهش میزان شیشه‌ای شدن، گیاهان باززا شده در محیط‌های پایه بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی واکشت شدند. در برخی از نمونه‌ها، میزان شیشه‌ای شدن کاهش یافت، اما این کاهش قابل توجه نبود. به طور کلی، حدود ۳۰٪ از گیاهان توانستند این عارضه را تا حدی بهبود دهند. این نتایج تأیید می‌کنند که غلظت بالای BAP یکی از عوامل مهم در ایجاد شیشه‌ای شدن است و تنظیم دقیق نسبت سیتوکینین به اکسین می‌تواند به کنترل این پدیده کمک کند. همچنین، واکشت گیاهان به محیط‌های بدون هورمون ممکن است در برخی موارد به کاهش این عارضه کمک کند، اما اثربخشی آن محدود است و باید همراه با سایر اصلاحات محیطی و فیزیولوژیکی انجام شود.

القاء ریشه

هر چند ریشه در برخی از گیاهان باززا شده شیشه‌ای شده بود، اما در گیاهان باززا شده که عارضه شیشه‌ای شدن را نشان دادند القاء نشد، بنابراین برای القای ریشه در این گیاهان از غلظت ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IAA استفاده شد. القای ریشه بعد از حدود یک هفته از کشت در این گیاهان صورت گرفت و بعد به طور معنی‌داری سبب کاهش پدیده شیشه‌ای شدن در این گیاهان شد، به صورتی که برگ‌های جدید سالم و طبیعی بودند. بطور کلی شیشه‌ای شدن در حدود ۷۰٪ از نمونه‌های برطرف شد. با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، به نظر می‌رسد کشت نمونه‌ها در غلظت‌های پائین اکسین و ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها می‌تواند در برطرف کردن پدیده شیشه‌ای شدن مؤثر باشد.

شدت نور

نور یکی از عوامل محیطی مهم در تنظیم رشد گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای است. شدت و کیفیت نور می‌تواند بر فتوسنتز، تشکیل رنگیزه‌ها، تنظیم تعادل آب و استحکام دیواره سلولی تأثیر بگذارد. در مرحله‌ی القایی باززایی، نمونه‌های مورد بررسی، ابتدا در تاریکی یا نور کم قرار گرفتند. این شرایط می‌تواند منجر به کاهش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل و کاروتنوئیدها شده و در نتیجه، گیاهان رنگ‌پریده و حساس به شرایط نوری شوند. پس از این مرحله، نمونه‌ها به محیطی با شدت نور ۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل شدند. برخی از نمونه‌ها که در ابتدا فاقد رنگ بودند، پس از قرارگیری در این شرایط، شروع به تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی کردند که این امر سبب افزایش فعالیت فتوسنتزی، تقویت دیواره سلولی، و کاهش محتوای آب اضافی در سلول‌ها شد. در نتیجه، ۳۰٪ از گیاهان باززا شده دچار کاهش عارضه شیشه‌ای شدن شدند. پژوهش‌های قبلی نیز این یافته را تأیید می‌کنند. (Correll & Weathers 2001) در پژوهشی نشان دادند افزایش شدت نور از ۶۵ به ۱۴۵ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه، همراه با افزایش غلظت دی‌اکسید کربن، سبب افزایش وزن خشک بافت‌های سالم از ۱۷٪ به ۲۵٪ شد. این نتیجه نشان داد شدت نور بالاتر، در کنار دسترسی کافی به CO₂، می‌تواند رشد سلولی را بهبود داده و از ایجاد بافت‌های نرم و آبکی که ویژگی شیشه‌ای شدن هستند، جلوگیری کند. سازوکار احتمالی کاهش شیشه‌ای شدن در اثر افزایش شدت نور می‌تواند به دلایلی از جمله افزایش تولید مواد فتوسنتزی و کاهش وابستگی گیاه به قندهای محلول محیط کشت، تقویت استحکام دیواره سلولی و کاهش جذب بیش از حد آب و ایجاد تعادل اسمزی و جلوگیری از تجمع غیرعادی آب در بافت‌ها باشد. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان دادند تنظیم شدت نور در مراحل مختلف رشد می‌تواند یکی از راهکارهای مؤثر برای کاهش شیشه‌ای شدن باشد. قرار دادن گیاهان در محیط‌های

کم‌نور در مرحله‌ی القاء ممکن است برای شروع فرآیند باززایی لازم باشد، اما افزایش تدریجی شدت نور پس از این مرحله می‌تواند به بهبود وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان کمک کند. همچنین، ترکیب شدت نور بالا با افزایش غلظت CO₂ ممکن است تأثیرات مثبتی بر کاهش این عارضه داشته باشد.

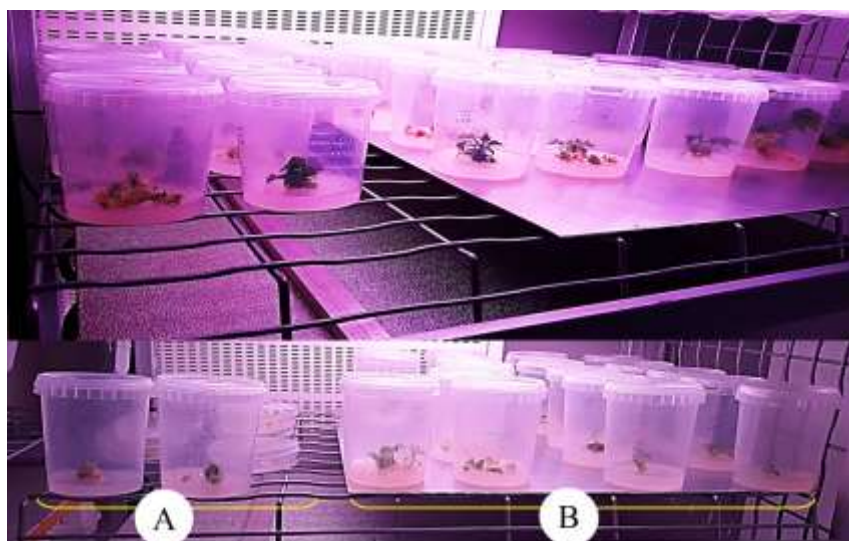
سرمادهی از کف

سرمادهی از کف (Bottom Cooling) یکی از روش‌های محیطی است که در برخی از پژوهش‌ها جهت کاهش شیشه‌ای شدن در کشت درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. این روش با تأثیر بر تعادل آب و تنظیم دمای ریشه و محیط کشت، می‌تواند سبب کاهش بروز این عارضه شود. در پژوهشی بر روی میخک گزارش شد که این روش سبب کاهش قابل توجهی در تعداد شاخساره‌های شیشه‌ای شده است (Saher et al., 2005). در پژوهش حاضر، برای اعمال سرمادهی از کف، از ورقه‌های فلزی به‌عنوان سطح سردکننده استفاده شد و کشت‌ها روی صفحه‌ی فلزی نگهداری شدند (شکل ۴B). همچنین، برخی از نمونه‌ها روی صفحات شبکه‌ای قرار گرفتند (شکل ۴A) تا آثار احتمالی تفاوت در توزیع دما و تهویه بررسی شود. هر چند در ۲٪ از نمونه‌ها بهبودی مشاهده شد، اما تفاوت معنی‌داری بین دو روش مشاهده نشد.

یکی از عوامل اصلی شیشه‌ای شدن، جذب بیش از حد آب توسط بافت‌هاست. سرمای اعمال‌شده از کف می‌تواند میزان تعرق را کاهش داده و در نتیجه، جذب غیرضروری آب را کنترل کند. این پژوهش نشان داد سرمادهی از کف، تأثیر جزئی در کاهش شیشه‌ای شدن دارد. احتمالاً میزان و روش اعمال دما، ترکیب آن با سایر عوامل محیطی (مانند شدت نور و ترکیب مواد غذایی)، و ویژگی‌های فیزیولوژیکی گونه مورد بررسی، در تعیین میزان موفقیت این روش نقش دارند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیشتر در مورد شدت و مدت‌زمان سرمادهی،

سایر راهکارهای کاهش شیشه‌ای شدن انجام شود.

تأثیر آن بر تعادل رطوبتی محیط کشت، و ترکیب آن با



شکل ۴- A- گیاهان باززا شده خیار روی صفحه مشبک و B- روی صفحه فلزی به منظور سرمادهی از کف

Figure 4- Cucurbit regenerated plants from anthers culture; A- on a mesh plate and B- on a metal plate for cooling from the floor

تغییر غلظت اجزاء محیط کشت

تغییر در غلظت عناصر معدنی می‌تواند بر تعادل اسمزی و جذب آب بر میزان شیشه‌ای شدن تأثیر بگذارد. برخی پژوهش‌ها نشان دادند کاهش غلظت محیط کشت می‌تواند شیشه‌ای شدن را کاهش دهد (Ziv, 1991). در این آزمایش، برای بررسی تأثیر تغییر غلظت مواد مغذی بر کاهش شیشه‌ای شدن، محیط‌های $MS \frac{1}{2}$ و $MS \frac{1}{4}$ به عنوان تیمار و محیط MS کامل به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نتایج نشان دادند تفاوت معنی‌داری بین این محیط‌ها از نظر کاهش عارضه‌ی شیشه‌ای شدن وجود ندارد. کاهش غلظت محیط ممکن است رشد ریشه و در نتیجه تأمین متعادل مواد غذایی را در بخش‌های هوایی گیاه تحت تأثیر قرار دهد. با این حال، در این آزمایش چنین تفاوتی بین محیط‌های مختلف مشاهده نشد. عدم مشاهده‌ی تفاوت معنی‌دار بین محیط‌های $\frac{1}{2}$ و $MS \frac{1}{4}$ با MS کامل نشان دادند کاهش کلی غلظت مواد مغذی به تنهایی برای کاهش شیشه‌ای شدن کافی نیست. به نظر می‌رسد که بررسی تغییرات در ترکیب خاصی از یون‌ها (مانند کاهش آمونیوم و افزایش نیترات) ممکن است نتایج متفاوتی ارائه دهد.

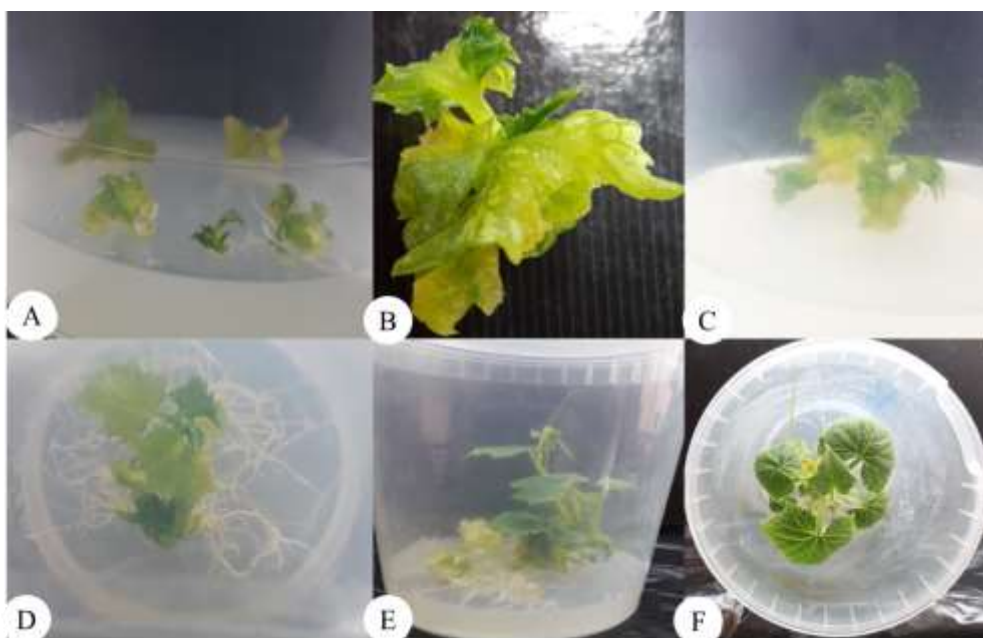
افزودن ترکیبات اسمولیت مانند پلی‌اتیلن گلیکول یا سوربیتول به محیط کشت می‌تواند به کاهش آبریزی بیش از حد و کاهش شیشه‌ای شدن کمک کند که توصیه می‌شود در پژوهش‌های آینده مورد استفاده قرار گیرند.

روند بهبودی گیاهان دچار عارضه‌ی شیشه‌ای شدن در شکل ۵ نشان داده شده است. بطور کلی در بین روش‌های مورد استفاده در این آزمایش برای بهبود مشکل شیشه‌ای شدن در گیاهان باززا شده، نگهداری ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های پائین اکسین (مثلاً 0.2 میلی گرم در لیتر IAA) مؤثر واقع شد. اکسین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد، در کنترل تقسیم سلولی، کشیدگی سلول‌ها، و توسعه‌ی بافت‌ها نقش دارند. افزایش میزان اکسین می‌تواند دیواره سلولی را ضخیم‌تر کند و موجب کاهش جذب بیش از حد آب شود که یکی از عوامل اصلی شیشه‌ای شدن محسوب می‌شود (George et al., 2007). همچنین ریشه‌دار شدن سبب تنظیم تبادلات آبی و کاهش آبریزی بیش از حد بافت‌های هوایی می‌شود و می‌تواند شیشه‌ای شدن را تحت تأثیر قرار دهد. با این حال در پژوهش حاضر،

منجر به اختلال در متابولیسم گیاه می‌شوند و سبب اختلالات آناتومیکی می‌شوند. همچنین سیتوکینین بیش از حد سبب افزایش بیوسنتز اتیلن می‌شود. استفاده از یک یا چند روش فوق برای از بین بردن شیشه‌ای شدن همیشه موثر نیست. انواع مختلف گیاهان ممکن است به محیط و شرایط کشت خاصی نیاز داشته باشند. در این راستا، شیشه‌ای شدن گونه‌های منفرد باید به صورت جداگانه و جامع مورد بررسی قرار گیرد و رویکردهای حذف آن باید پیچیده و خاص گونه باشد (Polivanova & Bedarev, 2022).

به علت عدم بررسی جداگانه‌ی این دو عامل (افزایش اکسین در مقابل القای ریشه)، تشخیص دقیق سازوکار مؤثر در بهبود شیشه‌ای شدن ممکن نبود.

اختلالات مرتبط با شیشه‌ای شدن عمدتاً در برگ‌ها و همچنین در ساقه و ریشه ظاهر می‌شود. شیشه‌ای شدن یک اختلال فیزیولوژیکی است که تحت تأثیر بسیاری از عوامل مرتبط است. یک محیط مایع سبب جذب رطوبت اضافی می‌شود که در فضاهای بین سلولی تجمع می‌یابد و تبادل گاز را مختل می‌کند و منجر به هیپوکسی و استرس اکسیداتیو می‌شود. یون‌های آمونیوم در غلظت‌های بالا



شکل ۵- روند بهبودی گیاهان خیار شیشه‌ای شده؛ A- گیاهان شیشه‌ای شده، B- بهبودی نسبی در برگ‌های جدید، C و D، تولید ساقه و برگ‌های تقریباً سالم، E - رشد گیاهان بهبود یافته و عدم رشد سایر ریزنمونه‌ها و F- گیاه کاملاً سالم و نجات یافته

Fig 5- Recovery of hyperhydric cucumber plants; A- hyperhydric plants, B- partial recovery in new leaves, C, and E, production of almost healthy stems and leaves, D- improved plant growth and lack of development in other explants, and F- completely healthy and recovered plants

جمع بندی

براساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، تفاوت‌های معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در کنترل و بهبود شیشه‌ای شدن ریز نمونه‌ها و بهبود سلامت گیاهان مشاهده شد. شیشه‌ای شدن به عنوان یک اختلال فیزیولوژیکی تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد. در پژوهش حاضر، القای ریشه در ریز نمونه‌ها به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌ها در

بهبود سلامت گیاهان شناسایی شد. همچنین، به نظر می‌رسد نوع تنظیم‌کننده رشد تأثیر بسزایی در پدیده شیشه‌ای شدن داشته باشد، به‌طوری که استفاده بیشتر از BAP ممکن است سبب تشدید این پدیده شود. افزایش شدت نور، کاهش تعداد دفعات واکشت و کاهش رطوبت نسبی درون ظروف کشت نیز بهبود قابل توجهی در وضعیت گیاهان ایجاد

سپاسگزاری

از پروفسور خوزِ ماریا سِگی سیمارو، موسسه حفاظت و بهبود تنوع زراعی (COMAV) و دانشگاه پلی تکنیک والنسیا بخاطر کمک در بخش‌های مقدماتی این پژوهش تشکر می‌شود.

کرده است. در مقابل، سرمادهی از کف و تغییر غلظت سایر اجزاء محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر بهبود وضعیت گیاهان نداشتند. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تنظیم دقیق محیط کشت و استفاده از روش‌های مؤثر می‌تواند بهبود قابل توجهی در وضعیت گیاهان شیشه‌ای شده فراهم کند، هرچند نیاز به پژوهش‌های بیشتری در این زمینه همچنان وجود دارد.

References

- Alverson, A. J., Rice, D. W., Dickinson, S., Barry, K., & Palmer, J. D. (2011). Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber. *The Plant Cell*, 23(7), 2499-2513. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087189>
- Asadi, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2021). Production of doubled haploid plants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through anther culture. *Doubled Haploid Technology: Emerging Tools, Cucurbits, Trees, Other Species*, 71-85. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1331-3_4
- Asadi, A., Zebarjadi, A., Abdollahi, M. R., & Seguí-Simarro, J. M. (2018). Assessment of different anther culture approaches to produce doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 214(11), 216. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2297-x>
- Ashnayi, M., Kharrazi, M., Sharifi, A., & Mehrvar, M. (2012). Carnation etched ring virus elimination through shoot tip culture. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(17), 175-180. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/497519>
- Correll, M., & Weathers, P. (2001). Effects of light, CO₂ and humidity on carnation growth, hyperhydration and cuticular wax development in a mist reactor. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 37(3), 405-413. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0071-5>
- Gao, H., Li, J., Ji, H., An, L., & Xia, X. (2018). Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 133, 65-76. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1361-x>
- Gaspar, T., Kevers, C., Franck, T., Bisbis, B., Billard, J. P., Huault, C., Le Dily, F., Petit-Paly, G., Rideau, M., & Penel, C. (1995). Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 21(2-3), 80-97. http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/wp-content/uploads/2011/06/95_2-3_80-97.pdf
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2007). *Plant propagation by tissue culture*. (Ed.), Springer Science and Business Media. (Vol. 1, pp. 501). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Hazarika, B. (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia horticulturae*, 108(2), 105-120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- Hazarika, B., & Bora, A. (2008). Hyperhydricity-A bottleneck to micropropagation of plants. In *IV International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants* 865 (pp. 95-101). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.865.11>
- Jesmin, R., & Mian, M. A. K. (2016). Callus induction and efficient plant regeneration in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 9(2), 796-803. <https://doi.org/10.18801/jbar.090216.96>
- Jeyakumar, J. J., & Kamaraj, M. (2015). Direct organogenesis of hypocotyl explants from in vitro seedlings of *Cucumis Anguria* L.

- Global Journal of Biology Agriculture and Health Science*, 4, 24-27. <https://B2n.ir/s87319>
- Kataeva, N. V., Alexandrova, I. G., Butenko, R. G., & Dragavtceva, E. V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 27, 149-154. <https://doi.org/10.1007/BF00041283>
- Kharrazi, M., Tehranifar, A., Nemati, H., Bagheri, A., & Sharifi, A. (2017). Factors affecting plant tissue hyperhydricity at *in vitro* culture and strategies to resolve it case study: (*Dianthus caryophyllus* L.). *Flower and Ornamental Plants*, 1(2), 85-95. http://flowerjournal.ir/browse.php?a_id=117&sid=1&slc_lang=en [In Persian].
- Leshem, B. (1983). Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Annals of Botany*, 52(3), 413-415. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086591>
- Park, S., Jeon, J. H., Kim, H. S., Park, Y., Aswath, C., & Joung, H. (2004). Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 99(2), 199-205. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00097-9)
- Pasqualetto, P. L., Zimmerman, R., & Fordham, I. (1988). The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 31-40. <https://doi.org/10.1007/BF00029573>
- Polivanova, O. B., & Bedarev, V. A. (2022). Hyperhydricity in plant tissue culture. *Plants*, 11(23), 3313. <https://doi.org/10.3390/plants11233313>
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., & Olmos, E. (2005). Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2), 149-158. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-4043-4>
- Tanurdzic, M., & Banks, J. A. (2004). Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell*, 16(1), 61-71. <https://doi.org/10.1105/tpc.016667>
- Vieitez, A., Ballester, A., San-José, M., & Vieitez, E. (1985). Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum*, 65(2), 177-184. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb02379.x>
- Whitaker, T. W., & Davis, G. N. (1962). *Cucurbits*. Leonard Hill Books Ltd.
- Ziv, M., Schwartz, A., & Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science*, 52(1-2), 127-134. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90114-2](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90114-2)
- Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. (Ed.), *Micropropagation*, (pp.45-69). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_4