

Thesis reference number:

University of Science and Technology of Hanoi
Doctoral School



**Utilizing CRISPR/Cas9 system to induce targeted mutations of *MLO*
genes related to soybean powdery mildew resistance**

Bui Phuong Thao

Pharmacological, Medical and Agronomical Biotechnology

Assoc. Prof. Dr. Do Tien Phat, Supervisor

Institute of Biology, VAST

Dr. Nguyen Van Phuong, Supervisor

University of Science and Technology of Hanoi, VAST

Hanoi, 2/2026

Abstract

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is an important annual legume crop grown and consumed all over the world. Soybean seeds contain high oil and protein contents which are important nutritional sources for human consumption and animal feed. However, soybean production is threatened by many diseases, one of which is powdery mildew caused by fungus *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck). This disease has been found in most of soybean producing countries including Vietnam. Soybean powdery mildew inhibits plant growth and development, reduces yield, quality and seed germination. Under the optimal conditions for fungal growth, powdery mildew can cause the crop yield loss up to 60%.

Using disease-resistant varieties has been considered as the most effective method to prevent crops from powdery mildew. In order to generate these varieties, besides identifying and utilizing the resistance genes, another potential way is to reduce the impact of susceptibility genes. The *Mildew Locus O (MLO)* genes are well-known susceptibility genes for powdery mildew in plants. They encode seven-transmembrane domain proteins located in the plasma membrane and required for susceptibility to powdery mildew infection. Recently, the targeted induced *MLO* mutations generated by different mutagenic approaches, such as RNAi, TALEN and CRISPR showed complete or enhanced resistance to powdery mildew in different important crops such as wheat, *Arabidopsis*, and tomato. In soybean, 39 *GmMLO* genes were previously predicted but their respective functions have not been defined. Six out of 39 *GmMLO* genes, including *GmMLO02*, *GmMLO10*, *GmMLO18*, *GmMLO19*, *GmMLO20*, and *GmMLO23*, were identified to be orthologs of three *AtMLO* genes (*AtMLO2*, *AtMLO6*, *AtMLO12*), which play a crucial role in conferring resistance against powdery mildew in *Arabidopsis*.

In this study, we aimed to develop and apply CRISPR/Cas9 systems to induce mutations of these *GmMLO* genes for improving powdery mildew resistance in a Vietnamese elite soybean cultivar ĐT26. A dual-sgRNA CRISPR/Cas9 construct was designed and successfully transferred into soybean cultivar ĐT26 through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Various mutant forms of the

GmMLO genes, including biallelic, chimeric and homozygous, were found at the T0 generation. The inheritance and segregation of induced mutations were confirmed and validated at T1 and T2 generations. Out of six *GmMLO* genes in the soybean genome, we obtained the *Gmml02/Gmml019/Gmml023* triple and *Gmml02/Gmml019/Gmml020/Gmml023* quadruple knockout mutants at the T2 generation. When challenged with *Erysiphe diffusa*, a fungus that causes soybean powdery mildew, all mutant plants showed enhanced resistance to the pathogen, especially the quadruple mutant lines, which were 3.1-3-41 and 3.1-5-44. The reduction in disease severity of mutant soybeans could reach up to 36.4% as compared to wild-type plants. The density of conidia per leaf area of the mutant lines decreased by 1.5-4 times compared with the control. In addition, fungal hyphae grew more slowly on the leaf surface of mutant lines. The lower production and late germination of fungal conidia were also observed on mutant soybean leaves. This improved resistance was confirmed to be stably maintained across generations. Moreover, the *Gmml0* mutant plants exhibited no pleiotropic effects on soybean growth and development as well as nutritional composition of the seeds under net-house conditions compared to wild-type plants. In particular, we obtained potential homozygous mutant lines that showed enhanced resistance to powdery mildew and were transgene-free at the T2 generation.

This is the first report on generating simultaneous mutations of multiple *MLO* genes in soybean using the CRISPR/Cas9 system. Our results indicate the involvement of *GmMLO02*, *GmMLO19*, *GmMLO20* and *GmMLO23* genes in powdery mildew susceptibility in soybean. The various targeted mutations of *MLO* genes created through the CRISPR/Cas9 system (deletion, insertion) are important materials for soybean breeding as well as for research on *GmMLO* gene function and interaction related to powdery mildew resistance in soybean. In addition, these *GmMLO* mutations can be used in further studies to evaluate the resistance to other fungal diseases in soybean. Further research should also be conducted to investigate the roles of individual tested genes and the involvement of other *GmMLO* genes in this disease infection mechanism. Importantly, utilizing the CRISPR/Cas9 system successfully created the *Gmml0* transgene-free homozygous mutant lines (3.1-3-41 and 3.1-5-44) with enhanced

resistance to powdery mildew, which could be potential materials for soybean breeding programs.

Tóm tắt

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill] là cây họ đậu quan trọng, được trồng và tiêu thụ rộng rãi trên toàn thế giới. Hạt đậu tương chứa hàm lượng dầu và protein cao, là nguồn dinh dưỡng quan trọng cho con người và thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, sản xuất đậu tương đang bị đe dọa bởi nhiều loại bệnh, trong đó có bệnh phấn trắng do nấm *Erysiphe diffusa* (Cooke & Peck) gây ra. Bệnh này đã được ghi nhận tại hầu hết các quốc gia trồng đậu tương, bao gồm cả Việt Nam. Bệnh phấn trắng trên đậu tương gây cản trở sự sinh trưởng và phát triển của cây, làm giảm năng suất, chất lượng và tỷ lệ nảy mầm của hạt giống. Trong điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nấm, bệnh phấn trắng có thể gây tổn thất năng suất lên đến 60%.

Việc sử dụng các giống cây kháng bệnh được xem là phương pháp hiệu quả nhất để phòng ngừa bệnh phấn trắng trên cây trồng. Để tạo ra các giống kháng bệnh này, bên cạnh việc xác định và khai thác các gen kháng, một hướng tiếp cận tiềm năng khác là làm giảm tác động của các gen nhiễm. Các gen *Mildew Locus O* (*MLO*) được biết đến là những gen nhiễm nổi bật nhất đối với bệnh phấn trắng ở thực vật. Chúng mã hóa các protein có bảy vùng xuyên màng nằm trong màng sinh chất và cần thiết cho sự xâm nhiễm của nấm phấn trắng vào cây trồng. Gần đây, các đột biến định hướng trên nhóm gen *MLO* được tạo ra bằng nhiều phương pháp gây đột biến khác nhau như RNAi, TALEN và CRISPR đã cho thấy khả năng kháng hoàn toàn hoặc tăng cường tính kháng đối với bệnh phấn trắng ở nhiều loại cây trồng quan trọng như lúa mì, *Arabidopsis* và cà chua. Ở cây đậu tương, 39 gen *GmMLO* đã được tìm ra, tuy nhiên chức năng cụ thể của các gen này vẫn chưa được xác định. Sáu trong số 39 gen *GmMLO*, bao gồm *GmMLO02*, *GmMLO10*, *GmMLO18*, *GmMLO19*, *GmMLO20* và *GmMLO23*, đã được chỉ ra là các gen tương đồng với ba gen *AtMLO* (*AtMLO2*, *AtMLO6*, *AtMLO12*), vốn đóng vai trò quan trọng trong việc tạo khả năng kháng bệnh phấn trắng ở *Arabidopsis*.

Nghiên cứu này của chúng tôi được thực hiện nhằm phát triển và ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để gây đột biến các gen *GmMLO* nhằm cải thiện khả năng kháng bệnh phấn trắng ở giống đậu tương ưu tú của Việt Nam - ĐT26. Một cấu trúc CRISPR/Cas9 mang hai đoạn sgRNA (dual-sgRNA) đã được thiết kế và chuyển thành công vào giống đậu tương ĐT26 thông qua phương pháp biến nạp sử dụng vi khuẩn

Agrobacterium tumefaciens. Nhiều dạng đột biến khác nhau của các gen *GmMLO*, bao gồm đột biến nhị thể (biallelic), thể khảm (chimeric) và đồng hợp (homozygous) đã được phát hiện ở thế hệ T0. Việc di truyền và phân ly của các đột biến được xác nhận và đánh giá ở thế hệ T1 và T2. Trong số sáu gen đích *GmMLO*, chúng tôi đã thu nhận được các dòng đột biến mất chức năng đồng thời ba gen *Gmmlo02/Gmmlo19/Gmmlo23* hoặc bốn gen *Gmmlo02/Gmmlo19/Gmmlo20/Gmmlo23* ở thế hệ T2. Khi lây nhiễm với nấm *Erysiphe diffusa* – tác nhân gây bệnh phấn trắng trên đậu tương – tất cả các dòng đột biến đều có khả năng kháng phấn trắng cao hơn giống đối chứng, đặc biệt là hai dòng mang đột biến đồng thời bốn gen 3.1-3-41 và 3.1-5-44. Mức độ nhiễm bệnh của các dòng đột biến này thấp hơn so với đối chứng với mức triệu chứng bệnh có thể giảm đến 36,4%. Mật độ bào tử trên diện tích lá ở các dòng đột biến giảm từ 1,5 - 4 lần so với đối chứng. Ngoài ra, sợi nấm phát triển chậm, bào tử nảy mầm muộn và ít hơn trên mặt lá các dòng đột biến. Việc tăng cường tính kháng bệnh này được duy trì ổn định qua các thế hệ. Hơn nữa, các dòng đột biến *Gmmlo* không biểu hiện tác động tiêu cực nào về mặt sinh trưởng, phát triển cũng như thành phần dinh dưỡng của hạt khi trồng trong điều kiện nhà lưới, so với dòng đối chứng. Đặc biệt, chúng tôi đã thu được các dòng đột biến đồng hợp tử tiềm năng có khả năng kháng bệnh phấn trắng cao và không mang gen chuyển (transgene-free) ở thế hệ T2.

Đây là công bố đầu tiên về việc tạo đột biến đồng thời nhiều gen *MLO* trên cây đậu tương bằng hệ thống CRISPR/Cas9. Kết quả của chúng tôi cho thấy sự tham gia của các gen *GmMLO02*, *GmMLO19*, *GmMLO20* và *GmMLO23* trong cơ chế miễn dịch với bệnh phấn trắng ở đậu tương. Sự đa dạng của các đột biến tạo được thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 (mất đoạn gen, thêm đoạn gen) là nguồn nguyên liệu quan trọng cho chọn tạo giống đậu tương cũng như là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về chức năng gen và sự tương tác của các gen *GmMLO* trên cây đậu tương liên quan đến tính kháng bệnh nấm phấn trắng. Ngoài ra, các đột biến gen *GmMLO* này có thể được sử dụng trong nghiên cứu tính kháng với các bệnh khác do nấm gây ra trên đậu tương. Các nghiên cứu sâu hơn cũng cần tiếp tục thực hiện để làm rõ vai trò của từng gen được khảo sát, cũng như sự tham gia của các gen *GmMLO* khác trong cơ chế gây bệnh này. Đặc biệt, việc ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 đã cho phép tạo ra các dòng đột biến đồng hợp tử không mang gen chuyển có khả năng kháng tốt với bệnh phấn trắng (dòng 3.1-3-41 và

3.1-5-44) – đây là nguồn vật liệu tiềm năng cho các chương trình chọn tạo giống đậu tương.