

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



**Towards understanding the  
genetics of tolerance to low soil  
phosphorus conditions in West  
African pearl millet**

**Dissertation \*Dorcus Chepkesis Gemenet\* 2015**

Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population  
Genetics

University of Hohenheim

Institute 350a (Plant Breeding)

apl. Prof. Dr. Bettina I.G. Haussmann

**Towards understanding the genetics of  
tolerance to low soil phosphorus conditions  
in West African pearl millet**

**Dissertation**

Submitted in fulfillment of the requirements for the degree  
„Doktor  
der Agrarwissenschaften“ (Dr. sc. agr. /Ph. D. in Agricultural  
Sciences) to the Faculty of Agricultural Sciences

Presented by  
Dorcus Chepkesis Gemenet  
From Saboti in Trans-Nzoia, Kenya

Stuttgart-Hohenheim  
2015

## Summary

About two hundred and twenty three million people are undernourished in Sub-Saharan Africa (SSA) with 11 million people being food insecure in the Sahel region of West Africa (WA). A growing global population and climate change are expected to exacerbate this situation and present new challenges on global food production. Phosphate rock, a non-renewable resource is expected to be depleted in about 40-400 years depending on the source of information but a phosphorus (P) peak (where P demand exceeds P supply) is likely to occur before 2040. The effects of limited global P supply are expected to be felt more by resource poor smallholder farmers in SSA. This is also the region already with the lowest inorganic fertilizer use and highly weathered P deficient soils. Given these factors, breeding for low-P tolerance in crop plants offers the main environmental friendly and economically feasible strategy for improving crop productivity under low-P soils for smallholder farmers in WA conditions. This will not only contribute towards food security in the short term but also in the long term by contributing towards the efficient use of a scarce resource.

Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.], the world's sixth cereal crop is the hardiest of the C<sub>4</sub> cereals and is therefore an important food security crop in the semi-arid tropics. In the Sahel region of WA where it is the staple cereal, it contributes to food security by providing calories as well as contributing towards nutritional security by providing higher iron and zinc levels than most staple cereals. Despite this contribution towards humanity, pearl millet has received little attention in terms of research and technology and is still considered an 'orphan' crop. In Sahelian WA, pearl millet grows under difficult conditions of random droughts, erratic rainfall, poor soils, high temperatures and low inputs, with sometimes labor and seed being the only inputs afforded by the smallholder farmers. P has been shown to be the most limiting macronutrient on pearl millet production within this region as a result of soils with low total P, high P fixing characteristics as well as interaction with other soil micronutrient toxicities and/or deficiencies. Despite this fact, the available pearl millet germplasm had never been evaluated for grain yield performance under low-P conditions within this region prior to this study and the magnitude of the genetic component of variation had not been tested from a breeding perspective.

To fill in this knowledge gap, three genotype groups: open-pollinated varieties, inbred lines and their testcrosses were evaluated in large-scale multi-environment trials in four countries (Niger, Burkina Faso, Mali and Senegal) under two P-levels (with P fertilization and without P fertilization) between 2010 and 2012. In addition, the open-pollinated varieties and inbred lines were evaluated for P-efficiency related traits at early growth stage in pot conditions and

at mature plant stage under field conditions (inbred lines only). The main aim of these evaluations was to explore the prospects of plant breeding for improving pearl millet grain yield under low-P conditions in WA. We sought to achieve the following specific objectives: (i) to estimate quantitative-genetic parameters for grain yield in order to establish a selection strategy for pearl millet targeting P-limited environments in WA; (ii) to determine the relationship between P-efficiency related traits and grain yield in order to make inferences on which target traits should be considered in adapting pearl millet to low-P conditions in WA; and (iii) to identify genetic regions underlying quantitative traits which are related to P-efficiency based on diversity array technology (DArT) markers.

There is significant genetic variation for pearl millet performance in low-P soils; hence genetic improvement for low-P conditions should be possible. Both wide and specific adaptation can be followed in breeding pearl millet varieties for low-P conditions in WA. The decision on which adaptation method to emphasize will however depend on the clear definition of breeding objectives and the target environment for which improvement is aimed for. Direct selection of pearl millet under low-P conditions is more efficient and should be carried out in breeding activities targeting low-P environments. Landraces offer a novel genetic pool for specific adaption to low-P conditions which could be used as a valuable genetic resource for improving pearl millet. Performance under pot conditions has low genetic correlation to performance under low-P field conditions. Indirect selection under pot conditions for estimating the field performance therefore has limited applicability in pearl millet breeding activities targeting low-P field conditions. Positive mid-parent heterosis of testcrosses over inbred lines indicates potential for hybrid breeding targeting low-P environments within WA. However, given the unpredictably variable rainfall conditions under which pearl millet grows, this heterosis can only be exploited using more heterogenous hybrids like 3-way cross, double-cross or top-cross hybrids which have a substantial amount of population buffering.

Pearl millet in WA exhibits a wide genetic variation for P-uptake and internal use efficiency. Improving either of these two mechanisms in varieties targeting low-P environments is therefore feasible. P-uptake efficiency is more correlated to grain yield in pearl millet than P-utilization efficiency, and given the interactions among P, drought and other soil characteristics evident within the region, P-uptake efficiency under these conditions should be selected for. However, given the already low P content of the soils in the region and the low input conditions, genotypes selected for low-P environments should combine both P-uptake efficiency and internal P-utilization efficiency to avoid further depletion of the soils. A lower

P concentration in grain could offer a strategy for improving internal P-use efficiency in pearl millet and allow more P cycling within the farming system but there is need to properly define the effects of this on the next generation crop performance (seedling vigor), human nutrition (phytate content) and DNA composition.

Several markers showed significant association with phenotypic traits in the current study. Nine markers were associated with different P-efficiency-related traits such as P concentration in stover, P concentration in grain, P uptake and P utilization efficiency. Nine markers and thirteen markers were found to be associated with flowering time and grain yield respectively. Each of these markers individually explained between 5.5 to 15.9 % of the observed variations indicating the polygenic nature of low P tolerance in pearl millet. Some of these markers were specific to environments where they occurred (adaptive markers) whereas some were stable across environments (constitutive markers). For instance marker PgPb11603 was constitutive for early flowering whereas marker PgPb12954 was constitutive for grain yield. Several markers were also significantly associated with more than one trait for example P-uptake efficiency and grain yield implying that such traits were probably controlled by same genomic regions. The results obtained in the current study indicate potential for applying marker-assisted selection approaches in breeding activities targeting low-P environments. However further validation of these markers is necessary.

The results presented in the current study indicate potential of improving pearl millet grain yield under P-limited conditions through breeding both conventionally and through molecular technologies. However, the challenges experienced during field evaluation for low-P tolerance in the current study indicate that plant breeding alone cannot solve the effects of low-P on pearl millet grain yield. Given the global P crisis, other agronomic, socio-economic and policy approaches need to be effected alongside breeding activities if the pearl millet production system should be made sustainable to ensure food security for current and future generations.

## Zusammenfassung

Ungefähr 230 Millionen Menschen in Afrika südlich der Sahara (SSA) sind unterernährt; davon haben 11 Millionen Menschen in der Sahel Region von West Afrika (WA) keine gesicherte Ernährung. Die wachsende Weltbevölkerung und der Klimawandel werden diese Situation weiter verschärfen und stellen die weltweite Nahrungsmittelproduktion vor eine große Herausforderung. Man geht davon aus, dass Rohphosphat, ein nicht erneuerbarer Rohstoff, innerhalb der nächsten 40-400 Jahre aufgebraucht sein wird. Diese Angabe ist abhängig von der Informationsquelle, allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Phosphor (P)-Knappheit (wobei die Nachfrage das Angebot übersteigt) schon vor 2040 eintreten wird. Besonders die ressourcenarmen Kleinbauern in SSA werden den Effekt von global begrenztem P-Angebot zu spüren bekommen. SSA ist die Region mit dem geringsten Einsatz von anorganischem Dünger und in der stark verwitterte Böden mit P-Mangel vorherrschen. Unter diesen Umständen bietet die Nutzpflanzenzüchtung auf P-Mangeltoleranz die umweltfreundlichste und ökonomisch sinnvollste Strategie zur Verbesserung der Produktivität für Kleinbauern in West Afrika zur verbessern. Dies wird nicht nur kurzfristig zur Ernährungssicherung, sondern auch langfristig zur effizienten Nutzung von knappen Ressourcen beitragen.

Perlhirse [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.], die weltweit sechst wichtigste Getreidepflanze, ist das widerstandsfähigste C<sub>4</sub> Getreide und für die Ernährungssicherung in den semiariden Tropen besonders bedeutend. In der Sahelregion von WA ist es das Grundnahrungsmittel und somit entscheidend für die Ernährungssicherung sowohl als Kalorien- als auch als Nährstofflieferant, da wichtige Mikronährstoffe wie Eisen und Zink in höheren Konzentrationen vorliegen als bei anderen Getreidearten. Trotz dieses Beitrags für die Menschheit wurde Perlhirse im Hinblick auf die Forschung und Technologieentwicklung nur wenig Beachtung geschenkt und wird immer noch als ‚orphan crop‘ (verwaiste Nutzpflanze) bezeichnet. Perlhirse wächst in der Sahelregion von WA unter schwierigen Bedingungen, dazu gehören unvorhersehbare Dürreperioden, unregelmäßige Regenfälle, nährstoffarme Böden, hohe Temperaturen und geringer Eintrag an Dünger. Häufig sind der Arbeitseinsatz und das Saatgut die einzigen Mittel, die die Kleinbauern aufbringen können. Es wurde gezeigt, dass P der limitierendste Makronährstoff für die Perlhirseproduktion in dieser Region ist. Dies ist bedingt durch Böden mit geringem Gesamt P-Gehalt, hoher P-Fixierungskapazität und Wechselwirkung/Interaktion mit Giftigkeit anderer Bodenmikronährstoffe und/oder deren Mangel. Trotz dieser Tatsache wurde in WA der vorhandene Perlhirsegenpool noch nie auf

Kornertrag unter P-Mangelbedingungen erforscht. Bisher gab es noch keine Studien zur Größenordnung der genetischen Varianzkomponenten in züchterischer Hinsicht.

Um diese Wissenslücke zu schließen wurden in groß angelegten mehr-ortigen Versuchen zwischen 2010 und 2012 in vier Ländern (Niger, Burkina Faso, Mali und Senegal) die Leistung von drei Gruppen von Genotypen (offen-abblühende Sorten, Inzuchtlinien und ihre Testkreuzungen) auf Standorten mit sowie ohne P Düngung untersucht. Zusätzlich wurden die offen-abblühenden Sorten und Inzuchtlinien im frühen Wachstumsstadium unter Topfbedingungen und im Reifestadium unter Feldbedingungen (nur Inzuchtlinien) auf Merkmale, die mit P-Effizienz verknüpft sind, untersucht. Das Hauptziel dieser Untersuchungen war die Möglichkeiten der Pflanzenzüchtung zur Verbesserung des Perlhirsekornertrags unter P-Mangelbedingungen in WA zu bewerten. Die folgenden spezifischen Aufgabestellungen setzten wir uns als Ziel: (i) die Schätzung von quantitativ genetischen Parametern für Kornertrag, um eine Selektionsstrategie für Perlhirse in P-Mangelumwelten zu erstellen; (ii) Ermittlung der Beziehung zwischen Kornertrag und Merkmalen der P-Effizienz, um vorhersagen zu können, welche Zielmerkmale betrachtet werden sollten, um Perlhirse an P-Mangelbedingungen in WA anzupassen; und (iii) die Identifizierung genetischer Marker, die mit quantitativen, mit P-Effizienz in Bezug stehenden, Merkmalen korreliert sind. Dabei wurden ‚diversity array technology‘ (DArT) Marker genutzt.

Es besteht eine signifikante genetische Variation für die Leistung von Perlhirse auf Böden mit P-Mangel, sodass eine genetische Verbesserung für P-Mangelbedingungen möglich sein sollte.

Breite als auch spezifische Anpassung von Perlhirsesorten an P-Mangel können in der Züchtung angestrebt werden. Die Entscheidung, auf welche Anpassungsmethode man den Schwerpunkt legt, ist abhängig von der klaren Definition der Züchtungsziele und der betrachteten Umwelt. Eine direkte Selektion von Perlhirse unter P-Mangelbedingungen ist effizienter und sollte bei Züchtungsvorhaben für P-Mangel Umwelten bevorzugt werden. Landrassen sind spezifischer angepasst an P-Mangel als verbesserte Sorten und stellen somit eine wertvolle genetische Ressource für die Perlhirseverbesserung dar. Die genetische Korrelation der Leistungsfähigkeit unter Topf- und Feldbedingungen bei P-Mangel ist sehr gering. Indirekte Selektion unter Topfbedingungen für die Schätzung der Leistung im Feld ist somit nur begrenzt anwendbar für die Perlhirsezüchtung. Positive ‚mid-parent heterosis‘ (Heterosis relativ zum Elternmittel) der Testkreuzungen der Inzuchtlinien zeigt das Potential der Hybridzüchtung für P-Mangel Umwelten innerhalb von WA. Dennoch, angesichts der

unvorhersehbaren und unregelmäßigen Regenverhältnisse unter welchen Perlhirse wächst, kann diese Heterosis nur mittels heterogener Hybriden genutzt werden. Möglich wären 3-Wege Kreuzungen, Doppel-Kreuzungen oder ‚Top-cross‘ Hybriden, welche ein umfangreiches Puffervermögen innerhalb der Population aufweisen. Perlhirse in WA weist eine breite genetische Variation für die Aufnahme und Nutzungseffizienz von P auf. Die Verbesserung beider Mechanismen in Sorten, die für P-Mangel angepasst werden, ist daher möglich. P-Aufnahme ist stärker mit Kornertrag korreliert als die P-Nutzungseffizienz, und in Anbetracht der Interaktion zwischen P, Dürre und anderen Bodenbedingungen in dieser Region, sollte auf P-Aufnahmeeffizienz unter diesen Bedingungen selektiert werden. Allerdings sollten bei geringem P-Gehalt des Bodens und geringem P-Eintrag Genotypen selektiert werden, die effizient in P-Aufnahme und Nutzung sind, um den Boden nicht weiter zu verarmen. Eine geringe P-Konzentration im Korn könnte eine Strategie darstellen, um die P-Nutzungseffizienz in Perlhirse zu verbessern und einen besseren P-Kreislauf innerhalb des landwirtschaftlichen Systems zu ermöglichen. Aber es besteht die Notwendigkeit den Effekt auf die Leistungsfähigkeit in der nächsten Generation (Keimfähigkeit), die menschliche Ernährung (Phytatgehalt) und den DNA-Aufbau genau zu definieren. In der vorliegenden Studie zeigten einige Marker einen signifikanten Zusammenhang mit phänotypischen Merkmalen. Neun Marker wurden mit verschiedenen Merkmalen assoziiert, die mit P-Effizienz in Verbindung stehen. Dazu gehören die P-Konzentration im Stroh, P-Konzentration in Korn, P-Aufnahme und P-Nutzungseffizienz. Eine Assoziation zwischen neun Markern und Blühzeitpunkt und dreizehn Markern und Kornertrag konnte festgestellt werden. Jeder der Marker erklärte einzeln zwischen 5,5 und 15,9 % der beobachteten Variation, was den polygenen Charakter von P-Mangeltoleranz deutlich macht. Einige der Marker waren spezifisch für die Umwelt, in der sie auftraten („adaptive Marker“), wobei andere über die Umwelten stabil waren („konstitutive Marker“). Zum Beispiel war Marker PgPb11603 konstitutiv für frühe Blüte und PgPb12954 konstitutiv für Kornertrag. Einige Marker waren mit mehr als einem Merkmal signifikant assoziiert zum Beispiel mit P-Aufnahme und Kornertrag, was bedeutet, dass diese Merkmale durch die gleiche genetische Region kontrolliert werden. Die Ergebnisse, die in dieser Studie erlangt wurden, weisen auf das Potenzial der Marker-gestützten Selektion für die Züchtung in Hinblick auf Umwelten mit P-Mangel hin. Jedoch ist eine weitere Validierung dieser Marker notwendig.

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse zeigen, welches Potential die Züchtung für die Verbesserung des Kornertrages unter P-Mangelbedingung hat, wobei die konventionelle als auch die molekulare Züchtung dienlich sind. Dennoch, Schwierigkeiten, die während der



Feldevaluierung für P-Mangeltoleranz, auftraten machen deutlich, dass Pflanzenzüchtung alleine den Effekt von P-Mangel auf den Ertrag von Perlhirse nicht lösen kann.

Angesichts der globalen P Krise ist es notwendig, dass andere agronomische, sozioökonomische und politische Ansätze neben den Züchtungsaktivitäten verfolgt werden. Nur so kann die Produktion von Perlhirse nachhaltiger und die Ernährungssicherung für die derzeitigen und nachfolgenden Generationen sichergestellt werden.