

Universität Hohenheim
Institut für Pflanzenzüchtung,
Saatgutforschung und Populationsgenetik
Prof. Dr. H. H. Geiger
Prof. Dr. A. E. Melchinger

**Characterization of Populations of
Striga hermonthica
(*Scrophulariaceae*)
in Niger**

Diplomarbeit
von
Jens Freitag
aus Lutherstadt Eisleben
Stuttgart, im April 1995

Diese Arbeit wurde gefördert aus Mitteln der Eiselen-Stiftung, Ulm.

9. Summary

Striga (witchweed) species are obligate semiparasitic flowering weeds of cereal and legume crops in semi-arid tropical and subtropical regions. The genus *Striga* belongs to the botanical family *Scrophulariaceae*. *Striga* is the most important biotic constraint in food crop production in sub-Saharan Africa. Approximately 50 % of cereal fields are infested by *Striga* spp. causing an average yield loss of 24 %. *Striga hermonthica* occurs on a variety of wild grasses and attacks crops such as sorghum (*Sorghum bicolor*), millet (*Pennisetum glaucum*), maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*) and sugarcane (*Saccharum officinarum*).

In this study we investigated *Striga* samples from different locations in Niger. By a factorial pot experiment we wanted to determine to what extent *Striga* from millet and sorghum was adapted to its corresponding host. Physiological and virulence characters were studied. Furthermore we measured the level of genetic diversity within and between the *Striga* populations using isozyme markers. Particularly interesting was the question if any specific adaptation to millet or sorghum would be reflected by isozyme differentiation.

Pot experiment. Seeds out of seven *Striga hermonthica* populations from five locations in Niger were used in this study. In all five locations pearl millet is the most important cereal species. In four locations (Bengou, Guéza, Birni N'Konni and Maradi) farmers additionally cultivate sorghum. In two of these four locations (Bengou, Birni N'Konni) *Striga* attacks sorghum. Landraces were used in the experiment exclusively. Studies were done at two infestation levels, one with 1000 and the other with 16,000 viable seeds per pot. An uninfested check per host population per replication was included. The experimental trial was conducted outdoors in pots at ICRISAT in Sadoré (Niger) during the period of May to December 1994. The study presented here was a continuation of a factorial infestation experiment performed at ICRISAT Sahelian Center in 1993.

According to the host species and the *Striga* source we found a significant adaptation of millet-*Striga* to millet and of sorghum-*Striga* to sorghum. However, neither of the two main *Striga* groups was exclusively adapted to its corresponding host. Traits studied in *Striga* were the number of *Striga* plants per pot, the number of flowering *Striga* plants per pot, and the dry matter weight of *Striga*. As reactions of the host plants plant height, dry matter weight, and grain yield were observed. *Striga* emergence in pots with the non-corresponding host was clearly decreased compared to the corresponding host. The highest level of non-corresponding *Striga* emergence was observed on sorghum at the high infestation level for all dates of measurement. Eleven weeks after sowing (w.a.s.) 4.9 sorghum-*Striga* plants at the high infestation level emerged on millet and 14.6 millet-*Striga* plants on sorghum. The lowest number of *Striga* emergence on millet was observed at the low infestation level. For the corresponding *Striga* 7.0 and 0.6 for the non-corresponding *Striga* emerged 11 w.a.s... Comparing the dry matter weight of *Striga* there was more productivity of *Striga* on its corresponding host. Millet-*Striga* produced 20.9 g dry matter on low infested millet compared

with 11.9 g on sorghum. Corresponding *Striga* dry matter production on sorghum at the low infestation level was 38.2 g. Sorghum-*Striga* on millet developed 5.4 g. On sorghum the average *Striga* dry matter productivity was much higher (27.2 g) than on millet (17.3 g). Host plant height was significantly more reduced by the corresponding *Striga*. Less damage was also observed for the dry matter production of host plants when pots were infested with non-corresponding *Striga*. The present study provides further that in Niger two principal "strains" of *S. hermonthica* exist, one parasitizing mainly sorghum and the other pearl millet. However, at the higher infestation level (16,000 seeds per pot) we observed that *Striga* may also damage its non-corresponding host considerably.

Genetic analysis. Genetic diversity within and between host adapted populations of *Striga hermonthica* was evaluated by analyzing isozyme patterns using standard starch gel electrophoresis at ORSTOM in Niamey (Niger). *Striga hermonthica* plants for the isozyme analysis were grown on their corresponding local variety hosts under greenhouse conditions at ICRISAT Sahelian Center in Sadoré (Niger). The samples comprised approximately 30 plants per population. A twice as large sample size (60 individuals per population) was used for *Striga* from Bengou and Guéza. In these locations *Striga* was found on sorghum and pearl millet. Leaves were harvested from young individual *Striga* plants mostly at the floral spike initiation growth stage. For the electrophoresis two gel-, electrode-, and extraction-buffer systems were used. Six staining and fixation systems which showed a readable and polymorphic pattern were used (AAT, PGM, PGI, 6 PGDH, LAP, and MPI). All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for most enzyme systems. Deviations from HWE were significant ($P = 0.05$) in four populations for one or two enzymes. Statistically significant deficiencies of heterozygotes were observed in four populations, with three being identical to those four deviating from HWE. For the seven populations a mean inbreeding coefficient (F) across populations of 19.0% (range from 11% to 29%) was estimated. Therefore we suggest that in local *S. hermonthica* populations, mating may not be completely random. Previous studies have shown the adaptation of *S. hermonthica* to insect pollination. Limited pollen movement and local foraging of insects can promote such a moderate level of inbreeding. In our study we found a mean average gene diversity (\hat{H}) of 46.9 % and a mean observed heterozygosity (H) of 37.9 %. This high genetic variability of *S. hermonthica* was interpreted as a consequence of the parasitic nature of *Striga* trying to adapt to new hosts, and the fluctuating environment of the Sahel. However, the high level of heterozygosity of *S. hermonthica* was also partly explained by the comparatively large number of alleles. We found here a mean number of alleles per locus (k) of 2.5 to 2.8.

The comparison among local populations yielded only little diversity among the seven populations (Mean $F_{ST} = 2.4$ %). Comparing observed and expected homozygote and heterozygote frequencies across populations, no significant deficit was noted. The same was concluded from pairwise comparisons of allele frequencies estimating the genetic relatedness within groups: allele frequencies were highly homogeneous among the seven samples.

Isolation by distance and random genetic drift were not observed. Mechanisms supporting gene flow among local and regional populations of the parasite may be more important than those restricting gene flow.

The specific adaptation of *Striga* populations to their corresponding host species found in the pot experiment was not apparent in the isozyme study.

10. Zusammenfassung

Striga hermonthica ist eine obligat-semiparasitische Blütenpflanze. Sie parasitiert verschiedene Getreidearten (Sorghum, Millet, Mais, Reis und Zuckerrohr) in semiariden tropischen und subtropischen Gebieten. Botanisch gehört sie, mit ca. 50 anderen *Striga*-Spezies, zur Familie der *Scrophulariaceae* (Braunwurzgewächse). In den westafrikanischen Ländern sind durchschnittlich 50 % aller im Getreideanbau befindlicher Flächen mit *S. hermonthica* befallen. Hier hat *Striga* die größte Bedeutung unter allen biotischen Schadfaktoren, mit geschätzten durchschnittlichen Ertragsverlusten von 24 %. *S. hermonthica* gilt als sehr anpassungsfähig, und man geht davon aus, daß es bestimmte "strains", d.h. Rassen, gibt, die verschiedene Wirtsarten befallen können. Die genetische Divergenz dieser Rassen und der Grad ihrer Wirtsspezifität sind bisher kaum untersucht worden. In diesem Experiment sollten sieben Populationen von *S. hermonthica*, die von verschiedenen Wirten stammten, anhand ihrer Virulenz in Topfexperimenten und zusätzlich durch genetische Marker (Isozyme) charakterisiert werden. Die Versuche wurden in Niger am ICRISAT Sahelian Center in Sadoré und dem französischen Institut ORSTOM in Niamey in der Zeit von Mai bis Dezember 1994 durchgeführt.

Topfversuch: Das im Versuch verwendete Pflanzenmaterial stammte aus fünf Regionen Nigers (Bengou, Guéza, Sadoré, Birni N'Konni und Maradi). In allen fünf Regionen wird vorrangig Kolbenhirse (*Pennisetum glaucum*) angebaut, in vier dieser fünf Regionen zusätzlich Sorghum (*Sorghum bicolor*). In allen Lokalitäten tritt *S. hermonthica* parasitierend an Kolbenhirse auf. In zwei dieser fünf Lokalitäten wächst *S. hermonthica* auch an Sorghum (Bengou und Birni N'Konni). Anknüpfend an frühere Untersuchungen am ICRISAT-SC wurden die gleichen lokalen *Striga*-Herkünfte, geerntet 1991, gewählt, und auf neun (zuvor vier) Wirtsgenotypen (fünf Perlhirse- und vier Sorghum-Sorten) getestet. Diese wurden in zwei Hauptgruppen, entsprechend ihrer Artzugehörigkeit, eingeteilt. Der Versuch wurde als mehrfaktorieller, vollständig randomisierter Blockversuch mit vier Wiederholungen angelegt. Neun Wirts-Populationen wurden mit sieben verschiedenen *Striga*-Populationen in zwei Stufen (1.000 bzw. 16.000 *Striga*-Samen je Topf) inokuliert. Eine nicht-inokulierte Kontrolle wurde ebenfalls mitgeprüft. Die erfassten Merkmale waren bei *Striga* die Anzahl aufgelaufener bzw. blühender Pflanzen je Topf und die *Striga*-Biotrockenmasse je Topf und beim Wirt dessen Wuchshöhe, Biotrockenmasse und Kornertrag. Eine deutliche, wenn auch nicht extreme, Anpassung an den jeweiligen Wirt war auf dem Gruppenniveau zu beobachten. Das heißt, Millet-*Striga* war virulenter gegen Millet als gegen Sorghum und umgekehrt war Sorghum-*Striga* virulenter gegen Sorghum als gegen Millet. In der Varianzanalyse war die *Striga*-Gruppe x Wirtsgruppe-Interaktion bei fast allen *Striga*-Merkmalen hochsignifikant. Besonders deutlich war die Anpassung bei der niedrigen Inokulationsstufe. Bei der hohen Inokulationsstufe konnte auch die nicht-korrespondierende *Striga* Sorghum bzw. Millet in

einem Ausmaß befallen, das der korrespondierenden *Striga* bei niedriger Inokulationsstufe entsprach.

Genetische Untersuchungen: Untersuchungen der genetischen Diversität innerhalb und zwischen *Striga-hermonthica*-Populationen wurde mit Hilfe der Stärke-Gel-Elektrophorese am französischen Institut ORSTOM in Niamey (Niger) durchgeführt. Mit dieser Methode können Isoenzyme nach ihrer elektrophoretischen Trennung im Stärkegel angefärbt werden. Isoenzyme sind multiple Enzymformen, die von ihrer Funktion her gleich sind, aber von verschiedenen Genloci, bzw. von unterschiedlichen Allelen eines Genortes kodiert werden und in ihrer Molekülstruktur voneinander abweichen. Letzteres führt zu unterschiedlichen Ladungen und damit zu unterschiedlichen Migrationsdistanzen im elektrischen Feld. Die für die Untersuchung genutzten Pflanzen wurden auf ihren korrespondierenden Wirtspflanzen unter Gewächshausbedingungen angezogen. Die Anzucht erfolgte am ICRISAT-SC in Sadoré (Niger). Alle weiteren Arbeiten wurde am Institut ORSTOM durchgeführt. Für die Untersuchung wurden junge *Striga*-Blätter zum Zeitpunkt des Erscheinens der Blütenknospen geerntet und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch diese Behandlung sollten eventuell auftretende Abbauprozesse der Enzymaktivität vermindert werden. Das schockgefrostete, zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde anschließend vakuumgefriergetrocknet. Die Lagerung der Einzelproben erfolgte über den Zeitraum des Experiments in einem Gefrierschrank bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analysiert wurden sieben lokale *S.-hermonthica*-Populationen aus fünf Regionen in Niger (s. oben). Je Population wurden ca. 30 Individuen untersucht. Für Populationen aus Regionen, in denen sowohl Kolbenhirse als auch Sorghum angebaut werden, wurde dieser Probenumfang verdoppelt.

Jeweils zwei unterschiedliche Gel-, Elektroden- und Extraktionspuffersysteme wurden für die Elektrophorese genutzt. Die genetischen Untersuchungen erfolgten mit sechs Enzymsystemen (AAT, PGM, PGI, 6 PGDH, LAP und MPI). Für alle sechs Systeme waren die untersuchten Populationen polymorph. Von diesen sechs Enzymsystemen wiesen drei eine monomere (PGM, LAP und MPI) und die anderen drei eine dimere (AAT, PGI und 6 PGDH) Struktur auf. Die Bandenmuster waren durch zwei (AAT) oder drei Allele an jeweils einem Locus erklärbar.

Alle sieben untersuchten *S. hermonthica* Populationen befanden sich für die meisten der untersuchten Enzymsysteme im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Abweichungen vom HWG wurden in vier Populationen für ein bis zwei Enzymsysteme bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P=0,05$ beobachtet. In vier von sieben Populationen waren die beobachteten Heterozygoten-Frequenzen signifikant geringer als die erwarteten. Drei dieser vier Populationen sind mit denen nicht im HWG befindlichen identisch. Für die sieben untersuchten *Striga*-Populationen wurde ein durchschnittlicher Inzuchtkoeffizient (F) von 19,0 % errechnet. Innerhalb der lokalen Populationen schwankt dieser Koeffizient von 11,0 bis 29,0 %. Dieses Defizit an Heterozygoten entspricht nicht einer obligat fremdbefruchtenden Pflanze mit Zufallspaarung. Wir vermuten, daß die Paarung bei *S. hermonthica* nicht völlig

zufällig erfolgt. Frühere Studien an *S. hermonthica* haben die Bedeutung von Insekten bei der Bestäubung dokumentiert. Dieser Bestäubungsmechanismus könnte eine entscheidende Ursache für die beobachtete Inzucht sein. Insekten, die mit ihrer Energie auf der Nahrungssuche rationell umgehen müssen, bestäuben nahe beieinander liegende Blüten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als weiter entfernt liegende. Andere Untersuchungen haben gezeigt, daß gereifte, ausgefallene *Striga*-Samen zu einem großen Teil am Ort verbleiben. Damit ist eine Sippenbildung zumindest vorstellbar, was zu einer moderaten Inzucht führen kann.

In unserer Untersuchung fanden wir desweiteren eine hohe durchschnittliche genetische Diversität (\hat{H}) von 46,9 % und eine durchschnittliche beobachtete Heterozygotie (H) von 37,9 %. Diese hohe genetische Variabilität von *S. hermonthica* kann als Ausdruck der parasitischen Lebensweise interpretiert werden. Der ständige Versuch, sich an neue Wirtspflanzen zu adaptieren bzw. bestehende Toleranzen oder Resistenzen zu überwinden, sowie das Leben in einer unausgewogenen mit hoher Variabilität behafteten Umwelt, wie es der Sahel ist, können dafür Ursachen sein. Die hohe Allelzahl je Locus (2,5 bis 2,8 Allele) ist eine weitere Erklärung für den hohen Grad an Heterozygotie (trotz moderater Inzucht).

Die Untersuchung der genetischen Diversität zwischen den Populationen ließen diese als eine große Population erscheinen. Die Heterozygotie der Teilpopulation verglichen mit der gesamten Population erbrachte lediglich eine Variation von $F_{ST} = 2,4$ %. Keine Unterschiede zwischen den Populationen wurden beim Vergleich von erwarteten und beobachteten homo- und heterozygoten Genotypen festgestellt. Ein paarweiser Vergleich der Genfrequenzen belegte ebenfalls die geringe Diversität der untersuchten Loci zwischen den Populationen.

Die Adaptation der einzelnen *Striga-hermonthica*-Populationen an ihren korrespondierenden Wirt (Kolbenhirse oder Sorghum) konnte mit den geleisteten Untersuchungen nicht genetisch nachgewiesen werden. Daß diese Anpassungen vorhanden sind, belegte das Topfexperiment.