

# CenH3 Centromeric Histone Gene Editing in Cucumber Using CRISPR Technology

Vasighi<sup>1</sup>, H., Mirzaie-Asl<sup>2\*</sup>, A. and Abdollahi<sup>3</sup>, M. R.

1 and 2. PhD Graduated and Associate Professor, Respectively, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

3. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

\*: Corresponding Author

Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

Received: 2025/05/12

Accepted: 2025/08/10

## Introduction

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is one of the most economically important crops among the *Cucurbitaceae* family. The development of high-quality hybrid cucumber varieties has greatly contributed to early maturity, enhanced drought resistance, better fruit uniformity, and increased yield. These hybrids are typically produced using homozygous pure lines, which are traditionally generated through recurrent selfing over multiple generations—a time-consuming and labor-intensive process. However, recent advances in genome editing have introduced a transformative pathway: the induction of haploids and doubled haploids, offering a rapid route to completely homozygous lines within one or two generations. While haploid and doubled haploid production has been reported in various crop species, the *Cucurbitaceae* family has lagged behind, with only limited successful applications of CRISPR/Cas9 technology for haploid induction. In particular, the application of CRISPR to target the centromeric histone H3 gene (CenH3), a gene with a pivotal role in chromosome segregation during cell division, remains largely unexplored in cucumber. This study aimed to investigate the feasibility of using CRISPR/Cas9 to induce targeted mutations in the CenH3 gene in cucumber. The long-term objective was to assess whether such mutations could serve as a basis for developing haploid inducer lines—a vital tool in modern cucumber breeding programs.

## Materials and Methods

To design a targeted genome editing construct, CenH3 sequences from cucumber and *Arabidopsis thaliana* were aligned using the Histone Database (HPD). A conserved motif (ALQEAAE) within the histone fold domain was identified, and a specific guide RNA (gRNA) targeting the alanine codon within this region was selected. The corresponding single-guide RNA (sgRNA) was cloned into the pDE-Cas9 vector, which was subsequently introduced into *Agrobacterium rhizogenes* to facilitate plant transformation. A composite plant system was employed, whereby cucumber seedlings were inoculated with *A. rhizogenes* carrying the CRISPR construct. Hairy root formation was induced, and genomic DNA was extracted from transformed root tissues. PCR amplification and DNA sequencing were used to confirm the presence of the CRISPR construct and to detect mutations in the target site of the CenH3 gene.

## Results

From a total of 700 inoculated cucumber explants, approximately 70% developed hairy roots. PCR screening confirmed successful integration of the CRISPR/Cas9 construct in 10 samples. DNA sequencing of three positive samples revealed three distinct mutations in the CenH3 gene, all within 11 nucleotides of the protospacer adjacent motif (PAM) site. These mutations included single nucleotide substitutions leading to either amino acid changes or silent mutations. Notably, one of the detected mutations resulted in a T-to-G transition, changing a codon encoding phenylalanine to serine, while another induced a thymine-to-adenine transition, modifying the encoded tyrosine. A third mutation occurred but did not alter the amino acid sequence. All mutations were located in close proximity to the PAM site, which is consistent with known CRISPR/Cas9 cleavage patterns.

## Discussion

This study represents the first successful application of CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the CenH3 gene in cucumber. The induced mutations, although not immediately lethal, demonstrate the potential of CenH3 as a target for haploid induction. Prior studies in other species, such as carrot and *Arabidopsis*, have shown that mutations in CenH3 can lead to genome elimination and the generation of haploid progeny. However, the high resistance of cucumber to haploid induction—possibly due to the gene structure and the scarcity of optimal PAM sites—presents a significant challenge. The limited number of targetable sites near the functional domain of CenH3 in cucumber contrasts with more flexible systems in crops like carrot, where diverse guide RNAs can be designed for efficient cleavage. This underscores the importance of identifying alternative CRISPR systems or engineering novel PAM recognition variants to enhance editing efficiency in cucurbits. Despite the technical success in generating targeted CenH3 mutations, the study could not confirm haploid induction in the transformed cucumber plants. Nevertheless, the results open new

## Vasighi *et al.*, CenH3 Centromeric Histone Gene Editing in...

avenues for future research into optimizing transformation systems and testing the phenotypic consequences of CenH3 disruption in subsequent generations.

### Conclusion

This research provides a proof-of-concept for CRISPR/Cas9-mediated editing of the CenH3 gene in cucumber, laying the groundwork for potential development of haploid inducer lines in Cucurbitaceae. The successful induction of three mutations in the target gene suggests that, with further optimization, this strategy may be harnessed to accelerate cucumber breeding programs. Given the challenges in achieving effective PAM positioning and the essential role of CenH3 in cell viability, alternative CRISPR systems or multiplexed editing approaches may be necessary to enhance the haploid induction efficiency in this recalcitrant species.

### Acknowledgements

This research was conducted under the financial and moral support of the Agricultural Biotechnology Laboratory, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University.

**Keywords:** CRISPR, Haploid Induction, Doubled Haploids, *Cucurbitaceae*

**Citations:** Vasighi, H., Mirzaie-Asl, A. and Abdollahi, M. R. (2026). CenH3 Centromeric Histone Gene Editing in Cucumber Using CRISPR Technology, *Plant Production Technology*, 25(2), 1-12.

<https://doi.org/10.22084/ppt.2025.30966.2161>

© 2025 The Author(s). Bu- Ali Sina University Publication. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Online ISSN:** 2476-5651

**Print ISSN:** 2476-6321

## ویرایش ژن هیستون سانترومری *CenH3* در گیاه خیار با استفاده از فن آوری کریسپر

### CenH3 Centromeric Histone Gene Editing in Cucumber Using CRISPR Technology

حسین وثیقی معراجی<sup>۱</sup>، اصغر میرزایی اصل<sup>۲\*</sup> و محمدرضا عبدالهی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹

(مقاله پژوهشی)

#### چکیده

ارقام هیبرید خیار برای زودرسی، مقاومت به خشکی، افزایش عملکرد، یکنواختی شکل میوه، اندازه، رنگ، کیفیت بهتر محصول و پارتنوکاری معرفی می‌شوند. لاین‌های خالص به‌عنوان والدین در تولید ارقام هیبرید به‌کار می‌روند. القای هاپلوئیدی برای تولید لاین‌های خالص با استفاده از ویرایش ژنومی، یک پیشرفت اساسی است که می‌تواند منجر به توسعه مسیرهای جدید برای به‌نژادی کدوئیان شود. گزارش‌هایی از تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید و استفاده از فن‌آوری CRISPR/Cas9 در برخی از گونه‌های گیاهی وجود دارد. با این حال به جز یک مورد، از سیستم القاکننده هاپلوئیدی با استفاده از ویرایش ژنومی در کدوئیان استفاده نشده است. هدف از این پژوهش ایجاد جهش در ژن *CenH3* گیاه خیار توسط سیستم CRISPR/Cas9 و گشودن مسیری برای توسعه لاین‌های القاکننده هاپلوئیدی بود. بدین منظور ابتدا توالی راهنما با توجه به توالی ژن *CenH3* در خیار طراحی و در ناقل pDE-Cas9 درج شد. سپس با استفاده از باکتری ریزوژنز به گیاه خیار منتقل شد. از بین نمونه‌ها آن‌هایی که سازه را با موفقیت دریافت کرده بودند توالی‌یابی شدند. سه جهش در ژن *CenH3* در ریشه مویین خیار شناسایی شد. دو جهش در فاصله سه و یک جهش در فاصله ۱۱ نوکلئوتیدی از نقطه PAM قرار داشتند. برای اولین بار در این پژوهش در ژن *CenH3* خیار جهش غیرکشنده ایجاد شد که می‌تواند راه را برای تولید القاکننده‌های هاپلوئیدی هموار سازد.

واژه‌های کلیدی: کریسپر، القای هاپلوئیدی، دابل هاپلوئیدی، کدوئیان

ارجاع به مقاله: وثیقی معراجی، ح، میرزایی اصل، ا. و عبدالهی، م. ر. (۱۴۰۴). ویرایش ژن هیستون سانترومری *CenH3* در گیاه خیار با استفاده از فن‌آوری

کریسپر، مجله فناوری تولیدات گیاهی، ۲۵(۲)، ۱-۱۲. <https://doi.org/10.22084/ppt.2025.30966.2161/>

حق نشر متعلق به نویسنده (گان) است و نویسنده تحت مجوز Commons Creative License

Attribution (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) به مجله اجازه می‌دهد مقاله‌ی چاپ شده را در

سامانه به اشتراک بگذارد، منوط بر اینکه حقوق مؤلف اثر حفظ و به انتشار اولیه مقاله در این مجله اشاره شود.



شاپا چاپی: ۲۴۷۶-۶۳۲۱

شاپا الکترونیکی: ۲۴۷۶-۵۶۵۱

۱ و ۲. به ترتیب فارغ‌التحصیل دکتری و دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

## ۱. مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. یکی از گونه‌های مهم خانواده‌ی کدوئیان<sup>۱</sup> است. میزان تولید سالانه این محصول در سال ۲۰۲۳، حدود ۹۸ میلیون تن و سطح زیر کشت آن دو و نیم میلیون هکتار بوده است (FAO, 2023). گیاه خیار یکی از ۱۰ سبزی مهم دنیا است. این محصول بیشتر در محیط‌های گلخانه‌ای کشت می‌شود (Wang et al., 2021). خیار دارای آب بالا و محتوی چربی، کلسترول و سدیم پایین است و منبع خوبی از مواد معدنی است. همچنین دارای ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضد میکروبی، قارچ‌کشی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی است (Jat et al., 2021; Obel et al., 2018). از خیار به‌عنوان مدل اولیه در پژوهش‌های تشخیص جنسیت و ساختار و کارکرد سیستم آوندی استفاده می‌شود. تولید ارقام پارتنوکارپ و ارقامی که فقط گل ماده تولید می‌کنند از جمله ویژگی‌های اصلاحی ارقام گلخانه‌ای خیار هستند (Jat et al., 2021). خیار گیاهی دیپلوئید ( $2n=2x=14$ ) است. لاین‌های خالص به‌عنوان والدین در تولید گیاهان هیبرید به کار می‌روند و از این نظر ارزشمند هستند. در حال حاضر دو روش اصلی برای تولید لاین‌های کاملاً هموزیگوس در کدویان، به‌نژادی کلاسیک و ایجاد دابل‌هاپلوئیدها<sup>۲</sup> است. به‌نژادی کلاسیک نیاز به چندین دوره (هشت تا ۱۰ نسل) خودگشتی و انتخاب دارد. درحالی‌که دابل‌هاپلوئیدی امکان ایجاد لاین‌های کاملاً هموزیگوس را در کمتر از دو سال فراهم می‌کند (Hooghvorst et al., 2021). دابل‌هاپلوئیدها به‌صورت گسترده در ایجاد لاین‌های پایدار هموزیگوس، به‌عنوان لاین‌های والدینی در تولید هیبریدهای  $F_1$  به‌کار رفته‌اند (Forster et al., 2007). پارتنوژنز روش غالب در ایجاد دابل‌هاپلوئیدها در خیار، خربزه، هندوانه و کدوتنبل است (Dong et al., 2016). روش دابل‌هاپلوئیدی پارتنوژنیک در کدوئیان شامل دو مرحله اصلی است. در مرحله اول گیاه اولیه هاپلوئید با استفاده از گرده‌افشانی با گرده‌های مورد تابش قرار گرفته در طی پارتنوژنز تولید می‌شود و در مرحله دوم کروموزوم‌های گیاه هاپلوئید دوبرابر می‌شود تا امکان تولید بذر دابل‌هاپلوئید فراهم شود. پارتنوژنز در کدویان با مشکلات و محدودیت‌هایی

همراه است که می‌تواند تولید لاین‌های دابل‌هاپلوئید را با چالش‌هایی همراه سازد. از جمله این مشکلات می‌توان وابستگی بالا به ژنوتیپ، تشکیل میوه ضعیف، شناسایی جنین‌های پارتنوژنتیک، میزان پایین تولید جنین پارتنوژنتیک، باززایی کشت درون‌شیشه‌ای، نرخ مرگ بالای گیاهان پارتنوژنتیک در طی کشت درون‌شیشه‌ای و بعد از تیمار دوبرابر شدن کروموزوم‌ها، نرخ پایین دوبرابر شدن کروموزوم‌ها و نرخ پایین تشکیل میوه در لاین‌های دابل‌هاپلوئید به محض دوبل شدن کروموزوم‌ها اشاره کرد. تا همین اواخر، به‌نژادی کلاسیک و دابل‌هاپلوئیدها روش‌های اصلی تولید لاین‌های والدینی بودند. هرچند القای هاپلوئیدی با استفاده از ویرایش ژنومی و تغییر ژن‌هایی که در فرایند تقسیم سلولی نقش دارند، یک پیشرفت اساسی است که می‌تواند منجر به توسعه‌ی مسیرهای جدید برای به‌نژادی کدوئیان شود (Hooghvorst et al., 2021).

کریسپر<sup>۳</sup> نوعی از سیستم ایمنی باکتریایی است که با به‌کارگرفتن نوکلئازهایی که تحت هدایت یک توالی راهنما هستند، DNA مهاجم شامل باکتیروفاژ یا پلاسمید ناشناس را تکه‌تکه کرده و از بین می‌برد. پژوهشگران این فرآیند طبیعی را به‌عنوان ابزاری برای ویرایش ژن توسعه دادند (Ebrahimi et al., 2024).

روش کریسپر با توجه به کارآمدی، انعطاف و کنترل بی-نظیر روی جهش‌ها، روش غالب ویرایش ژنومی است. کریسپر، شامل یک نوکلئاز Cas9 است که توسط یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی (توالی راهنما) هدایت می‌شود. این سیستم در DNA دورشته‌ای شکاف (DSBs) ایجاد می‌کند که توسط دو مسیر NHEJ و HDR تصحیح می‌شود و موجب ایجاد جهش‌های حذف و اضافه می‌شود (Bortesi et al., 2015).

سیستم کریسپر به روش غالب در مهندسی ژن گیاه تبدیل شده است چراکه دقیق است و استفاده از آن به‌مراتب آسان‌تر و ارزان‌تر است. البته مزیت اصلی این سیستم قدرت آن در ایجاد جهش‌های دقیق با هزینه پایین می‌باشد. از این رو از انواع سیستم‌های کریسپر در اصلاح بیش از ۲۰ گونه گیاهی از جمله

3. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)  
4. Guide-RNA

1. Cucurbitaceae  
2. Doubled Haploids

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱. طراحی سازه ژنی *CenH3*

برای یافتن توالی ژن *CenH3* در خیار از توالی ژن *CenH3* گیاه آراییدوپسیس استفاده شد. بدین منظور ابتدا توالی پروتئینی و نوکلئوتیدی ژن *CenH3* آراییدوپسیس از پایگاه‌های داده‌ی NCBI<sup>۲</sup> و Histone protein database (HPD) با توالی‌های گیاه *Cucumis sativus* هم‌ردیف شد. با توجه به امتیازدهی و طبقه‌بندی سایت HPD، توالی‌های با شناسه نوکلئوتیدی XM\_011660850، XM\_011660851، XM\_031889117 به‌عنوان ژن *CenH3* شناخته شدند. برای یافتن ناحیه مشترک بین توالی‌های پروتئین *CENH3* گیاه خیار و آراییدوپسیس از نرم‌افزار MegAlign استفاده شد. تمام توالی‌ها در ناحیه ALQEAAE با هم مشترک بودند. برای تعیین اسیدآمین و نوکلئوتید هدف، از سایت HDB برای هم‌ردیفی استفاده شد. با توجه به نتایج پژوهش (Britt et al., 2016)، اسیدآمین آلانین (آلانین شماره شش در توالی ناحیه مشترک) که در ناحیه مشترک توالی پروتئینی ALQEAAE قرار دارد، به‌عنوان کاندید جهش برای کاهش عملکرد ژن انتخاب شد.

برای تبدیل اسیدآمین آلانین (GCA) به ترئونین (ACA)، باز گوانین باید به باز آدنین تغییر یابد. بدین ترتیب، نوکلئوتید شماره ۱۶ در توالی نوکلئوتیدی ناحیه مشترک (GCTCTTCAGGAAGCAGCAGAAGA) نوکلئوتید هدف در نظر گرفته شد. مناسب‌ترین توالی راهنما با استفاده از سایت Scaffold (https://chopchop.cbu.uib.no) تعیین شد. راه‌انداز و مبتنی بر توالی PAM از پژوهش‌های (Xingliang Ma et al., 2015) به‌کار برده شد. با استفاده از سایت NEB cutter جایگاه برشی آنزیم BamHI و لنگر در دو طرف سازه جای‌گذاری شد. توالی کامل سازه ژنی *CenH3* در (جدول ۱) قابل مشاهده است. توالی کامل سازه جهت سنتز در ناقل PUC19 به شرکت Bio Basic ارسال شد.

ذرت، برنج، جو و... با اهداف اصلاحی متنوعی از جمله بهبود عملکرد و مدیریت تنش‌های زنده و غیرزنده استفاده شده است (Chen et al., 2019).

گزارشات متعددی استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 را در گونه‌های کدویان گزارش کرده‌اند، هرچند استفاده از این روش با تنگنهایی همراه است، به اصلاح‌گران این امکان را می‌دهد تا لاین‌های القاکننده‌ی هاپلوئیدی برای به‌دست‌آوردن جنین‌های پارتنوژنتیک ایجاد کنند. گزارش‌های زیادی از تولید دابل‌هاپلوئید و استفاده از CRISPR/Cas9 در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله کدویان وجود دارد. باین‌حال از سیستم القاکننده هاپلوئیدی با استفاده از ویرایش ژنومی در کدویان استفاده نشده است. در گیاهان دولپه‌ای روش‌های تولید لاین القاکننده هاپلوئیدی بر ژن *CenH3* متمرکز هستند. این ژن هیستونی که در تمام گیاهان یافت می‌شود، مسئول مشخص کردن محل سنترومر است و هدف تغییرات پس‌اترجمه‌ای است. این قسمت با DNA و دیگر هیستون‌ها در ارتباط است تا نوکلئوزوم تشکیل گردد. ژن *CenH3* نقش مهمی در تفرق کروموزوم‌ها در طول میتوز دارد و تغییر دادن آن ممکن است دارای پیامدهای شدید و کشنده باشد. از زمان کشف آن تلاش‌های زیادی برای تعریف و روشن‌سازی نقش و ظرفیت آن در فرآیند القای هاپلوئیدی در گیاهان دولپه‌ای شده است. هرچند هنوز فرآیند دقیق آن مشخص نشده است (Hooghvorst et al., 2021).

زمانی که گیاهان دارای ژن *CenH3* جهش‌یافته با گیاهان دارای گونه وحشی *CenH3* تلاقی داده می‌شوند، کروموزوم‌های لاین جهش‌یافته ناپدید شده و هاپلوئیدی را القا می‌کنند (Ravi et al., 2010).

تا کنون سیستمی برای ویرایش ژن *CenH3* در گیاه خیار معرفی نشده است از این‌رو در پژوهش حاضر، امکان ایجاد جهش توسط سیستم CRISPR/Cas9 بر ژن *CenH3* گیاه خیار بررسی شد تا مسیری برای ویرایش این ژن و دستیابی به القاکننده هاپلوئیدی گشوده شود.

Table 1: Guid-RNA Structure Elements

Element	Sequence
Anchor	CG
Promoter	ACTGGTTACCACGAAACATCGGTATATATTT CGTCAATAAAGAAGTGAGCGAATGGCTACAC CCTGCGTTTTAAGCATTCTTTTTTCTTTAGTAT TCGAATA
BamHI site	GGATCC
guide-RNA	GCTCTTCAGGAAGCAGCAGAA
Scaffold	CGTGGCTGAGCCACGGTGAAAAAGTTCAACTA TTGCCTGATCGGAATAAAATTGAACGATAAAGATCGAGATTTTG

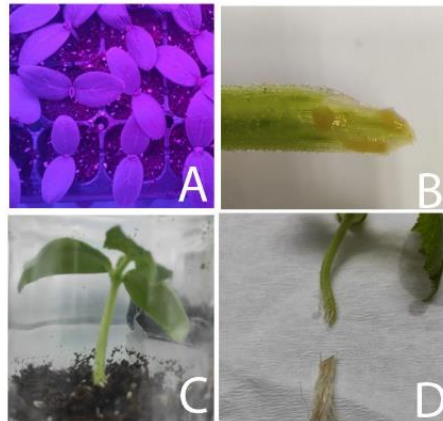


Fig. 1: Composite plant preparing and inoculating Steps: A. Growing seedlings in a growth chamber B. Inoculating with rhizogenesis C. Growing cuttings in culture medium D. Removing the lower part of the root for DNA extraction

برای دستیابی به توالی Guide-RNA (توالی درج) و انتقال

آن به درون pDE-Cas9 (ناقل)، توالی مورد نظر طی فرآیند PCR تکثیر شد. ظرف واکنش PCR به ترتیب حاوی آغازگرهای 'F-5'-GCGCAGCCTGAATGGCGAATGG-3 و 'R-5'-CCCAATACGCAAACCGCCTCTCC-3 (طول توالی تکثیر 615 نوکلئوتید) به میزان یک میکرولیتر، مسترمیکس PFU به میزان 10 میکرولیتر، DNA به میزان یک میکرولیتر و آب دیونیزه به میزان هفت میکرولیتر بود. واسرشته سازی اولیه با دمای 95 درجه سلسیوس و به مدت 5 دقیقه، مرحله اتصال آغازگر به مدت 30 ثانیه در دمای 59 درجه سلسیوس و تکثیر نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سلسیوس در نظر گرفته شد.

محصول مرحله قبل در معرض هضم توسط آنزیم BamHI قرار گرفت، تا سازه ژنی از باقی قسمت‌های تکثیر شده جدا شود. محصول هضم آنزیمی به مدت 35 دقیقه با ولتاژ 85 ولت، روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. برای استخراج قطعه درج، ژل باند در محدوده 215 جفت باز، برش خورد و با استفاده از کیت شرکت Thermo Fisher، استخراج شد.

## ۲-۲. همسانه سازی

سازه ژنی توسط شرکت سنتز و درون ناقل PUC19 جایگذاری شد. پس از دریافت، ناقل حاوی سازه ژنی به باکتری *E. coli* سویه DH5-alpha مستعد شده، منتقل شد (Chang et al., 2017). پس از انتقال ناقل PUC19 به سلول مستعد و تکثیر آنها، جهت شناسایی کلون‌های حاوی ناقل مورد نظر، به میزان 100 میکرولیتر از باکتری روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (100 میلی‌گرم در لیتر) پخش شد. نمونه‌ها در دمای 37 درجه سلسیوس قرار گرفته و بعد از 16 ساعت جهت رشد کلون‌های باکتری بررسی شدند. برای تأیید انتقال ناقل PUC19 حاوی سازه ژنی، ناقل (پلاسمید) باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت GeneAll، استخراج و در معرض سه میکرولیتر هضم توسط آنزیم BamHI طبق پروتکل سازنده (thermo) قرار داده شد. محصول واکنش بر روی ژل الکتروفورز<sup>1</sup> بارگذاری<sup>2</sup> شد.

1. Electrophoresis
2. Run

برای بررسی این حالت تعداد ۴۵۰ قلمه با ناقل pDE-Cas9 حاوی قطعه درجی تلقیح شد (گروه یک). ژن توسط باکتری در ژنوم گیاه الحاق شود ولی به دلیل کشنده بودن جهش، امکان تکثیر سلول وجود نداشته باشد و یا به واسطه ایراد در فرآیند انتقال، باکتری موفق به الحاق ژن در ژنوم گیاه نشود. برای بررسی این حالت تعداد ۱۲ قلمه، با ناقل pDE-Cas9 بدون قطعه درجی به عنوان شاهد فرآیند انتقال تلقیح شد (گروه دو). تعدادی قلمه بدون تلقیح به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند (گروه سه).

#### ۲-۴. بررسی نمونه‌های تلقیح شده

نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. بیشتر حجم ریشه برش خورد و نمونه دوباره در محل خود واگشت شد. استخراج DNA ریشه به روش CTAB انجام شد. برای بررسی انتقال ژن از PCR استفاده شد. برای تأیید انتقال ناقل از آغازگرهای 3'-GCTCCCTAGGCCTGTTATCC 'F-5' و 'R-5' و 3'-GCAATGGAATCCGAGGAGGT استفاده شد. آغازگرها در این مرحله به شکلی طراحی شدند که اگر قطعه درجی منتقل و بیان شده باشد باند در محدوده ۶۱۵ جفت بازی ایجاد می‌شود و اگر منتقل یا بیان نشده باشد بانندی مشاهده نخواهد شد. از این آغازگرها برای تأیید و تعیین فرآیند و نرخ انتقال پلاسمید در گروه دوم نیز استفاده شد، بدین ترتیب در نمونه‌هایی که ناقل PDE-Cas9 بدون سازه ژنی را دریافت کرده باشند، باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی مشاهده می‌شود.

بررسی با گروه سوم و مقایسه‌ی تفاوت‌های ظاهری ریشه موئین و معمولی شروع شد. سپس گروه دوم به منظور تأیید فرآیند تلقیح و انتقال بررسی شدند. در آخر الحاق توالی درجی در ژنوم نمونه‌های گروه اول بررسی شد. نمونه‌های مثبت بعد از شستشو با سفتی‌زوکسیم (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در بستر کشت حاوی علف‌کش بایولوفوس (۷۰ میلی‌گرم در لیتر) به منظور بررسی رشد ریشه و حذف نتایج مثبت کاذب، واگشت شدند. همچنین برای تأیید کارکرد گزینشگری بایولوفوس، نمونه‌های گروه سه نیز واگشت شدند. باند مربوط به نتایج مثبت از روی ژل استخراج و برای توالی‌یابی استفاده

استخراج ناقل: از پلاسمید PDE-Cas9 با طول ۱۵۷۵۸ جفت‌باز، به عنوان ناقل کریسپر آگروباکتریومی استفاده شد. با توجه به اطلاعات مندرج در سایت <https://www.addgene.org>، با استفاده از آنزیم BamHI توالی بین بازهای شماره ۱۲۵۵۸ الی ۱۴۱۴۲ حذف و ناقل با طول ۱۴۱۷۴ استخراج و به کارگیری شد.

نسبت قطعه درجی به ناقل توسط سایت <https://nebiocalculator.neb.com> محاسبه و نسبت مولی یک به سه (قطعه، ناقل) انتخاب شد. اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز شرکت Thermo Fisher و طبق پروتکل سازنده انجام شد. به میزان پنج میکرولیتر از محلول واکنش به ۵۰ میکرولیتر از سلول مستعد منتقل شد. بعد از شوک دمایی و رشد باکتری به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، سلول‌های مستعد روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) پخش شدند. بعد از ۱۶ ساعت، رشد کلونی‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

برای شناسایی کلون حاوی قطعه درجی، از روش Colony-PCR استفاده شد. برای این منظور از آغازگرهای F- 3'-CGGGATCCACTGGTTAC '5' و 'R-5' و 'GGATCCCAAATCTCGATC-3' برای تکثیر قطعه ۲۱۵ جفت بازی در دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. به میزان ۵ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

از آگروباکتریوم ریزوژنز<sup>۱</sup> سویه ATCC برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. با استفاده از روش [Weise et al., 2013](#) سلول مستعد آگروباکتریوم ریزوژنز تهیه و پلاسمید به باکتری منتقل شد.

#### ۲-۳. انتقال ژن به گیاه خیار

برای انتقال باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز به گیاه از روش کمپوزیت استفاده شد (شکل ۱). در این روش به جای تهیه و تلقیح ریز نمونه از تهیه و تلقیح قلمه استفاده می‌شود (*Fan et al., 2020*). برای این منظور تعداد ۷۰۰ بذر خیار N50 کشت شد. در بررسی انتقال ژن به گیاه سه حالت مورد انتظار بود: ژن توسط باکتری در ژنوم گیاه الحاق و با موفقیت بیان شود که

وثیقی معراجی و همکاران: ویرایش ژن هیستون سانترومیری *CenH3* در...  
 شد. نتایج توالی‌یابی با نرم‌افزار MegAlign برنامه Lasergene هم‌ردیفی و اختلافات بررسی شد.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۳-۱. انتقال سازه ژنی به باکتری

سازه ژنی به سلول‌های مستعد انتقال یافت، بعد از ۱۶ ساعت، رشد کلون‌های باکتری روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک بررسی شد. پس از هضم توسط آنزیم *BamH1* محصول، روی ژل الکتروفورز بارگذاری شد. باند در محدوده ۲۱۵ جفت بازی مشاهده شد که تایید کننده انتقال پلاسمید می‌باشد (شکل ۲-۱A).

به‌منظور تکثیر قطعه درج، یک ناحیه ۶۱۵ جفت بازی دربردارنده قطعه وارد شده توسط PCR تکثیر و هضم آنزیمی شد. نتیجه‌ی هضم محصول PCR، یک قطعه ۲۱۵ جفت بازی، یک قطعه در محدوده‌ی ۲۶۰ جفت بازی و یک قطعه در محدوده‌ی ۱۴۰ جفت بازی بود. همچنین باند متعلق به توالی

وارد شده که در محدوده ۲۱۵ جفت بازی بود (شکل ۲-۱B) توسط کیت ریکاوری، از روی ژل استخراج شد.

پلاسمید PDE-Cas9 تحت هضم آنزیم *BamH1* قرار گرفت. نتیجه دو باند در محدوده ۱۴ کیلو باز متعلق به قسمت اصلی پلاسمید PDE-Cas9 بود که به‌عنوان ناقل مورد استفاده قرار گرفت و یک باند در محدوده ۱۵۰۰ که حذف شد (شکل ۲-۱C و ۲-۱D و ۲-۱E).

باکتری‌های حاوی محصول اتصال روی محیط‌کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کشت شدند. پس از ۱۶ ساعت رشد کلون‌ها مشاهده شد.

محصول PCR به‌منظور ردیابی قطعه درجی روی ژل الکتروفورز بارگذاری شد (شکل ۲-۱D). قطعات حاوی کلون دارای باند در محدوده ۲۱۵ جفت بازی بودند. باکتری راپیروژنر حاوی ناقل، به محیط حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شد و پس از ۱۶ ساعت کلون‌های رشد کرده بر روی محیط‌کشت قابل مشاهده بودند.

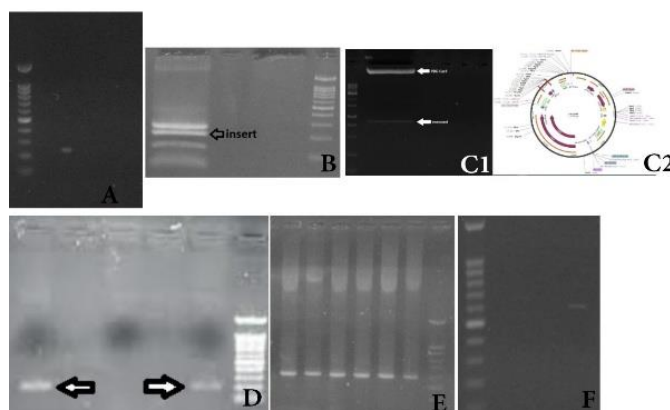


Fig. 2: (A) Band at 215 bp from the digestion of the PUC19 vector extracted from bacteria (B) Band at 215 bp from the insert sequence (C1) Band from the vector fragment and the isolated fragment at 14 kb and 1500 bp, respectively (C2) Fragment between the two red lines isolated by the enzyme (D) Band at 215 bp from the clone containing the insert sequence (E) Band at 400 bp from plants inoculated with the vector without the insert (F) Band at 615 bp from the extract extracted from the plant

ناقل بدون توالی درج و به‌منظور بررسی پروتوکل، نرخ انتقال و به‌عنوان شاهد فنوتیپ ریشه، تلقیح شده بودند، هفت مورد دارای باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی بودند (شکل ۲-۱F). این نتایج نشان داد که کارآمدی پروتوکل انتقال و نیز نرخ انتقال ۷۰ درصدی بود. ریشه‌ی قلمه‌هایی که در گروه دو، تلقیح آن‌ها با PCR تأیید شده بود، با ریشه‌ی قلمه‌های گروه سه که تلقیح نشده بودند مقایسه شدند و تفاوتی دیده نشد (شکل ۲-۱G).

#### ۳-۲. تلقیح گیاه توسط آگروباکتریوم راپیروژنر حاوی سازه ژنی

برای تلقیح گیاه از روش کامپوزیت پلنت استفاده شد (شکل ۲-۱A). نتایج بررسی‌های مولکولی نشان داد در بین ۴۰۰ قلمه که با ناقل حاوی قطعه درج تلقیح شده بودند سه مورد دارای باند در محدوده ۶۱۵ جفت بازی بودند که بیانگر انتقال و تکثیر موفق قطعه درج در گیاه بود (شکل ۲-۱E). از ۱۰ قلمه که با

### ۳-۳. نتایج توالی یابی

داده و نوکلئوتید تغییر کرده است. جهش اول در فاصله سه نوکلئوتیدی از نقطه PAM رخ داده است و در پی آن باز تیمین تبدیل به باز گوانین شده است. جهش دوم نیز در فاصله سه نوکلئوتیدی از نقطه PAM رخ داده است و منجر به تغییر باز تیمین به آدنین شده است. جهش سوم در فاصله ۱۱ نوکلئوتیدی از نقطه PAM و در توالی اسیدآمینه هدف رخ داده است.

پس از اینکه نمونه ها با روش PCR برای بررسی درج سازه در سلول های گیاهی مورد آزمون قرار گرفتند در سه نمونه باند مشاهده شد. ریشه های مربوط به نمونه ها در محیط کشت MS حاوی بایولو فوس نیز رشد کردند. بنابراین محصول PCR برای بررسی جهش توالی یابی شد. نتیجه توالی یابی در (شکل ۴) قابل مشاهده است. باتوجه به شکل ۴، در سه نقطه جهش رخ



Fig. 3: Rhizogenesis-inoculated cutting (right) non-rhizogenesis-inoculated cutting (left)

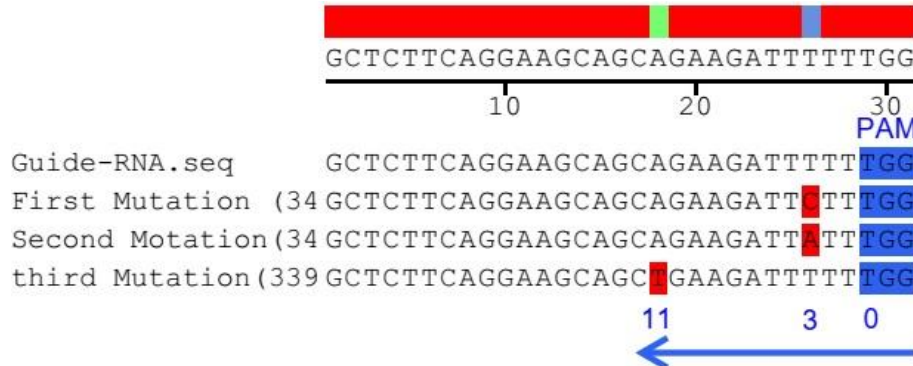


Fig. 4: Mutations in the CenH3 gene sequence is marked in red. (Alignment was performed using MegAlign software)

اعتقاد (Wang *et al.*, 2018) از نظر کیفیت (نحوه اتصال عوامل پروتئین) و کمیت (تعداد پروتئین) تفاوت هایی بین پروتئین CENH3 جهش یافته و وحشی وجود دارد که این تفاوت در نهایت منجر به یک تأخیر در سرهم بندی دوک تقسیم می شود این تأخیر باعث جاماندن پروتئین های جهش یافته از اتصال به دوک شده و در نهایت منجر به انتقال کروموزم ها به یک قطب سلول می شود. به نظر می رسد برخی گیاهان می توانند این اختلاف را تحمل کنند ولی این جهش در برخی گیاهان منجر به مرگ سلول می شود (Kuppu *et al.*, 2020).

با توجه به شکل ۵ تفاوت ظاهری در ریشه های موئین و معمولی در روش کامپوزیت پلنت وجود ندارد. این مشاهدات با گزارش (Fan *et al.*, 2020 و Kiryushkin *et al.*, 2021) همخوانی دارد. در این پژوهش ها برای تشخیص ریشه های موئین از شناساگرهای مولکولی استفاده شده است. هنوز نقش اصلی ژن *CenH3* در القای هاپلوئیدی مشخص نشده است (Kuppu *et al.*, 2020) معتقدند که نقش این پروتئین در جایگیری عوامل تشکیل دوک و نیز جذب کیتوکور به محل مناسب در هنگام تقسیم سلولی است. به

وثیقی معراجی و همکاران: ویرایش ژن هیستون ساترومری *CenH3* در ...

به عنوان محل شناسایی Guide-RNA می باشد، چراکه شانس ایجاد جهش موفق را افزایش می دهد.

باتوجه به شکل ۵ می توان دریافت که تنها یک نقطه PAM آن هم با فاصله نسبتاً زیاد از نوکلئوتید هدف وجود دارد. در ضمن باید در نظر داشت از بین گزینه های موجود این نزدیکترین نقطه به محل PAM است. نه تنها دسترسی به یک نقطه PAM کاری دشوار است بلکه در همردیفی توالی ژن *CenH3* در خیار و آرابیدوپسیس انعطافی در طراحی Guide-RNA برای خیار وجود نداشت. تنها دو توالی مناسب برای طراحی توالی راهنما وجود دارد که توالی مناسب تر (نقطه PAM نزدیک تر) برای این پژوهش استفاده شد. در مقایسه با توالی ها و نقاط PAM در گیاه هویج که [Dunemann et al., 2018](#) بیش از چهار توالی با نقاط PAM متنوع طراحی شد. به نظر می رسد با توجه به روش کار توالی راهنما که از نقطه PAM به عنوان سایت شناسایی استفاده می کند و با ایجاد DBS های مختلف منجر به ایجاد جهش می شود، دسترسی به توالی های راهنمای متنوع و نیز نقاط PAM مختلف در میزان موفقیت این روش بسیار مؤثر است. لذا بهتر است از سایر سیستم های کریسپر برای گیاه خیار استفاده گردد که کمتر به توالی PAM وابسته باشد.

با توجه به شکل ۶ دو جهش در فاصله سه نوکلئوتیدی از نقطه PAM رخ داده است. باتوجه به نتایج قبلی از جمله [Kuppu et al., 2020](#) و [Dunemann et al., 2018](#)، این نتیجه غیرمنتظره نیست چرا که به دلیل اتصال Guide-RNA به نقطه PAM به عنوان محل شناسایی بیشترین تعداد جهش در فاصله ۴ نوکلئوتیدی از این نقطه رخ می دهد. همانطور که پژوهشگران مختلفی گزارش کرده اند ( [Gatazaka et al., 2013](#)؛ [Feng et al., 2020](#)) خانواده کدوئیان به ویژه خیار از جمله گیاهانی هستند که در برابر القای هاپلوئیدی سرسخت هستند هرچند یکی از شانس های تولید القا کننده هاپلوئیدی در این خانواده استفاده از سیستم کریسپر است، تا کنون گزارشی از ایجاد جهش از این راه در گیاه خیار و سایر اعضای کدوئیان به جز ملون ([Parsa et al., 2023](#)) وجود ندارد.

احتمالاً یکی از دلایل اصلی این پدیده به ساختار ژن *CenH3* در خیار بر می گردد. دسترسی سخت به یک نقطه PAM در محلی مناسب از این موارد است. همانطور که در شکل زیر مشخص است به نظر می رسد در طراحی یک Guide-RNA مطلوب که نقطه PAM در فاصله چهار نوکلئوتیدی از محل جهش باشد محدودیت های جدی وجود دارد. یکی از دلایل موفقیت و نرخ های بالای جهش در گیاهانی همچون هویج و آرابیدوپسیس وجود نقاط متنوع

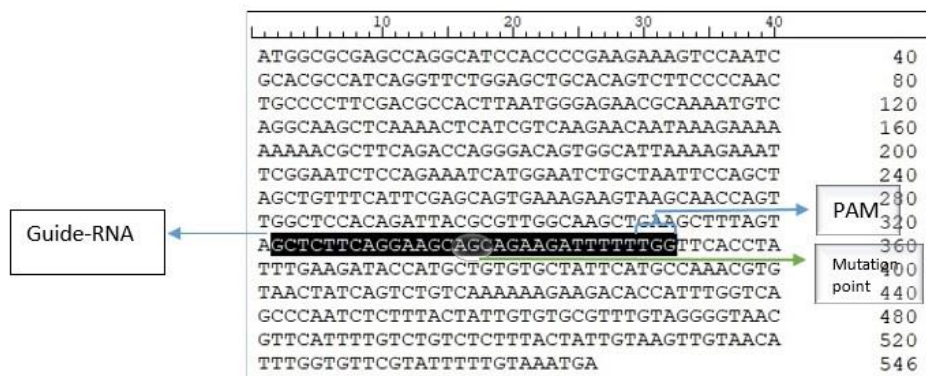


Fig. 5: Location of PAM compared to mutation site

ایجاد جهش در برخی گیاهان می تواند کشنده باشد باتوجه به اینکه تاکنون گزارشی در مورد جهش در ژن *CenH3* خیار ارائه نشده است. باتوجه به تعداد بالای نمونه های تلقیح شده در این آزمایش (۴۵۰ نمونه)، می توان برآورد کرد که

در جهش اول و دوم در بالادست ژن *CenH3* ماهیت اسید آمینه یعنی فنیل آلانین به ترتیب به سرین و تیروزین تبدیل شده است اما در جهش سوم که در توالی خود ژن رخ داده ماهیت اسید آمینه یعنی آلانین تغییری نکرده است.

#### ۴. نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش دست‌کم سه جهش توسط سیستم کریسپر در توالی ژن CenH3 در خیار القا شد. هرچند استفاده از روش‌های القاکننده هاپلوئیدی مدرن مانند روش‌های مبتنی بر ایجاد جهش در ژن CenH3 با ابزارهایی همچون کریسپر در خانواده کدوئیان از جمله خیار محدود و سخت است و باید مورد بررسی بیشتر قرار بگیرد، در خیار از سیستم‌های کریسپر با وابستگی کمتر به نقطه PAM استفاده شود نتایج بهتری به دست خواهد آمد.

#### ۵. سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از پایان‌نامه دکتری با شماره پیگیری ۱۷۷۵۳۸۰ حسین وثیقی معراجی به راهنمایی دکتر اصغر میرزائی اصل، تحت حمایت مادی و معنوی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا است.

دست‌کم گیاه خیار نسبت به تغییر آرایش توالی CenH3 سرسخت است. باتوجه‌به اینکه نرخ تلقیح در همین آزمایش ۷۰ درصد بوده است، به نظر ممکن است در سایر نمونه‌ها هم تلقیح انجام شده باشد اما منجر به مرگ سلول گیاهی شده است. تنها یک جهش در محل هدف قابل‌شناسایی بوده است که منجر به تغییر ماهیت اسیدآمین و در نتیجه شکل پروتئین نشده است. هرچند جهش در نزدیکی نقطه PAM قابل‌تحمل بود. اما باتوجه‌به پژوهش‌های (Britt et al., 2016) جزو محدوده تغییرات برای القای هاپلوئیدی نیست؛ بنابراین تنها با آزمون‌های بعدی مشخص می‌شود که آیا این جهش می‌تواند منجر به القای هاپلوئیدی شود یا خیر.

در گزارشی که (Parsa et al., 2023) منتشر کرده‌اند نرخ جهش در ملون (یکی دیگر از گیاهان خانواده کدوئییان) با استفاده از روش کریسپر سه تا چهار درصد گزارش شده است. هرچند ایجاد جهش در ژن CenH3 قبل از این در خانواده کدوئییان با روش‌های دیگر ممکن نبوده است به نظر می‌رسد استفاده از روش کریسپر می‌تواند راهگشا باشد (Hooghvorst et al., 2021).

#### ۶. منابع

- Adhikary, D., da Costa Ribeiro Quintans, I. L. A. and Bhowmik, P. K. (2020). A procedure to design guide RNA, assemble fragments, and detect mutation for genome editing in flax. *CRISPR-Cas Methods*, 173-190. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0616-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0616-2_16)
- Bortesi, L. and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Britt, A. B. and Kuppu, S. (2016). CenH3: an emerging player in haploid induction technology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00357>
- Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A. and Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25).
- Dong, Y. Q., Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Huang, J. H. and Tang, Z. H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in *cucurbit* species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991-2019.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. and Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 667-697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
- Dong, Y. Q., Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Huang, J. H. and Tang, Z. H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in *cucurbit* species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991-2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dunemann, F., Unkel, K. and Sprink, T. (2018), September). Using CRISPR/Cas9 to produce haploid inducers of carrot through targeted mutations of centromeric histone H3 (CENH3). In II International Symposium on Carrot and Other *Apiaceae* 1264 (pp. 211-220). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1264.26>
- Ebrahimi, V. and Hashemi, A. (2024). CRISPR-based gene editing in plants: Focus on reagents and their delivery tools. *BioImpacts: BI*, 15, 30019. <https://doi.org/10.34172/bi.30019>
- Fan, Y., Xu, F., Zhou, H., Liu, X., Yang, X., Weng, K. and Lyu, S. (2020). A fast, simple, high efficient and one-step generation of composite cucumber plants with transgenic roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141, 207-216. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01781-x>

- Feng, S., Zhang, J., Mu, Z., Wang, Y., Wen, C., Wu, T. and Wang, H. (2020). Recent progress on the molecular breeding of *Cucumis sativus* L. in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1777-1790. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03484-0>
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Science*, 12, 368-375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>
- Gałązka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K. (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*, 25(1), 67-78. <http://dx.doi.org/10.2478/fhort-2013-0008>
- Hooghvorst, I., Nogués, S. (2021). Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops. *Plant Cell Report*, 40, 255-270. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02605-0>
- Jat, G. S., Behera, T. K., Lata, S. and Kumar, S. (2021). Classical genetics and traditional breeding in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Cucumber economic values and its cultivation and breeding, 201-215. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97593>
- Kiryushkin, A. S., Ilina, E. L., Guseva, E. D., Pawlowski, K. and Demchenko, K. N. (2021). Hairy CRISPR: genome editing in plants using hairy root transformation. *Plants*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.3390/plants11010051>
- Kuppu, S., Ron, M., Marimuthu, M. P., Li, G., Huddleson, A., Siddeek, M. H. and Britt, A. B. (2020). A variety of changes, including CRISPR/Cas9-mediated deletions, in CENH3 lead to haploid induction on outcrossing. *Plant Biotechnology Journal*, 18(10), 2068-2080. <https://doi.org/10.1111/pbi.13365>
- Marimuthu, M. P., Maruthachalam, R., Bondada, R., Kuppu, S., Tan, E. H., Britt, A. and Comai, L. (2021). Biased removal and loading of centromeric histone H3 during reproduction underlies uniparental genome elimination. *BioRxiv*, 2021-02. <https://doi.org/10.1101/2021.02.24.432754>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R. and Liu, Y. G. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Kuppu, S., Ron, M., Marimuthu, M. P. A., Li, G., Huddleson, A., Siddeek, M. H., Terry, J., Buchner, R., Shabek, N., Comai, L. and Britt, A. B. (2020). A variety of changes, including CRISPR/Cas9-mediated deletions, in CENH3 lead to haploid induction on outcrossing. *Plant Biotechnology Journal*, 18(10), 2068-2080. <https://doi.org/10.1111/pbi.13365>
- Obel, H. O., Cheng, C., Tian, Z., Li, J., Lou, Q., Yu, X. and Chen, J. (2022). Molecular research progress on xishuangbanna cucumber (*Cucumis sativus* L. var. xishuangbannensis Qi et Yuan): Current status and future prospects. *Agronomy*, 12(2), 300. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020300>
- Ravi, M.; Chan, S. W. L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature Cell Biology*, 464, 615-618. <https://doi.org/10.1038/nature08842>
- Shirazi Parsa, H., Sabet, M. S., Moieni, A., Shojaeiyan, A., Dogimont, C., Boualem, A. and Bendahmane, A. (2023). CRISPR/Cas9-mediated cytosine base editing using an improved transformation procedure in melon (*Cucumis melo* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11189. <https://doi.org/10.3390/ijms241311189>
- Wang, N. and Dawe, R.K. (2018). Centromere Size and Its Relationship to Haploid Formation in Plants. *Molecular Plant*, 11, 398-406. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.009>
- Wang, S., Fang, H., Xie, J., Wu, Y., Tang, Z., Liu, Z. and Yu, J. (2021). Physiological responses of cucumber seedlings to different supplemental light duration of red and blue LED. *Frontiers in Plant Science*, 12, 709313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.709313>
- Weise, S. (2013). *Agrobacterium Transformation and Competent Cell Preparation*. Michigan State University.