Déterminisme du sexe chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* (Poir.) du Bénin

Narcisse Denadi

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique

Composition du Jury de thèse :

Président : Prof. Frédéric Gaspart (UCLouvain, Belgique)

Secrétaire : Prof. Pierre Bertin (UCLouvain, Belgique)

Promoteurs : Prof. Muriel Quinet (UCLouvain, Belgique)

Prof. Christophe B. Gandonou (UAC, Bénin)

Lecteurs : Prof. Stanley Lutts (UCLouvain, Belgique)

Prof. Claire Périlleux (ULiège, Belgique)

Prof. Hana Chaïr (CIRAD-Montpellier, France)

Octobre 2022

Dédicace

A la Professeur **Jeanne Zoundjihépkon.**

J’ai appris de vous qu’il faut, quand bien même c’est parfois douloureux, renoncer au bien-être pour l’éthique ; une pensée inspirée de la philosophie socratique « la bonne renommée vaut mieux que ceinture dorée ». Mais du fauteuil de votre retraite, vous pouvez regarder avec fierté la relève que vous avez construite, tenir le flambeau de ces valeurs « **les petits moyens au service de la science consciente** ». Mon plus grand remerciement serait que cette œuvre puisse apporter quelques réponses à ces questions qui ont longtemps sommeillé en vous.

Remerciements

Au terme de ces quatre années de ma vie, consacrées à la réalisation de cette œuvre, je trouve plus qu'un devoir de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réussite.

Pour commencer, je rends grâce à Dieu pour toutes ses merveilles dans ma vie, lui qui m'a guidé et éclairé tout au long de ce parcours scientifique.

Je tiens à remercier mes promoteurs de thèse, les Professeurs Muriel Quinet et Christophe Gandonou de m'avoir tenu la main tout au long de cette thèse. Quand je remonte à la genèse de ce travail je ne peux m'empêcher de leur adresser ma profonde gratitude pour leur franche collaboration qui a permis que ce travail passe du rêve à la réalité. Au-delà d'un guide scientifique, ils ont été pour moi des personnes à qui je peux recourir dans mes difficultés personnelles.

Je remercie très sincèrement les membres de mon comité d'accompagnement et de mon jury de thèse, les Professeurs Frédéric Gaspart, Pierre Bertin, Stanley Lutts, Anne-Laure Jacquemart, Clair Périlleux et Hana Chaïr pour l'accompagnement, les apports et suggestions qui ont contribué à l'amélioration de la qualité scientifique de ce travail. Merci également aux Professeurs André Lejeune, Ogoubi Daïnou et Alexandre Dansi pour les conseils édifiants.

A tous les collègues des équipes du GRPV (Groupe de recherche en Physiologie Végétale ; Belgique), du LAPVES (Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux ; Bénin) et du LGE (Laboratoire de Génétique Ecologique) je dis mes sincères remerciements pour la bonne ambiance de travail que vous m'avez offerte.

Je remercie très sincèrement le promoteur du Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA) et tout son personnel pour la bonne coopération et le bon climat de travail qui m'a permis de mener à bien les expériences de terrain.

J'adresse mes sincères remerciement au Département Conseil de l'Action Internationale (CAI / UCLouvain) qui m'a octroyé la bourse doctorale pour réaliser ce projet. Je remercie l'ensemble du personnel académique, scientifique et administratif de l'UCLouvain.

J’exprime ma profonde gratitude à toute ma famille, petite et grande, proche et lointaine pour les soutiens de tout genre.

A tous mes amis et connaissances, je dis un sincère merci pour les soutiens inconditionnels qui m’ont aidé à passer un bon séjour en Belgique.

Summary

Cultivated yam (*Dioscorea rotundata*) is a staple tuber crop in West Africa that is mainly propagated vegetatively. Although the majority of yam cultivars flower, the control of its sexual reproduction – in particular sexual expression – remains largely unknown despite its importance for breeding programs. Our objectives were to: 1) characterize the flowering phenology and identify the causes of sex variation in this species; 2) analyze the genetic and hormonal controls of sex determinism; and 3) study the performance of sexual reproduction in monoecious cultivars. Our histological study showed that during floral morphogenesis, stamen and carpel primordia are initiated in all flowers irrespective of sex, but while only primordia corresponding to the sex of the flower continue to develop in sex-stable plants, male and female flowers of sub-dioic populations retain remnants of organs of the opposite sex. Our results also showed that the sex variation of the offspring was more related to the sex of the parents (monoecious in this case) than to the tuber sections used as seed tubers. Our genetic study did not identify a clear genetic marker for early determination of sex identity in *D. rotundata* yams from Benin but supported the involvement of a genetic locus (Z-) in sex expression with a possible transition from a ZZ/ZW female heterogamous system to an XX/XY male heterogamous system. Our hormonal analyses showed that jasmonates (MeJa) had a masculinizing effect in monoecious plants and that application of MeJA and cytokinins (BAP) accelerated flowering and increased inflorescence production. Furthermore, our crossing results showed that flowers of monoecious plants were fertile and showed a reproductive performance comparable to that of dioecious plants, so that they can partially compensate for the scarcity of female flowers in breeding programs. Altogether, our study has improved our understanding of the control of sex in cultivated yam (*Dioscorea rotundata*).

Table des matières

SUMMARY ..... **V**

TABLE DES MATIERES ..... **VII**

LISTE DES ABREVIATIONS ..... **XI**

INTRODUCTION GENERALE **1**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **7**

1 REPRODUCTION CHEZ LES ANGIOSPERMES **7**

1.1 DEFINITION ET HISTORIQUE DE LA SEXUALITE CHEZ LES PLANTES 7
1.2 LES SYSTEMES DE REPRODUCTION DES ANGIOSPERMES 8
1.2.1 Les systèmes sexuels chez les angiospermes *9*
1.2.1.1 La diversité des systèmes sexuels chez les angiospermes 9
1.2.1.2 Evolution de la dioécie 12
1.2.1.3 Mécanismes de détermination du sexe chez les espèces dioïques 13
1.2.1.3.1 Contrôle génétique du sexe chez les plantes dioïques 14
1.2.1.3.1.1 Détermination basée sur les chromosomes sexuels 14
1.2.1.3.1.2 Diversité des mécanismes moléculaires de la détermination du sexe 17
1.2.1.3.2 Environnement et contrôle épigénétique de la détermination du sexe 19
1.2.1.3.3 Contrôle hormonal du sexe 21
1.2.2 Les stratégies de reproduction *23*
1.2.2.1 Diversité des stratégies de reproduction 23
1.2.2.1.1 L'autogamie 24
1.2.2.1.2 La géitonogamie 25
1.2.2.1.3 L'allogamie 25
1.2.2.2 Mécanisme du système d'auto-incompatibilité (SI) 26
1.2.2.2.1 L'autoincompatibilité gamétophytique (GSI) 27
1.2.2.2.2 L'autoincompatibilité sporophytique homomorphe (SSI) 28
1.2.2.2.3 Autoincompatibilité sprophytique hétéromorphe (HetSI) 29
1.2.2.2.4 Auto-incompatibilité tardive (LSI) 30

2 LES IGNAMES **31**

2.1 SYSTEMATIQUE DES IGNAMES 31
2.2 ORIGINES ET DISTRIBUTION DES IGNAMES 32
2.2.1 Du conflit taxonomique entre D. rotundata et D. cayenensis aux origines des ignames cultivées d'Afrique *34*
2.2.2 Histoire de domestication des ignames cultivées D. rotundata et D. cayenensis *35*
2.3 DIVERSITE DES IGNAMES CULTIVEES D'AFRIQUE 37

2.3.1 Diversité agro-morphologique *37*
2.3.2 Diversité cytogénétique *39*
2.3.3 Diversité moléculaire *40*
2.4 IMPORTANCE DES IGNAMES 41
2.4.1 Importance économique des ignames *41*
2.4.2 Importance nutritionnelle des ignames *43*
2.4.3 Importance ethnobotanique des ignames *43*
2.4.4 Importance socioculturelle des ignames *44*
2.5 CONTRAINTES PHYTOSANITAIRES ET CULTURE D'IGNAME 44
2.6 BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DES IGNAMES 46
2.6.1 Reproduction végétative *46*
2.6.2 Reproduction sexuée chez les ignames cultivées *47*
2.6.2.1 La floraison chez les ignames cultivées 48
2.6.2.1.1 Généralité sur la floraison des ignames 48
2.6.2.1.2 Description florale 49
2.6.2.1.3 Plasticité du sexe chez les ignames 50
2.6.2.1.4 Déterminisme du sexe chez les ignames cultivées 51
2.6.2.1.5 Prédiction du sexe chez les ignames 52
2.6.2.2 La pollinisation 53
2.6.2.2.1 Pollinisation naturelle 54
2.6.2.2.2 Pollinisation manuelle 54
2.6.2.3 Mise à fruit et mise à graine chez les ignames cultivées 55
2.6.2.4 Evaluation de la viabilité des organes reproducteurs 57
2.6.2.4.1 La viabilité pollinique 57
2.6.2.4.2 Réceptivité du stigmate et efficience de la pollinisation 60

3 MILIEU D'ETUDE 61

3.1 SITUATION GEOGRAPHIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE 61
3.2 HISTORIQUE DE LA COLLECTION NATIONALE DES IGNAMES CULTIVÉES DU BÉNIN… 63

4 OBJECTIFS DE THÈSE 65

CHAPITRE I. EXPRESSION DU SEXE ET DÉVELOPPEMENT INFLORESCENTIEL ET FLORAL CHEZ LES IGNAMES CULTIVÉES *DIOSCOREA ROTUNDATA* DU BÉNIN 97

RESUME 98

1. INTRODUCTION 99

2. MATERIEL ET METHODES 101

3. RESULTAT 104

4. DISCUSSION 115

5. CONCLUSIONS 120

CHAPITRE II. PLANT SEX PREDICTION USING GENETIC MARKERS IN CULTIVATED YAMS (*DIOSCOREA ROTUNDATA* POIR.) IN BENIN. 137

ABSTRACT 138

1. INTRODUCTION 139

2. MATERIALS AND METHODS 141

3. RESULTS 143

4. DISCUSSION 151

5. CONCLUSIONS 155

CHAPITRE III. THE SEX OF THE MOTHER PLANT AFFECTS THE SEX VARIATION IN THE OFFSPRING IN *DIOSCOREA ROTUNDATA* 175

ABSTRACT 176

1. INTRODUCTION 177

2. MATERIALS AND METHODS 179

3. RESULTS 183

4. DISCUSSION 192

5. CONCLUSIONS 196

CHAPITRE IV. CYTOKININS AND JASMONATES AFFECT SEX EXPRESSION, FLOWERING TIME AND FLOWERING INTENSITY IN CULTIVATED YAM *DIOSCOREA ROTUNDATA* (POIR.) 217

ABSTRACT 218

1. INTRODUCTION 219

2. MATERIALS AND METHODS 221

3. RESULTS 225

4. DISCUSSION 234

5. CONCLUSIONS 238

CHAPITRE V. YAM (*DIOSCOREA ROTUNDATA* POIR.) DISPLAYS PREZYGOTIC AND POSTZYGOTIC BARRIERS TO PREVENT AUTOGAMY IN MONOECIOUS CULTIVARS 253

ABSTRACT 254

1. INTRODUCTION 255

2. MATERIALS AND METHODS 257

3. RESULTS 267
4. DISCUSSION 275
5. CONCLUSIONS 280
DISCUSSION GENERALE 295
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 315
ANNEXE 331
IMPACT DES PHYTOHORMONES SUR LA CROISSANCE VEGETATIVE DES IGNAMES CULTIVEES *D. ROTUNDATA* (POIR.) 333

Liste des abréviations

δ	:	Inbreeding depression
ABA	:	Abscisic acid
ACC	:	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
AFLP	:	Amplification Fragment Length *Polymorphism*
AG	:	*AGAMOUS*
ANOVA	:	Analysis of variance
AP	:	*APETALA*
ARF2	:	*AUXIN RESPONSE FACTORS2*
ARN	:	Ribonucleic acid
ASECNA	:	Agence pour la Sécurité de la Navigation aérienne en Afrique et à Madagascar
BAP	:	6-benzylaminopurine
BK	:	Brewbaker et Kwack
Br	:	Brassinosteroides
BzA	:	Benzoic acid
CAPS	:	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CK	:	Cytokinines
CREFIISDA	:	Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole
DAD1	:	*DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1*
DEG	:	Differential Gene Expression
DNA	:	Deoxyribonucleic Acid
DRMT1	:	Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1
FAA	:	Formalin-Aceto-Alcohol
FAOSTAT	:	Food and Agriculture Organization Statistics
fCFA	:	franc de la Communauté Financière Africaine
F1	:	Fratrie 1
GA	:	Gibbérellines
GSI	:	Gametophytic Self-Incompatibility
HetSI	:	Hétéromporphic Self-Incompatibility
HPLC	:	High-Performance Liquid Chromatography
IAA	:	Indole-3-acetic acid
IITA	:	International Institute of Tropical Agriculture
I2KI	:	Iodine potassium iodide

ISSR	:	Inter Simple Sequence Repeat
JA	:	Jasmonic acid
LecRK1	:	Lectin receptor kinase1
LSI	:	Late-acting self-incompatibility
LFY	:	*LEAFY*
Lys9	:	Lysine en position 9
MAPK	:	Mitogen-Activated Proteine Kinase
MCA	:	Multiple component analysis
MeJa	:	Méthyl jasmonate
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PI	:	*PISTILLATA*
P^H	:	Hydrogen potential
PIB	:	Produit Intérieur Brute
PrpS7	:	Papaver rhoaes pollen S7
PrsS		Papaver sitgma pollen S
RADP	:	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	:	Ribonucleic acid
RNase	:	Ribonucléase
SA	:	Salicylic acid
SAM	:	Shoot Apical Meristem
SCI	:	self-compatibility index
SCF	:	Skp1-Cullin1-F-box
SCR	:	S-Locus Cysteine Rich
SFI	:	self-fertility index
SI	:	Self-Incompatibility
SLF	:	S-Locus F-box
SLG	:	S- Locus-Glycoprotéine
SNP	:	Single Nucleotide Reapeat
SOX	:	*SRY-related HMG-box genes*
sp1 OA	:	sp1 secondary amplications
SP11	:	S-locus protein 11
SpGAI	:	*Specific expression of GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*
SRK	:	*S-Locus Receptor Kinase*
SRY	:	*sex determining region of the Y*
SSI	:	Sporophytic Self-Incompatibility
SSR	:	Simple Sequence Repeat
YMV	:	Yam Mosaic Virus

Introduction Générale

L'agriculture est la principale source d'alimentation des populations à travers le monde. Elle connaît des essors remarquables grâce aux connaissances accrues des travaux scientifiques. Mais face aux défis des changements climatiques et à l'insécurité alimentaire, les recherches dans le sens de l'amélioration des plantes alimentaires sont de plus en plus sollicitées. Malgré les nouvelles méthodes de transformations géniques qui ont révolutionné le domaine, les méthodes conventionnelles basées sur le système de reproduction des plantes restent un outil majeur de la sélection et de la création variétale.

Les plantes terrestres présentent une grande diversité au sein de leur système de reproduction sexuée (Cardoso et al., 2018). Chez les angiospermes, la majorité des espèces sont hermaphrodites (72 %), 7 % sont monoïques, 17 % présentent des formes sexuelles intermédiaires et seulement 4 à 6 % sont dioïques (Renner, 2014; Yampolsky, 1922). Les plantes hermaphrodites présentent les organes reproducteurs mâles et femelles dans la même fleur ; si certaines peuvent s'auto-polliniser et tolérer l'allogamie, d'autres ont développé des mécanismes d'auto-incompatibilité favorisant ainsi l'allogamie (Cardoso et al., 2018). L'allogamie est également favorisée chez les plantes à fleurs unisexuées comme chez les plantes monoïques où les fleurs mâles et femelles sont portées sur la même plante (Opedal, 2018, 2019) et chez les plantes dioïques où les fleurs mâles et femelles se développent sur des plantes séparées, occasionnant une allogamie stricte (Carey et al., 2021). Chez les espèces dioïques, la détermination du sexe est généralement contrôlée par des systèmes chromosomiques mâle hétérogamétique XX/XY, femelle hétérogamétique ZZ/ZW ou par un équilibre X-autosomes (Charlesworth, 2022). Cependant, l'environnement et des facteurs endogènes comme les hormones peuvent également affecter le développement et le sexe des fleurs (Yu et al., 2004). A cet effet, de nombreux cas de réversions de sexe par application exogène de phytohormones ont été signalés (Çınar et al., 2022; Muyle et al., 2021).

Si les profondes connaissances des systèmes de reproduction ont très tôt permis l'amélioration des grandes cultures utilisant la reproduction sexuée comme mode de reproduction, cela n'a toujours pas été le cas de celles qui utilisent la reproduction végétative comme principal mode de multiplication.

On retrouve dans le lot, les plantes à racine et tubercule dont le manioc (*Manihot esculenta*), la patate douce (*Ipomoea batatas*), et les ignames (*Dioscorea spp*) principalement cultivées dans les régions tropicales d'Afrique et d'Asie. Ces cultures se démarquent par une importance irrévocable dans les domaines alimentaires, fourragers et industriels en Afrique subsaharienne et dans beaucoup d'autres régions du monde (Akanbi et al., 2007; Iyagba, 2010; Norman et al., 2018). Connues pour leur mode de reproduction essentiellement végétatif, ces cultures ont l'avantage d'avoir conservé la reproduction sexuée au cours de leur domestication permettant d'envisager une possibilité d'amélioration génétique. Malgré leur importance, la sélection conventionnelle des plantes à racines et tubercules est limitée par de nombreux défis. Plusieurs sont liés à leur système reproducteur sexué comme la faible production de fleurs, l'irrégularité de la floraison, le décalage de la période de floraison entre fleurs mâles et femelles, la faible fertilité des fleurs (réceptivité stigmatique et viabilité pollinique réduites), l'auto-incompatibilité, l'incompatibilité croisée, la polyploïdie ou le faible taux de nouaison (Jennings, 2009; Norman et al., 2018; Van Berloo et al., 2007). Il est donc évident qu'une meilleure connaissance de la biologie de la reproduction des plantes à tubercules et à racine s'avère nécessaire en amont des programmes d'amélioration génétique notamment ceux s'appuyant essentiellement sur les méthodes conventionnelles. Cette étude va se concentrer sur le cas des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* du Bénin.

Plusieurs espèces d'ignames sont produites en Afrique de l'Ouest, mais l'espèce *Dioscorea rotundata* reste la plus prisée, la plus cultivée et la plus consommée (Dumont et al., 2010; Mignouna et Dansi, 2003). Le Bénin est le quatrième producteur mondial de cette espèce derrière le Nigéria, le Ghana et la Côte d'Ivoire (FAOSTAT, 2020). Dans certaines régions du Bénin notamment le Centre et le Nord, l'igname est l'aliment de base et contribue à plus du tiers des apports caloriques de la population (Adejumo et al., 2013). La production d'ignames constitue une source de revenu importante pour plus de 75% de la population rurale (Loko et al., 2013). Au Bénin, le développement d'une filière marchande de cossettes d'igname séchées a permis de pallier en partie aux pertes post-récolte et d'accroître la commercialisation de l'igname au niveau régional et international. L'igname est alors passée du statut de culture rituelle et vivrière, à celui de culture de rente et fait partie intégrante des composantes de l'économie des régions productrices (Baco, 2007).

La culture d'igname est confrontée à de nombreuses difficultés à savoir, la sécheresse (Yolou, 2016) et les problèmes phytosanitaires dont l'anthracnose (Joseph et al., 2020; Ntui et al., 2021b) , les champignons (Yolou, 2016), les nématodes (Etchiha Afoha et al., 2018) et les virus (Bakayoko et al., 2021; Luo et al., 2022; Silva et al., 2015) pouvant causer des dommages importants chez les cultivars sensibles et entrainer une perte de rendement avoisinant 66% (Ignatius et al., 2019). Malgré cet état de chose, les ignames ont été pendant longtemps oubliées par la recherche et les services agricoles (Brice et al., 2016). Cela se justifierait par le mode de reproduction principalement végétatif adopté par les ignames. Pourtant, plusieurs investigations entreprises sur la biologie de la reproduction ont montré que les ignames cultivées *D. rotundata* fleurissent et fructifient (Darkwa et al., 2020b; Mondo et al., 2020). Les plantes sont généralement dioïques, portant soit des fleurs mâles, soit des fleurs femelles mais certains cultivars sont monoïques et portent les deux types de fleurs sur le même plant (Mondo et al., 2020). Au Bénin, 70% des cultivars détenus par les paysans fleurissent (Dansi et al., 1997; Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b) avec une inégale répartition du sexe des cultivars entre le Centre et le Nord du Bénin (Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b).

Plusieurs travaux de recherche (Agbangla et al., 2002; Agre et al., 2021; Bhattacharjee et al., 2020; Darkwa et al., 2020a; Scarcelli et al., 2019; Scarcelli et al., 2011; Tostain et al., 2006) ont montré une grande diversité génétique au sein des cultivars *D. rotundata* même à l'intérieur des cultivars (Yolou, 2016). Même si les graines d'ignames ne sont pas exploitées par les cultivateurs (Tostain et al., 2005), elles contribuent à l'enrichissement de la diversité variétale. L'amélioration génétique de l'espèce pour l'obtention de cultivars performants peut passer par l'utilisation de ces graines, issues de la reproduction sexuée (Dumont et al., 2010).

L'instabilité du sexe est l'une des contraintes majeures qui pourrait entraver les programmes d'amélioration chez les ignames *D. rotundata* (Agre et al., 2020). On note également des floraisons irrégulières d'une année à l'autre (Darkwa et al., 2020b; Mondo et al., 2020). Plusieurs travaux ont tenté d'expliquer les mécanismes génétiques de l'expression du sexe chez les ignames cultivées ces dernières années (Agre et al., 2020; Asfaw et al., 2022; Girma et al., 2019; Mondo et al., 2021; Tamiru et al., 2017) mais jusqu'à ce jour, le déterminisme du sexe chez les ignames *D. rotundata* reste une véritable énigme qu'il est nécessaire d'élucider en amont de toute

recherche qui s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des ignames par voie sexuée.

Dans ce cadre, **l'objectif général de cette thèse est d'approfondir les connaissances sur la biologie de la reproduction, principalement le contrôle du déterminisme sexuel des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* en vue de faciliter leur amélioration génétique.**

Ce document est subdivisé en trois grandes parties : une revue bibliographique replaçant notre étude dans le contexte des connaissances actuelles sur le sujet qui sera suivie par la présentation des objectifs spécifiques de ce travail, une partie expérimentale présentant les résultats obtenus sous forme de 5 articles scientifiques, une discussion générale en réponse à nos 4 questions de recherches et finalement les perspectives apportées par notre étude.

Partie I
Revue bibliographique

Revue bibliographique

Revue bibliographique

1 Reproduction chez les angiospermes

1.1 Définition et historique de la sexualité chez les plantes

Etymologiquement le mot « sexe » proviendrait du latin *secare*, qui signifie «couper, diviser » (Gouyon, 2009). Cette origine met l'accent sur la séparation des sexes et s'accorde avec la définition génétique du sexe (ou la sexualité) qui est un échange d'informations génétiques (ou épigénétiques) entre des individus (Garraud, 2011). Chez les Eucaryotes, le sexe est rythmé par l'alternance de la méiose, qui divise par deux le niveau de ploïdie, et de la fécondation qui le double, en rassemblant le génome de deux cellules haploïdes, les gamètes (Garraud, 2011).

Jusqu'à la fin du XVIIIe siècle, la sexualité des plantes a fait l'objet de nombreuses controverses entre hommes de science et hommes d'église. Le médecin et botaniste allemand Rudoph Camerarius fut le tout premier chercheur en 1694 à faire le lien entre fleur et sexualité à l'aide d'expériences de castration chez le Ricin (*Ricinus communis* L., famille des Euphorbiacées), où fleurs mâles et femelles sont séparées. Il démontra ainsi que l'étamine correspondait au sexe mâle et le pistil au sexe femelle (Figure 2) et que les deux sexes étaient nécessaires pour obtenir des fruits et des graines. En se basant sur la découverte de Camerarius, le naturaliste Carl von Linné décida d'utiliser le sexe comme principe classificateur, notamment le nombre d'étamines. L'auteur opposait les plantes à mariages publics, celles portant des fleurs et des sexes visibles (angiospermes), aux plantes à mariages clandestins, comme les mousses et les fougères, où les sexes ne sont pas apparents. Sa classification rapidement adoptée en Europe, fit grand scandale à l'époque où il comparait l'étamine de la fleur au pénis et le stigmate à la vulve ; il lui fut reproché un esprit de luxure et son système sexuel considéré comme lubrique fut condamné par nombre de ses contemporains (Daugey, 2015). Mais jusqu'à présent, les fleurs et leurs structures servent toujours pour différencier les espèces d'angiospermes.

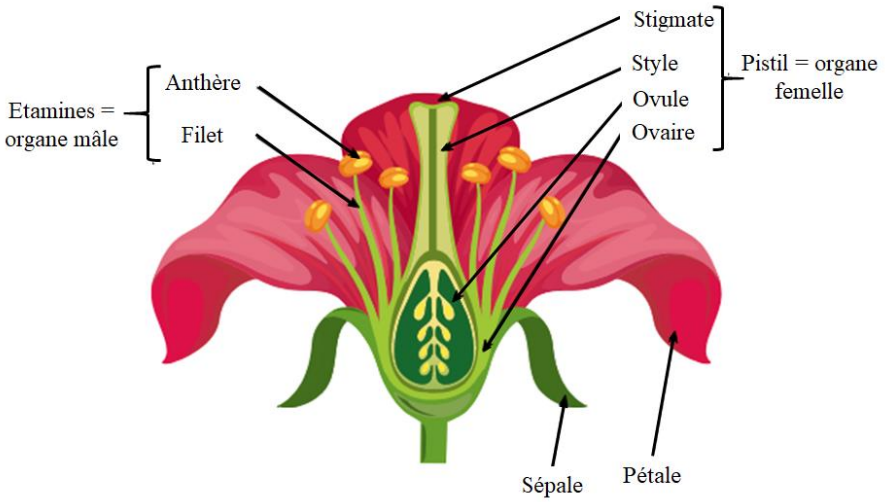


Figure 2 : schéma d'une fleur d'angiosperme montrant les différents organes floraux Source : https://www.nagwa.com/fr/explainers/134107961717/.

1.2 Les systèmes de reproduction des angiospermes

Le système de reproduction est l'ensemble des caractéristiques qui influencent le choix des partenaires pour la reproduction sexuée. Il regroupe à la fois les concepts de système sexuel (ou système reproducteur) et la stratégie de reproduction (ou système d'appariement) qui sont parfois utilisés comme synonymes mais très souvent dissociés (Cardoso et al., 2018; Diggle et al., 2011). Les systèmes sexuels font référence à la distribution des structures morphologiques productrices de gamètes mâles et femelles sur et entre les individus (Diggle et al., 2011). La stratégie de reproduction est définie par la modalité de l'échange des gamètes et va de l'autogamie à l'allogamie stricte, selon le taux d'autofécondation. L'allogamie est un mode de reproduction qui évite les effets délétères de la dépression de consanguinité et favorise l'hétérozygotie, la variabilité génétique et les échanges génétiques. Les plantes ont développé divers mécanismes pour promouvoir l'allogamie, notamment le développement des systèmes sexuels. Le système sexuel des angiospermes fait appel à un ensemble de terminologies récapitulées dans la figure 3. Ces terminologies seront développées en détails plus loin dans le document.

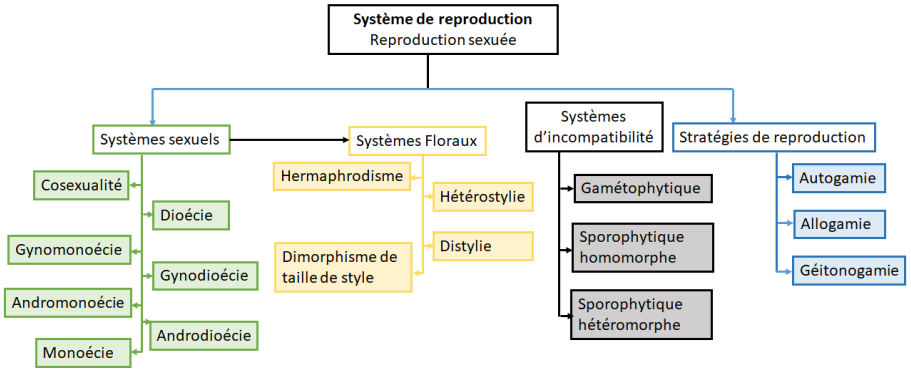


Figure 3 : Cadre général des différentes terminologies liées au système reproducteur des angiospermes (Cardoso et al., 2018).

1.2.1 Les systèmes sexuels chez les angiospermes

1.2.1.1 La diversité des systèmes sexuels chez les angiospermes

Contrairement aux animaux chez qui la restriction de la fonction mâle et femelle à des individus différents est de mise (Garraud, 2011), les plantes terrestres sont plutôt caractérisées par une grande diversité de systèmes sexuels (Cardoso et al., 2018). Chez les angiospermes, la majorité des espèces sont hermaphrodites (72 à 75%), 7 % sont monoïques. 17 % présentent des formes sexuelles intermédiaires (allant de la gynodioécie à la triécie) et seulement 4 à 6 % sont dioïques (Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993; Gaude et al., 2001; Renner, 2014; Yampolsky, 1922). Ces systèmes sont classés en deux types de forme (morphes) à savoir les monomorphes qui présentent un seul type de phénotype sexuel par système et les polymorphes qui en contiennent deux ou plus (définition schématique, Figure 4).
Les différents systèmes sexuels vont dans certains cas conditionner la stratégie de reproduction des espèces, l'autogamie ou l'allogamie. Par exemple, la présence des deux sexes sur une même fleur et la maturité concomitante des organes reproducteurs peuvent favoriser l'autogamie tandis que la séparation des sexes sur des fleurs/plantes différentes, la séparation temporelle de la maturité des organes mâles et femelles et/ou les agents de pollinisation (animaux, vent, eau) peuvent favoriser à des degrés divers l'allogamie (Carré, 2021).

Selon la plupart des théories de l'évolution, la forte représentativité des espèces hermaphrodites serait liée à la possibilité qu'elles ont de produire des gamètes mâles et femelles et de pouvoir s'autoféconder. Cependant, plusieurs espèces mettent en place un système d'auto-incompatibilité, pour empêcher l'autofécondation et la fécondation avec des individus génétiquement très proches. Elles sont qualifiées de plantes allogames malgré le regroupement des organes sexuels à priori en faveur de l'autofécondation (Cardoso et al., 2018). Nous reviendrons plus en détails sur le fonctionnement des systèmes d'auto-incompatibilité au cours du développement des stratégies de reproduction.

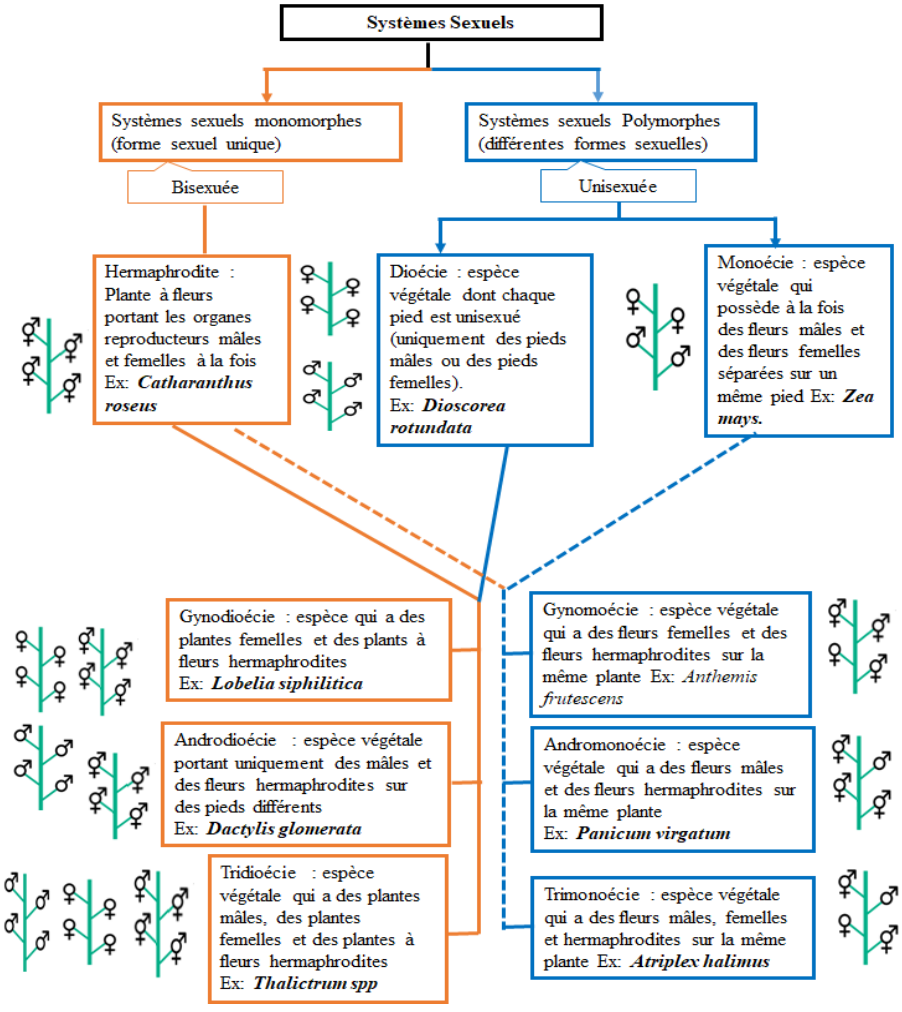


Figure 4 : Les principaux systèmes sexuels chez les plantes angiospermes adapté de Heikrujam et al. (2015).

D'autres espèces hermaphrodites vont plutôt mettre en place une barrière spatiale en modifiant le développement floral par la production de fleurs morphologiquement différentes pour favoriser l'allogamie. Les espèces hétérostyles, vont par exemple produire des fleurs avec un décalage significatif entre la longueur du style et le niveau des anthères favorisant ainsi la reproduction entre morphes différents (Figure 5). Ce cas de figure inclut également le polymorphisme de taille des grains de pollen et des papilles stigmatiques. On retrouve également des cas d'espèces hermaphrodites qui développent un mécanisme de décalage temporel entre la maturation des organes mâles et femelles. Il s'agit d'une maturation mâle précoce (protandrie) fréquente chez les Astéracées ou d'une maturation femelle précoce (protogynie) fréquente chez les Brassicacées (Dellaporta et Calderon-Urrea, 1993). Le système apparaît encore plus complexe chez d'autres espèces. Les fleurs fonctionnent alternativement en mâles ou femelles selon le moment du jour. Chez des espèces de gingembre par exemple, des mouvements coordonnés du style (flexistyle) permet à ce qu'une partie des plantes soit femelle le matin et mâle l'après-midi, tandis que l'autre morphe fait l'inverse, tout dans le but de favoriser une pollinisation entre morphe compatibles (Garraud, 2011).

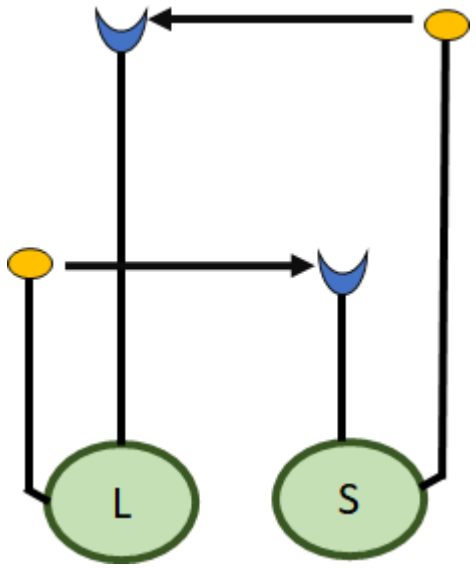


Figure 5 : Polymorphisme de style chez les plantes à fleurs, cas de distylie, (Barrett et al., 2000). L = longistyle, S = brévistyle.

1.2.1.2 Evolution de la dioécie

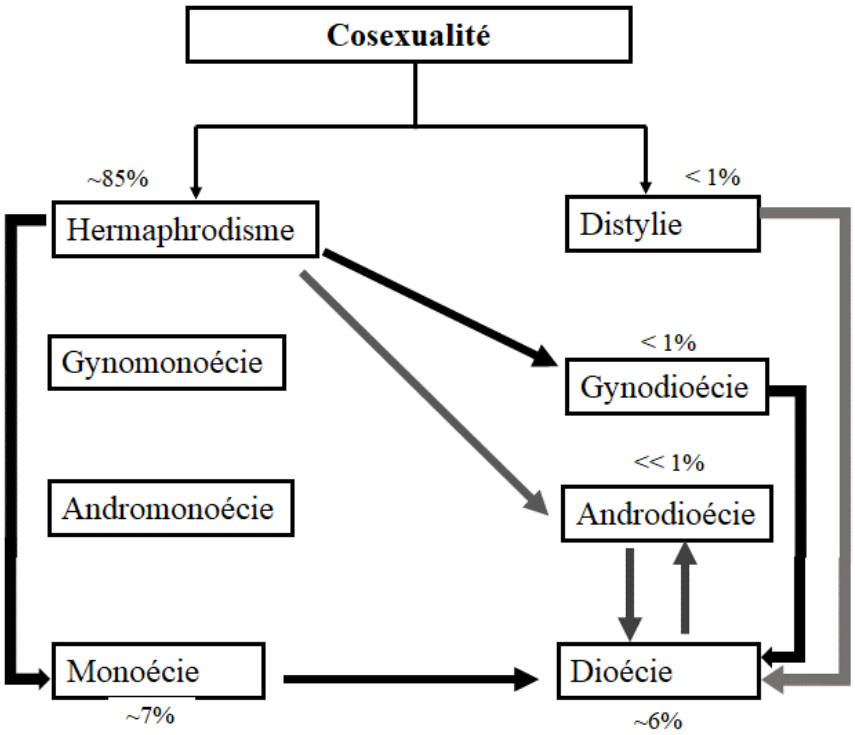


Figure 6 : Représentation schématique des diverses conformations des sexes monomorphiques ou dimorphiques dans les populations végétales et estimations du pourcentage d'espèces d'angiospermes correspondant à chaque conformation. Les flèches correspondent aux voies de transitions principales identifiées : en noir les voies majoritairement étudiées de la gynodioécie et de la monoécie-paradioécie, et en gris les voies pour lesquelles les études sont plus limitées (Carré, 2021; Käfer et al., 2017)

Si plusieurs voies sont possibles pour une transition vers la dioécie (Figure 6), la voie de la gynodioécie est l'une des hypothèses les plus probantes. Le point de départ serait l'apparition et le maintien d'un gène de stérilité mâle. Ensuite, une pression de sélection sera exercée pour faire prédominer la fonction mâle chez les hermaphrodites. La séparation a lieu lorsque la pression arrive à son apogée de sorte que la fonction mâle soit héritable et que l'investissement mâle soit corrélé négativement avec l'investissement femelle (McCauley et al., 2000).

L'autre voie de transition de la dioécie est connue sous le nom de la monoécie-paradioécie (Figure 6). Comme l'indique l'expression, il s'agit d'une voie de transition via la monoécie. En effet, les plantes vont tout d'abord développer des fleurs qui ne contiennent que l'un ou l'autre des organes reproducteurs (mâles ou femelles). Par la suite des groupes vont se séparer en accentuant pour les uns, la fonction mâle par suppression des fleurs femelles et pour les autres la fonction femelle par suppression des fleurs mâles (Käfer et al., 2017). La séparation des sexes dans ce cas est plus progressive que via la voie gynodioïque.

Il arrive qu'en cas de distylie, l'une des deux morphologies (généralement celle avec des styles longs) évolue vers une spécialisation de la fonction femelle croissante et que l'autre (généralement le morphe à styles courts) évolue vers une spécialisation de la fonction mâle (Pailler et al., 1998) : Il s'agit de la voie de la distylie (Figure 6).

1.2.1.3 Mécanismes de détermination du sexe chez les espèces dioïques

La détermination du sexe est définie comme l'ensemble de processus de formation des caractères sexuels dus au fonctionnement des structures responsables de la production de gamètes mâles et femelles sous l'influence de facteurs génétiques et des conditions des milieux externes et internes (Tanurdzic et Banks, 2004). Ainsi la détermination du sexe est un processus impliquant un volet génétique et un volet non-génétique y compris la participation des hormones (Figure 7) (Diggle et al., 2011, Heikrujam et al., 2015).

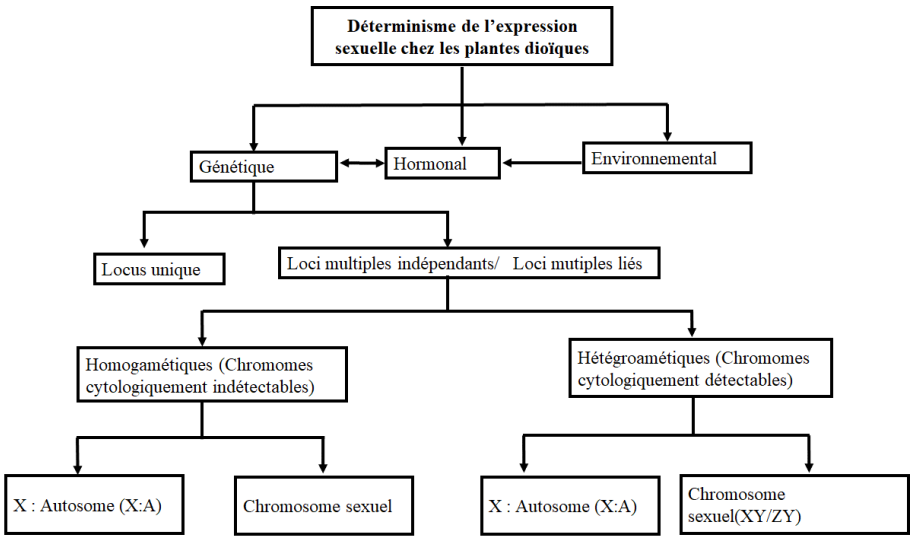


Figure 7 : Les différents mécanismes de la détermination du sexe chez les plantes dioïques (Heikrujam et al., 2015)

1.2.1.3.1 Contrôle génétique du sexe chez les plantes dioïques

1.2.1.3.1.1 Détermination basée sur les chromosomes sexuels

Chez les espèces dioïques, le contrôle génétique du sexe est assuré par les chromosomes sexuels et leurs gènes de détermination du sexe. Plusieurs gènes compilés dans des groupes de liaison spéciaux, trouvés sur les chromosomes sexuels ou sur les autosomes (chromosomes non-sexuels) ont été documentés comme étant associés au processus de détermination du sexe chez plusieurs espèces (Charlesworth, 2002; Ming et al., 2011). Chez les plantes supérieures dioïques, on observe généralement trois types de mécanismes de détermination du sexe chromosomique, à savoir le système XX/XY (ou Y actif), le système analogue ZZ/ZW et le rapport chromosome X/autosomes (X : A) (Figure 7)

- **Le système XX/XY**

Le système XX/XY a été découvert pour la première fois chez *Silene latifolia* (Winge, 1923), système analogue au mécanisme de détermination du sexe des mammifères (Westergaard, 1958b). Les mâles sont hétérogamétiques possédant un chromosome X et un chromosome Y dominant qui sont physiquement différents l'un de l'autre, tandis que les femelles sont homogamétiques et possèdent deux chromosomes X

identiques. Affichant ce type de dimorphisme sexuel, *S. latifolia* est l'une des plantes les plus étudiées (Aryal et Ming, 2014). La présence du chromosome Y est essentielle pour la masculinité dans ce type de détermination du sexe et est donc connue sous le nom de système de chromosome Y actif. Ce système est le plus répandu et rencontré dans plusieurs familles d'espèces dioïques telles que les Dioscoreacées, les Asparagacées, les Arecacées, les Vitacées, les Euphorbiacées, les Amaranthacées, etc. (Carey et al., 2021). Certains modèles sont dérivés du système XX/XY, comme le système XX/XY1Y2 dans lequel les mâles possèdent deux chromosomes Y (par exemple *Humulus japonicus* ou *Rumex. acetosa*) et le X1X1X2X2/X1X2Y où il y a quatre et deux chromosomes X chez les femelles et les mâles respectivement, comme chez certaines espèces de *Podocarpus* (Qi-Xing et Zhi-Jian, 2001). Bien qu'un nombre élevé de chromosomes X puisse surmonter l'effet de masculinisation, la présence d'un seul chromosome Y supprime le développement des femelles, même lorsque 3X sont présents, ce qui démontre le rôle actif du chromosome Y dans la détermination du sexe chez *S. latifolia* (Westergaard, 1958a).

- **Le système ZZ/ZW**

Un autre mécanisme chromosomique de détermination sexuelle observé chez les plantes, bien que beaucoup moins fréquent, est le système ZZ/ZW. Dans ce cas, les femelles sont hétérogamétiques (ZW) tandis que les mâles sont homogamétiques (ZZ) (Ming et al., 2011). Ce système a été trouvé dans au moins sept familles de plantes dont les Ambrelacées (*Amborella trichopoda*) (Müller et al., 2020), les Salicacées (*Populus alba*) (Müller et al., 2020), les Rosacées (*Fragaria ananassa*) (Edger et al., 2019), les Anacardiacées (*Pistacia vera*) (Wu et al., 2021), les Myricacées (*Morella rubra*) (Carey et al., 2020) et les Dioscoreacées (*D. rotundata*) (Tamiru et al., 2017). Le système ZZ/ZW mâle homogamétique constitue également le système de détermination du sexe des oiseaux, et de certains reptiles et insectes.

- **Système X-autosome (X : A)**

A cheval entre les formes les plus simples de détermination du sexe basée sur un ou plusieurs loci autosomaux et le système de détermination XX/XY, on retrouve la forme peu classique X : A, une association de chromosome sexuel X et de paires d'autosomes. Cette forme de système de détermination serait le résultat de la dégénérescence du chromosome Y (Ming et al., 2011). Ce système de détermination n'est pas aussi rare qu'on peut l'imaginer. Il a été observé non seulement chez les espèces dioïques qui sont caractérisées

par la présence de chromosomes sexuels distincts, mais également chez des plantes ayant des chromosomes sexuels homomorphes. On peut citer *Rumex acetosa* (Ainsworth, 2000), *Humulus japonicas*, *H. lupulus* (Shephard et al., 2000; Shephard et al., 2004) et *Phoenix dactylifera* (Siljak-Yakovlev et al., 1996). Dans ce type de mécanisme d'héritage et de détermination du sexe, l'absence de chromosome Y ne signifie pas systématiquement une détermination de sexe unilatérale orchestrée par le chromosome X. le phénotype sexuel est déterminé par le rapport entre le nombre de chromosomes X et d'autosomes (Ainsworth et al., 1998).

Un système structurellement proche de X : A a été trouvé chez la Cucurbitacée *Coccinia grandis*. Il s'agit du système Y/autosome (Sousa et al., 2013). Le fonctionnement de ce système est encore très peu connu (Hobza et al., 2018) mais des études récentes (Devani et al., 2017; Mohanty et al., 2017) soutiennent l'idée que le mécanisme de détermination du sexe chez *C. grandis* pourrait être similaire à celui de *Cucumis sativus* et *Cucumis melo*. Aucun chromosome sexuel n'a été identifié jusqu'à présent chez les deux espèces (espèces monoïques pour la plupart) mais elles possèdent trois gènes déterminant du sexe chacun situé sur un chromosome différent (Boualem et al., 2008; Boualem et al., 2015; Martin et al., 2009).

Les différents mécanismes de détermination du sexe retracent parfaitement le modèle d'évolution (en 6 étapes) des chromosomes sexuels proposé par Ming et al. (2011) (Figure 8). A la première étape (cas de *Fragaria virginiana*), les chromosomes homologues portent les loci déterminant le sexe pour la stérilité mâle et femelle sur les proto-Y (W) et proto-X (Z) respectivement permettant la recombinaison entre les loci déterminant le sexe. A l'étape 2 (cas d'*Asparagus officinalis*), la recombinaison est supprimée entre les deux loci déterminant le sexe et leur région voisine immédiate tandis que le génotype YY est toujours viable. A l'étape 3 (cas de *Carica papaya*), on assiste à l'extension de la suppression de la recombinaison et la formation d'une petite région du chromosome Y spécifique aux mâles (MSY). Cette région s'étendrait par l'accumulation de rétrotransposons et par la translocation et la duplication de fragments génomiques. Le génotype YY n'est plus viable, alors que les chromosomes X et Y ont la même taille. Au cours de la quatrième étape (cas de *Silene latifolia*), le MSY s'étend à la majorité du chromosome Y. Les chromosomes sexuels hétéromorphes sont le résultat de l'accumulation d'éléments transposables et de duplications dans le chromosome Y. A la

cinquième étape (cas de *Cycas revoluta*), on assiste à la perte de séquences non fonctionnelles du chromosome Y, pouvant entraîner un rétrécissement de ce dernier. L'appariement méiotique est autorisé dans une petite partie des chromosomes sexuels. A l'étape 6, la suppression de la recombinaison s'étend à l'ensemble du chromosome Y, entraînant la perte de la région pseudo-autosomique et, finalement, la perte du chromosome Y (cas de *Rumex acetosa*). Un nouveau système de détermination du sexe basé sur le rapport X/autosome évolue, tandis qu'un nouveau chromosome Y pourrait être formé mais ne joue aucun rôle dans la détermination du sexe (Ming et al., 2011).

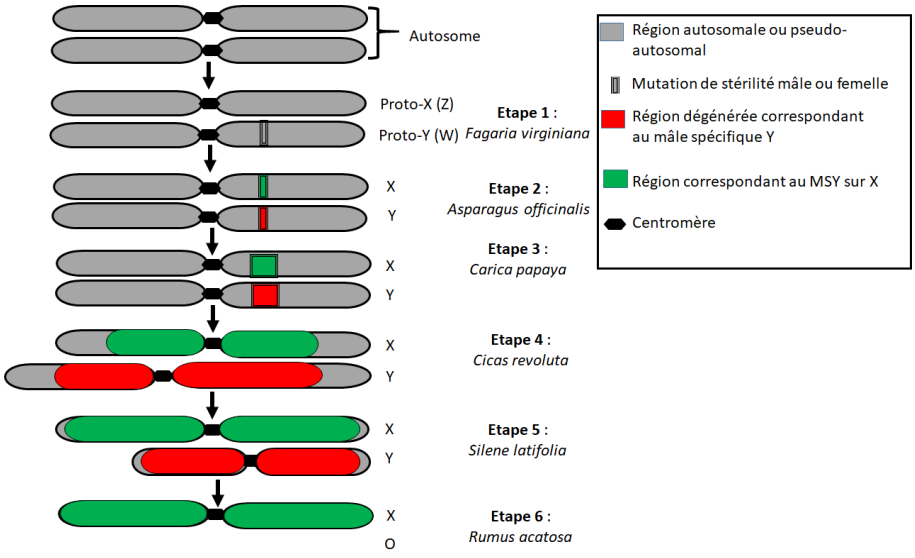


Figure 8 : Les étapes de l'évolution des chromosomes sexuels (Ming et al., 2011).

1.2.1.3.1.2 Diversité des mécanismes moléculaires de la détermination du sexe

Les nombreuses origines évolutives indépendantes de la dioécie suggèrent que de nombreux mécanismes génétiques et moléculaires différents sont impliqués dans la séparation des sexes chez les angiospermes (Diggle et al., 2011; Leite Montalvão et al., 2021). L'un des modèles les plus populaires de différenciation sexuelle est la détermination du sexe via un seul commutateur sexuel (femelle ↔ mâle) (Leite Montalvão et al., 2021). Le modèle de locus unique chez les espèces végétales dioïques a été soutenu

expérimentalement par Akagi et al. (2014). Toutefois, un autre modèle émergent soutenant plutôt l'implication de deux gènes pour la dioécie a été également démontré chez l'asperge et le kiwi (Akagi et al., 2019; Harkess et al., 2020).

Contrairement aux animaux chez qui les mêmes gènes sont impliqués dans la détermination du sexe de nombreux taxons (par exemple, *SRY/SOX3, DRMT1*) (Graves, 2013), il a été démontré qu'un grand nombre de gènes différents ont évolué pour devenir les déterminants du sexe chez les végétaux (Carey et al., 2021). Certaines similitudes sont indispensables pour attribuer le rôle de déterminant sexuel aux gènes identifiés chez les plantes : ils doivent être impliqués à un certain stade du développement de la structure spécifique du sexe (par exemple, l'anthère ou le carpelle). On ignore si certains gènes de ces voies de développement sont plus susceptibles d'évoluer vers la détermination du sexe que d'autres mais il est évident que les gènes dont l'expression est spécifique à un tissu ou plus étroite peuvent être plus susceptibles d'évoluer vers un rôle déterminant pour le sexe. La théorie la plus adaptée et la plus acceptée pour le développement et la différenciation de la structure reproductive, c'est-à-dire la fleur, est le modèle ABC (Coen et Meyerowitz, 1991). Du point de vue de la génétique moléculaire et du développement, ce modèle décrit comment les différents organes de la fleur, c'est-à-dire les sépales, les pétales, les étamines et les carpelles, se forment dans un ordre approprié en fonction de l'expression de 3 classes de gènes, appelés gènes d'identité des organes floraux. L'identité des sépales est déterminée par les gènes de classe A, l'identité des pétales dépend de l'action combinée des gènes de classe A et B, l'identité des étamines dépend des gènes de classes B et C, et l'identité des carpelles est déterminée par les gènes de classe C. Plus tard, ce modèle a été révisé et étendu à d'autres classes de gènes, D et E qui sont respectivement nécessaire pour l'identité des ovules et pour l'ensemble des différents organes (Turczyn, 2011). La plupart des gènes des classes A-D sont des gènes de la famille des gènes MADS-box. Toutefois, il est difficile de différentier les gènes déterminant le sexe de ceux à expression sexe-biaisée qui jouent un rôle clé dans l'établissement du sexe (Carré, 2021).

Même si le mécanisme d'expression du sexe n'a pas été beaucoup étudié au niveau moléculaire chez les plantes dioïques, il est évident que le dimorphisme sexuel est principalement limité à l'organogenèse des fleurs ou à la différenciation des organes reproducteurs et qu'un ou quelques gènes

sont impliqués dans ces processus (Heikrujam et al., 2015). La différenciation sexuelle est obtenue par la suppression du développement d'un ensemble d'organes sexuels (Ainsworth, 2000; Negrutiu et al., 2001).

Les plantes dioïques sont divisées en trois classes selon le stade de développement au cours duquel les différences entre les sexes peuvent être détectées (Bai et al., 2019; Charlesworth, 2002; Heikrujam et al., 2015; Matsunaga et Kawano, 2001): Le type I, dont les bourgeons floraux forment rarement les primordia du sexe opposé, comme chez *Cannabis sativa*, *Humulus spp* et *Spinacia oleracea* où les bourgeons mâles ne contiennent aucune trace de primordia de carpelle et les bourgeons femelles manquent de primordia d'étamines (Ainsworth et al., 1998; Matsunaga et Kawano, 2001; Mohan Ram et Nath, 1964; Sherry et al., 1993) ; le type II, où le développement des primordia du sexe opposé est initié mais s'arrête ensuite dans les premiers stades. Ce cas est légion chez *S. latifolia* (Grant et al., 1994), *R. acetosa* (Ainsworth et al., 1995; Ainsworth et al., 1998) et *Pistacia vera* (Bai et al., 2019; Hormaza et Polito, 1996) et le type III où le développement des organes du sexe opposé est arrêté à des stades beaucoup plus tardifs comme on l'observe chez *Actinidia deliciosa* (Schmid, 1978) et *A. officinalis* (Caporali et al., 1994; Galli et al., 1993; Schmid, 1978). Les différentes études ayant examiné les schémas d'expression des gènes floraux MADS-box chez les plantes dioïques de types I, II et III ont montré que leur expression suit essentiellement le modèle ABC classique (Coen et Meyerowitz, 1991; Khadka et al., 2019). Dans le même sens, Sather et al. (2010) ont montré que la suppression des gènes de classe B chez *S. oleracea* est suffisante pour modifier le sexe floral des mâles en hermaphrodites ou en femelles par la transformation des étamines en carpelles. Chez *R. acetosa*, le gène de classe C *RAP1* (*Ras-proximate-1*) s'exprime à un stade précoce dans les primordia d'étamines et de carpelles quel que soit le sexe de la fleur tandis que son expression ultérieure est maintenue uniquement dans les étamines des fleurs mâles et dans les carpelles des fleurs femelles, de telle sorte que l'arrêt de son expression cause l'arrêt du développement de l'organe du sexe opposé (Ainsworth et al., 1995).

1.2.1.3.2 Environnement et contrôle épigénétique de la détermination du sexe

Comme décrit jusqu'ici, l'expression sexuelle chez les plantes dioïques à chromosomes sexuels différenciés est généralement déterminée

génétiquement mais plusieurs études qui se sont intéressées au système de reproduction des plantes ont depuis lors rapporté des données sur la plasticité sexuelle (Adam et al., 2011; Aryal et Ming, 2014; Milewicz et Sawicki, 2012). Les conditions environnementales qui stressent les plantes tendent à perturber leur fonction de reproduction (Golenberg et West, 2013). Les facteurs les plus importants sont la sécheresse, l'intensité lumineuse, l'abondance relative de ressources nutritives, les stress liés aux métaux lourds dans le sol, etc.

Dans la plupart des cas, le stress hydrique est masculinisant. Il opère soit en augmentant la proportion de fleurs staminées sur les individus monoïques, soit en augmentant le nombre de plantes staminées dans les populations dioïques ou androdioïques, soit en augmentant la proportion d'hermaphrodites dans les populations gynomonoïques ou gynodioïques (Golenberg et West, 2013). Pickett (1915) a signalé une augmentation des ratios de fleurs mâles et femelles (mâles/femelles) chez *Arisaema triphyllum* en réponse à la sécheresse. Des réponses similaires ont été rapportées chez *Ochradenus baccatus*, *Colchicum stevenii*, *Solanum carolinense*, *Elaeis guineensis*, et *Atriplex canescens* (Golenberg et West, 2013). Toutefois, une plus grande féminisation en réponse au stress hydrique a été observée chez les arbres mourants ou à croissance réduite chez *Acer rufinerve* (Nanami et al., 2004).

L'abondance de ressources nutritives a généralement un effet féminisant chez les plantes. On peut citer *Cleome spinosa* (de Jong et Bruinsma, 1974), *Cucumis melo* (Brantley et Warren, 1960) et *Spinacia oleracea* (Thompson, 1955). Néanmoins, *Xanthium pennsylvanicum* avait montré une forte masculinisation dans un milieu riche en ressources nutritives. Comme les ressources nutritives, les fortes intensités lumineuses sont généralement féminisantes. C'est le cas chez *Rumex nivalis* (Orozco-Arroyo et al., 2012), *Arisaema triphyllum* (Doust et Cavers, 1982) et *Elaeis guineensis* (Bertin, 1982). Mais, *Canabis sativa* a montré une forte masculinisation après une culture sous forte intensité lumineuse (Borthwick et Scully, 1954). D'un autre côté, alors que l'ombrage montrait un effet masculinisant chez certaines espèces dont *Solanum carolinense* (Solomon, 1985) et *Catasetum ventricosum* (Gregg, 1973), il était plutôt féminisant chez *Zea mays* (Rood, 1980) et *Cycnoches densiflorum* (Gregg, 1973; Gregg, 1975).

Il a été rapporté que le développement des étamines dans les plantes femelles est favorisé par un traitement à l'$Ag_2S_2O_3$ et à l'$AgNO_3$ (Law et al., 2002)

chez plusieurs espèces, à savoir *Cucumis sativa* (Den Nijs et Visser, 1980), *Ricinus communis* (Mohan Ram et Sett, 1980), *Cannabis sativa* (Mohan Ram et Sett, 1982), et *Coccinia grandis* (Devani et al., 2017). Chez *Canabis sativa* et *S. latifolia* une corrélation a été observée entre un changement dans l'expression du sexe et l'accumulation de métaux lourds tels que Pb^{2+}, Cu^{2+} et Ag^{+} (Law et al., 2002; Soldatova et Khryanin, 2010). Chez *Cannabis sativa*, l'accumulation de métaux lourds (Cu^{2+} et Zn^{2+}) entraine une forte féminisation lorsqu'elle est corrélée avec l'accumulation de la zéatine. Par contre, lorsque l'accumulation des ion Pb^{2+} est corrélée avec celle la GA on assiste à une forte masculinisation (Soldatova et Khryanin, 2010).

Plusieurs études (Aryal et Ming, 2014; Bräutigam et al., 2017) associent ce phénomène de labilité du sexe à un processus épigénétique. Il se produit généralement par la modification de la structure de l'euchromatine et/ou de la méthylation de l'ADN (Aryal et Ming, 2014; Milewicz et Sawicki, 2012). Par exemple, le développement du gynécée peut être favorisé par un traitement au froid chez les mâles de *Carica papaya* (Lin et al., 2016). Ce comportement sexuel a été associé à l'inactivation du suppresseur putatif du gynécée présent sur le chromosome Y qui serait causée par l'hyper-méthylation de Lys9 de l'histone 3 (*H3K9*) (Lin et al., 2016) très déterminant dans la formation de l'hétérochromatine (Rivera et al., 2015).

1.2.1.3.3 Contrôle hormonal du sexe

L'initiation et le développement des structures reproductrices étant une étape morphogénétique importante dans la vie de la plante, il est probable que l'expression du sexe puisse être influencée et modifiée par les hormones végétales (Heikrujam et al., 2015). Ainsi de nombreuses études menées au cours des décennies précédentes ont examiné les effets des hormones sur le développement sexuel alternatif ou plastique. Il s'est avéré que de nombreuses hormones ont des effets masculinisant ou féminisant similaires chez des espèces indépendantes. Cependant, il n'existe pas d'hormones purement masculinisantes ou féminisantes. L'acide gibbérellique a un effet masculinisant chez *Solanum carolinense*, *Asparagus officinalis*, *Coriandrium sativum*, *Cannabis sativus* et *Spinacia oleracea*, et a un effet féminisant chez *Luffa acutangula*, *Hyoscyamus niger*, et *Zea mays* (Golenberg et West, 2013). L'auxine a un effet féminisant chez *Opuntia stenopetala*, *Cannabis sativus*, *Silene pendula*, *Spinacia oleracea*, et *Cucumis sp*. mais est masculinisant chez *Mercurialis annua* et *Cleome*

spinosa (Golenberg et West, 2013). Toutefois, les cytokinines se sont avérées féminisantes chez la plupart des espèces chez qui elles ont été expérimentées. C'est le cas de *Mercurialis annua*, *Vitis vinifera*, *Spinacia oleracea*, *Asparagus officinalis* et *Solanum carolinense*, etc. (Chailakhyan et Khryanin, 1978; Negi et Olmo, 1966).

La capacité d'inversion du sexe par application d'hormones chez les plantes dioïques suggère que les gènes nécessaires à l'expression des deux sexes sont potentiellement fonctionnels mais que leur expression peut être modulée par l'homéostasie hormonale (Khadka et al., 2019). Etant donné le rôle et l'activation des hormones végétales en réponse aux stress environnementaux, les observations de l'effet des stress environnementaux et des hormones sur le développement et la labilité sexuelle ne peuvent être indépendantes (Gerashchenkov et Rozhnova, 2013). Généralement quand la plante atteint une maturité physiologique requise, des méristèmes et des primordia spécialisés sont formés sous l'influence de signaux internes et environnementaux. Ensuite, les plantes s'engagent dans le développement des fleurs, et plus tard dans la formation des organes reproducteurs en faisant appel à une boucle de rétroaction (feedback) avec l'implication des gènes spécifiques et d'hormones (Gerashchenkov et Rozhnova, 2013).
En effet, les gibbérellines (GAs) sont connues pour leur rôle de chef d'orchestre du contrôle de l'induction florale en interagissant avec les voies génétiques et d'autres hormones (Bao et al. 2020) mais elles interviennent également dans les processus de détermination du sexe de façon directe ou indirecte. Chez *Arabidopsis* par exemple, la GA régule le gène de contrôle du méristème floral *LFY* (Blázquez et al., 1998) qui, à son tour, régule les gènes d'identité des organes floraux, notamment *APETALA1* (*AP1*) (Wagner et al., 1999), *AGAMOUS* (*AG*) (Busch et al., 1999) et *APETALA3* (*AP3*) (Lamb et al., 2002). La gibbérelline peut également affecter directement l'expression des gènes d'identité des organes floraux *AG, AP3* et *PISTILLATA* (*PI*) (Yu et al., 2004). De même, il a été démontré que la GA est importante pendant le développement de l'étamine (Cheng et al., 2004). Une application exogène de GA peut entraîner une masculinisation du sexe chez les femelles de *Spinacia oleracea*, alors qu'une régulation négative du facteur de transcription *SpGAI* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*) féminise les fleurs mâles (West et Golenberg, 2018).
L'auxine est impliquée dans l'initiation et la disposition des organes floraux (Chandler, 2011). Chez Arabidopsis, Il intervient également dans le développement des étamines et leur déhiscence à travers le gène *AUXIN*

RESPONSE FACTORS2 (*ARF2*) (Lee et al., 2019). Son rôle dans le développement du gynécée a été également prouvé (Marciniak et Przedniczek, 2019). L'implication de l'auxine dans la différentiation sexuelle a été récemment évoquée chez le papayer (Liu et al., 2021).
L'expression des récepteurs d'éthylène a été observée dans l'inflorescence, les méristèmes floraux, les pétales et les ovules en développement d'Arabidopsis (Sakai et al., 1998). De plus, l'éthylène a été impliqué dans l'expression des gènes d'identité des organes floraux notamment le carpelle chez la tomate (Llop-Tous et al., 2000) et les étamines chez le chanvre (De Martinis et Mariani, 1999). L'éthylène est l'une des rares hormones impliquées dans le contrôle du sexe par voie épigénétique. Une étude détaillée de l'apparition de l'androgynie chez les Cucurbitacées (*Cucumis melo* et *C. sativus*) a impliqué les enzymes de biosynthèse de l'éthylène *CmACS-7* et *CmACS-11* dans la détermination du sexe (Boualem et al., 2009, 2015), et elles sont nécessaires pour la répression épigénétique du gène *CmWIP1* promoteur du sexe masculin.
Il a été démontré qu'une partie des gènes à expression sexe-biaisée et/ou de détermination du sexe jouent également un rôle dans la voie des cytokinines chez plusieurs espèces dont le peuplier, le saule, le palmier dattier et le kiwi (Akagi et al., 2019; Müller et al., 2020; Torres et al., 2018).

1.2.2 Les stratégies de reproduction

1.2.2.1 Diversité des stratégies de reproduction

Les angiospermes sont caractérisées par une grande diversité de stratégies de reproduction qui va de l'autogamie à l'allogamie stricte avec des formes intermédiaires mixtes. Les différentes terminologies au sein des systèmes d'accouplement considèrent le mode de transfert des gènes d'une génération à l'autre par la reproduction sexuée. Elles dépendent de la répartition spatio-temporelle des organes sexuels sur les plantes mais sont également liées à la relation génétique entre les gamètes impliqués, en particulier en ce qui concerne l'origine du gamète mâle, les agents pollinisateurs et d'autres vecteurs abiotiques (Cardoso et al., 2018).

En fonction des systèmes floraux qui caractérisent les espèces, trois modes d'échange de pollen (pollinisation) sont possibles à savoir l'autopollinisation, la pollinisation géitonogamique et la pollinisation croisée (Figure 10) (Cardoso et al., 2018)

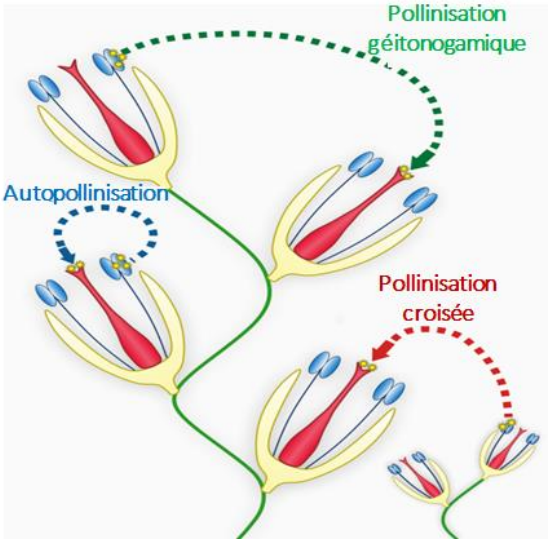


Figure 10 : Différents types de pollinisation en fonction de la source de pollen. Les étamines et les pistils sont colorés respectivement en bleu et rouge (Cardoso et al., 2018).

Selon que les espèces pratiquent avec succès l'autopollinisation, la pollinisation géitonogamique ou soient contraintes naturellement et/ou génétiquement à la pollinisation croisée, elles sont qualifiées respectivement d'autogames, géitonogames ou allogames. En termes de stratégie de reproduction, on distingue ainsi :

1.2.2.1.1 L'autogamie

L'autogamie est une stratégie d'accouplement observée uniquement chez les fleurs bisexuées (Richards, 1997) et qui consiste en la fécondation des gamètes mâles et femelles de la même fleur après autopollinisation (Figure 10). On distingue deux formes d'autogamie : Une première forme dite autonome où la fécondation se produit après le dépôt de l'autopollen de manière spontanée, sans l'intervention d'un vecteur pollinique (Eckert, 2000). Celle-ci est facilitée par la courbure du style, la fermeture florale et les abscissions de corolles (Goodwillie et Weber, 2018). Dans l'autre forme d'autogamie justement qualifiée d'autogamie facilitée, la fécondation se réalise par le biais d'un agent pollinisateur dont l'intervention est parfois obligatoire comme chez la vanille (*Vanilla planifolia*) et le cacaoyer (*Theobroma cacao*). Lorsque l'autogamie se réalise alors que les fleurs sont

fermées on parle de cléistogamie et les espèces sont qualifiées de cléistogames par opposition aux chasmogames (fleurs ouvertes). L'autogamie est recherchée en agronomie afin de faciliter le maintien de variétés génétiquement identiques. Dans la nature, l'autogamie est majoritairement pratiquée par les espèces envahissantes pour faciliter leur occupation rapide de l'environnement (Barrett, 2010; Holsinger, 2000; Williamson et Fitter, 1996). L'autogamie peut en effet être avantageuse pour des plantes bien adaptées dans un environnement stable.

1.2.2.1.2 La géitonogamie

La géitonogamie est un mode de reproduction dans lequel la fécondation se réalise entre les gamètes de différentes fleurs d'un même individu (Figure 10) (Eckert, 2000; Richards, 1997; Rood et al., 1980). Elle peut se produire chez les fleurs bisexuées et unisexuées (dans ce cas, chez les espèces monoïques). Contrairement à l'autogamie, la géitonogamie n'offre que peu ou pas d'assurance reproductive, puisqu'elle nécessite un vecteur de pollen pour effectuer la pollinisation (Eckert, 2000). Toutefois, elle peut se produire spontanément sans implication d'influences extérieures (haptogamie). Soit c'est le style allongé d'une fleur qui arrive à atteindre le pollen de la fleur voisine ou c'est plutôt une chute de pollen sur les stigmates d'autres fleurs de la plante. Du point de vue génétique, la géitonogamie est similaire à la l'autogamie puisque dans les deux cas le patrimoine génétique et transmis intégralement à la génération suivante.

1.2.2.1.3 L'allogamie

L' allogamie est un mode de reproduction où la fécondation est réalisée entre gamètes provenant de fleurs de différents individus après une pollinisation croisée (Figure 10) (Richards, 1997). Contrairement à l'autogamie et à la géitonogamie, l'allogamie favorise une grande variabilité génétique qui augmente la probabilité de survie et de changements évolutifs des plantes (Simpson, 2006). Toutefois elle est dépendante de vecteurs de pollinisation. Très répandue (Canuto et al., 2014; Ferrer et Good, 2012), l'allogamie est systématique (obligatoire) chez les espèces dioïques compte tenu de la séparation des organes reproducteurs qui les caractérise. Elle est également très fréquente chez les espèces ayant développé un système d'auto-incompatibilité, notamment chez les hermaphrodites. En effet, malgré

l'étroite proximité des organes reproducteurs qui prédispose les espèces hermaphrodites à l'autogamie, nombreuses sont celles qui développent des barrières génétiques pour limiter l'autofécondation connue sous le nom de système d'auto-incompatibilité (SI).

1.2.2.2 Mécanisme du système d'auto-incompatibilité (SI)

Inventé par Stout (1917), le terme auto-incompatibilité désigne l'incapacité d'une plante à fleurs hermaphrodites produisant des gamètes mâles et femelles au développement fonctionnel à produire des graines par autopollinisation. Cette capacité est obtenue en interposant une barrière physiologique à n'importe quel stade entre la pollinisation et la fécondation (Samiksha et al., 2022). Le terme autostérilité est parfois utilisé pour désigner le phénomène lorsque les raisons qui empêchent l'autofécondation sont génétiquement inconnues. Le SI a été signalé chez environ 60% d'angiospermes (Allen et Hiscock, 2008; Hiscock et Kües, 1999) dont plusieurs espèces cultivées (Muñoz-Sanz et al., 2020; Samiksha et al., 2022). L'auto-incompatibilité peut être classée sur la base de morphologie de la fleur, les gènes impliqués et le site de l'expression de la réaction d'auto-incompatibilité (Gibbs, 2014) ou encore la cytologie du pollen (Samiksha et al., 2022). Le système d'auto-incompatibilité peut alors être classé en quatre types principaux : gamétophytique (GSI), sporophytique homomorphe (SSI), sporophytique hétéromorphe (HetSI), et les systèmes d'auto-incompatibilité à action tardive (LSI). Dans la plupart des cas, un seul locus ‘‘S’’ multi-allélique est impliqué (Nettancourt 2001) dans la détermination du SI à exception des Poacées qui présentent 2 loci ‘‘S’’ et ‘‘Z’’(Yang et al., 2008). Il est important de noter que le locus S correspond à une région contenant au moins deux gènes étroitement liés (Glover, 2014) dont l'un code pour le déterminant mâle exprimé au niveau du grain de pollen et l'autre pour le déterminant femelle qui s'exprime au niveau du pistil. Les déterminants mâle et femelle sont polymorphes et hérités comme une seule unité dont les variants sont connus sous le nom d'haplotypes S. La liaison entre les deux gènes est importante pour conserver l'auto-incompatibilité. Autrement, toute recombinaison au niveau du locus S entraine une rupture de cette liaison, provoquant la perte de l'auto-incompatibilité en générant des combinaisons haplotypiques auto-compatibles (Carré, 2021; Wheeler et al., 2009)

1.2.2.2.1 L'autoincompatibilité gamétophytique (GSI)

Le GSI se produit chez les plantes à fleurs homomorphes à stigmate généralement humide et est contrôlée par un seul locus S contenant plusieurs allèles avec absence de dominance (Oliveira et Maruyama, 2014). Il est déterminé par le génotype haploïde du pollen de sorte que, si l'allèle S du pollen correspond à l'un des deux allèles S exprimés dans les tissus stigmatiques diploïdes, le pollen est rejeté (Figure 11 a). Les mécanismes de reconnaissance (interaction protéine-protéine) étant contrôlés à la fois par les ovules et les tubes polliniques, de sorte que la reconnaissance d'allèles égaux provoque l'incompatibilité et empêche la fécondation (Gibbs, 2014; Glover, 2014; Li et Newbigin, 2018; Takayama et Isogai, 2005). La réaction de rejet caractérisée ici par l'arrêt précoce de la croissance du tube pollinique n'aura lieu que si le génotype haploïde exprimé par le grain de pollen est le même que celui exprimé par les carpelles de la plante mère (Glover, 2014; Tanksley et Loaiza-Figueroa, 1985). Il se forme dans une pareille population des individus les uns complètement auto-incompatibles (Figure 11 a, cas1), les autres semi-compatibles (Figure 11 a, cas 2) et totalement compatibles (Figure 11 a, cas 3). L'auto-incompatibilité gamétophytique est fréquente chez de nombreuses familles d'angiospermes dont les Fabacées, les Papaveracées, les Plantaginacées, les Rosacées, Scrophulariacées et les Solanacées (Franklin-Tong et Franklin, 2003; Li et Newbigin, 2018). Les bases génétiques et moléculaires du GSI peuvent varier d'une famille à l'autre. Chez les Rosacées et les Solanacées, il est régi par un système de reconnaissance du non-soi. Le déterminant femelle est une ribonucléase (S-RNase) sécrétée en grande quantité dans la matrice extracellulaire du style susceptible de dégrader l'ARN du tube pollinique d'un pollen incompatible pour inhiber sa croissance (Takayama et Isogai, 2005). Le déterminant mâle est une association de protéines F-box (SLF pour « S-Locus F-box »), une sous-unité de reconnaissance de substrat du complexe SCF (Skp1-Cullin1-F-box) ubiquitine ligase E3 qui inactivent de manière spécifique l'ensemble des S-RNAses codées par les autres spécificités SI que celle portée par le pollen lui-même (Carré, 2021). Contrairement aux Rosasées et aux Solanacées, le GSI chez les Pavacées, se manifeste par un système basé sur la reconnaissance du soi. La réponse d'auto-incompatibilité est déclenchée par l'interaction d'un récepteur transmembranaire PrpS7 (*Papaver rhoaes pollen S*) exprimé à la surface du pollen et d'un ligand, PrsS (*Papaver rhoaes* stigma S) sécrété dans les cellules stigmatiques. La liaison du ligand à son

récepteur déclenche l'activation de la voie des MAPK (Mitogen-activated Proteine Kinase) et conduit à la mort programmée cellulaire (apoptose) d'où le rejet du pollen (Fujii et al., 2016). Chez les Poacées, en dehors de la particularité d'un GSI faisant intervenir deux loci les déterminants mâles et femelles sont très peu connus. Un potentiel gène (*LpSDUF247*) candidat du déterminant mâle a été récemment proposé (Manzanares et al., 2016) mais ses fonctions sont encore mal déterminées (Carré, 2021)

1.2.2.2.2 L'autoincompatibilité sporophytique homomorphe (SSI)

Le SSI se produit dans les populations de plantes à fleurs homomorphes et est dirigé par un locus S unique multi-allélique (Gibbs, 1986, 1988; Mable et al., 2003). A la différence des systèmes gamétophytiques, le SSI est déterminé par le génotype diploïde du parent, le sporophyte, de sorte que si l'un des deux allèles S du sporophyte est exprimé dans le stigmate, la germination du grain de pollen est systématiquement inhibée (Gibbs, 2014; Hiscock et Tabah, 2003; Mable et al., 2003; Samiksha et al., 2022) (Figure 11 b). La réaction se déroule au niveau du stigmate et fait intervenir un système de dominance-récessivité (Allen et Hiscock, 2008; Takayama et Isogai, 2005). Le système SSI est moins répandu par rapport au GSI, et semble être plus récent (Allen et Hiscock, 2008). Ce système a été largement étudié chez les Asteracées et les Brassicacées, pour des raisons agronomiques (Hinata et al., 1993). La réponse d'auto-incompatibilité est dirigée par l'interaction d'un récepteur transmembranaire à activité kinase du nom de SRK (S-locus Receptor Kinase), exprimé dans les papilles stigmatiques et d'un ligand, SCR (S-locus Cysteine Rich) ou SP11 (S-locus protein 11), sécrété dans la couche extérieure (manteau) du pollen. Ainsi, toute liaison spécifique entre le récepteur SRK le ligand SCR/SP11 du même haplotype S entraîne l'auto-phosphorylation du SRK et la voie de la transduction conduit au rejet du pollen (Muñoz-Sanz et al., 2020). Il existe un troisième gène étroitement lié à ceux du récepteur et des ligands (Sehgal et Singh, 2018) codant pour une glycoprotéine (SLG pour « S- locus-glycoprotéine ») qui peut renforcer l'expression du SI (Muñoz-Sanz et al., 2020) mais dont l'action n'est pas indispensable (Carré, 2021).

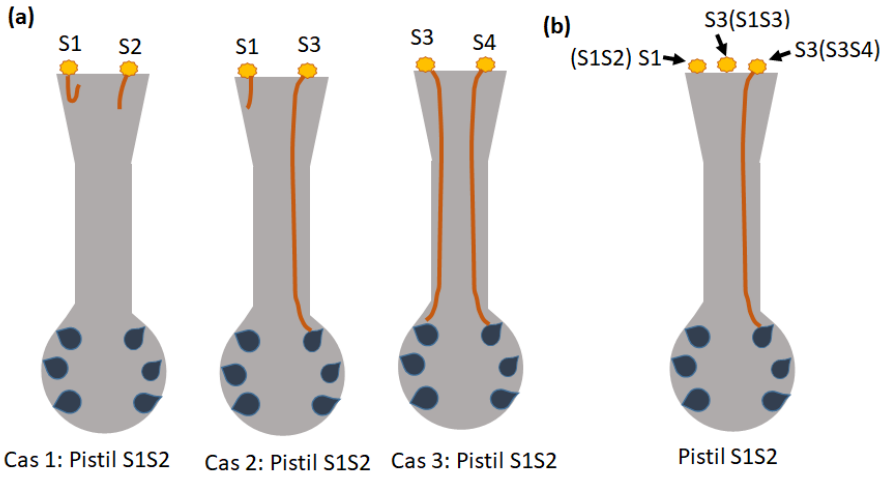


Figure 11 : Le fonctionnement cytologique des systèmes d'auto-incompatibilités. a- auto-incompatibilité gamétophytique (cas 1 : situation d' auto-incompatibilité complète, cas 2 : situation de semi-compatibilité et cas : 3 : situation de compatibilité complète) et b-sporophytique

1.2.2.2.3 Autoincompatibilité sprophytique hétéromorphe (HetSI)

Le HetSI est un système qui caractérise les groupes de plantes à fleurs essentiellement hétérotylées (Gibbs, 1986, 2014) quoiqu'il a été signalé chez certaines famille de plantes à fleurs homomorphes dont les Sterculiacées (Allen et Hiscock, 2008). Les loci responsables du SI dans les fleurs hétérostylées et ceux qui dirigent le polymorphisme des fleurs sont fortement liés de sorte que les deux traits sont cohérités. La distylie et la tristylie sont déterminées par un locus et deux loci respectivement chacun présentant deux allèles. Dans une population de plantes distyles comme chez les espèces du genre *Primula*, les morphes longistyles (longs styles) sont homozygotes (ss) alors que celles brévistyles (styles courts) sont hétérozygotes (Ss). Du fait de la présence de l'allèle dominant S dans la morphologie à style court, celui-ci sera toujours exprimé lors de la pollinisation croisée intra-morphe (entre individus à style court), inhibant ainsi la croissance du tube pollinique. Dans les croisements impliquant la morphologie à style long, l'inhibition se produira quel que soit l'allèle exprimé par le grain de pollen, puisqu'ils sont tous deux ss (Gibbs, 1986) conduisant au rejet du pollen. En tout, il n'y aura donc de fécondation possible qu'entre plantes à fleurs morphologiquement distinctes (Ganders, 1979). Cette pratique permet de maintenir un rapport

équitable des génotypes Ss et ss (Ganders, 1976; Ornduff, 1975) de sorte à garantir une meilleure variabilité génétique. Dans les populations de plantes tristylées, il existe en plus du locus S, un deuxième locus M avec deux allèles également. Malgré le fait d'avoir un grand nombre de combinaisons génotypiques dans ce cas, le système fonctionne de sorte à toujours maintenir un rapport équitable entre les génotypes (Spieth, 1971). Le HetSI a été signalé dans environ 25 familles dont essentiellement les espèces distyles. Il se retrouve dans seulement quatre familles tristyles (Cardoso et al., 2018; De Nettancourt, 2001).

1.2.2.2.4 Auto-incompatibilité tardive (LSI)

Le LSI est un système d'auto-incompatibilité homomorphe dans lequel les tubes polliniques issus de l'autopollinisation ne sont pas inhibés avant d'atteindre l'ovaire et peuvent parfois y pénétrer (Bittencourt Júnior, 2017). Quatre scénarios d'inhibition sont possibles en situation de LSI : Les tubes polliniques de l'auto-pollen s'allongent dans le style mais sont inhibés avant d'atteindre les ovules (1) ; les ovules sont pénétrés, mais l'inhibition se produit dans le micropyle ou le nucelle (2) ; les tubes polliniques pénètrent les ovules mais un échec se produit pendant la syngamie, après que les gamètes mâles soient déposés dans le sac embryonnaire (3) ; l'autofécondation se produit mais pas l'embryogenèse (4). Ce type d'auto-incompatibilité tardive a été supposé très rare (De Nettancourt, 1997) mais signalé chez plusieurs familles d'angiospermes dont les Fabacées (Borges et al., 2009) les Malvacées (Souza et Venturieri, 2010), les Apocynacées (Araújo et al., 2011) et récemment chez les Bignoniacées (Bittencourt Júnior, 2017). Jusqu'à présent, les bases génétiques sont encore peu connues. Une étude effectuée récemment chez le thé (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) a montré un rejet de l'auto-pollen, détecté au niveau de l'ovaire, correspondant aux systèmes LSI. L'analyse du transcriptome des styles autogames et allogames a permis d'identifier un gène exprimé de manière différentielle (DEG) hautement homologue à la S-RNase (Zhang et al., 2016). Cette analyse n'a pas été confirmée par des études similaires qui ont trouvé d'autres DEGs (par exemple LecRK1 pour « lectin receptor kinase1 ») autres que la S-RNase (Ma et al., 2018). Seth et al. (2019) ont quant à eux trouvé des DEGs dans le style et dans l'ovaire, et soutiennent un système LSI qui commence dans le style et s'étend à l'ovaire avec l'implication putative des gènes *S-RNase*, et *SRK* dans les autopollinisations. D'autres recherches dans

ce sens sont nécessaires pour le contrôle génétique du SI tarif (Muñoz-Sanz et al., 2020).

2 Les ignames

2.1 Systématique des ignames

L'igname(s) (ou tévi en langues locales fongbé et gungbé du Bénin), est une appellation qui désigne toutes les espèces monocotylédones du genre *Dioscorea* de la famille des Dioscoreacées. La famille des Dioscoreacées appartient à l'ordre des Dioscoreales dans la division Magnoliophyta (Kumar et al., 2017 ; Govaerts et al., 2007). Le genre *Dioscorea* comprend plus de 650 espèces soit environ 95% des espèces connues de la famille des Dioscoreacées (Couto et al., 2018) et continue d'engranger de toutes nouvelles espèces ; la dernière en date, *Dioscorea magnibracteata* a été découverte dans les forêts tropicales de la côte équatorienne et décrite en 2022 (Couto et Cornejo, 2022). Les espèces du genre *Dioscorea* sont regroupées en une cinquantaine de sections dont 8 sont très représentées à savoir *Lasiophyton, Macrocarpaea, Macroura, Opsophyton, Perennia, Rhacodophyllum, Asterotricha* et *Enantiophyllum* (N'kounkou, 1996). La majorité des espèces de *Dioscorea* cultivées et commercialisées telles que *D. alata*, *D. rotundata*, *D. opposite*, *D. cayenensis* et *D. japonica*, appartiennent à la section des *Enantiophyllum* (Peter, 2007). Récemment, des analyses phylogénétiques ont été menées sur la base de séquences d'ADN chloroplastique et de séquences de gènes nucléaires (Noda et al., 2020). Ces auteurs ont fourni un arbre phylogénétique à grande échelle contenant 183 espèces et ont proposé de diviser la famille des Dioscoreacées en deux sous-genres (*Dioscorea* et *Helmia*), avec 11 clades majeurs et 27 sections/groupes d'espèces. Les espèces du genre *Dioscorea s*ont des plantes généralement glabres ou pubescentes, à tubercules vivaces, semi vivaces (fréquents chez les espèces sauvage) ou annuels (chez la plupart des espèces cultivées). Les tiges des *Dioscorea* sont volubiles (grimpantes), soit dextroses (enroulement dans le sens des aiguilles d'une montre ; cas de *D. rotundata* et *D. alata*) soit sinistrorses (enroulement dans le sens contraire des aiguilles d'une montre ; cas de *D. bulbifera*) (Figure 12). Les tiges portent des feuilles alternes ou opposées, simples ou composées-digitées, pétiolulées ; présentant parfois des stipules ; le limbe est entier ou lobé à nervation secondaire réticulée (N'kounkou, 1996). Les espèces de *Dioscorea* sont généralement dioïques (Couto et Cornejo, 2022).

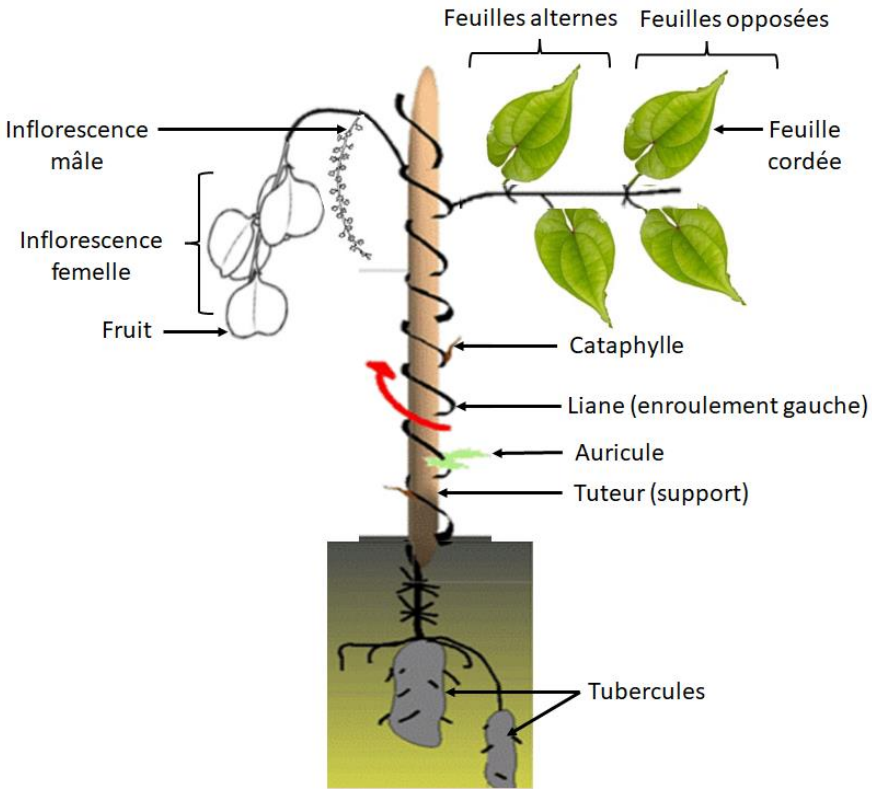


Figure 12 : Représentation schématique montrant la structure d'un plan d'igname en fin de cycle source : adapté de https://formad-environnement.org/.

2.2 Origines et distribution des ignames

Le genre *Dioscorea* est considéré comme l'un des plus anciens genres d'angiospermes originaires de la région paléarctique laurasienne et serait apparu entre la fin du Crétacé (57,7-85,9 Ma) et l'Éocène moyen (47,6-49,1 Ma), avec des propagations ultérieures vers les régions méridionales par dispersion à longue distance ou migration par des ponts terrestres à l'Oligocène-Miocène (33,90-5,33 Ma) (Viruel et al., 2016) (Figure 13). Le nombre d'événements de spéciation biogéographique semble avoir diminué après le début de la période quaternaire (Maurin et al. 2016 ; Viruel et al. 2016 ; Couto et al. 2018).

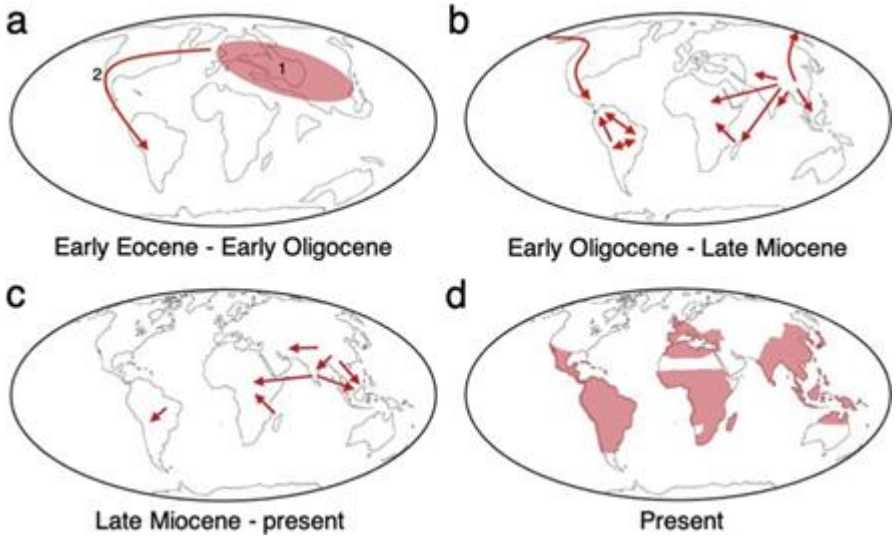


Figure 13 : Origine biogéographique et distribution des espèces de *Dioscorea* (Viruel et al. 2016). (a) *Dioscorea* est probablement originaire du Paléarctique laurasien au Crétacé supérieur et à l'Éocène inférieur (1), puis s'est dispersé de l'Asie à l'Amérique du Sud (2). (b) Au cours de l'Oligocène et du Miocène, *Dioscorea* s'est principalement étendu à la région méridionale. (c) Certaines lignées se sont dispersées dans de nouvelles régions au Miocène et au Pliocène, mais les événements de spéciation ont diminué au Quaternaire. (d) Répartition géographique à l'époque actuelle (Sugihara et al., 2021).

Les différentes espèces de *Dioscorea* ont apparemment suivi une évolution divergente sur trois continents séparés par la formation de l'océan Atlantique et la dessiccation du Moyen-Orient (Kumar et al., 2017). En conséquence, ces principales espèces sont présentes dans trois centres isolés : En Afrique de l'Ouest, on a les espèces *D. bulbifera* L., *D. dumetorum* Kunth, *D.cayenensis* Lam. et *D. rotundata* (Poir.), ces deux dernières étant parfois nommées complexe d'espèces *D. cayenensis-D. rotundata* ; en Amérique tropicale, l' espèce *D. pentaphylla* L. et en Asie du Sud-Est, les espèces *D. alata* L., *D. esculenta* Lour, *D. batatas* Decne, *D.nummularia* Lam. ou *D. opposita* Thumb (Kumar et al., 2017; Viruel et al., 2016).

Malgré le grand nombre d'espèces que compte le genre *Dioscorea* (plus de 600 espèces), seulement 10 espèces sont cultivées dans le monde dont la majorité principalement en Afrique de l'Ouest (Padhan et Panda, 2020), la zone de l'igname qui regroupe les plus grands pays producteurs à savoir le Ghana, la Côte d'Ivoire, le Togo, le Nigéria, le Cameroun, et le Bénin. Dans

cette région, l'espèce *D. rotundata* est très répandue. On retrouve également *D. alata*, dont la culture est plutôt concentrée en Côte d'Ivoire et *D. dumetorum* beaucoup plus cultivée dans la région du Nord-Cameroun. D'autres espèces dites mineures sont également rencontrées telles que *D. cayenensis, D. bulbifera* et *D. esculenta*. Certaines de ces espèces existent à l'état sauvage *D. bulbifera, D. dumetorum* (Scarcelli, 2005). Plus de 50 autres espèces sont consommées comme aliments de base ou aliments de famine et récoltées à l'état sauvage (Omohimi et al., 2018).

2.2.1 Du conflit taxonomique entre *D. rotundata* et *D. cayenensis* aux origines des ignames cultivées d'Afrique

L'espèce *D. cayenensis* fut la toute première décrite en 1789 par Lamarck à partir d'un spécimen en provenance de Guyane et l'espèce *D. rotundata* fut décrite un peu plus tard en 1813 par Poiret à partir d'un spécimen portoricain. Toutes les deux sont connues sous le nom d'igname de Guinée. Elles avaient été catégorisées par la couleur de la chair de leurs tubercules. Ainsi, on a appelé l'espèce *D. cayenensis* l'igname de guinée à chair jaune et l'espèce *D. rotundata*, l'igname de guinée à chair blanche (Burkill, 1921). Le même auteur (Burkill, 1939) a ensuite supposé que *D. rotundata* n'était qu'une sous-espèce de *D. cayenensis* regroupant les deux sous le nom de *D. cayenensis*, un avis qui a été partagé par certains chercheurs de l'époque (Chevalier, 1936; Miège, 1952). Plus tard en 1960, Burkill va reconsidérer sa position de départ en séparant à nouveau les deux espèces ; une position également soutenue par d'autres auteurs (Ayensu, 1972; Coursey, 1975). Toutefois, d'autres chercheurs estiment qu'il n'est pas nécessaire de séparer les deux espèces car il n'y a pas de barrières génétiques malgré les nombreuses différences morphologiques (Dumont, 1977). Compte tenu de cette polémique autour de la nomenclature des espèces, la conférence de Buéa tenue au Cameroun en 1978 a décidé de considérer ces deux espèces comme un complexe d'espèces d'où la naissance du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* (Miège et Lyonga, 1982). Même si cette dénomination a été adoptée par plusieurs auteurs (Dansi et al., 2000; Dumont et Vernier, 2000), d'auteurs continuent d'utiliser la terminologie *D. rotundata* et *D. cayenensis* (Akoroda et Chedda, 1983; Terauchi et al., 1992; Vernier et al., 2003). Jusqu'à présent, cette question continue de diviser les scientifiques qui travaillent sur l'igname surtout en Afrique de l'ouest. Selon Scarcelli (2005), le problème que pose la définition de ces deux espèces est

indéniablement lié à nos lacunes sur leur histoire ainsi qu'à leur grande diversité morphologique.

2.2.2 Histoire de domestication des ignames cultivées *D. rotundata* et *D. cayenensis*

Après la conférence de Buéa en 1978, plusieurs travaux se sont penchés sur la question de la nomenclature des deux espèces en remontant à leurs origines sur base à la fois de descripteurs morphologiques et de marqueurs moléculaires. A l'issu de leurs travaux, Terauchi et al. (1992) estiment que l'ancien *D.cayenensis* Lamk. devrait être reclassé en tant que variété ou sous-espèce de *D. rotundata*, dénommé *D. rotundata* var. x ''*cayenensis*'' et propose une nouvelle nomenclature des ignames de Guinée ''*D. rotundata* Poir.'' qui devrait être utilisée pour englober tous les cultivars de la sous-section *Cayenensis*. Une étude phylogénétique menée par Magwé-Tindo et al. (2018) indique un rapprochement très ultime entre les ignames cultivées (*D. rotundata* et *D. cayenensis*) et leurs plus proches parents sauvages ouest-africains (*D. abyssinica*, *D. praehensilis* et *D. sagittifolia*). En utilisant les nouvelles méthodes d'analyse du génome (whole-genome resequencing) et des modèles statistiques, Scarcelli et al. (2019) indiquent que les ignames cultivées *D. rotundata* auraient été domestiquées dans le bassin du fleuve Niger à partir d'une espèce forestière *D. praehensilis*. Une adaptation et une transformation (perte de certains caractères et acquisitions d'autres : syndrome de domestication) auraient permis de passer d'un tubercule fibreux de *D. praehensilis* à un gros tubercule amidonné *D. rotundata* (Figure 14) sans hybridation. Il s'agit plus précisément de l'adaptation à un environnement plus sec et plus lumineux en culture. La transformation a été interprétée comme l'effet de la sélection humaine pour l'augmentation de la taille des tubercules et de leur teneur en amidon (Scarcelli et al., 2019). Toutefois, une étude plus récente confirme l'hypothèse d'une origine hybride de l'espèce *D. rotundata* telle que supposée par Coursey (1976) en suggérant que le *D. rotundata* diploïde est très probablement issu d'une hybridation homoploïde entre *D. abyssinica* et *D. praehensilis* (Sugihara et al., 2020). L'évaluation des contributions génomiques de chaque espèce parentale à *D. rotundata*, a révélé une plus grande représentation du génome de *D. abyssinica* dans le chromosome sexuel de *D. rotundata* et serait son parent maternel le plus probable (Sugihara et al., 2020). *D. cayenensis* serait, quant à lui issu d'une hybridation polyploïde (allopolyploidisation) entre *D.*

rotundata femelle et le mâle d'igname sauvage africaine, *D. bulkilliana* (Figure 14) (Sugihara et al., 2021).

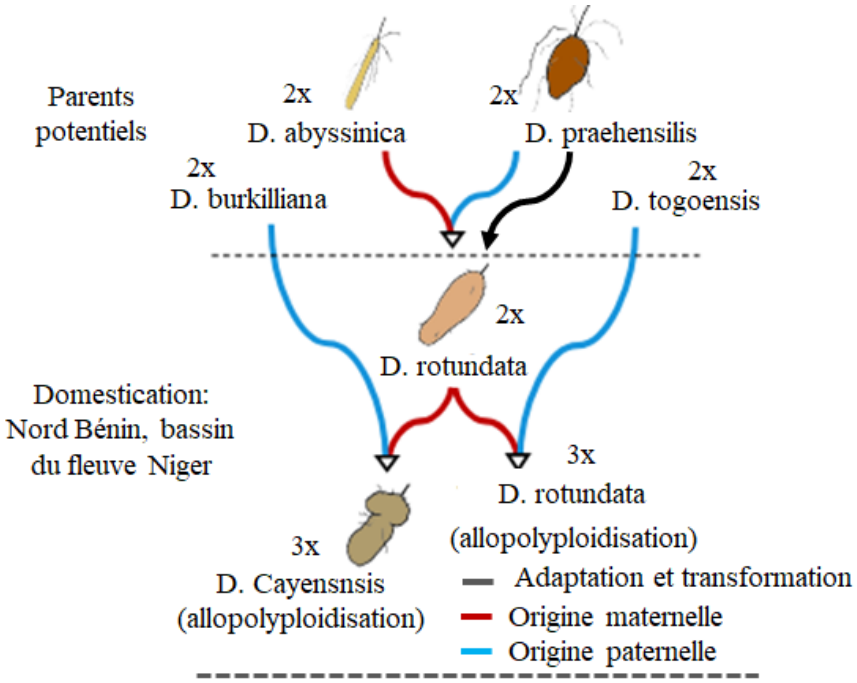


Figure 14: Scénarii possibles de la domestication de l'igname de Guinée. La ligne noire représente l'adaptation et la transformation (Scarcelli et al., 2019), la ligne bleue représente l'origine paternelle et la ligne rouge représente l'origine maternelle. (Sugihara et al., 2020).

Parallèlement aux espèces *D. rotundata* et *D. cayenensis*, l'hypothèse d'une origine hybride a été émise au sujet de l'igname cultivée *D. alata* mais ses géniteurs directes restent toujours ambiguës (Chaïr et al., 2016). *D. alata* est également rapporté comme ayant probablement deux centres de domestication distincts (Sud Pacifique et l'Inde) (Arnau et al., 2017; Sharif et al., 2020). En ce qui concerne *D. dumetorum*, l'espèce dite mineure serait d'origine africaine et probablement domestiquée au Nigéria et/ou au Togo (Sugihara et al., 2021).

En croisant toutes les informations disponibles sur l'origine des deux espèces *D. rotundata* et *D. cayenensis*, nous pensons qu'il est fort probable qu'elles soient génétiquement différentes car elles n'ont pas le même nombre de chromosomes et ont des histoires évolutives pas tout à fait

identiques ; point de vue partagé par Scarcelli (2005). Des travaux récents ont également montré une compatibilité croisée très faible voire nulle entre les deux espèces (Mondo et al., 2022a; Mondo et al., 2022b) suggérant l'existence d'une potentielle barrière reproductrice contrairement aux suggestions de Dumont (1977) . Sur ce, bien que des études récentes comme la nôtre réalisées sur les ignames cultivées du Bénin continuent de faire usage de la nomenclature du complexe d'espèces *D. cayenensis-D. rotundata* (Assaba et al., 2021; Assaba et al., 2018; Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b), nous allons opter dans ce document pour la nouvelle nomenclature de Terauchi et al. (1992) « *D. rotundata* (Poir.) ».

Par ailleurs, il est important de faire une différence entre variété et cultivar particulièrement chez les ignames cultivées. Cultivar est un terme d'origine anglaise « Cultivated variety » pour (variété cultivée). La différence, c'est qu'on entend par variété une variante de l'espèce existant à l'état sauvage, alors qu'un cultivar est une variété créée ou fixée par l'homme. Si les variétés sélectionnées sont communément admises comme cultivars, celles fixées et cultivées par les communautés locales sont qualifiées de variétés-populations ou « landraces » en terme génétique compte tenu de leur hétérogénéité comparativement aux variétés sélectionnées par un processus génétique approprié, qui sont plutôt homogènes et stables. Au sein des ignames *D. rotundata* d'Afrique et du Bénin en particulier, toutes les accessions détenues par les communautés locales sont cultivées et sont pour la plupart le résultat d'un long processus de domestication et d'ennoblissement comme décrit plus haut. Il ne s'agit donc ni de variantes de formes sauvages ni de variétés créées par un processus de sélection proprement dite (bien que ces dernières existent dans les centres de recherches), mais de variétés fixées et cultivées par les communautés locales qu'il conviendrait d'appeler **variétés-populations**. Mais considérant d'une part qu'il s'agit de variétés cultivées après une ''sélection empirique'' et par simplicité de terminologie d'autre part, nous avons opté pour ce document, l'appellation de cultivar.

2.3 Diversité des ignames cultivées d'Afrique

2.3.1 Diversité agro-morphologique

En ce qui concerne la systématique de l'igname en Afrique, les producteurs sont les premiers à identifier et nommer les espèces sont d'abord. Ceux-ci se basent sur des critères spécifiques notamment les organes aériens et souterrains comme par exemple la présence de tubercules aériens ou non. Ce

critère leur a permis de distinguer *D. bulburea* du reste des espèces (Figure 15 a). Les espèces *D. rotundata* et *D. cayenensis* se distinguent du reste des espèces cultivées par la meilleure qualité de leur tubercule à faire de l'igname pilée et entre elles par la couleur de la chair des tubercules (Figure 15 b). *D. alata* se démarque par sa tige quadrangulaire, la grosseur de son tubercule à chair généralement violette (Figure 15 c) par rapport au reste des espèces cultivées et sa non adaptabilité pour faire de l'igname pilée (Yolou, 2016). L'espèce *D. dumetorum* est connue sous le nom d''‘igname trifoliée'' en raison de ses feuilles trifoliées (Figure 15 d) (Sugihara et al., 2021). En recherche fondamentale, plusieurs critères sont utilisés pour caractériser les différences morphologiques au sein des cultivars d'une même espèce. Entre autre on peut citer, la présence ou non d'épine sur la tige ; la taille, le poids, la couleur de la chair et la maturité des tubercules (précoce, intermédiaire ou tardive) ; la floraison (mâle, femelle, monoïque ou non florifère), etc. (Afoha et al., 2019).

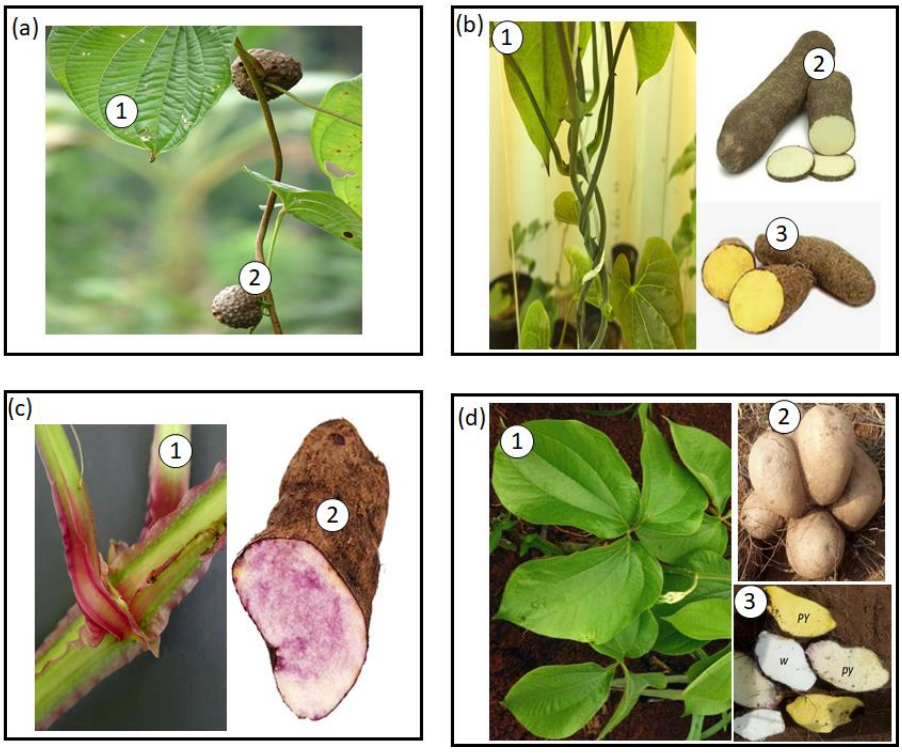


Figure 15 : Diversité morphologique de quelques espèces d'ignames cultivées en Afrique. **a** : (1) limbe cordé et feuilles alternes, (2) tubercule aérien de *D. bulbifera* ; **b** : (1) tige cylindrique épineuse dextrose de *D.*

rotundata et *D. cayenensis*, (2) tubercule à chair de *D. rotundata* et (3) tubercule à chair jaune de *D. cayenensis* ; **c** : (1) tige quadrangulaire et (2) gros tubercule à chair violette de *D. alata* ; **d** : (1) feuille trilobée, (2) tubercule rond, (3) tubercules à chair blanche (w) et jaune pale (py) de *D. dumetorum*. Source : a, b, c et d1 (Wikipédia) ; d2 et d3 (Adigoun-Akotegnon et al., 2019).

2.3.2 Diversité cytogénétique

Les ignames du genre *Dioscorea* sont caractérisées par une grande diversité de niveau de ploïdie. 33% des espèces étudiées sont polyploïdes (Sugihara et al., 2021).

Jusqu'en 2001 la plupart des études cytologiques (Dansi, 2001; Gamiette et al., 1999; Hamon et al., 1992; Miège, 1952; Zoundjihekpon et al., 1990) rapportent la polyploïdie des ignames d'Afrique. Il existe deux grands groupes à savoir les espèces dont le nombre chromosomique de base est x = 10 (40, 60, 80 chromosomes) et celles où le nombre chromosomique de base est x = 9 (ex. 36, 54, 72 chromosomes). Selon Scarcelli (2005), la détermination du nombre chromosomique de base des ignames a été basée sur l'existence d'espèces d'ignames européennes et asiatiques à 20 chromosomes qui avaient logiquement un nombre chromosomique de base x = 10. C'est le cas de *D. tokoro, D. gracilliama* et *D. nipponica* en Asie et *D. balcanica* et *D.caucasica* en Europe (Miège, 1952). Les nombres chromosomiques de base de 9 et 10 ont été remis en cause par Daïnou et al. (2002). Sur la base d'analyses isozymiques, les auteurs ont observé une ségrégation de type diploïde chez une descendance d'igname cultivée *D. rotundata* à 40 chromosomes et suggèrent que le nombre chromosomique des espèces considérées à x = 10 serait en réalité x = 20. Cette hypothèse a été ensuite confirmée par une étude basée sur l'utilisation d'isozymes et de marqueurs microsatellites (Scarcelli et al., 2005). Il est dorénavant admis que toutes les espèces d'ignames cultivées africaines ont un nombre chromosomique de base x = 20. Ainsi, les espèces à 40 (*D. rotundata*), 60 et 80 (*D. cayenensis*) chromosomes sont considérées respectivement comme diploïdes, triploïdes et tétraploïdes. Chez *D. alata* le nombre de chromosomique de base x = 10 longtemps admis (Abraham et Gopinathan Nair, 1991; Gamiette et al., 1999; Malapa et al., 2005) est également reconsidéré à x = 20 (Arnau et al., 2009). Selon les auteurs, l'espèce serait polyploïde avec une dominance diploïde (76%), triploïde (7%) et tétraploïde

(17%). Cette approche fait également l'unanimité chez *D. alata* (Sharif et al., 2020). Chez *D. dumetorum*, on rencontre également de la polyploïdie (Obidiegwu et al., 2009; Sugihara et al., 2021).

2.3.3 Diversité moléculaire

De nombreux systèmes de marqueurs ont été développés et appliqués de manière routinière à l'évaluation de la diversité génétique chez l'igname. On distingue des marqueurs moléculaires de type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Mignouna et al., 2005; Zannou et al., 2009), AFLP (Amplification Fragment Length *Polymorphism*) (Scarcelli et al., 2006), SSR (Simple Sequence Repeat) (Girma et al., 2017; Loko et al., 2017; Pachakkil et al., 2021); ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Kedra et al., 2019) et SNP (Single Nucleotide Reapeat) (Agre et al., 2021; Bhattacharjee et al., 2020; Darkwa et al., 2020a). La plupart de ces études rapportent une forte diversité au sein des ignames cultivées d'Afrique. Chez *D. rotundata*, l'utilisation de marqueurs SNP a récemment révélé une forte diversité (de l'ordre de 96%) que ce soit au sein des variétés sélectionnées, locales ou commerciales du Ghana et du Nigéria (Bhattacharjee et al., 2020). Darkwa et al. (2020a) ont également observé une forte diversité au sein des collections d'ignames *D. rotundata* (variétés sélectionnés et locales) du Ghana, du Nigéria, du Togo, de la Côte d'Ivoire, et du Bénin en associant des données morphologiques et moléculaires. Ils indiquent que certaines variétés morphologiquement identiques présentent parfois une forte diversité au niveau moléculaire. Au Bénin, les données moléculaires (marqueurs SNP) et phénotypiques ont révélé une forte diversité génétique chez les cultivars d'ignames *D. rotundata* au sein de différentes zones de production (Atakora, Borgou, Collines et Donga). Toutefois, la variabilité génétique des cultivars entre les zones de production du pays était faible en raison de l'échange important de matériel végétal entre les agriculteurs des différentes régions (Agre et al., 2021). D'autres études avaient déjà notifié l'existence d'une forte diversité génétique au sein des cultivars *D. rotundata* du Bénin (Agbangla et al., 2002; Scarcelli et al., 2011) y compris à l'intérieur d'un même cultivar (Yolou, 2016). En Ethiopie, l'utilisation des marqueurs ISSR a également révélé une forte diversité intra-région au sein des ignames cultivées *D. cayenensis* et *D. rotundata* alors que la diversité est plutôt faible entre les différentes régions de culture (Kedra et al., 2019). La très grande diversité qui caractérise l'igname de Guinée y compris à l'intérieur d'un même cultivar serait liée à l'introduction de nouveaux génotypes et de la

variation somaclonale. Cette hypothèse est soutenue par une pratique paysanne connue sous le nom d'ennoblissement (Dumont et Vernier 2000 ; Mignouna et Dansi 2003 ; Scarcelli et al. 2006 ; Chaïr et al. 2010). Il s'agit d'une pratique traditionnelle des agriculteurs qui consiste à collecter des tubercules d'ignames sauvages dans la brousse et la forêt et à les planter dans leurs champs. Au bout de 3 à 6 années de culture ces nouveaux génotypes sont introduits dans les cultivars existants (potentielle source de variabilité intra-cultivar) s'ils présentent des traits de ressemblance avec ces derniers. Dans le cas contraire, ils sont cultivés sous une nouvelle nomenclature locale (potentielle source de variabilité inter-cultivar) (Baco, 2000).

Chez *D. alata*, une étude intercontinentale menée dans le Sud pacifique (Vanuatu), en Asie, en Afrique et dans les Caraïbes a révélé une forte diversité génétique au sein de l'espèce en relation avec l'origine des variétés et leur niveau de ploïdie (Arnau et al., 2017). La plus grande diversité a été rencontrée en Inde et au Vanuatu, ce qui a conduit à l'hypothèse de deux centres de diversification. L'autre étude de portée mondiale réalisée sur les ignames *D. alata* a plutôt notifié une diversité globalement faible qui serait liée à un processus de domestication basé principalement sur la propagation végétative ainsi que la forte autopolyploïdisation qui caractérise l'espèce (Sharif et al., 2020).

L'étude de la diversité génétique de *D. dumetorum* a révélé que les accessions du Togo et du Nigeria avaient la plus grande diversité génétique (Sonibare et al. 2010). Par contre, au Bénin, les ignames cultivées *D. dumeturum* ne présentent presque pas de variabilité génétique. Les données morphologiques (Baco, 2007) et moléculaires (Yolou, 2016) n'ont montré aucune diversité au sein de l'espèce. L'absence de floraison femelle en serait la cause principale (Yolou, 2016).

2.4 Importance des ignames

Les ignames cultivées comme sauvages sont utiles pour leurs valeurs économiques, nutritionnelles, ethnobotaniques et socioculturelles.

2.4.1 Importance économique des ignames

En tant que source de nutriments alimentaires, les espèces de *Dioscorea* se classent au quatrième rang mondial des cultures de racines et de tubercules

après la pomme de terre, le manioc et la patate douce (Lev et Shriver, 1998). Elles représentent environ 10 % de la production totale de racines et de tubercules dans le monde (Padhan et Panda, 2020). L'igname est un aliment de base et une source de revenus pour environ 300 millions de personnes dans le monde, notamment en Afrique subsaharienne (Syombua et al., 2022). Dans les régions de l'Afrique de l'Ouest, *D. alata* L., et *D. rotundata* (Poir.) sont de première importance comme culture de base, principalement pour plus de 100 millions de personnes (Price et al., 2018). Les pays comme le Nigéria avec 50 millions de tonnes, le Ghana 8,53 millions de tonnes, la Côte d'Ivoire 7,65 millions de tonnes, le Bénin 3,15 millions de tonnes, le Togo 0,87 millions de tonnes et le Cameroun avec 0,70 millions de tonnes sont les plus grands producteurs mondiaux (95% de la production mondiale) en 2020 (Figure 16 A). La production d'igname évaluée en produit intérieur brute (PIB) est comprise entre 380 millions et 13,6 milliard de dollar US dans ces pays en 2020 (Figure 16 B) (FAOSTAT, 2020).

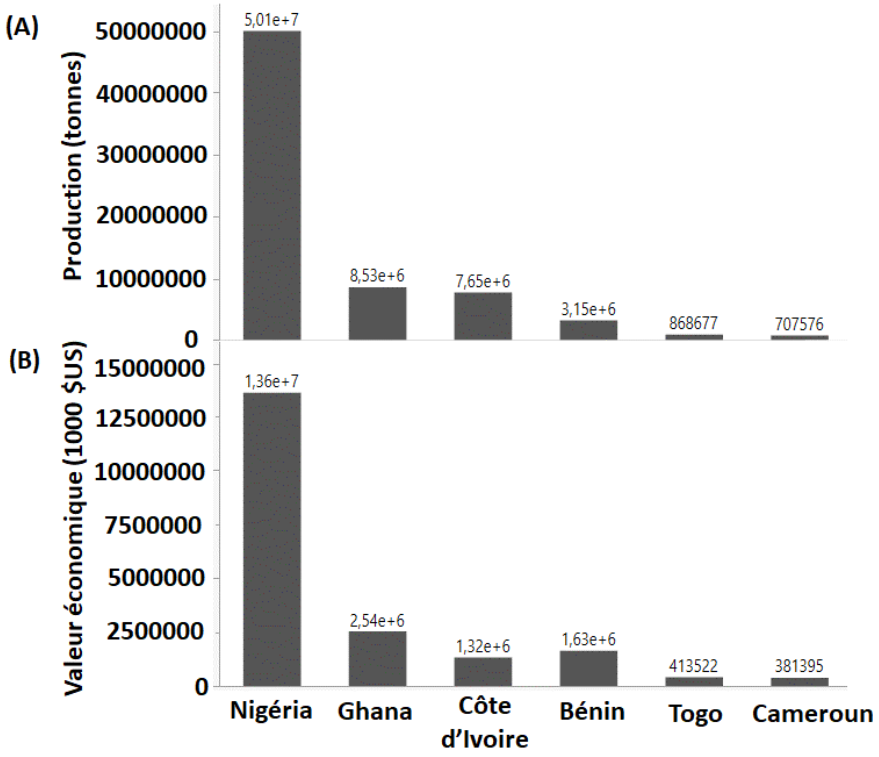


Figure 16 : Valeur de la production d'igname estimée en tonnes (A) et en dollar US dans la zone ‘‘ceinture d'igname'' (FAOSTAT, 2020).

2.4.2 Importance nutritionnelle des ignames

Les ignames sont considérées comme ayant une quantité considérable de divers nutriments alimentaires par rapport à d'autres cultures de tubercules tropicales. Le tubercule de l'igname est une bonne source de composants nutritionnels essentiels tels que l'amidon, les protéines, les lipides, les vitamines et les minéraux, etc. (Padhan et Panda, 2020). Plusieurs variétés et espèces de tubercules d'ignames sont alors utilisées pour obtenir des produits industriels tels que l'amidon, des stéroïdes, du poison de flèche, des insecticides et des tanins (Degras, 1993). Elles sont également employées comme matière première pour l'obtention de produits tels que la bière blonde, les crèmes glacées, les bonbons et les chips pour les collations (Degras, 1993; Kordylas, 1990; Yolou, 2016). Certaines espèces d'ignames comme *D. alata* présentent une forte concentration en antioxydants (Champagne et al., 2010; Sakthidevi et Mohan, 2013).

2.4.3 Importance ethnobotanique des ignames

Dans les régions forestières et les zones de production, les ignames sont utilisées dans le traitement de nombreuses maladies. C'est le cas des régions de forêt tropicale humide de l'Asie du Sud-Est (sud de la Thaïlande) où les populations locales utilisent les espèces de *Dioscorea* pour traiter les verrues (Maneenoon et al., 2008). Les tubercules bouillis de *D. membranacea* sont utilisés pour traiter l'asthme et la fièvre (Maneenoon et al., 2008). *D. prazeri* est utilisé comme savon et shampooing pour tuer les poux en Inde (Maneenoon et al., 2008). Des espèces de *Dioscorea* sont utilisées dans la guérison de la gastrite parmi les groupes locaux Yoruba de Cuba (Kadiri et al., 2014). Les tubercules de *D. hamiltonii* sont utilisés comme réfrigérant corporel pendant l'été et sont également utilisés pour traiter la diarrhée (Dutta, 2015). *D. bulbifera* L. est utilisé contre la tuberculose et le tubercule cru de *D. pentaphylla* L. contre la diphtérie chez le bétail (Sharma et Bastakoti, 2009). Les tubercules de *D. oppositifolia* sont utilisés dans le traitement des gonflements, des piqûres de scorpion et des morsures de serpent (Dutta, 2015). Au Zimbabwe, le tubercule de *D. bulbifera* est utilisé pour soigner les blessures et les plaies, la pâte de bulbilles est appliquée en externe sur les furoncles et les plaies au Cameroun et à Madagascar (Mbiantcha et al., 2010). Les communautés tribales locales d'Enugu au

Nigeria utilisent *D. alata* contre la fièvre et les tubercules de *D. cayenensis* sont utilisés pour traiter la diarrhée (Aiyeloja et OA, 2006).

2.4.4 Importance socioculturelle des ignames

L'igname est étroitement liée à l'histoire sociale et culturelle de l'Afrique, et représente un symbole fort de l'identité des populations (Baco et al., 2004). Quand bien même les traditions et les croyances se perdent, la culture de l'igname reste encore associée à des rites et coutumes particuliers (Scarcelli, 2005). Dans certaines régions d'Afrique, la consommation de la nouvelle igname est strictement interdite tant que des offrandes rituelles ne sont pas faites aux ancêtres. Certains cultivars sont donnés en offrande aux ancêtres au cours d'une cérémonie nommée "Fête de l'igname". Au Bénin, elle a lieu tous les 15 août et est pilotée par les chefs religieux traditionnels et les Rois. Jusqu'à présent, l'entrée de la nouvelle igname au Marché royal Houndjro d'Abomey ne peut se faire qu'après cette fête dirigée par le "Vodoun Kataounto". Cependant, la "Fête de l'igname" a perdu son caractère sacré et aujourd'hui, dans beaucoup de régions, surtout dans les villes, plus personne ne l'attend pour consommer l'igname (Perrot, 1998). L'igname, symbole d'amour, est également présente lors des mariages (Yolou, 2016) au Bénin. La taille des tubercules d'igname présentés reflète le degré d'amour que l'on éprouve pour sa femme et pour sa belle famille (Baco et al., 2004; Dansi et al., 1997).

2.5 Contraintes phytosanitaires et culture d'igname

Les maladies qui affectent la production d'igname sont d'origines multiples et interviennent à tous les niveaux de la chaîne de production depuis l'état de semenceaux jusqu'à la récolte et le stockage. On distingue les maladies virales et fongiques qui sont les plus importantes et d'autres causées par les nématodes et les insectes.

La mosaïque de l'igname (YMV, pour Yam mosaic Virus) (Ayisah et Gumedzoe, 2012) est le principal virus qui touche notamment les espèces *D. rotundata, D. alata* et *D. dumetorum* (Ayisah et Gumedzoe, 2012). Adeniji et al. (2012) ont rapporté des pertes allant de 52 à 65% causées par la mosaïque d'ignames chez ***D. rotundata***. Au Cameroun par exemple, 81% des producteurs sont concernés par les problèmes d'infection virales de champs d'ignames avec des pertes allant de 52 à 66% (Ignatius et al., 2019).

La maladie de l'anthracnose causée par le champignon *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) est le facteur le plus important affectant la productivité de l'igname, dévastant toutes les parties de la plante d'igname à chaque stade de développement, y compris les feuilles, les tiges, les tubercules et les graines dans de nombreuses régions du monde (Joseph et al., 2020; Ntui et al., 2021b). Des pertes de rendement dues à la maladie allant jusqu'à 90% ont été rapportées dans des conditions sévères sur différents cultivars d'ignames en Afrique (Ntui et al., 2021a; Nwadili et al., 2017; Pwakem et al., 2020).

Une dizaine d'agents fongiques ont été également identifiés comme responsables de la pourriture des tubercules d'igname pendant le stockage. Leur incidence sur les tubercule est de 1,2 à 28,5% (Aboagye-Nuamah et al., 2005). Les dégâts les plus graves sont causés par *P. brevi-compactum*. Une forte sensibilité aux agents fongiques a été remarquée chez les espèces ***D. rotundata*** **et** ***D. cayenensis*** (Yolou, 2016).

L'espèce *Scutellonema bradys* a été signalée comme le nématode le plus important qui affecte l'igname au Bénin (Baimey et al., 2009), responsable de la pourriture sèche des tubercules d'igname, une maladie dégénérative qui entraîne des dommages importants à la production au champ et surtout des pertes post-récolte pendant le stockage (Etchiha Afoha et al., 2018).

73 espèces d'insectes ont été identifiées comme insectes ravageurs associées à l'igname dans différentes parties du monde. Parmi eux 49 espèces attaquent la culture de plein champ et 27 infestent l'igname après la récolte (Korada et al., 2010). Les cochenilles et quelques coléoptères sont économiquement les plus ravageurs. Des pertes de rendement estimées à 5t/ha liées aux termites ont été rapportées (Yolou, 2016). Les cochenilles causent des pertes de levée de germination des tubercules de l'ordre de 30% et peuvent également réduire la croissance des plantes par succion de leur sève (Mani et al., 2016) chez ***D. rotundata*** **et** ***D. cayenensis***.

Au total, il ressort que la production d'ignames est limitée par une série de maladies et les infestations de ravageurs. Pour arriver à lutter efficacement contre celles-ci, il faudra entreprendre des recherches dans le sens de la sélection de variétés résistantes à ces maladies et cela nécessite une bonne maitrise de la biologie de la reproduction de la plante.

2.6 Biologie de la reproduction des ignames

A l'instar des grandes cultures comme la pomme de terre et le manioc, les ignames cultivées se propagent par voie végétative mais ont également conservé l'aptitude à se reproduire sexuellement tout comme leurs homologues sus-cités.

2.6.1 Reproduction végétative

La culture d'igname se fait traditionnellement par voie végétative. La plante d'igname émerge d'un mini-tubercule ou d'un fragment de tubercule appelé semenceau (ou tubercule-semence à la différence des semences botaniques) mis en terre à la plantation (Ile et al., 2006; Yolou, 2016). Chez les principales espèces cultivées *D. rotundata* et *D. alata*, les producteurs utilisent de petits tubercules issus de la deuxième récolte (pour les cultivars précoces à deux récoltes). Mais chez les cultivars tardifs à une seule récolte ou par manque de semences chez les cultivars précoces, les producteurs sont très souvent obligés d'avoir recours aux tubercules relativement longs qui sont généralement coupés pour générer des fragments de tubercule-semences (tête, milieu et base). Le rendement à la récolte est fortement impacté par la taille des fragments semés (Adejumobi et al., 2022; Molongo et al., 2021; Waziri et al., 2021). Les morceaux de 200 - 500 g sont recommandés pour obtenir un meilleurs rendement (Iseki et Matsumoto, 2020; Zoundjihekpon et al., 1995). Dans un système agricole traditionnel, il faut environ 10 000 ignames de semence, pesant chacune entre 200 et 1000 g, pour planter un hectare (Iseki et Matsumoto, 2020). Les tubercule-semences représentent jusqu'à 30 % de la récolte, ce qui génère une concurrence pour l'utilisation des tubercules soit comme nourriture, soit comme matériel de plantation (Iseki et Matsumoto, 2020). En cas de manque, les producteurs s'approvisionnent sur le marché de semenceaux au prix de 200 f CFA (30 centimes environ) l'unité (Yolou, 2016). Certaines espèces d'ignames cultivées en Afrique telles que *D. esculenta*, *D. trifida* et *D. bulbifera* considérées comme des ignames secondaires ou mineures sont cultivées à partir de tubercules entiers (micro-tubercules) aériennes ou souterraines (Mathurin et Degras, 1975). Le manque de semence constitue l'une des contraintes majeures qui affectent le secteur de production des ignames. Pour pallier à ce problème, des alternatives ont été proposées pour la production

de semences plus accessibles. Il s'agit notamment de production de semence par la technique de minissetts et de culture *in vitro*.

La technique traditionnelle de production de semenceaux ne répond plus aux besoins de la production actuelle (Brice et al., 2016). C'est ainsi qu'à la fin des années 1970, une technique qui sépare la production semencière de la production consommable a été développée. Il s'agit de la technique des minisetts (propagation clonale par fragmentation de macro-tubercules en micro-tubercules) qui utilise des mini-fragments de tubercules de 20 à 50 g, chacun d'eux ayant une portion de l'épiderme qui est le point de départ de la germination (Brice et al., 2016). Les fragments sont pré-germés et repiqués en champ après la germination à raison de 80000 pieds/ha. La récolte intervient au bout de 5 à 6 mois chez *D. cayenensis* et *D. rotundata* et les tubercules obtenus ont un poids compris entre 50 et 1000 g. Les meilleurs rendements chez ces deux espèces sont obtenus quand les fragments ont un poids supérieur à 35g et encore meilleur lorsqu'ils proviennent de la région sommitale du tubercule mère (Molongo et al., 2021). La durée minimum de la culture est estimée à 215 jours pour un rendement compris entre 10 et 24 tonnes à l'hectare (selon la taille des mini-fragments) chez *D. alata* (Meena, 2020). En dehors de sa capacité à produire des semences en remplacement aux tubercules destinés à la consommation nous pensons que la technique de minisett est une meilleure solution de production de génotypes clones utilisables dans les travaux de recherche quand on sait que certaines espèces comme *D. rotundata* présentent une diversité génétique au sein d'un même cultivar (Yolou, 2016).

L'autre méthode de production de semences chez les ignames, moins courante que la technique des missetts est la culture *in vitro*. Elle utilise deux modalités principales à savoir la micro-propagation par bourgeonnement axillaire et la micro-tubérisation (Nazir et al., 2021; Nazir et al., 2022). Cette technique est beaucoup moins appliquée car elle demande une technologie non accessible aux producteurs.

2.6.2 Reproduction sexuée chez les ignames cultivées

Malgré que les ignames soient propagées végétativement, certaines espèces ont conservé la reproduction sexuée durant le processus de domestication. Nous allons consacrer cette section à la description de la floraison, notamment le

comportement sexuel et ensuite la formation de fruits et de graines chez les ignames cultivées.

2.6.2.1 La floraison chez les ignames cultivées

2.6.2.1.1 Généralité sur la floraison des ignames

Le comportement de la floraison et son intensité varient au sein et entre les espèces d'ignames cultivées. La plupart des ignames cultivées sont dioïques portant des fleurs mâles et femelles sur des plantes distinctes (Agre et al., 2020; Mitchell-Olds et al., 2005; Wilkin et al., 2005) mais il existe des génotypes monoïques portant à la fois les fleurs mâles et femelles sur une même plante (Figure 17) (Mitchell-Olds et al., 2005; Tamiru et al., 2017). A notre connaissance, il n'existe pas de cultivars typiquement monoïques chez *D. rotundata*. On distingue des cultivars unisexués à floraison typiquement mâle ou femelle qu'on peut qualifier de dioïques stricts. Par contre, d'autres cultivars présentent une population composée de plantes qui fleurissent les unes mâles, les autres femelles ou monoïques. Nous les qualifions de « sub-dioïques » par opposition aux cultivars strictement dioïques. La floraison est généralement initiée 85 à 95 jours après la germination (Zoundjihekpon et al., 1997) et est utilisée comme signe de maturité des tubercules par les producteurs d'ignames *D. rotundata* et *D. cayenensis* (Yolou, 2016). Selon Yolou (2016), la période de floraison est fortement liée au cycle de pluie (démarrage précoce ou tardive) de l'année en cours. Les mâles généralement dominants dans les populations sont les premiers à fleurir (Mondo et al., 2020). La durée de floraison est de 5 à 10 jours chez les mâles et de 10 et 20 jours chez les femelles (Abraham et Gopinathan Nair, 1990) et peut varier selon les conditions météorologiques au cours d'une saison (Mondo et al., 2020). La différence entre les pics de floraison des mâles et des femelles est de 1 à 3 semaines (Akoroda, 1983a; Segnou et al., 1992; Zoundjihekpon et al., 1997). L'écart de temps de floraison entre les génotypes à floraison précoce et ceux à floraison tardive peut atteindre parfois 2 mois (ex. cv. Ala mâle précoce et cv. Allassiri mâle tardif du Bénin) (Yolou, 2016). La domestication de l'igname a été marquée par des changements évolutifs importants, caractérisés par le passage d'une propagation sexuelle à une propagation végétative (Akakpo et al., 2017; Scarcelli et al., 2019). Par conséquent, la floraison des espèces d'ignames cultivées est devenue rare, irrégulière ou absente, de sorte que dans certains cas, certains génotypes parfois de très grandes valeurs agronomiques ne fleurissent pas du tout (Girma et al., 2019; López Montes et al., 2012). Le taux de floraison et l'intensité de la floraison sont généralement faibles chez les ignames et varient selon les

génotypes, le sexe, l'endroit, la date et l'année de semis, la vigueur de la plante et le tuteurage offrant un accès suffisant à la lumière (Hamadina et al., 2009). En conditions expérimentales, le taux de floraison varie entre 25 et 56% en serre (Zoundjihèkpon, 1993) en champ il est de 70% en moyenne chez *D. rotundata* et *D. cayenensis* du Bénin. Il est à noter que la floraison est faible ou absente au niveau des semis (F1) et des premières générations clonales suite à des croisements (Mitchell-Olds et al., 2005; Tamiru et al., 2017). Selon l'intensité de la floraison (surtout l'abondance relative d'inflorescences par plante), les génotypes sont classés en 3 catégories : cultivars à floraison faible, moyenne et perfuse (Dansi et al., 1999; Hamadina et al., 2009).

2.6.2.1.2 Description florale

L'expression du sexe chez les ignames se traduit par la production de fleurs staminées sur une plante qualifiée de mâle ou de fleurs pistillées sur une plante qualifiée femelle. Au cas où les fleurs staminées et pistillées se retrouvent séparées sur une même plante, celle-ci est qualifiée de monoïque. Les fleurs mâles (Figure 17 a) et femelles (Figure 17 b) sont portées par des inflorescences axillaires. Les inflorescences mâles sont en faisceaux d'épis (Figure 17 d), en racèmes ou en panicules selon les espèces. Les fleurs mâles sont glabres, sessiles et sphériques. Elles portent un périgone dressé ou étalé. Les pièces sont libres, entières et disposées en 2 verticilles valvaires avec au centre, 3 à 6 étamines. Les anthères sont portées par des filets libres et caractérisées par une déhiscence longitudinale. Les inflorescences monoïques et femelles sont également en épis (Figure 17 c et e) ou en racèmes selon les espèces. Les fleurs femelles ont un périgone identique à celui des fleurs mâles. Elles disposent d'un ovaire infère, triloculaire avec 3 styles libres ou soudés ; chaque loge comportant 2 ovules à placentation axillaire (N'kounkou, 1996). Les femelles comportent aussi parfois des organes mâles sous forme de staminodes. L'existence de fleurs bisexuées a été rapportée chez les monoïques de *D. rotundata*, (Hamadina et al., 2009). Il est alors possible que chez cette espèce, les organes de sexes opposés soient initiés au moment de l'organogenèse et que des mécanismes génétiques et/ou épigénétiques parviennent ou non à les supprimer au cours de la différenciation sexuelle.

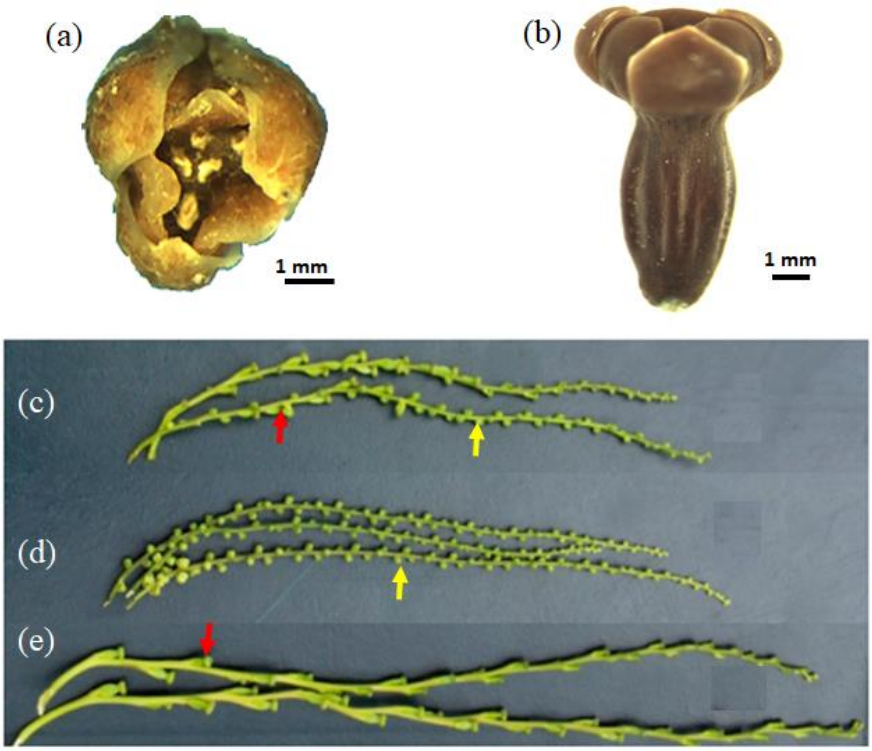


Figure 17 : Fleurs mâle (a) et femelle (b) de *D. rotundata* portées par des inflorescences mixtes (c) (inflorescences porteuses de fleurs staminées et pistillées), inflorescences mâles (d) (inflorescences porteuses de fleurs staminées uniquement) et inflorescences femelles (inflorescences porteuses de fleurs pistillées uniquement), Source (c, d et e) (Mondo et al., 2020).

2.6.2.1.3 Plasticité du sexe chez les ignames

Il arrive parfois d'observer différents phénotypes sexuels chez des plantes issues de fragments d'un même tubercule (Dansi et al., 1999). Autrement, les plantes issues d'une même propagule fleurissent les unes mâles et les autres femelles. Ce phénomène est très fréquent chez les monoïques et son ampleur varie selon l'endroit et les saisons (Mondo et al., 2020). Dans ce sens, beaucoup de travaux ont mentionné des variations du sex-ratio dans les cultures d'igname *D. rotundata* et sa dépendance du type de semence (plantes issues de graines ou plantes clonales sans précision d'une quelconque relation avec les fragments de tubercules), l'environnement (Hamadina et al., 2009; Tamiru et al., 2017) et de l'année (Abraham et Nair, 1979; Doku, 1985; Sadik et Okereke, 1975; Segnou

et al., 1992). Les changements de sexe d'une année à l'autre et d'un lieu à l'autre compromettent les plans expérimentaux, en particulier ceux qui impliquent une pollinisation croisée (Denadi et al., 2022; Tamiru et al., 2017). Il y a alors lieu de se questionner sur le contrôle du sexe chez les ignames cultivées.

2.6.2.1.4 Déterminisme du sexe chez les ignames cultivées

La majorité des espèces du genre *Dioscorea* possèdent un système de détermination sexuel XX/XY mâle hétérogamétique à l'exception de quelques-unes (Tableau 2).

Martin et Ortiz (1966) avaient décrit un déterminisme génétique du sexe basé sur le système Y-actif chez les ignames *Dioscorea*. Selon Martin et Ortiz (1966), les mâles sont toujours hétérogamétiques XY et les femelles sont homogamétiques XX. Ce système est confirmé chez des espèces sauvages comme *D. floribunda* (Martin et Ortiz, 1966) et *D. tokoro* (Terauchi et Kahl, 1999). Au sein des espèces cultivées, des travaux effectués récemment ont montré un système XY mâle hétérogamétique chez l'espèce *D. alata* (Cormier et al., 2019; Mondo et al., 2021). Par contre, chez les ignames cultivées *D. rotundata*, le contrôle du sexe serait plutôt régi par un système femelle hétérogamétique ZW (Agre et al., 2020; Asfaw et al., 2022; Tamiru et al., 2017). Tamiru et al. (2017) ont émis l'hypothèse d'une ségrégation des loci Z et W dans la détermination du sexe chez l'igname *D. rotundata*. En conséquence, l'état homozygote du locus ZZ détermine le phénotype sexuel mâle tandis que l'état hétérozygote (ZW) ou hémizygote (Z-) du locus détermine le phénotype sexuel femelle. W étant dominant sur Z exerce un effet dit Z-suppresseur sur ce dernier de sorte que si l'effet Z-suppresseur est partiel ou nul, la descendance sera monoïque, mâle ou non florifère. Tamiru et ses collaborateurs estiment que le locus W serait sous influence des conditions de l'environnement. Agre et al. (2020) ont montré que les changements de sexe en fonction de l'environnement de croissance sont dus à l'expression allélique différentielle de l'allèle W chez les plantes monoïques. Cinq gènes considérés comme directement liés à l'expression sexuelle ou à la régulation de l'équilibre des hormones influençant directement l'orientation sexuelle ont été identifiés chez *D. rotundata* (Asfaw et al., 2022). Il est donc possible que l'expression du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* implique des facteurs épigénétiques et hormonaux. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour élucider l'impact de l'environnement sur l'allèle W pour une compréhension approfondie des

mécanismes contrôlant les variations spontanées du sexe chez *D. rotundata* d'une année sur l'autre (Mondo et al., 2020) en tenant compte à la fois des facteurs épigénétiques et hormonaux.

Tableau 2 : Systèmes de détermination du sexe signalés chez les espèces de *Dioscorea* et méthode de détection (Sugihara et al., 2021)

Espèces	système	méthode	Références
D.alata	XY	QTL	(Cormier et al., 2019)
D.bulbifera	XY	cytologie	(Ramachandran, 1962)
D.deltoidea	ZW	cytologie	(Bhat et Bindroo, 1980)
D.discolor	a	cytologie	(Smith, 1937)
D.fargesii	a	cytologie	(Smith, 1937)
D. gracillima	XY	cytologie	(Nakajima, 1942)
D.japonica	XY	cytologie	(Nakajima, 1942)
D.macroura	a	cytologie	(Smith, 1937)
D.pentaphylla	XY	cytologie	(Ramachandran, 1962)
D.reticulata	XO	cytologie	(Smith, 1937)
D.rotundata	ZW	QTL	(Tamiru et al., 2017)
D.sinuata	XO	cytologie	(Meurman, 1925)
D.spinosa	XY	cytologie	(Ramachandran, 1962)
D.tokoro	XY	AFLP	(Terauchi et Kahl, 1999)
D.tomentosa	XY	Cytologie	(Ramachandran, 1962)

[a] Des chromosomes hétéromorphes ont été signalés mais aucune information sur le système de détermination du sexe.

2.6.2.1.5 Prédiction du sexe chez les ignames

Compte tenu de l'instabilité sexuelle cruciale qui caractérise les ignames notamment l'espèce *D. rotundata*, la question de la prédiction du sexe a été au cœur des recherches au cours de cette décennie. Des recherches exploratoires ont commencé par la recherche de traits phénotypiques (couleur de la tige et des feuilles, présence ou absence de cire et de taches sur les tiges, forme des

feuilles…) qui pourraient aider à prédire très tôt le sexe avant la floraison (Agre et al., 2020; Girma et al., 2014). Des pistes liées au niveau de ploïdie des espèces ont été également explorées et il s'est avéré une corrélation entre le niveau de ploïdie et le type de fleur chez *D. rotundata*. Tous les triploïdes expriment un phénotype sexuel soit mâle, soit non florifère (Agre et al., 2020; Girma et al., 2014). Les auteurs ont tout de même notifié l'absence de floraison femelle chez *D. cayenensis* polyploïdes (di-, tri- et tétraploïdes). Chez *D. dumetorum*, la floraion femelle est très rare (Yolou, 2016). Globalement, la prédiction du sexe sur base de traits agro-morphologiques ou sur base des niveaux de ploïdie n'a pas été concluante. C'est ainsi que des recherches au niveau moléculaire ont été entreprises dont certaines ont abouti au développement de marqueurs génétiques potentiellement discriminants du sexe mâle et femelle chez *D. rotundata* (Tamiru et al., 2017). A l'issu de leurs travaux ayant abouti à la proposition d'un système hétérogamétique femelle (ZW) chez les ignames cultivées *D. rotundata* (voir section précédente), Tamiru et al. (2017) ont également développé un marqueur SNP (SP16) sexe-discriminant. Le marqueur SP16 se trouve sur le pseudo-chromosome 11 de l'igname *D. rotundata* et est étroitement associé à la féminité dans un système hétérogamétique de détermination du sexe. Ce marqueur a été testé efficace sur les ignames cultivées *D. rotundata* du Nigéria dans la discrimination du sexe mâle et femelle (Agre et al., 2020). Toutefois, la prédiction de la monoécie, l'absence de la floraison et les changements spontanés du sexe demeurent toujours un mystère à élucider. La détermination électrochimique du sexe chez les plantes de *D. zingiberensis* et *D. bulbifera* à l'aide de feuilles de graphène fonctionnalisées à la polydopamine a également fait ses preuves (Fu et al., 2020). Dans ce procédé, les feuilles de graphène sont enroulées autour des tissus de plantes à tester. Des modèles de dispersion et des modèles de surface 3D permettent de comparer les voltammogrammes électrochimiques enregistrés et de déterminer le sexe des sujets en présence (Fu et al., 2020).

2.6.2.2 La pollinisation

La dioécie contraint les ignames à l'allogamie stricte mais la présence de plantes monoïques laisse envisager la possibilité d'une éventuelle géitonogamie naturelle ou artificielle. La structure des fleurs et la disponibilité d'agents pollinisateurs sont autant de facteurs qui affectent le succès reproducteur. La pollinisation chez les ignames cultivées peut être assurée naturellement par les insectes mais peut également être faite manuellement.

2.6.2.2.1 Pollinisation naturelle

Les grains de pollen des ignames sont fortement vacuolisés, petits et noyés dans une substance gélatineuse très collante et adhèrent fortement aux anthères. Leur transport par le vent est quasiment impossible (Sadik et Okereke, 1975). La pollinisation chez toutes les espèces de *Dioscorea* est essentiellement entomophile. Les fleurs pistillées et staminées présentent une fente à trois ouvertures de 100-200 µm, limitant les visites aux seuls petits insectes (Mondo et al., 2020). Au Nigéria par exemple, la pollinisation est assurée par des insectes appartenant aux ordres Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera et Thysanoptera (Akoroda, 1985; Govaerts et al., 2007; Segnou et al., 1992). Au Bénin, elle est essentiellement assurée par les Thrips (Yolou et al., 2015a). En outre, ces pollinisateurs sont sélectifs. Certaines espèces d'ignames comme *D. composita* et *D. floribunda* sont rarement visitées par les insectes. Leurs fructifications naturelles sont faibles : 0,9 et 4,5%, respectivement (Martin et al., 1963). Pour obtenir une pollinisation efficace, les plantes doivent produire de la nourriture (concentration élevée de nectar, pollen et composés volatiles) pour faciliter les visites d'insectes (Segnou et al., 1992). Martin et al. (1963) ont rapporté que les fleurs de certaines espèces telles que *D. spiculifora* attiraient de nombreuses mouches et fourmis et avaient une nouaison supérieure à 90%.

2.6.2.2.2 Pollinisation manuelle

En dehors de la pollinisation naturelle par les insectes, la pollinisation manuelle se fait également chez l'igname. Plusieurs techniques sont utilisées pour cela. On distingue la technique de pinceau, la technique de l'écharde ou celle du compte-gouttes (Akoroda, 1983a, 1985; Akoroda et al., 1981). La méthode du pinceau a donné un taux de fructification constamment plus élevé (41% contre 16 et 3% pour l'écharde et le compte-gouttes, respectivement) (Akoroda, 1985). Un plan d'expérimentation adéquat et une parfaite maîtrise de la floraison des cultivars sont également indispensables pour la réussite de la pollinisation manuelle.

Pour réussir une pollinisation manuelle artificielle, il est fortement recommandé de trouver le juste décalage entre la date de plantation des mâles et des femelles en tenant compte également de la précocité des cultivars en jeu. Cela va permettre de synchroniser la floraison. Les blocs femelles sont généralement plantés 2 à 4 semaines avant les homologues mâles. Les blocs de croisement

mâles et femelles sont plantés à une distance de 500 à 1000 m les uns des autres pour éviter la pollinisation involontaire par les insectes (Darkwa et al., 2020b). Dans les blocs de pollinisations contrôlées, les épis femelles contenant des fleurs matures sont soigneusement ensachés (idéalement à l'aide de sacs en tissu anti-mauvaises herbes) 2 à 7 jours avant leur ouverture pour empêcher la pollinisation par des sources de pollen indésirables (Segnou et al., 1992). La viabilité des fleurs mâles étant très courte, parallèle à l'ouverture des fleurs et variant selon le moment de la journée (Zoundjihekpon, 1993), il est généralement recommandé d'opérer la pollinisation avant 15 h, l'heure après laquelle la viabilité des fleurs mâles diminue considérablement (Mondo et al., 2022b). Il est aussi préférable d'utiliser les fleurs femelles au moins un jour après l'anthèse pour obtenir de meilleurs résultats (Abraham et Gopinathan Nair, 1990).

2.6.2.3 Mise à fruit et mise à graine chez les ignames cultivées

Deux à trois jours après une pollinisation, la nouaison est attestée par l'augmentation de la largeur de l'ovaire à environ 5 mm (Figure 18 a) (Akoroda, 1985). 12 semaines après, les fruits atteignent leur maturité (Figure 18 b). Un fruit bien formé est triloculaire et mesure environ 1 à 3 cm de longueur (Figure 18 b). Ils sont secs et déhiscents (Figure 18 c). Chaque loge comporte 2 graines. La graine est petite, plate, légère et ailée (Figure 18 d), ce qui facilite son déplacement par le vent. (Coursey, 1967; Onwueme, 1978). La graine botanique de *D. rotundata* est entièrement entourée par l'aile, alors que chez *D. bulbifera* ou d'autres espèces, l'aile se trouve respectivement sur un ou deux côtés des graines. La graine d'igname est constituée d'un petit embryon entouré d'une membrane relativement grande (figure 18 d). Les fleurs bisexuées produisent généralement des fruits déformés, sans graines (Mondo et al., 2020). Il est important de noter que les graines de certaines espèces d'ignames, comme *D. rotundata*, sont dormantes pendant une longue période (3-4 mois) après la récolte alors que celles de *D. alata*, n'ont pas de dormance et peuvent germer immédiatement après le séchage (Abraham, 1992).

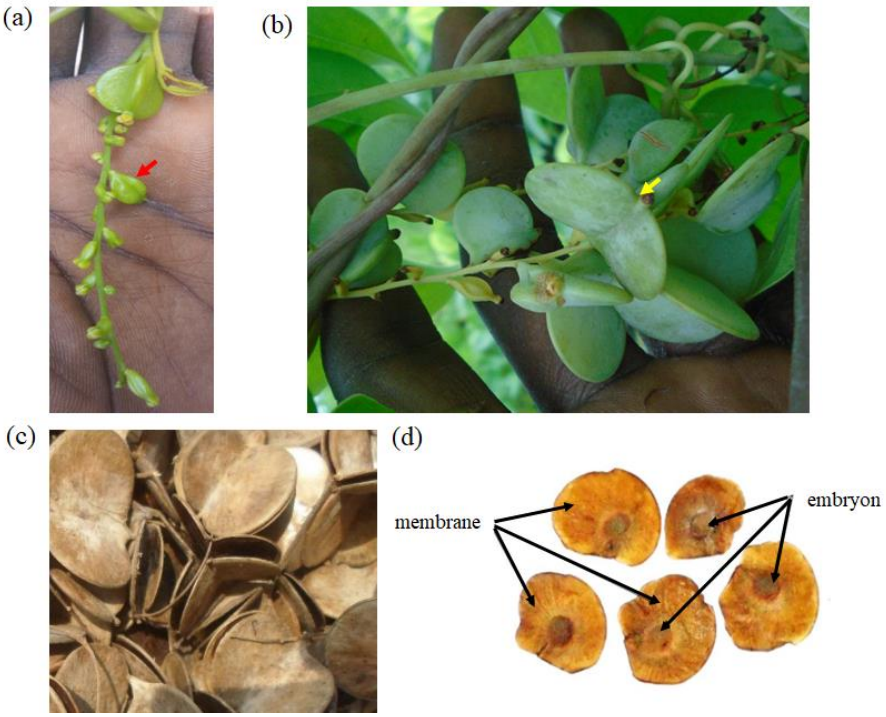


Figure 18 : fruits et graines de *D. rotundata*. (a) : inflorescence monoïque montrant une fleur en début de nouaison (fleur indiquée par la flèche rouge) ; (b) : fruits frais matures (fruit bien formé, trilobé indiqué par la flèche jaune) ; (c) : fruit secs et déhiscents ; (d) : graines ailées. Source c et d (Assaba et al., 2018).

Par ailleurs, la quantité et la qualité des fruits et des graines produites peuvent dépendre des techniques de pollinisation et du degré de compatibilité entre les variétés (pour un croisement intraspécifique) et éventuellement les espèces impliquées dans les croisements (pour un croisement interspécifique). Les productions de fruits et de graines sont généralement faibles après une pollinisation manuelle. Le taux de mise à fruit est de 27% en moyenne dans les combinaisons de croisements intraspécifiques et de 6,1% dans les combinaisons de croisements interspécifiques. Quant à la mise à graine, elle est de 9,3% et 1,1% pour les croisements intraspécifiques et interspécifiques respectivement (Mondo et al., 2022a). Selon les auteurs, *D. rotundata* a des indices de compatibilité croisée interspécifique plus élevés que *D. alata*. Toutefois, ce rapport peut changer selon les années (Mondo et al., 2022b). L'indice de compatibilité croisée interspécifique (*D. rotundata* x *D. cayenensis*) est particulière faible par rapport à l'indice de compatibilité croisée

intraspécifique (*D. rotundata* x *D. rotundata*) et suggère qu'il existe réellement une barrière reproductrice entre les deux espèces contrairement à ce que pensent certains auteurs comme Dumont (1977). Les indices de compatibilité croisée ne sont pas particulièrement impactés par les distances génétiques et les taux d'hétérozygotie (Mondo et al., 2022a). Par contre, les différences de niveau de ploïdie sont l'une des causes majeures de l'échec des croisements interspécifiques. Les conditions météorologiques et les agents de pollinisation sont également très déterminants dans le succès des croisements (Mondo et al., 2020; Mondo et al., 2022a). Comparativement aux pollinisations manuelles, les taux de fructification entomophile en champ sont généralement plus élevés, de l'ordre de 30 et 70% chez *D. rotundata*. (Yolou, 2016). Pour optimiser le succès reproducteur chez les ignames il est important d'opérer des choix de parents pouvant offrir une compatibilité croisée conséquente. Des travaux récents réalisés chez *D alata* ont permis la découverte de marqueurs SNP (en attente de validation) situés sur les chromosomes 1 et 17 susceptibles de prédire la compatibilité croisée des individus impliqués dans un plan de croisement (Mondo et al., 2021). La validation de ces travaux et leur élargissement à d'autres espèces comme *D. rotundata* seront un atout majeur pour les programmes de sélection et de création variétale. Norman et al. (2020) ont déjà démontré le potentiel des marqueurs SNP dans l'identification précise des relations de parenté entre descendants d'ignames cultivées *D. rotundata* issus de croisements libres.

Dans le choix des parents pour une optimisation de la production de fruits et surtout de graines, des méthodes classiques sont également utilisées telles l'évaluation de la viabilité des grains de pollen la réceptivité des stigmates. Dans la section suivante nous allons développer quelques-unes de ces méthodes avec leurs avantages potentiels.

2.6.2.4 Evaluation de la viabilité des organes reproducteurs

2.6.2.4.1 La viabilité pollinique

Les études sur la viabilité du pollen sont essentielles tant pour la production d'un grand nombre de graines que pour la pollinisation croisée en vue de l'amélioration génétique (dos Santos Ferreira et al., 2021; Güçlü et al., 2020). Tester la viabilité pollinique est un moyen indirect de mesurer la capacité reproductrice d'un mâle pollinisateur. En outre, le pollen joue un rôle dans les études d'incompatibilité et de fertilité, la génétique, la maintenance des banques de gènes, l'échange de germoplasme sans risque de transfert de maladies,

l'évaluation de la dispersion et du flux génétique (Dafni et Firmage, 2000; Volk, 2011). La viabilité du pollen est un terme générique qui décrit la capacité du pollen à vivre, germer, croître ou se développer (Dafni et Firmage, 2000). Plusieurs méthodes permettent d'évaluer la viabilité pollinique mais trois parmi elles sont couramment utilisées. Il s'agit de la germination *in vitro*, la coloration vitale des grains de pollen et la fécondation et le développement des grains de pollen *in vivo* (Alexander, 2019; Dupl'akova et al., 2016; Impe et al., 2020; Tello et al., 2018).

- **Les méthodes de coloration**

La coloration est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer la viabilité du pollen dans différentes cultures. Elle est moins exigeante en termes du temps de travail (environ 30 minutes). Cette méthode est basée sur l'activité métabolique (généralement le taux de respiration) et la semi-perméabilité de la membrane des grains de pollen (Towill et Walters, 2000). Elle utilise des colorants pour distinguer les pollens viables des pollens non viables, avortés ou morts. Les principaux colorants sont le diacétate de fluorescéine, le chlorure de tétrazolium d'Alexander, 2,3,5-triphényle, le bromure de monotétrazolium de 2,5-diphényle, le carmin acétique, la benzidine-H_2O_2, la coloration à l'encre bleue, le bleu de méthylène, l'I_2-KI, l'acide inorganique et les méthodes de coloration au peroxyde (Luo et al., 2020). L'efficacité et la pertinence de ces méthodes de coloration dépendent de l'espèce. Les tests utilisant la coloration d'Alexander ont été jugés efficaces pour tester les grains de pollen des ignames *D. rotundata* et *D. cayenensis* de la Côte d'Ivoire (Zoundjihèkpon, 1993). Une étude récente a également montré un résultat probant avec l'utilisation du carmin acétique chez les ignames cultivées *D. rotundata* et *D. cayenensis* du Bénin (Assaba et al., 2020).

- **La germination *in vitro***

La méthode de germination du pollen *in vitro* a généralement été explorée pour estimer la viabilité du pollen et s'est révélée plus fiable que les méthodes de coloration (Jayaprakash et al., 2015; Soares et al., 2018) quoiqu'elle est plus coûteuse en temps que les méthodes colorimétriques. Dans cette méthode, il s'agit d'évaluer la germination du pollen sur un milieu nutritif. Les grains de pollen sont considérés comme viables si leurs tubes s'allongent jusqu'à une longueur égale à leur diamètre (Alexander, 2019; Dafni et Firmage, 2000) ou au triple du diamètre (Colas et Mercier, 2000). Les milieux de culture les plus simples contiennent du saccharose en tant qu'un agent osmorégulateur, du bore qui assure l'intégrité des membranes, l'allongement du tube pollinique et du

calcium qui assure la progression du tube pollinique sans être pour autant indispensable au milieu de culture dont les concentrations varient selon les besoins nutritifs du pollen testé (Colas et Mercier, 2000). D'autres composés pourront être ajoutés mais de sorte que la proportion de tous les composants conduit à un pH favorable à la germination du pollen. La composition du milieu et le pH sont spécifiques à chaque espèce (dos Santos Ferreira et al., 2021; Wood, 2017). L'inclusion de polyéthylène glycol dans le milieu a permis d'améliorer les pourcentages de germination chez plusieurs espèces (Towill et Walters, 2000). Bien que variant selon les espèces, la température optimale de germination du pollen pour la plupart des cultures est de 25°C (Volk, 2011). Le pourcentage de germination *in vitro* du pollen d'igname est généralement faible, bien qu'il existe une grande variabilité entre les espèces et les cultivars. La viabilité varie de 0,3 à 85 % pour le pollen de *D. rotundata* (Akoroda, 1985) et de 20 à 98 % pour *D. alata* (Akoroda, 1985). Dans les travaux précédents sur l'igname, le milieu BK (Brewbaker et Kwack) a été utilisé dans sa recommandation initiale sans optimiser aucun des éléments qui sont connus pour changer avec les espèces (Akoroda, 1983b; Daniel et al., 2002; Sadik et Okereke, 1975). Par ailleurs, tous les événements intervenants entre la récolte et le test lui-même peuvent également influencer le résultat. On peut citer entre autres le moment de la récolte des grains de pollen, les conditions de température et d'humidité relative dans lesquelles sont placés les échantillons (Mondo et al., 2022b; Zoundjihèkpon, 1993). Des tests de germination du pollen *in vitro* ont confirmé que le milieu de la journée (12 h à 14 h) était le moment optimal pour la collecte du pollen chez *D. rotundata* et *D. alata*, tandis que les extrêmes du matin et du soir doivent être évitées (Mondo et al., 2022b). A ces conditions s'ajoutent d'autres facteurs tels que le génotype, le stress, l'âge de la plante, le type de pollen (bicellulaire ou tricellulaire), la pollution, la lumière ultraviolette, etc. (Colas et Mercier, 2000; Zoundjihèkpon, 1993). La capacité de germination des grains de pollen dépend aussi des conditions et de la rapidité avec lesquelles se déroule l'extraction. Après récolte, le pollen doit être extrait des organes mâles le plus tôt possible au risque d'altération de la respiration cellulaire (Snyder et Clausen, 1974).

- **Germination *in vivo***

La germination *in vivo* du pollen prend beaucoup de temps mais reste la méthode de test la plus appropriée pour la viabilité des grains de pollen. La longueur du tube pollinique est mesurée après un intervalle de temps prédéterminé ou en évaluant le développement des fruits et la production de

graines (Dafni et Firmage, 2000; Volk, 2011). Un niveau de viabilité élevé n'est pas souvent requis pour cette méthode car la nouaison se produit lorsque le stigmate est traité avec seulement 5% de pollen viable (Volk, 2011). Cette méthode semble plus pratique pour l'igname car dans un échantillon de pollen, seuls quelques grains de pollen viables sont nécessaires pour fertiliser les six ovules d'une fleur femelle. Akoroda (1985) a signalé qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre le degré de nouaison et le pourcentage de germination *in vitro*, car les échantillons de pollen à faible pourcentage de germination donnaient une nouaison satisfaisante. La germination *in vitro* est souvent suffisante pour tester la viabilité du pollen car sa corrélation avec la pollinisation in *vivo* est élevée pour la plupart des cultures. Sur l'igname *D. rotundata*, Ng et Daniel (2000) ont établi une relation positive entre la germination *in vitro* et la nouaison après une pollinisation manuelle. Cette relation positive a également été confirmée par Volk (2011). Cependant, il est important de noter que le pollen peut être viable mais ne pas germer dans les conditions de terrain en raison de la non-réceptivité du stigmate et/ou de conditions environnementales défavorables (Dafni et Firmage, 2000). Dans le processus de germination *in vivo*, la comptabilité entre les deux parents serait très déterminante dans la capacité des pollens à germer et à croître dans le style.

2.6.2.4.2 Réceptivité du stigmate et efficience de la pollinisation

Les stigmates secrètent des substances qui fournissent les conditions environnementales nécessaires à la germination du pollen sur le stigmate (Hao et al., 2022) preuve de leur réceptivité. Bien que le stigmate soit réceptif pendant l'anthèse, il peut ne l'être que pendant quelques heures après l'anthèse chez certaines espèces (Soares et al., 2018). La réceptivité du stigmate est donc un paramètre important pour l'efficacité de la pollinisation (Figueiredo et al., 2020). La réceptivité du stigmate est généralement évaluée en mesurant les activités d'enzymes spécifiques, telles que les estérases, les peroxydases, les phosphatases et les déshydrogénases sur le stigmate (Chen et al., 2013; Dafni et Maués, 1998; Galen et Plowright, 1987; Soares et al., 2018; Wojciechowicz et al., 2016). Plusieurs méthodes ont été décrites pour tester l'activité enzymatiques des stigmates c'est-à-dire leur réceptivité. Il s'agit entre autres de la méthode de benzidine, peroxyde d'hydrogène et acétate d'α-naphtyle. Ayant expérimenté ces trois méthodes sur 18 espèces de Broméliacées, Souza et al. (2016) observent une efficacité plus élevée de la méthode de l'acétate d'α-naphtyle. Les auteurs ont également observé une forte corrélation entre la morphoanatomie des stigmates et leur réceptivité

(Souza et al., 2016). Chez les ignames, la réceptivité des stigmates est généralement faible et coïncide avec l'épanouissement des fleurs. La durée de réceptivité du stigmate varie entre 9 et 11 jours selon les espèces (Mondo et al., 2020).

3 Milieu d'étude

3.1 Situation géographique et conditions de culture

Les travaux de terrain réalisés pour le compte de cette étude se sont déroulés au Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA). Le centre est situé dans la commune de Zogbodomey (République du Bénin), comprise entre 6°56' et 7°08 de Latitude Nord, 1°58' et 2°24' de Longitude Est. Cette zone est caractérisée par un climat subéquatorial avec une forte pluviosité annuelle (1200 mm/a) et une température moyenne annuelle envoisinant les 28°C. Il y a une alternance de saisons sèches (de novembre à Février et de mi-juillet à Août) et de saisons pluvieuses (d'avril à mi-Juillet et de septembre à octobre) (Figure 19, ASECNA-Bénin). Le sol est argileux et permet une bonne rétention d'eau favorable à la culture d'igname.

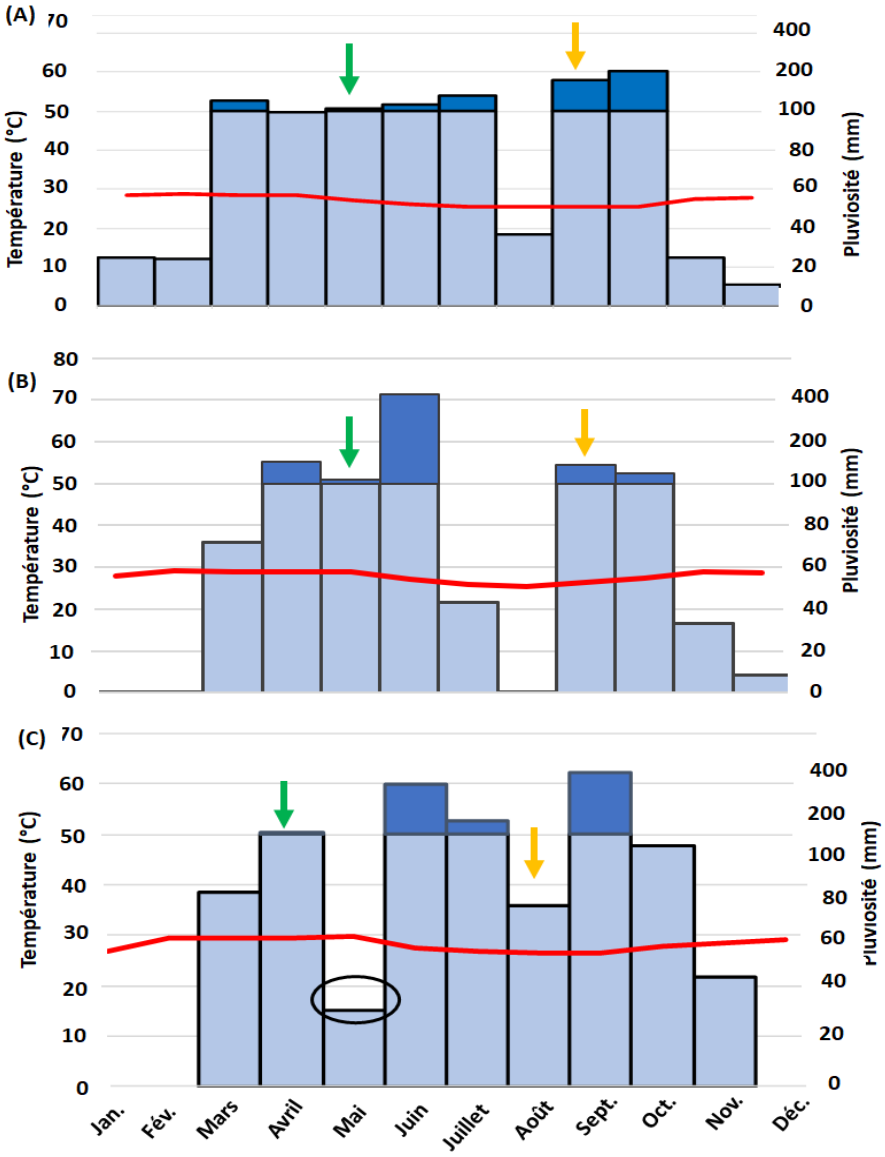


Figure 19 : Diagramme ombrothermique de la zone d'expérimentation (Massi, Zogbodomey : 6°56' -7°08' Nord, 1°58' - 2°24' Est). A, B et C sont les données climatiques des années 2019, 2020 et 2021 respectivement. L'encerclé noir indique un mois anormalement sec. Les flèches vertes et jaunes indiquent respectivement les dates de semis et les débuts de floraison. Les températures moyennes mensuelles sont représentées en rouge et les pluviosités mensuelles en bleu (bleu clair : pluviosité ≤100 mm et bleu foncé : pluviosité >100 mm). Source, ASECNA-Bénin.

3.2 Historique de la collection nationale des ignames cultivées du Bénin

L'un des objectifs principaux du CREEFIISDA était de faire une conservation ex-situ des grandes cultures à racines et tubercules dont les ignames et le manioc. En ce qui concerne les ignames, principalement quatre espèces sont concernées à savoir *Dioscorea alata*, *D. dumetorum D. cayenensis* et surtout *D. rotundata*. La collection d'ignames a été mise en place en 2018 suite à des études de prospection-collecte à travers les grandes zones de production (le Centre et le Nord-Bénin). Des tubercules de différents cultivars sont collectés par centaines chez plusieurs producteurs de différents villages. La collection compte plus de 100 cultivars différents de *D. rotundata* (à raison d'une centaine d'individus par cultivar), collectés à travers tout le pays. Pour le maintien de la collection, les tubercules sont semés en entier sur des butes en ligne (20 butes par ligne). Les individus d'un même cultivar sont regroupés dans un même bloc et étiquetés pour faciliter leur identification à la récolte. Le semis est généralement fait entre les mois de mars et de mai au rythme des premières pluies. Les récoltes sont faites en Décembre et les tubercules sont stockés dans un grenier à température ambiante pour une période de 3 à 4 mois. Le renouvellement de la culture se base sur le choix de tubercules sains parmi ceux qui sont stockés. Toutefois, de nouveaux cultivars sont rajoutés à la collection lorsqu'ils sont découverts au cours des prospections annuelles organisées par le CREFIISDA. Dans le but du maintien de la diversité, les tubercules ne sont pas morcelés et les clones qui sont issus d'une même plante sont éliminés au moment du semis contrairement aux pratiques paysannes décrites plus haut. A ce jour, la collection compte environ 120 cultivars de *D. rotundata*. Les autres espèces (*D. alata*, *D. dumetorum* et *D. cayenensis*) sont minoritaires avec moins de 50 cultivars.

Au terme de cette introduction, il ressort que les ignames cultivées sont d'une grande importance agronomique pouvant garantir la sécurité alimentaire dans les zones de production notamment ouest-africaines. Mais leur culture est confrontée à des problèmes phytosanitaires et climatiques qui entravent fortement le rendement dans les conditions où l'accès aux produits phytosanitaires et à l'eau est très limité pour les producteurs de ces régions (cas du Bénin). Si les méthodes conventionnelles se présentent comme une option pour parvenir à l'amélioration des ignames cultivées en Afrique, le manque d'informations sur leur système de reproduction de façon générale

et les problèmes d'instabilité du sexe en particulier peuvent constituer une limite à cette option. C'est pourquoi cette thèse s'est intéressée à l'étude du « **déterminisme du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* (Poir.) du Bénin** ».

4 Objectifs de thèse

L'objectif général de cette thèse est d'**approfondir les connaissances sur la biologie de la reproduction, principalement le contrôle du déterminisme sexuel des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* en vue de faciliter leur amélioration génétique.**

Notre hypothèse de travail est que le déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* est contrôlé génétiquement mais peut également être modifié par des paramètres internes tels que les hormones et les paramètres environnementaux.

Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons principalement sur les causes de la variation du sexe ainsi que son contrôle génétique et hormonal chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* du Bénin. Pour ce faire, cette thèse vise à répondre aux quatre questions de recherche suivantes :

Q1- Quelles sont la phénologie de la floraison et les causes de la variation du sexe chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* ?

Pour répondre à cette question, il s'agira dans un premier temps de faire l'état des lieux de la floraison et de l'expression du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* ; de suivre la morphogenèse florale (au niveau microscopique et macroscopique) pour déterminer le moment de la transition florale et surtout la formation éventuelle d'organes de sexes opposés (**chapitre 1**). Dans un second temps, il sera question d'examiner les éventuelles causes de la variation du sexe en partant de l'hypothèse que les types de tubercule-semence (sections tête, milieu et base) et leur profil hormonal ou encore le sexe parental pourraient influencer l'expression du sexe (**chapitre 3**).

Q2- Quel est le contrôle génétique du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

Il s'agira ici d'étudier le contrôle du déterminisme génétique du sexe notamment la possibilité de prédiction précoce du sexe par utilisation de marqueurs moléculaires actuellement disponibles ; évaluer la liaison de l'expression sexuelle à un ou plusieurs loci spécifiques et le système de détermination du sexe (ZZ/ZW femelle hétérogamétique ou XX/XY mâle hétérogamétique) chez l'espèce (**chapitre 2**).

Q3- Quel est le contrôle hormonal du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

Il s'agira ici d'évaluer l'impact des hormones végétales sur l'expression du sexe - c'est-à-dire leur capacité à induire une orientation sexuelle spécifique - ou à impacter l'intensité de la floraison (quantité d'inflorescences et de fleurs) ainsi que le temps de floraison (**chapitre 4**) ; le choix des hormones testées étant basé sur les résultats du profil hormonal des tubercules de sexes différents (**chapitre 3**).

Q4- Quelle est la performance de la reproduction sexuée chez les ignames cultivées *D. rotundata* et sa contribution à l'amélioration génétique de l'espèce ?

Enfin, il est question ici, d'une part de comparer la performance de la reproduction sexuée entre plantes monoïques et dioïques afin de voir dans quelle mesure les plantes monoïques peuvent compenser la rareté des pieds femelles dioïques ; d'autre part, d'évaluer la tolérance à la géitonogamie chez les plantes monoïques pour des fins d'amélioration génétique de l'espèce (**chapitre 5**).

Les liens entre les différents chapitres de thèse et les questions de recherche sont présentés par la figure 20 ci-dessous.

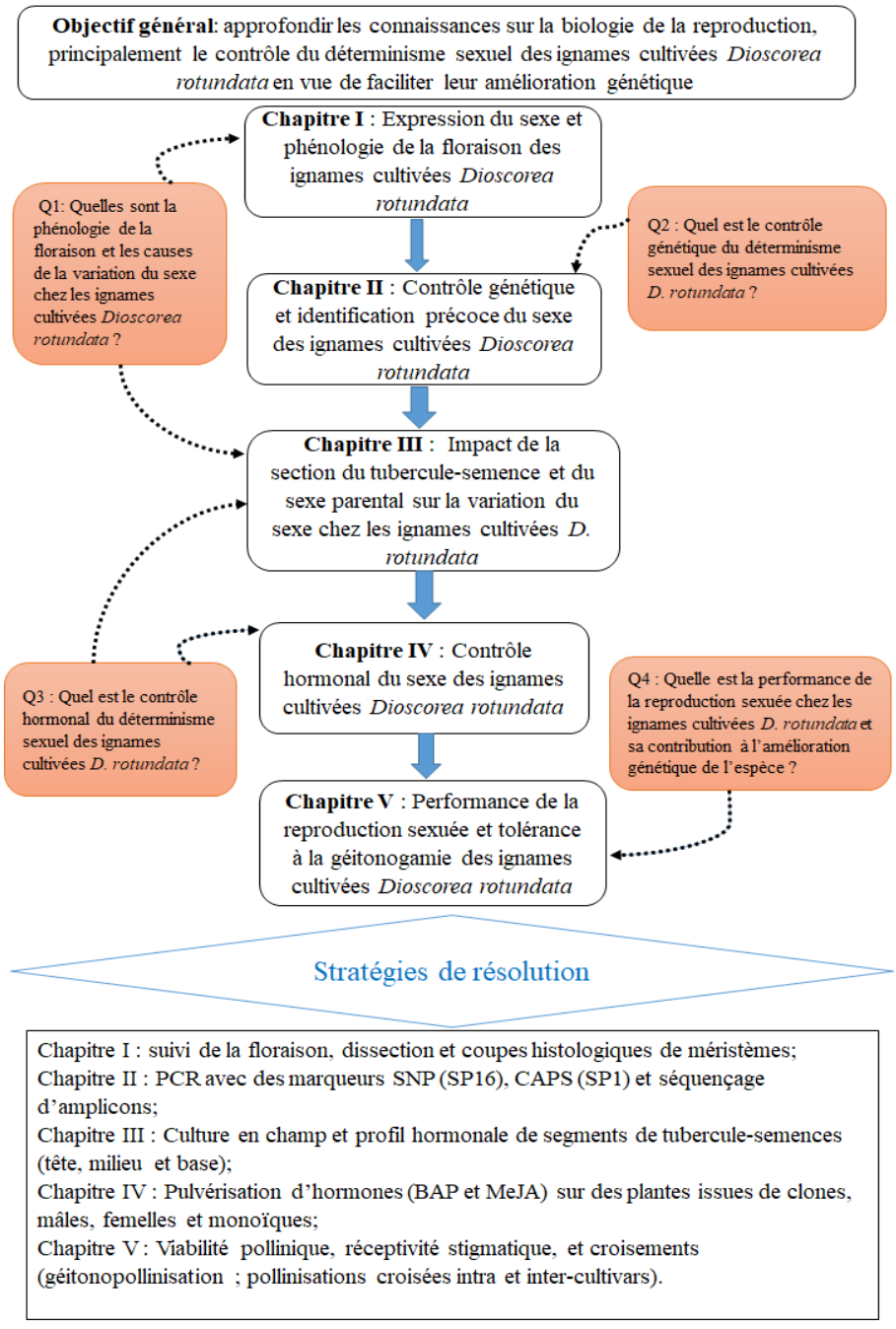


Figure 20 : Structure schématique montrant les interactions entre les chapitres de thèse (liaison établie par les flèches bleues) et les questions de recherche associées à chaque chapitre (liaison établie par les flèches noires) ainsi que les stratégies de résolution des différentes questions de recherche.

Références

Aboagye-Nuamah, F., Offei, S., Cornelius, E., and Bancroft, R. (2005). Severity of spoilage storage rots of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Annals of Applied Biology* **147**, 183-190.

Abraham, K. (1992). Dormancy and viability of *Dioscorea alata* seeds. *J. Root Crops* **18**, 142-143.

Abraham, K., and Gopinathan Nair, P. (1990). Floral biology and artificial pollination in *Dioscorea alata* L. *Euphytica* **48**, 45-51.

Abraham, K., and Gopinathan Nair, P. (1991). Polyploidy and sterility in relation to sex in *Dioscorea alata* L.(Dioscoreaceae). *Genetica* **83**, 93-97.

Abraham, K., and Nair, S. (1979). Anomalies in sex expression of *Dioscorea rotundata* Poir. *Journal of Root Crops* **5**, 19-24.

Adam, H., Collin, M., Richaud, F., Beulé, T., Cros, *D.*, Omoré, A., Nodichao, L., Nouy, B., and Tregear, J. W. (2011). Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. *Annals of botany* **108**, 1529-1537.

Adejumo, B., Okundare, R., Afolayan, O., and Balogun, S. (2013). Quality attributes of yam flour (Elubo) as affected by blanching water temperature and soaking time. *Int J Eng Sci* **2**, 216-221.

Adejumobi, I. I., Agre, P. A., Onautshu, *D.* O., Adheka, J. G., Bambanota, M. G., Monzenga, J.-C. L., Komoy, J. L., and Cipriano, I. M. (2022). Diversity, trait preferences, management and utilization of yams landraces (*Dioscorea* species): an orphan crop in DR Congo. *Scientific reports* **12**, 1-16.

Adeniji, M., Shoyinka, S., Ikotun, T., Asiedu, R., Hughes, J. A., and Odu, B. (2012). Yield loss in Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) due to infection by Yam mosaic virus (YMV) genus Potyvirus. *Ife Journal of Science* **14**, 237-244.

Adigoun-Akotegnon, F. A., Adoukonou-Sagbadja, H., Fadinan, C., Tchougourou, A., Agassounon-Tchibozo, M., and Ahanhanzo, C. (2019). Diversity, distribution and ethnobotanical importance of cultivated and wild African trifoliate yam [*Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax] in Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution* **66**, 659-683.

Afoha, E., Antoine, A., Estelle, L. Y. L., Clément, A., and Alexandre, *D.* (2019). Yam (*Dioscorea rotundata* Poir. and *D. cayenensis* Lam complex) in the traditional agriculture of benin: present-day cultivar diversity and farmers' perception on their tolerance to tuber dry rot caused by the nematode Scutellonema bradys. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **8**, 1119-1138.

Agbangla, C., Ahanhanzo, C., Tostain, S., Dansi, A., and Daïnou, O. (2002). Evaluation de la diversité génétique par RAPD d'un échantillon de *Dioscorea alata* d'un region du Bénin, la Sous-préfecture de Savè.

Journal de la Recherche Scientifique de l'Universite de Lome **6**, 167-172.

Agre, P., Nwachukwu, C., Olasanmi, B., Obidiegwu, J., Nwachukwu, E., Adebola, P., De Koeyer, *D.*, and Asrat, A. (2020). Sample preservation and plant sex prediction in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Agre, P. A., Dassou, A. G., Loko, L. E., Idossou, R., Dadonougbo, E., Gbaguidi, A., Mondo, J. M., Muyideen, Y., Adebola, P. O., and Asiedu, R. (2021). Diversity of white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivars from Benin as revealed by agro-morphological traits and SNP markers. *Plant Genetic Resources* **19**, 437-446.

Ainsworth, C. (2000). Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* **86**, 211-221.

Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Thangavelu, M., and Parker, J. (1995). Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *The Plant Cell* **7**, 1583-1598.

Ainsworth, C., Parker, J., and Buchanan-Wollaston, V. (1998). Sex determination in plants. *Curr Top Dev Biol* **38**, 167-223.

Aiyeloja, A., and OA, B. (2006). Ethnobotanical potentials of common herbs in Nigeria: A case study of Enugu state. *Educational Research and Reviews* **1**, 16-22.

Akagi, T., Henry, I. M., Tao, R., and Comai, L. (2014). A Y-chromosome–encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* **346**, 646-650.

Akagi, T., Pilkington, S. M., Varkonyi-Gasic, E., Henry, I. M., Sugano, S. S., Sonoda, M., Firl, A., McNeilage, M. A., Douglas, M. J., Wang, T., Rebstock, R., Voogd, C., Datson, P., Allan, A. C., Beppu, K., Kataoka, I., and Tao, R. (2019). Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nature Plants* **5**, 801-809.

Akakpo, R., Scarcelli, N., Dansi, A., Djedatin, G., Thuillet, A.-C., Rhone, B., François, O., Alix, K., and Vigouroux, Y. (2017). Molecular basis of African yam domestication: analyses of selection point to root development, starch biosynthesis, and photosynthesis related genes. *BMC genomics* **18**, 1-9.

Akanbi, W., Adebooye, C., Togun, A., Ogunrinde, J., and Adeyeye, S. (2007). Growth, herbage and seed yield and quality of *Telfairia occidentalis* as influenced by cassava peel compost and mineral fertilizer. *World Journal of Agricultural Sciences* **3**, 508-516.

Akoroda, M. (1983a). Floral biology in relation to hand pollination of white yam. *Euphytica* **32**, 831-838.

Akoroda, M. (1983b). Long-term storage of yam pollen. *Scientia horticulturae* **20**, 225-230.

Akoroda, M. (1985). Pollination management for controlled hybridization of white yam. *Scientia horticulturae* **25**, 201-209.

Akoroda, M., and Chedda, H. (1983). Agro-botanical and species relationships of Guinea yams [Dioscorea]. *Tropical Agriculture (Trinidad and Tobago)*.

Akoroda, M., Wilson, J., and Chheda, H. (1981). Artificial pollination, pollen viability, and storage in white yam. *In* "Tropical root crops: research strategies for the 1980s: proceedings of the First Triennial Root Crops Symposium of the International Society for Tropical Root Crops-Africa Branch, 8-12 Sept. 1980, Ibadan, Nigeria". IDRC, Ottawa, ON, CA.

Alexander, L. W. (2019). Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids. *Scientia Horticulturae* **246**, 244-250.

Allen, A., and Hiscock, S. (2008). Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. *In* "Self-incompatibility in flowering plants", pp. 73-101. Springer.

Araújo, L. *D.* A. d., Quirino, Z. G. M., and Machado, I. C. (2011). Fenologia reprodutiva, biologia floral e polinização de *Allamanda blanchetii*, uma *Apocynaceae endêmica* da Caatinga. *Brazilian Journal of Botany* **34**, 211-222.

Arnau, G., Bhattacharjee, R., Mn, S., Chair, H., Malapa, R., Lebot, V., Perrier, X., Petro, *D.*, Penet, L., and Pavis, C. (2017). Understanding the genetic diversity and population structure of yam (*Dioscorea alata* L.) using microsatellite markers. *PLoS One* **12**, e0174150.

Arnau, G., Némorin, A., Maledon, E., and Abraham, K. (2009). Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L.(Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1239-1249.

Aryal, R., and Ming, R. (2014). Sex determination in flowering plants: papaya as a model system. *Plant Science* **217**, 56-62.

Asfaw, A., Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., and Akoroda, M. O. (2022). Association mapping of plant sex and cross-compatibility related traits in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) clones. *BMC Plant Biology* **22**, 294.

Assaba, E., Mounirou, Y., Saliou, B., Adonis, B., Djakaridja, T., and Jeanne, Z. (2021). Adaptation of plants derived from cultivated yam of *Dioscorea cayenensis–D. rotundata* complex species seeds germination in two agroecological zones of Benin. *World Journal of Advanced Research and Reviews* **9**, 027-041.

Assaba, E. I., Yolou, M., Denadi, N., Ida, A., and Jeanne, Z. (2020). Variability of pollen grains in clones of *Dioscorea cayenensis - D. rotundata* complex grown in centre of Benin. *International Journal of Biosciences* **16**, 223-231.

Assaba, E. I., Yolou, M., Totin Vodounon, H., Quenum, G. A., and Zoundjihekpon, J. (2018). Caractéristiques des graines d'ignames cultivées du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis—Dioscorea rotundata* et évolution du taux de germination des graines. *Afr. Sci* **14**, 195-208.

Ayensu, E. S. (1972). "Anathomy of the monocotyledons: Dioscoreales. VI," Clarendon Press.

Ayisah, K. *D.*, and Gumedzoe, Y. M. *D.* (2012). Genetic diversity among yam mosaic virus (YMV) isolates infecting yam of the complex *Dioscorea cayenensis rotundata* in Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **6**, 1090-1101.

Baco, M. (2007). Gestion locale de la diversité cultivée au Nord Bénin: éléments pour une politique publique de conservation de l'agrobiodiversité de l'igname (*Dioscorea spp*). Thèse de doctorat soutenue le 14 décembre 2007. Université d'Orléans. 406pp

Baco, M., Tostain, S., Mongbo, R., Dainou, O., and Agbangla, C. (2004). Gestion dynamique de la diversite varietale des ignames cultivees (*Dioscorea cayenensis*-D, *rotundata*) dans la commune de Sinende au nord Benin. *Plant Genetic Resources* **139**, 18-24.

Baco, M. (2000). La domestication des ignames sauvages dans la sous-préfecture de Sinendé: savoirs locaux et pratiques endogènes d'amélioration génétique de *Dioscorea Abyssinica* Hochst, Thèse d'ingénieur, Université Nationale du Bénin, Fac. Sc. Agronomie.

Bai, Q., Zhu, C., Lei, X., Cao, T., Su, S., and Leng, P. (2019). Sex determination during inflorescence bud differentiation in monoecious *Pistacia chinensis* Bunge. *Forests* **10**, 202.

Baimey, H., Coyne, *D.*, and Labuschagne, N. (2009). Pathogenicity of Scutellonema bradys populations from different geographical areas in Benin on yam (*Dioscorea spp*.). *Crop Protection* **28**, 715-721.

Bakayoko, Y., Kouakou, A. M., Kouassi, A. B., Gomez, R. M., Dibi, K. E., Essis, B. S., N'Zué, B., Adebola, P., N'Guetta, A. S. P., and Umber, M. (2021). Detection and diversity of viruses infecting African yam (*Dioscorea rotundata*) in a collection and F1 progenies in Côte d'Ivoire shed light to plant-to-plant viral transmission. *Plant pathology* **70**, 1486-1495.

Barrett, S. C. (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 99-109.

Barrett, S. C., Jesson, L. K., and Baker, A. M. (2000). The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* **85**, 253-265.

Bertin, R. I. (1982). The Ecology of Sex Expression in Red Buckeye. *Ecology* **63**, 445-456.

Bhat, B., and Bindroo, B. (1980). Sex chromosomes in *Dioscorea deltoidea* wall. *Cytologia* **45**, 739-742.

Bhattacharjee, R., Agre, P., Bauchet, G., De Koeyer, *D.*, Lopez-Montes, A., Kumar, P. L., Abberton, M., Adebola, P., Asfaw, A., and Asiedu, R. (2020). Genotyping-by-sequencing to unlock genetic diversity and population structure in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Agronomy* **10**, 1437.

Bittencourt Júnior, N. S. (2017). Evidence for post-zygotic self-incompatibility in *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae). *Plant Reproduction* **30**, 69-79.

Borges, L. A., Sobrinho, M. S., and Lopes, A. V. (2009). Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam.(Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **204**, 111-130.

Boualem, A., Fergany, M., Fernandez, R., Troadec, C., Martin, A., Morin, H., Sari, M.-A., Collin, F., Flowers, J. M., and Pitrat, M. (2008). A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons. *Science* **321**, 836-838.

Boualem, A., Troadec, C., Camps, C., Lemhemdi, A., Morin, H., Sari, M.-A., Fraenkel-Zagouri, R., Kovalski, I., Dogimont, C., and Perl-Treves, R. (2015). A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges. *Science* **350**, 688-691.

Brantley, B. B., and Warren, G. F. (1960). Sex Expression and Growth in Muskmelon. *Plant physiology* **35**, 741-745.

Bräutigam, K., Soolanayakanahally, R., Champigny, M., Mansfield, S., Douglas, C., Campbell, M. M., and Cronk, Q. (2017). Sexual epigenetics: gender-specific methylation of a gene in the sex determining region of *Populus balsamifera*. *Scientific Reports* **7**, 45388.

Brice, *D.* K. E., Michel, K. A., Brahima, C., Boni, N. z., and Pierre, Z. G. (2016). Inventaire des méthodes de production de semenceaux d'igname (*Dioscorea spp*): une revue de la littérature. *Journal of Animal &Plant Sciences* **29**, 4496-4514.

Burkill, I. H. (1939). Notes on the genus *Dioscorea* in the Belgian Congo. *Bulletin du Jardin botanique de l'Etat, Bruxelles/Bulletin van den Rijksplantentuin, Brussel*, 345-392.

Burkill, L. (1921). The correct botanical names for white and yellow Guinea yams. *Gdn's Bull. Straits Settl* **12**, 438-441.

Canuto, J., Alves-Pereira, A., and Côrtes, M. (2014). Genética nos estudos com polinização. *Biologia da polinização. Rio de Janeiro, Projeto cultural*, 439-460.

Caporali, E., Carboni, A., Galli, M. G., Rossi, G., Spada, A., and Marziani Longo, G. P. (1994). Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. *Sexual Plant Reproduction* **7**, 239-249.

Cardoso, J. C. F., Viana, M. L., Matias, R., Furtado, M. T., Caetano, A. P. d. S., Consolaro, H., and Brito, V. L. G. d. (2018). Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* **32**, 329-348.

Carey, S., Yu, Q., and Harkess, A. (2021). The diversity of plant sex chromosomes highlighted through advances in genome sequencing. *Genes* **12**, 381.

Carey, S. B., Jenkins, J., Lovell, J. T., Maumus, F., Sreedasyam, A., Payton, A. C., Shu, S., Tiley, G. P., Fernandez-Pozo, N., and Barry, K. (2020). The *Ceratodon purpureus* genome uncovers structurally complex, gene rich sex chromosomes. *bioRxiv*. Prepr Serv Biol.

Carré, A. (2021). Caractérisation génomique et transcriptomique du sexe et du système d'auto-incompatibilité diallélique chez l'espèce androdioïque *Phillyrea angustifolia*, Université de Lille.

Chailakhyan, M. K., and Khryanin, V. N. (1978). Effect of growth regulators and role of roots in sex expression in spinach. *Planta* **142**, 207-210.

Chaïr, H., Perrier, X., Agbangla, C., Marchand, J., Dainou, O., and Noyer, J. (2005). Use of cpSSRs for the characterisation of yam phylogeny in Benin. *Genome* **48**, 674-684.

Chaïr, H., Sardos, J., Supply, A., Mournet, P., Malapa, R., and Lebot, V. (2016). Plastid phylogenetics of Oceania yams (*Dioscorea spp*., Dioscoreaceae) reveals natural interspecific hybridization of the greater yam (*D. alata*). *Botanical Journal of the Linnean Society* **180**, 319-333.

Champagne, A., Bernillon, S., Moing, A., Rolin, *D.*, Legendre, L., and Lebot, V. (2010). Carotenoid profiling of tropical root crop chemotypes from Vanuatu, South Pacific. *Journal of food composition and analysis* **23**, 763-771.

Charlesworth, *D.* (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* **88**, 94-101.

Charlesworth, *D.* (2022). Some thoughts about the words we use for thinking about sex chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **377**, 20210314.

Chen, F., Yuan, W., Shi, X., and Ye, Y. (2013). Evaluation of pollen viability, stigma receptivity and fertilization success in *Lagerstroemia indica* L. *African Journal of Biotechnology* **12**, 6460-6467.

Chevalier, A. (1936). "Contribution à l'étude de quelques espèces africaines du genre *Dioscorea*." Bulletin du Muséum, **8**, 520-551.

Çınar, Ç., Wesseldijk, L., Karinen, A., Jern, P., and Tybur, J. M. (2022). Sex differences in the genetic and environmental underpinnings of meat and plant preferences. *Food Quality and Preference* **98**, 104421.

Coen, E. S., and Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.

Colas, F., and Mercier, S. (2000). Évaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres. *Mémoire de recherche forestière*.

Cormier, F., Lawac, F., Maledon, E., Gravillon, M.-C., Nudol, E., Mournet, P., Vignes, H., and Arnau, G. (2019). A reference high-density genetic map of greater yam (*Dioscorea alata* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **132**, 1733-1744.

Coursey, *D.* (1975). The origins and domestication of yams in Africa. *Gastronomy: the anthropology of food and food habits***.** *World Anthropology Paris*, 187-212.

Coursey, *D.* (1976). Yams: *Dioscorea spp*.(Dioscoreaceae). in *Evolution of Crop Plants.* Edited by N. W. Simmonds. London : Longman. 70-74

Coursey, *D.* G. (1967). Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. Longmans, London. pp. 244.

Couto, R. S., and Cornejo, X. (2022). *Dioscorea magnibracteata* (Dioscoreaceae), a new species from western Ecuador based on the unpublished work of Temple Clayton. *Phytotaxa* **542**, 293–299.

Couto, R. S., Martins, A. C., Bolson, M., Lopes, R. C., Smidt, E. C., and Braga, J. M. A. (2018). Time calibrated tree of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) indicates four origins of yams in the Neotropics since the Eocene. *Botanical Journal of the Linnean Society* **188**, 144-160.

Dafni, A., and Firmage, *D.* (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Pollen and pollination*, 113-132.

Dafni, A., and Maués, M. M. (1998). A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual plant reproduction* **11**, 177-180.

Daïnou, O., Agbangla, C., Berthaud, J., and Tostain, S. (2002). Le nombre chromosomique de base des espèces de *Dioscorea* constituant la section Enantiophyllum pourrait être égal à x= 20. Quelques preuves. *In* "Annales des Sciences Agronomiques du Bénin", Vol. 3, pp. 21-43.

Daniel, I., Ng, N., Tayo, T., and Togun, A. (2002). Wet–cold preservation of West African yam (*Dioscorea spp*.) pollen. *The Journal of Agricultural Science* **138**, 57-62.

Dansi, A. (2001). Collecte et caractérisation des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* du Bénin. *These de Doctorat (These unique) en Sciences naturelles*.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihékpon, J., Sangare, A., Ahoussou, N., and Asiedu, R. (2000). Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis*/*Dioscorea rotundata* complex) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution* **47**, 619-625.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Dansi, A., Zoundjihekpon, J., Mignouna, H., and Quin, F. (1997). Collecte des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* au Bénin. Plant Gen. Res. Newsletter 112:81–85.

Darkwa, K., Agre, P., Olasanmi, B., Iseki, K., Matsumoto, R., Powell, A., Bauchet, G., De Koeyer, *D.*, Muranaka, S., and Adebola, P. (2020a). Comparative assessment of genetic diversity matrices and clustering methods in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata*) based on morphological and molecular markers. *Scientific reports* **10**, 1-14.

Darkwa, K., Olasanmi, B., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020b). Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp*.) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

Daugey, F. (2015). "Les plantes ont-elles un sexe?: histoire d'une découverte," Ulmer.

de Jong, A. W., and Bruinsma, J. (1974). Pistil development in Cleome flowers IV. Effects of growth-regulating substances on female abortion in *Cleome spinosa* Jacq. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **73**, 152-159.

De Nettancourt, *D.* (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 185-199.

De Nettancourt, *D.* (2001). "Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants," Springer Science & Business Media, Berlin. pp.322

Degras, L. (1993). "The yam: a tropical root crop," Macmillan Press Ltd.

Dellaporta, S. L., and Calderon-Urrea, A. (1993). Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* **5**, 1241-1251.

Den Nijs, A. P. M., and Visser, *D.* L. (1980). Induction of male flowering in gynoecious cucumbers (*Cucumis sativus* L.) by silver ions. *Euphytica* **29**, 273-280.

Denadi, N., Yolou, M., Dadonougbo, A. E., Zoundjihékpon, J., Dansi, A., Gandonou, C., and Quinet, M. (2022). Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Displays Prezygotic and Postzygotic Barriers to Prevent Autogamy in Monoecious Cultivars. *Agronomy* **12**, 872.

Devani, R. S., Sinha, S., Banerjee, J., Sinha, R. K., Bendahmane, A., and Banerjee, A. K. (2017). De novo transcriptome assembly from flower buds of dioecious, gynomonoecious and chemically masculinized female Coccinia grandis reveals genes associated with sex expression and modification. *BMC plant biology* **17**, 1-15.

Diggle, P. K., Di Stilio, V. S., Gschwend, A. R., Golenberg, E. M., Moore, R. C., Russell, J. R., and Sinclair, J. P. (2011). Multiple

developmental processes underlie sex differentiation in angiosperms. *Trends in Genetics* **27**, 368-376.

Doku, E. (1985). Sex expression and tuber yields of seedlings and clones derived from seedling tubers of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Legon Agricultural Research Bulletin* **1**, 13-17.

dos Santos Ferreira, M., Soares, T. L., Costa, E. M. R., da Silva, R. L., de Jesus, O. N., Junghans, T. G., and Souza, F. V. *D.* (2021). Optimization of culture medium for the in vitro germination and histochemical analysis of *Passiflora spp*. pollen grains. *Scientia Horticulturae* **288**, 110298.

Doust, J. L., and Cavers, P. B. (1982). Sex and Gender Dynamics in Jack-in-the-Pulpit, *Arisaema Triphyllum* (Araceae). *Ecology* **63**, 797-808.

Dumont, R. (1977). Etude morpho-botanique des ignames (*Dioscorea* rotundata et *Dioscorea cayenensis*) cultivees au Nord-benin.

Dumont, R., and Vernier, P. (2000). Domestication of yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) within the Bariba ethnic group in Benin. *Outlook on Agriculture* **29**, 137-142.

Dumont, R., Zoundjihekpon, J., and Vernier, P. (2010). Origine et diversité des ignames *Dioscorea rotundata* Poir. *Cahiers Agricultures* **19**, 255-261 (1).

Dupl'akova, N., Dobrev, P. I., Reňák, *D.*, and Honys, *D.* (2016). Rapid separation of *Arabidopsis* male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient. *Nature protocols* **11**, 1817-1832.

Dutta, B. (2015). Food and medicinal values of certain species of *Dioscorea* with special reference to Assam. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **3**.

Eckert, C. G. (2000). Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology* **81**, 532-542.

Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., Smith, R. *D.*, Teresi, S. J., Nelson, A. *D.*, and Wai, C. M. (2019). Origin and evolution of the octoploid *strawberry* genome. *Nature genetics* **51**, 541-547.

Etchiha Afoha, S. A. P., Affokpon, A., Waeyenberge, L., de Sutter, N., Agbangla, C., Dansi, A., Coyne, *D.* L., and Viaene, N. (2018). Molecular diversity of Scutellonemabradys populations from Benin, based on ITS1 rDNA and COImtDNA. *Tropical Plant Pathology* **43**, 323-332.

FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available on line: http://www.fao.org/faostat/en/data/QL (Accessed on 24th April 2022).

Ferrer, M. M., and Good, S. V. (2012). Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates. *Annals of Botany* **110**, 535-553.

Franklin-Tong, N. V., and Franklin, F. C. H. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in plant science* **8**, 598-605.

Fu, L., Wang, Q., Zhang, M., Zheng, Y., Wu, M., Lan, Z., Pu, J., Zhang, H., Chen, F., and Su, W. (2020). Electrochemical sex determination of dioecious plants using polydopamine-functionalized graphene sheets. *Frontiers in Chemistry* **8**, 92.

Fujii, S., Kubo, K.-i., and Takayama, S. (2016). Non-self-and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nature Plants* **2**, 1-9.

Galen, C., and Plowright, R. (1987). Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Canadian Journal of Botany* **65**, 107-111.

Galli, M. G., Bracale, M., Falavigna, A., Raffaldi, F., Savini, C., and Vigo, A. (1993). Different kinds of male flowers in the dioecious plant Asparagus of officinalis L. *Sexual Plant Reproduction* **6**, 16-21.

Gamiette, F., Bakry, F., and Ano, G. (1999). Ploidy determination of some yam species (*Dioscorea spp*.) by flow cytometry and conventional chromosomes counting. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 19-27.

Ganders, F. R. (1976). Pollen flow in distylous populations of Amsinckia (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany* **54**, 2530-2535.

Ganders, F. R. (1979). The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**, 607-635.

Garraud, C. (2011). Evolution de la gynodioécie-gynomonoécie: approches expérimentales chez Silene nutans & approche théorique. Thèse de doctorat. Paris 11, France.

Gaude, T., Glémin, S., Cabrillac, *D.*, and Mignot, A. (2001). L'auto-incompatibilité chez les plantes à fleurs. Med. Sci. (Paris) **17**, 6–7

Gerashchenkov, G., and Rozhnova, N. (2013). The involvement of phytohormones in the plant sex regulation. *Russian journal of plant physiology* **60**, 597-610.

Gibbs, P. E. (1986). Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* **154**, 285-323.

Gibbs, P. E. (1988). Self-incompatibility mechanism in flowering plants: some complications and clarification. *Lagascalia, 15, 17-28.*

Gibbs, P. E. (2014). Late-acting self-incompatibility–the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist* **203**, 717-734.

Girma, G., Gedil, M., and Spillane, C. (2017). Morphological, SSR and ploidy analysis of water yam (*Dioscorea alata* L.) accessions for utilization of aerial tubers as planting materials. *Genetic resources and crop evolution* **64**, 291-305.

Girma, G., Hyma, K. E., Asiedu, R., Mitchell, S. E., Gedil, M., and Spillane, C. (2014). Next-generation sequencing based genotyping, cytometry

and phenotyping for understanding diversity and evolution of guinea yams. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1783-1794.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Glover, B. J. (2014). "Understanding flowers and flowering: an integrated approach," Oxford University Press.

Golenberg, E. M., and West, N. W. (2013). Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American journal of botany* **100**, 1022-1037.

Goodwillie, C., and Weber, J. J. (2018). The best of both worlds? A review of delayed selfing in flowering plants. *American Journal of Botany* **105**, 641-655.

Gouyon, P.-H. (2009). "Aux origines de la sexualité," Fayard.

Govaerts, R., Wilkin, P., and Saunders, R. M. (2007). "World Checklist of Dioscorales: Yams and their allies," Royal Botanic Gardens Kew., UK, London.

Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Siroky, J., Pan, W. H., Macas, J., and Saedler, H. (1994). Genetics of sex determination in flowering plants. *Developmental Genetics* **15**, 214-230.

Graves, J. A. M. (2013). How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Developmental Dynamics* **242**, 354-359.

Gregg, K. B. (1973). Studies On The Control Of Sex Expression In The Genera Cycnoches And Catasetum, Subtribe Catasetinae, Orchidaceae, University of Miami.

Gregg, K. B. (1975). The effect of light intensity on sex expression in species of *Cycnoches* and *Catasetum* (orchidaceae). *Selbyana* **1**, 101-113.

Güçlü, S. F., Öncü, Z., and Koyuncu, F. (2020). Pollen performance modelling with an artificial neural network on commercial stone fruit cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **61**, 61-67.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Hamon, P., Brizard, J.-P., Zoundjihékpon, J., Duperray, C., and Borgel, A. (1992). Etude des index d'ADN de huit espèces d'ignames (*Dioscorea* sp.) par cytométrie en flux. *Canadian journal of botany* **70**, 996-1000.

Hao, Q., Xu, L., Wang, H., Liu, Q., and Wang, K. (2022). Evaluation of pollen viability, stigma receptivity, and the cross barrier between tropical and hardy water lily cultivars. *Flora* **290**, 152046.

Harkess, A., Huang, K., van der Hulst, R., Tissen, B., Caplan, J. L., Koppula, A., Batish, M., Meyers, B. C., and Leebens-Mack, J. (2020). Sex Determination by Two Y-Linked Genes in Garden Asparagus[OPEN]. *The Plant Cell* **32**, 1790-1796.

Heikrujam, M., Sharma, K., Prasad, M., and Agrawal, V. (2015). Review on different mechanisms of sex determination and sex-linked molecular markers in dioecious crops: a current update. *Euphytica* **201**, 161-194.

Hinata, K., Watanabe, M., Toriyama, K., and Isogai, A. (1993). A review of recent studies on homomorphic self-incompatibility. *International review of cytology* **143**, 257-296.

Hiscock, S. J., and Kües, U. (1999). Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *International review of cytology* **193**, 165-295.

Hiscock, S. J., and Tabah, *D.* A. (2003). The different mechanisms of sporophytic self–incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **358**, 1037-1045.

Hobza, R., Hudzieczek, V., Kubat, Z., Cegan, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E., and Janousek, B. (2018). Sex and the flower - developmental aspects of sex chromosome evolution. *Ann Bot* **122**, 1085-1101.

Holsinger, K. E. (2000). Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 7037-7042.

Hormaza, J., and Polito, V. (1996). Pistillate and staminate flower development in dioecious *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* **83**, 759-766.

Ignatius, N. A., Rachid, H., Pierre, N. S., and Achiangia, P. N. (2019). Yam (*Dioscorea spp*.) production trends in Cameroon: A review. *African Journal of Agricultural Research* **14**, 1097-1110.

Ile, E., Craufurd, P., Battey, N., and Asiedu, R. (2006). Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *Annals of Botany* **97**, 497-504.

Impe, *D.*, Reitz, J., Köpnick, C., Rolletschek, H., Börner, A., Senula, A., and Nagel, M. (2020). Assessment of pollen viability for wheat. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1588.

Iseki, K., and Matsumoto, R. (2020). Effect of seed sett size on sprouting, shoot growth, and tuber yield of white guinea yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Production Science* **23**, 75-80.

Iyagba, A. (2010). A review on root and tuber crop production and their weed management among small scale farmers in Nigeria. *Journal of Agricultural and Biological Science* **5**, 52-58.

Jayaprakash, P., Annapoorani, S., Vikas, V., Sivasamy, M., Kumar, J., Saravannan, K., Punniakotti, E., and Sheeba, *D.* (2015). An improved in vitro germination medium for recalcitrant bread wheat

(Triticum aestivum L.) pollen. *Indian J. Genet. Plant Breed* **75**, 446-452.

Jennings, *D.* (2009). Tropical Root and Tuber Crops. Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids. By V. Lebot. Wallingford, UK: CABI (2009), pp. 413,£ 37.50. ISBN 978-1-84593-424-8. *Experimental Agriculture* **45**, 382-382.

Joseph, K. K., Elias, N. K. S., and Benjamin, K. B. (2020). Morphological and molecular characterisation of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) isolates obtained from *Dioscorea rotundata* (Poir.). *African Journal of Biotechnology* **19**, 231-239.

Käfer, J., Marais, G. A., and Pannell, J. R. (2017). On the rarity of dioecy in flowering plants. *Molecular Ecology* **26**, 1225-1241.

Kedra, M. O., Kassahun, T., and Teklehaimanot, H. (2019). Genetic diversity assessment of yams (*Dioscorea spp*.) from Ethiopia using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* **18**, 970-977.

Khadka, J., Yadav, N. S., Guy, M., Grafi, G., and Golan-Goldhirsh, A. (2019). Epigenetic aspects of floral homeotic genes in relation to sexual dimorphism in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Journal of experimental botany* **70**, 6245-6259.

Korada, R. R., Naskar, S., and Edison, S. (2010). Insect pests and their management in yam production and storage: a world review. *International Journal of Pest Management* **56**, 337-349.

Kordylas, J. (1990). Traditional and industrial processing of tubers. *Processing and preservation of tropical and subtropical foods. Macmillian Education Ltd. London*, 34-48.

Kumar, S., Das, G., Shin, H.-S., and Patra, J. K. (2017). *Dioscorea spp*. (A Wild Edible Tuber): A Study on Its Ethnopharmacological Potential and Traditional Use by the Local People of Similipal Biosphere Reserve, India. *Frontiers in Pharmacology* **8**.

Law, T. F., Lebel-Hardenack, S., and Grant, S. R. (2002). Silver enhances stamen development in female white campion (Silene latifolia [Caryophyllaceae]). *American Journal of Botany* **89**, 1014-1020.

Leite Montalvão, A. P., Kersten, B., Fladung, M., and Müller, N. A. (2021). The diversity and dynamics of sex determination in dioecious plants. *Frontiers in Plant Science*, 2280.

Lev, L., and Shriver, A. (1998). A trend analysis of yam production, area, yield, and trade (1961-1996). *Colloques-CIRAD*, 11-20.

Li, J., and Newbigin, E. (2018). Self-Incompatibility in Flowering Plants: The Ribonuclease-Based Systems. *Annual Plant Reviews online*, 271-293.

Lin, H., Liao, Z., Zhang, L., and Yu, Q. (2016). Transcriptome analysis of the male-to-hermaphrodite sex reversal induced by low temperature in papaya. *Tree Genetics & Genomes* **12**, 94.

Loko, Y., Dansi, A., Agre, A., Akpa, N., Dossou-Aminon, I., Assogba, P., Dansi, M., Akpagana, K., and Sanni, A. (2013). Perceptions paysannes et impacts des changements climatiques sur la production et la diversité variétale de l'igname dans la zone aride du nord-ouest du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **7**, 672-695.

Loko, Y. L., Bhattacharjee, R., Agre, A. P., Dossou-Aminon, I., Orobiyi, A., Djedatin, G. L., and Dansi, A. (2017). Genetic diversity and relationship of Guinea yam (*Dioscorea cayenensis* Lam.–*D. rotundata* Poir. complex) germplasm in Benin (West Africa) using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **64**, 1205-1219.

López Montes, A. J., Bhattacharjee, R., and Girma Tessema, G. (2012). Yam breeding at IITA: achievements, challenges, and prospects.

Luo, G.-F., Podolyan, A., Kidanemariam, *D.* B., Pilotti, C., Houliston, G., and Sukal, A. C. (2022). A Review of Viruses Infecting Yam (*Dioscorea spp*.). *Viruses* **14**, 662.

Luo, S., Zhang, K., Zhong, W.-P., Chen, P., Fan, X.-M., and Yuan, *D.*-Y. (2020). Optimization of in vitro pollen germination and pollen viability tests for *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*. *Scientia Horticulturae* **271**, 109481.

Ma, Q., Chen, C., Zeng, Z., Zou, Z., Li, H., Zhou, Q., Chen, X., Sun, K., and Li, X. (2018). Transcriptomic analysis between self-and cross-pollinated pistils of tea plants (*Camellia sinensis*). *BMC genomics* **19**, 1-12.

Mable, B., Schierup, M., and Charlesworth, *D.* (2003). Estimating the number, frequency, and dominance of S-alleles in a natural population of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae) with sporophytic control of self-incompatibility. *Heredity* **90**, 422-431.

Magwé-Tindo, J., Wieringa, J. J., Sonké, B., Zapfack, L., Vigouroux, Y., Couvreur, T. L. P., and Scarcelli, N. (2018). Guinea yam (*Dioscorea spp*., Dioscoreaceae) wild relatives identified using whole plastome phylogenetic analyses. *TAXON* **67**, 905-915.

Malapa, R., Arnau, G., Noyer, J.-L., and Lebot, V. (2005). Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. and *D. transversa* Br. as revealed with AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **52**, 919-929.

Maneenoon, K., Sirirugsa, P., and Sridith, K. (2008). Ethnobotany of *Dioscorea* L.(Dioscoreaceae), a major food plant of the Sakai tribe at Banthad Range, Peninsular Thailand. *Ethnobotany Research and Applications* **6**, 385-394.

Mani, M., Kalyanasundaram, M., Jayaprakas, C., Harish, E., Sreerag, R., and Nedunchezhiyan, M. (2016). Tuber Crops. *In* "Mealybugs and their Management in Agricultural and Horticultural crops", pp. 471-494. Springer.

Manzanares, C., Barth, S., Thorogood, *D.*, Byrne, S. L., Yates, S., Czaban, A., Asp, T., Yang, B., and Studer, B. (2016). A gene encoding a DUF247 domain protein cosegregates with the S self-incompatibility locus in perennial ryegrass. *Molecular biology and evolution* **33**, 870-884.

Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C., and Bendahmane, A. (2009). A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461**, 1135-1138.

Martin, F., Cabanillas, E., and Ortiz, S. (1963). Natural pollination, hand pollination and crossability of some Mexican species of Dioscorea. *Tropical Agriculture* **40**.

Martin, F. W., and Ortiz, S. (1966). New chromosome numbers in some *Dioscorea* species. *Cytologia* **31**, 105-107.

Mathurin, P., and Degras, L. (1975). Effets des modalités de division des tubercules de semences sur la germination et la production des ignames (*D. alata*, *D.* trifida). *Nouvelles Agronomiques des Antilles et de la Guyane* **1**, 139-152.

Matsunaga, S., and Kawano, S. (2001). Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biology* **3**, 481-488.

Mbiantcha, M., Kamanyi, A., Teponno, R., Tapondjou, A., Watcho, P., and Nguelefack, T. (2010). Analgesic and anti-inflammatory properties of extracts from the bulbils of *Dioscorea* bulbifera L. var sativa (Dioscoreaceae) in mice and rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**.

McCauley, *D.* E., Olson, M. S., Emery, S. N., and Taylor, *D.* R. (2000). Population structure influences sex ratio evolution in a gynodioecious plant. *The American Naturalist* **155**, 814-819.

Meena, M. K. (2020). Determination of yield, dry matter and economic feasibility of greater yam (*Dioscorea alata*) through minisett technique. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **9**, 1947-1949.

Meurman, O. (1925). "The Chromosome Behaviorour of Some Dioecious Plants and Their Relatives with Special Refrence to the Sex Chromosomes, *Helsingfors centraltryckeri* och bokbinderi aktiebolag, Soc. Sci. Fennica, Commentationes Biol. 2:1-104.

Miège, J. (1952). Contribution à l'étude systématique des *Dioscorea* d'Afrique Occidentale. *These de doctorat, faculté des sciences, Paris*.

Miège, J., and Lyonga, S. (1982). Yams. Ignames. Edited by Lyonga, S.N.;

Oxford (UK) Clarendon Press.

Mignouna, H., Abang, M. M., Wanyera, N., Chikaleke, V., Asiedu, R., and Thottappilly, G. (2005). PCR marker-based analysis of wild and cultivated yams (*Dioscorea spp*.) in Nigeria: genetic relationships

and implications for ex situ conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* **52**, 755-763.

Mignouna, H. *D.*, and Dansi, A. (2003). Yam (*Dioscorea* ssp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**, 519-528.

Milewicz, M., and Sawicki, J. (2012). Mechanisms of Sex Determination in Plants. *Acta Musei Silesiae, Scientiae Naturales* **61**, 123-129.

Ming, R., Bendahmane, A., and Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual review of plant biology* **62**, 485-514.

Mitchell-Olds, T., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M., and Sharbel, T. F. (2005). Crucifer evolution in the post-genomic era. *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*, 119-137.

Mohan Ram, H., and Nath, R. (1964). The morphology and embryology of *Cannabis sativa* Linn. *Phytomorphology* **14**, 414-429.

Mohan Ram, H. Y., and Sett, R. (1980). Induction of male flowers in a pistillate line of *Ricinus communis* L. by silver and cobalt ions. *Planta* **149**, 413-415.

Mohan Ram, H. Y., and Sett, R. (1982). Induction of fertile male flowers in genetically female *Cannabis sativa* plants by silver nitrate and silver thiosulphate anionic complex. *Theoretical and Applied Genetics* **62**, 369-375.

Mohanty, J. N., Nayak, S., Jha, S., and Joshi, R. K. (2017). Transcriptome profiling of the floral buds and discovery of genes related to sex-differentiation in the dioecious cucurbit *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Gene* **626**, 395-406.

Molongo, M., Koto-Nyiwa, N., Abote, *D.*, and Taffouo, V. (2021). Influence du materiel semencier sur la croissance et le rendement de l'igname (*Dioscorea cayenensis* L.) Dans une zone agro-ecologique de la Republique Democratique du Congo. *Agronomie Africaine* **33**, 119-132.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2021). Genome-Wide Association Studies for Sex Determination and Cross-Compatibility in Water Yam (*Dioscorea alata* L.). *Plants* **10**, 1412.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022a). Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp*.). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Mondo, J. M., Paterne, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022b). Optimum time for hand pollination in yam (*Dioscorea spp*.). *bioRxiv* **in press**.

Müller, N. A., Kersten, B., Leite Montalvão, A. P., Mähler, N., Bernhardsson, C., Bräutigam, K., Carracedo Lorenzo, Z., Hoenicka, H., Kumar, V., Mader, M., Pakull, B., Robinson, K. M., Sabatti, M., Vettori, C., Ingvarsson, P. K., Cronk, Q., Street, N. R., and Fladung, M. (2020). A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nature Plants* **6**, 630-637.

Muñoz-Sanz, J. V., Zuriaga, E., Cruz-García, F., McClure, B., and Romero, C. (2020). Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Frontiers in Plant Science* **11**.

Muyle, A., Bachtrog, *D.*, Marais, G. A., and Turner, J. M. (2021). Epigenetics drive the evolution of sex chromosomes in animals and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **376**, 20200124.

N'kounkou, J.S. (1996). L'homme et l'igname au Congo. In: van der Maesen, L.J.G., van der Burgt, X.M., van Medenbach de Rooy, J.M. (eds) The Biodiversity of African Plants. Springer, Dordrecht. pp. 761-767.

Nakajima, G. (1942). Cytological studies in some flowering dioecious plants, with special reference to the sex chromosomes. *Cytologia* **12**, 262-270.

Nanami, S., Kawaguchi, H., and Yamakura, T. (2004). Sex Change Towards Female in dying *Acer rufinerve* Trees. *Annals of Botany* **93**, 733-740.

Nazir, R., Gupta, S., Dey, A., Kumar, V., Gupta, A. P., Shekhawat, M. S., Goyal, P., and Pandey, *D.* K. (2022). *In vitro* tuberization, genetic, and phytochemical fidelity assessment of *Dioscorea deltoidea*. *Industrial Crops and Products* **175**, 114174.

Nazir, R., Kumar, V., Gupta, S., Dwivedi, P., Pandey, *D.* K., and Dey, A. (2021). Biotechnological strategies for the sustainable production of diosgenin from *Dioscorea spp*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**, 569-585.

Negi, S. S., and Olmo, H. P. (1966). Sex Conversion in a Male *Vitis vinifera* L. by a Kinin. *Science* **152**, 1624-1625.

Negrutiu, I. o., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S., and Moneger, F. (2001). Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* **127**, 1418-1424.

Ng, N. Q., and Daniel, I. (2000). Storage of pollens for long-term conservation of yam genetic resources. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application; Englemann, F., Tagaki, H., Eds*, 136-139.

Noda, H., Yamashita, J., Fuse, S., Pooma, R., Poopath, M., Tobe, H., and Tamura, M. N. (2020). A large-scale phylogenetic analysis of *Dioscorea* (Dioscoreaceae), with reference to character evolution

and subgeneric recognition. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* **71**, 103-128.

Norman, P. E., Asfaw, A., Tongoona, P. B., Danquah, A., Danquah, E. Y., Koeyer, *D. D.*, and Asiedu, R. (2018). Can parentage analysis facilitate breeding activities in root and tuber crops? *Agriculture* **8**, 95.

Norman, P. E., Paterne, A. A., Danquah, A., Tongoona, P. B., Danquah, E. Y., De Koeyer, *D.*, Ikeogu, U. N., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020). Paternity assignment in white guinea yam (*Dioscorea rotundata*) half-sib progenies from polycross mating design using SNP markers. *Plants* **9**, 527.

Ntui, V. O., Uyoh, E. A., Ita, E. E., Markson, A.-A. A., Tripathi, J. N., Okon, N. I., Akpan, M. O., Phillip, J. O., Brisibe, E. A., Ene-Obong, E.-O. E., and Tripathi, L. (2021a). Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology* **22**, 1302-1314.

Ntui, V. O., Uyoh, E. A., Ita, E. E., Markson, A. A. A., Tripathi, J. N., Okon, N. I., Akpan, M. O., Phillip, J. O., Brisibe, E. A., and Ene-Obong, E. O. E. (2021b). Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology* **22**, 1302-1314.

Nwadili, C. O., Augusto, J., Bhattacharjee, R., Atehnkeng, J., Lopez-Montes, A., Onyeka, T. J., Kumar, P. L., Asiedu, R., and Bandyopadhyay, R. (2017). Comparative reliability of screening parameters for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). *Plant disease* **101**, 209-216.

Obidiegwu, J., Rodriguez, E., Ene-Obong, E., Loureiro, J., Muoneke, C., Santos, C., Kolesnikova-Allen, M., and Asiedu, R. (2009). Estimation of the nuclear DNA content in some representative of genus *Dioscorea*. Academic Journals **4**, 448-452.

Oliveira, P., and Maruyama, P. (2014). Sistemas reprodutivos. *Biologia da polinização. Rio de Janeiro: Projeto Cultural*, 71-92.

Omohimi, C., Piccirillo, C., Roriz, M., Ferraro, V., Vasconcelos, M., Sanni, L., Tomlins, K., Pintado, M., and Abayomi, L. (2018). Study of the proximate and mineral composition of different Nigerian yam chips, flakes and flours. *Journal of food science and technology* **55**, 42-51.

Onwueme, I. C. (1978). "The tropical tuber crops: yams, cassava, sweet potato, and cocoyams," John Wiley and sons. Chichester, UK. pp. 248.

Opedal, Ø. H. (2018). Herkogamy, a principal functional trait of plant reproductive biology. *International Journal of Plant Sciences* **179**, 677-687.

Opedal, Ø. H. (2019). Evolutionary Potential of Herkogamy. *eLS*, 1-8.

Ornduff, R. (1975). Complementary roles of halictids and syrphids in the pollination of *Jepsonia heterandra* (Saxifragaceae). *Evolution* **29**, 371-373.

Orozco-Arroyo, G., Vázquez-Santana, S., Camacho, A., Dubrovsky, J. G., and Cruz-García, F. (2012). Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* **236**, 225-238.

Pachakkil, B., Yamanaka, S., Girma, G., Matsumoto, R., Tamiru-Oli, M., Bhattacharjee, R., Abberton, M., Muranaka, S., Asiedu, R., and Terauchi, R. (2021). Simple sequence repeat-based mini-core collection for white Guinea yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm. *Crop Science* **61**, 1268-1279.

Padhan, B., and Panda, *D.* (2020). Potential of Neglected and Underutilized Yams (*Dioscorea spp.*) for Improving Nutritional Security and Health Benefits. *Frontiers in Pharmacology* **11**.

Pailler, T., Humeau, L., Figier, J., and Thompson, J. *D.* (1998). Reproductive trait variation in the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **64**, 297-313.

Perrot, C. (1998). L'igname dans les cérémonies politico-religieuses de l'aire culturelle akan. *Colloques-CIRAD*, 47-50.

Peter, K. V. (2007). "Tuber Crops," National Book Trust, India.

Pickett, F. L. (1915). "A Contribution to Our Knowledge of *Arisaema triphyllum*, By FL Pickett." Reprinted from memoirs of the torrey botanical club. vol **I6** n°1, pp. 54.

Price, E. J., Bhattacharjee, R., Lopez-Montes, A., and Fraser, P. *D.* (2018). Carotenoid profiling of yams: Clarity, comparisons and diversity. *Food Chemistry* **259**, 130-138.

Pwakem, *D.*, Sowley, E., and Kankam, F. (2020). Evaluation of Efficacy of some Plant Extracts for the Control of Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of White Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Agricultural and Food Science Journal of Ghana* **13**, 1268-1281.

Qi-Xing, Z., and Zhi-Jian, G. (2001). Karyomorphology of Podocarpus sl in China and its systematic significance. *Caryologia* **54**, 121-127.

Ramachandran, K. (1962). Studies on the cytology and sex determination of the Dioscoreaceae. J Indian Bot. Soc. **41**, 93–8.

Renner, S. S. (2014). The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of botany* **101**, 1588-1596.

Renner, S. S., and Ricklefs, R. E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American journal of botany* **82**, 596-606.

Richards, A. (1997). Plant Breeding Systems., 2nd edn.(Chapman and Hall: London.).

Rivera, C., Saavedra, F., Alvarez, F., Díaz-Celis, C., Ugalde, V., Li, J., Forné, I., Gurard-Levin, Z. A., Almouzni, G., Imhof, A., and

Loyola, A. (2015). Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Research* **43**, 9097-9106.

Rood, S. B., Pharis, R. P., and Major, *D.* J. (1980). Changes of endogenous gibberellin-like substances with sex reversal of the apical inflorescence of corn. *Plant Physiology* **66**, 793-796.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975). Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* **39**, 597-604.

Sakthidevi, G., and Mohan, V. (2013). Total phenolic, flavonoid contents and in vitro antioxidant activity of *Dioscorea alata* L. tuber. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **5**, 115.

Samiksha, V. B., Kumar, N., and Pathak, S. K. (2022). Role of sterility and incompatibility and crop improvement in vegetable crops.

Sather, *D.* N., Jovanovic, M., and Golenberg, E. M. (2010). Functional analysis of B and C class floral organ genes in spinach demonstrates their role in sexual dimorphism. *BMC plant biology* **10**, 1-14.

Sauquet, H., Von Balthazar, M., Magallón, S., Doyle, J. A., Endress, P. K., Bailes, E. J., Barroso de Morais, E., Bull-Hereñu, K., Carrive, L., and Chartier, M. (2017). The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature communications* **8**, 1-10.

Scarcelli, N. (2005). Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative: le cas des ignames au Bénin (*Dioscorea* sp.). Thèse de doctorat, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.

Scarcelli, N., Cubry, P., Akakpo, R., Thuillet, A.-C., Obidiegwu, J., Baco, M. N., Otoo, E., Sonké, B., Dansi, A., and Djedatin, G. (2019). Yam genomics supports West Africa as a major cradle of crop domestication. *Science advances* **5**, eaaw1947.

Scarcelli, N., Daïnou, O., Agbangla, C., Tostain, S., and Pham, J.-L. (2005). Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* (2n= 40). *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 226-232.

Scarcelli, N., Tostain, S., Mariac, C., Agbangla, C., Da, O., Berthaud, J., and Pham, J.-L. (2006). Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**, 121-130.

Scarcelli, N., Tostain, S., Vigouroux, Y., Luong, V., Baco, M., Agbangla, C., Daïnou, O., and Pham, J.-L. (2011). Genetic structure of farmer-managed varieties in clonally-propagated crops. *Genetica* **139**, 1055-1064.

Schmid, R. (1978). Reproductive anatomy of Actinidia chinensis(Actinidiaceae). *Bot. Jahrb. Syst.* **100**, 149-195.

Segnou, Fatokun, C. A., Akoroda, M. O., and Hahn, S. K. (1992). Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica* **64**, 197-203.

Sehgal, N., and Singh, S. (2018). Progress on deciphering the molecular aspects of cell-to-cell communication in *Brassica* self-incompatibility response. *3 Biotech* **8**, 1-17.

Seth, R., Bhandawat, A., Parmar, R., Singh, P., Kumar, S., and Sharma, R. K. (2019). Global transcriptional insights of pollen-pistil interactions commencing self-incompatibility and fertilization in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International journal of molecular sciences* **20**, 539.

Sharif, B. M., Burgarella, C., Cormier, F., Mournet, P., Causse, S., Van, K. N., Kaoh, J., Rajaonah, M. T., Lakshan, S. R., Waki, J., Bhattacharjee, R., Badara, G., Pachakkil, B., Arnau, G., and Chaïr, H. (2020). Genome-wide genotyping elucidates the geographical diversification and dispersal of the polyploid and clonally propagated yam (*Dioscorea alata*). *Annals of Botany* **126**, 1029-1038.

Sharma, L. N., and Bastakoti, R. (2009). Ethnobotany of *Dioscorea* L. with emphasis on food value in Chepang communities in Dhading district, central Nepal. *Botanica Orientalis: Journal of Plant Science* **6**, 12-17.

Shephard, H., Parker, J., Darby, P., and Ainsworth, C. (2000). Sexual development and sex chromosomes in hop. *New Phytologist* **148**, 397-411.

Shephard, H., Parker, J., Darby, P., and Charles, C. A. (2004). Sex expression in hop (*Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Sieb. et Zucc.) floral morphology and sex chromosomes. *In* Ainsworth, C.C. "Sex determination in plants", Garland Science. London, UK, pp. 139-150.

Sherry, R. A., Eckard, K. J., and Lord, E. M. (1993). Flower Development In Dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* **80**, 283-291.

Siljak-Yakovlev, S., Cerbah, M., Sarr, A., Benmalek, S., Bounaga, N., Coba de la Pena, T., and Brown, S. (1996). Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sexual Plant Reproduction* **9**, 127-132.

Silva, G., Bömer, M., Nkere, C., Lava Kumar, P., and Seal, S. E. (2015). Rapid and specific detection of Yam mosaic virus by reverse-transcription recombinase polymerase amplification. *Journal of Virological Methods* **222**, 138-144.

Simpson, M. (2006). Phylogenetic Systematics. Plant Systematics. Elsevier academic press, Cannada.

Smith, B. W. (1937). Notes on the cytology and distribution of the Dioscoreaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 189-197.

Snyder, E., and Clausen, K. (1974). Pollen handling. *Seeds of woody plants in the United States. USDA Agric. Handb* **450**, 75-97.

Soares, T. L., de Jesus, O. N., de Souza, E. H., and de Oliveira, E. J. (2018). Floral development stage and its implications for the reproductive success of *Passiflora* L. *Scientia Horticulturae* **238**, 333-342.

Soldatova, N. A., and Khryanin, V. N. (2010). The effects of heavy metal salts on the phytohormonal status and sex expression in marijuana. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**, 96-100.

Solomon, B. P. (1985). Environmentally Influenced Changes in Sex Expression in an Andromonoecious Plant. *Ecology* **66**, 1321-1332.

Sousa, A., Fuchs, J., and Renner, S. S. (2013). Molecular cytogenetics (FISH, GISH) of *Coccinia grandis*: a ca. 3 myr-old species of Cucurbitaceae with the largest Y/autosome divergence in flowering plants. *Cytogenetic and genome research* **139**, 107-118.

Souza, E. H., Carmello-Guerreiro, S. M., Souza, F. V. *D.*, Rossi, M. L., and Martinelli, A. P. (2016). Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. *Scientia Horticulturae* **203**, 118-125.

Souza, M. S. d., and Venturieri, G. A. (2010). Floral biology of cacauhy (Theobroma speciosum-Malvaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **53**, 861-872.

Spieth, P. T. (1971). A necessary condition for equilibrium in systems exhibiting self-incompatible mating. *Theoretical Population Biology* **2**, 404-418.

Stout, A. B. (1917). Fertility in Cichorium intybus: the sporadic occurrence of self-fertile plants among the progeny of self-sterile plants. *American Journal of Botany* **4**, 375-395.

Sugihara, Y., Darkwa, K., Yaegashi, H., Natsume, S., Shimizu, M., Abe, A., Hirabuchi, A., Ito, K., Oikawa, K., and Tamiru-Oli, M. (2020). Genome analyses reveal the hybrid origin of the staple crop white Guinea yam (*Dioscorea rotundata*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 31987-31992.

Sugihara, Y., Kudoh, A., Oli, M. T., Takagi, H., Natsume, S., Shimizu, M., Abe, A., Asiedu, R., Asfaw, A., Adebola, P., and Terauchi, R. (2021). Population Genomics of Yams: Evolution and Domestication of *Dioscorea* Species. Springer International Publishing, Cham. pp. 1-28.

Syombua, E. *D.*, Tripathi, J. N., Obiero, G. O., Nguu, E. K., Yang, B., Wang, K., and Tripathi, L. (2022). Potential applications of the CRISPR/Cas technology for genetic improvement of yam (*Dioscorea spp.*). *Food and Energy Security* **11**, e330.

Takayama, S., and Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annual review of plant biology* **56**, 467.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tanksley, S. *D.*, and Loaiza-Figueroa, F. (1985). Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 5093-5096.

Tanurdzic, M., and Banks, J. A. (2004). Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell* **16**, S61-S71.

Tello, J., Montemayor, M. I., Forneck, A., and Ibáñez, J. (2018). A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: evaluation of inter-and intra-cultivar diversity in grapevine. *Plant methods* **14**, 1-17.

Terauchi, R., Chikaleke, V., Thottappilly, G., and Hahn, S. (1992). Origin and phylogeny of Guinea yams as revealed by RFLP analysis of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **83**, 743-751.

Terauchi, R., and Kahl, G. (1999). Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome* **42**, 752-762.

Thompson, A. E. (1955). Methods of producing first-generation hybrid seed in spinach. Cornell University Agricultural Experiment Station, pp. 48.

Torres, M. F., Mathew, L. S., Ahmed, I., Al-Azwani, I. K., Krueger, R., Rivera-Nuñez, *D.*, Mohamoud, Y. A., Clark, A. G., Suhre, K., and Malek, J. A. (2018). Genus-wide sequencing supports a two-locus model for sex-determination in *Phoenix*. *Nature Communications* **9**, 3969.

Tostain, S., Scarcelli, N., Brottier, P., Marchand, J. L., Pham, J. L., and Noyer, J. L. (2006). Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.). *Molecular Ecology Notes* **6**, 173-175.

Tostain, S., Scarcelli, N., Noyer, J.-L., Agbangla, C., Marchand, J.-L., and Pham, J.-L. (2005). Diversité, origine et dynamique évolutive des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* Poir. au Bénin.

Towill, L. E., and Walters, C. (2000). Cryopreservation of pollen. *Cryopreservation of tropical plant germplasm*, 115-129.

Turczyn, M. (2011). ABC architektury kwiatu. *Postępy Biologii Komórki* **38**, 673-684.

Van Berloo, R., Hutten, R., Van Eck, H., and Visser, R. (2007). An online potato pedigree database resource. *Potato research* **50**, 45-57.

Vernier, P., Orkwor, G., and Dossou, A. (2003). Studies on yam domestication and farmers' practices in Benin and Nigeria. *Outlook on agriculture* **32**, 35-41.

Viruel, J., Segarra-Moragues, J. G., Raz, L., Forest, F., Wilkin, P., Sanmartín, I., and Catalán, P. (2016). Late Cretaceous–early Eocene origin of yams (*Dioscorea*, Dioscoreaceae) in the Laurasian Palaearctic and their subsequent Oligocene–Miocene diversification. *Journal of Biogeography* **43**, 750-762.

Volk, G. M. (2011). Collecting pollen for genetic resources conservation. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*, 1-10.

Waziri, A., Garba, Y., Majin, N., and Saidu, A. (2021). effect of planting methods on growth and yield of four varieties of yam minisett (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Lapai Journal of Science and Technology* **7**, 14.

Westergaard, M. (1958a). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *In* "Advances in genetics", Vol. 9, pp. 217-281. Elsevier.

Westergaard, M. (1958b). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in genetics* **9**, 217-281.

Wheeler, M. J., De Graaf, B. H., Hadjiosif, N., Perry, R. M., Poulter, N. S., Osman, K., Vatovec, S., Harper, A., Franklin, F. C. H., and Franklin-Tong, V. E. (2009). Identification of the pollen self-incompatibility determinant in Papaver rhoeas. *Nature* **459**, 992-995.

Wilkin, P., Schols, P., Chase, M. W., Chayamarit, K., Furness, C. A., Huysmans, S., Rakotonasolo, F., Smets, E., and Thapyai, C. (2005). A plastid gene phylogeny of the yam genus, Dioscorea: roots, fruits and Madagascar. *Systematic Botany* **30**, 736-749.

Williamson, M. H., and Fitter, A. (1996). The characters of successful invaders. *Biological conservation* **78**, 163-170.

Winge, O. (1923). On sex chromosomes, sex determination and preponderance of female in some dioecious plants. *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **15**, 1-25.

Wojciechowicz, M. K., Zarychta, L., and Zenkteler, E. (2016). Significance of stigma receptivity in intergeneric cross-pollination of Salix× Populus. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **85**.

Wood, B. W. (2017). Flavonoids, alkali earth, and rare earth elements affect pecan pollen germination. *HortScience* **52**, 85-88.

Wu, M., Haak, *D.* C., Anderson, G. J., Hahn, M. W., Moyle, L. C., and Guerrero, R. F. (2021). Inferring the genetic basis of sex determination from the genome of a dioecious nightshade. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 2946-2957.

Yampolsky, E. (1922). Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibl. Genet.* **3**, 1-62.

Yang, B., Thorogood, *D.*, Armstead, I., and Barth, S. (2008). How far are we from unravelling self-incompatibility in grasses? *New Phytologist* **178**, 740-753.

Yolou, M. (2016). Diversité génétique des ignames africaines cultivées (Complexe *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* et *D. dumetorum*) et perception des paysans du Centre-Bénin des questions des droits de propriété intellectuelle. Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. *D.*, and Zoundjihekpon, J. (2015a). Etat des lieux de la reproduction

sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., Zoundjihekpon, J., Assaba, E. I., Anizehou, I., and Akoegninnou, A. (2015b). La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et *D. dumetorum*) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492.

Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., and Meyerowitz, E. M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7827-7832.

Zannou, A., Agbicodo, E., Zoundjihékpon, J., Struik, P., Ahanchédé, A., Kossou, *D.*, and Sanni, A. (2009). Genetic variability in yam cultivars from the Guinea-Sudan zone of Benin assessed by random amplified polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology* **8**.

Zhang, C.-C., Wang, L.-Y., Wei, K., Wu, L.-Y., Li, H.-L., Zhang, F., Cheng, H., and Ni, *D.*-J. (2016). Transcriptome analysis reveals self-incompatibility in the tea plant (*Camellia sinensis*) might be under gametophytic control. *BMC genomics* **17**, 1-15.

Zoundjihekpon, J. (1993). Biologie de la reproduction et génétique des ignames cultivées de l'Afrique de l'Ouest, *Dioscorea cayenensis-rotundata*. PhD Thesis, Université Nationale de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Zoundjihekpon, J., Essad, S., and Toure, B. (1990). Dénombrement chromosomique dans dix groupes variétaux du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*. *Cytologia* **55**, 115-120.

Zoundjihekpon, J., Hamon, P., Hamon, S., and Tio-Toure, B. (1995). Relation entre germination, mise à fleurs et niveau de prélèvement des semenceaux d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*-Rotundata. *Agronomie Africaine* **7**, 223-235.

Zoundjihekpon, J., Hamon, P., Noirot, M., Tio-Toure, B., and Hamon, S. (1997). Flowering synchronisation between male and female West African cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata* complex). *Euphytica* **95**, 371-375.

Partie II

Phase expérimentale

Inter-chapitre Objectifs-Chapitre I

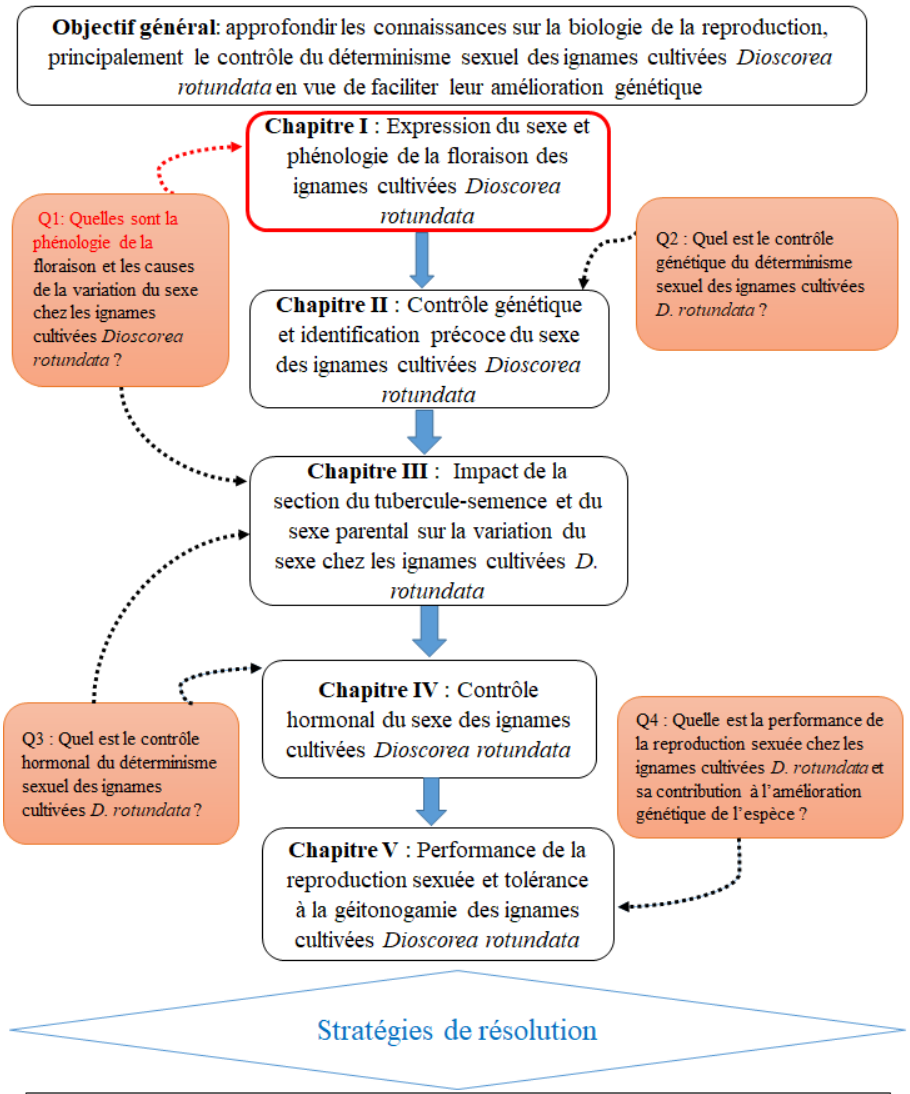
Le but visé dans ce premier chapitre

Le but de ce premier chapitre était double :

- Caractériser la floraison et l'expression du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* de la collection nationale du Bénin, et plus précisément des cultivars utilisés dans la suite de ce travail, afin de voir si certains cultivars sont plus sensibles à la variation du sexe que d'autres.
- Caractériser la transition florale et la morphogenèse florale des ignames cultivées *D. rotundata* au niveau histologique afin de voir à quel stade de développement la morphogenèse florale des fleurs mâles et femelles diverge.

La stratégie utilisée

La caractérisation de la floraison a été faite sur 101 cultivars (dioïques et sub-dioïques : cultivars comprenant des plantes males, femelles et monoïques) de la collection nationale de Bénin hébergés sur le site du Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA). Les paramètres tels que le taux de floraison et le sex-ratio ont été évalués. L'historique de l'expression du sexe a été particulièrement examinée sur la base des observations faites en champ et des données de la littérature. Une caractérisation plus complète a été faite pour 6 cultivars utilisés dans la suite du travail, à raison de 2 cultivars par sexe (mâles, femelles et monoïques), pour mesurer le temps de floraison en champ (délai de la floraison après germination) et l'intensité de la floraison (nombre d'inflorescences par plante, la longueur des inflorescences et le nombre de fleurs par inflorescence). Par ailleurs, une analyse histologique de la transition florale et des morphogenèses inflorescentielle et florale a été réalisée sur des plantes mâles, femelles et monoïques afin de voir si les primordia des différents organes floraux sont présents tant chez les fleurs mâles que femelles et donc savoir à quel stade de développement la sélection du sexe a lieu.



Aperçu des relations inter-chapitres et stratégies de résolution.

Chapitre I. Expression du sexe et développement inflorescentiel et floral chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* du Bénin

Narcisse Denadi[1,2,3], Jeanne Zoundjihékpon[2], Christophe Gandonou[3] and Muriel Quinet[1]

[1]Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-laNeuve Belgium narcisse.denadi@uclouvain.be ; muriel.quinet@uclouvain.be

[2]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP4521, Benin. agboyinou@gmail.com

[3]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP526, Benin; ganchrist@hotmail.com

Résumé

Les ignames cultivées *Dioscorea - rotundata* sont l'une des cultures phares qui garantissent la sécurité alimentaire dans les régions ouest-africaines et au Bénin en particulier. Propagée végétativement, certains cultivars *D. rotundata* du Bénin fleurissent mais le système de reproduction, notamment l'expression du sexe reste très peu maîtrisée. Cette étude vise à faire l'état des lieux de la floraison de la collection nationale du Bénin et discuter du contrôle du sexe au sein de l'espèce. Pour ce faire, la floraison des cultivars de la collection nationale a été suivie en champ et documentée dans la littérature. La transition florale et la morphogenèse inflorescentielle et florale ont été également étudiées. Les résultats ont montré que 97% des cultivars de la collection nationale étaient florifères avec une forte dominance de la floraison mâle (65%). Les femelles et les monoïques représentaient respectivement 29% et 3% de la population. Par ailleurs, une variabilité du sexe a été observée chez certains cultivars. La transition florale a eu lieu en moyenne 63 jours après la germination au niveau méristématique tandis que le début de la floraison n'était visible en champ que 78 jours après la germination en moyenne. Le temps de floraison variait en fonction du sexe de la plante et du cultivar, les plantes mâles fleurissant généralement plus précocement que les plantes monoïques et femelles. Les inflorescences sont des racèmes initiés à l'aisselle de feuilles et leur nombre, leur longueur et le nombre de fleurs par inflorescence variait également en fonction du sexe et du cultivar. Lors de la morphogenèse florale, le méristème floral initie des primordia d'étamines et de carpelles chez toutes les fleurs et leur développement s'arrête ou non en fonction du sexe de la fleur. Cependant, les organes de sexes opposés peuvent être conservés à l'état rudimentaire (chez les mâles) et même parfois assez développé (chez les femelles, surtout celles des plantes monoïques) après la différenciation sexuelle. Cette propension au développement des organes de l'autre sexe était surtout visible chez les cultivars à floraison instable. Exceptionnellement chez les monoïques, quelques fleurs bisexuées ont été observées, renvoyant à un probable ancêtre hermaphrodite.

Mots clés : *Dioscorea rotundata* ; Floraison ; expression du sexe, transition florale ; morphogenèse florale.

1. Introduction

Dans le cycle de vie des Angiospermes, la floraison est une période de développement importante qui détermine directement le succès de la reproduction et la production de graines, et qui est régulée de manière dynamique par divers signaux endogènes et environnementaux (Fornara et al., 2010). Ces signaux interagissent pour réguler le moment propice de la floraison (transition florale), ainsi que la morphogenèse des inflorescences et des fleurs (Bernier et al., 2018; Leijten et al., 2018; Quinet et al., 2004). Bien que la plupart des fleurs sont hermaphrodites, un pourcentage non négligeable sont unisexuées. On distingue ainsi les plantes monoclines qui ont des fleurs hermaphrodites des plantes diclines qui ont des fleurs unisexuées ; celles-ci peuvent être soit dioïques si les fleurs mâles et femelles sont portées sur des pieds différents, soit monoïques si les fleurs mâles et femelles sont portées sur le même pied (Renner, 2014). L'identité du sexe des fleurs dépend de facteurs génétiques mais également d'autres facteurs endogènes et environnementaux (Khadka et al., 2019). Bien que les mécanismes moléculaires contrôlant l'identité du sexe ne soient pas tous compris, il est clair que l'expression sexuelle a lieu lors de l'organogenèse des fleurs ou lors de la différenciation des organes reproducteurs (Bai et al., 2019; Heikrujam et al., 2015). Une instabilité du sexe a été observée chez plusieurs espèces (Bürli et al., 2022; Charlesworth, 2022; Cronk, 2022; Käfer et al., 2022) et la non maitrise du contrôle de l'identité du sexe est un frein pour l'amélioration génétique de plusieurs espèces végétales d'intérêt agronomique dont les ignames cultivées.

L'igname cultivée, *Dioscorea rotundata* Poir., est l'une des espèces les plus prisées et les plus cultivées en Afrique de l'Ouest (FAOSTAT, 2020). Malgré son importance économique et socioculturelle considérable (Obidiegwu et Akpabio, 2017), l'amélioration génétique de l'igname cultivée *D. rotundata* reste difficile et lente compte tenu de son système de reproduction très peu maîtrisé (Mignouna et al., 2007). La culture d'igname se fait généralement par propagation végétative mais la possibilité de floraison conservée par de nombreux cultivars constitue a priori un atout majeur pour l'amélioration génétique de l'espèce (Mondo et al., 2020). *D. rotundata* est essentiellement dioïque avec des plantes androïques (portant uniquement des fleurs mâles) et gynoïques (portant uniquement des fleurs

femelles) mais des cas de monoécie (sexes mâle et femelle séparés sur le même pied), triécie (plantes dont certaines inflorescences portent des fleurs mâles et femelles tandis que d'autres sont complètement mâles ou femelles) et même de rares fleurs hermaphrodites ont été également rencontrés au sein de l'espèce (Abraham et Nair, 1979; Burkill, 1960; Coursey, 1967; Degras, 1993; Hamadina et al., 2009; Sadik et Okereke, 1975).

De nombreuses études ont émis l'hypothèse que la dioécie aurait évolué à partir d'ancêtres hermaphrodites (Charlesworth, 2002; Khadka et al., 2019; Pannell, 2017). Selon le stade de développement au cours duquel les différences entre les sexes peuvent être détectées, les plantes dioïques sont divisées en trois classes : Type 1, celles chez lesquelles les bourgeons floraux forment rarement les primordia du sexe opposé ; Type 2, celles chez lesquelles le développement des primordia du sexe opposé est initié mais s'arrête dans les premiers stades ; et Type 3, celles chez lesquelles le développement des organes du sexe opposé est arrêté à des stades beaucoup plus tardifs (Bai et al., 2019; Heikrujam et al., 2015; Matsunaga et Kawano, 2001). La période clé de la détermination du sexe devrait être la période de transition entre la phase bisexuelle et la phase unisexuelle (Bai et al., 2019). Cependant, le moment précis de cette transition et son contrôle restent mal connus chez *D. rotundata*. Il a été reporté que des fleurs mâles et femelles matures de plantes dioïques d'ignames *D. rotundata* conservent des rudiments d'organes du sexe opposé (Miège, 1952). Il a aussi été signalé que l'expression du sexe et l'intensité (abondance) de la floraison variaient selon la génération et le type de semence (plantes issues de graines par rapport aux plantes clonales) chez cette espèce (Mondo et al., 2020). L'endroit, l'année, la température et la photopériode sont également des facteurs impactant l'expression du sexe et l'intensité de la floraison chez les ignames (Abraham et Nair, 1979; Doku, 1985; Hamadina et al., 2009; Sadik et Okereke, 1975; Segnou et al., 1992).

Cette étude vise à caractériser de façon plus approfondie la floraison et la morphogenèse inflorescentielle et florale chez les ignames *D. rotundata* du Bénin. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les paramètres de floraison de 101 cultivars de *D. rotundata* parmi les plus cultivés au Bénin. Nous avons ensuite détaillé l'initiation des inflorescences et des fleurs et leur morphogenèse au niveau morphologique et histologique afin d'identifier à quel stade de développement la différenciation entre fleurs mâles et femelles a lieu. Nous avons ensuite décrit plus en détails la phénologie florale et la

morphologie des structures reproductrices des 6 cultivars qui seront les plus utilisés dans le cadre de cette thèse.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude était constitué de 101 cultivars de *Dioscorea rotundata* issus de la collection nationale du Bénin (Tableau S1). Ce sont les cultivars les plus répandus dans les différentes zones agro-écologiques du Bénin qui ont été collectés et mis en culture à la station privée du Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA-Bénin).

2.2. Site d'expérimentation et mise en place de la culture

Les différentes expériences menées au cours de cette étude ont été réalisées sur le site du CREFIISDA. Ce centre d'une superficie de 24 ha est situé dans la commune de Zogbodomey (6°56' et 7°08 de Latitude Nord, 1°58' et 2°24' de Longitude) plus précisément dans le village de Lomey. La température moyenne annuelle est de 26,8°C, la pluviosité annuelle est de 1244 mm et la photopériode est de 12h en moyenne.

Sur le site de CREFIISDA, un espace d'environ 1 hectare est réservé à la collection. Après l'aménagement de l'espace et la confection des butes en avril 2019, le semis des cultivars a été fait le 09 mai 2019 en utilisant les tubercules récoltés l'année précédente. Les tubercules récoltés sont conservés dans un grenier (à température ambiante) où ils passent 3 à 4 mois de dormance (de mi-décembre à avril). Pour le semis, les tubercules longs et apparemment sains sont sélectionnés et coupés en deux ou 3 tranches selon leur taille. Les fragments sont ensuite séchés à l'ombre pendant 2 à 3 jours avant d'être semés sur des butes espacées de 1 à 1,5 m. Chacun des 101 cultivars occupait 4 lignes de 20 butes, soit un total de 80 individus par cultivar (8080 plantes espérées).

2.3. Caractérisation des paramètres de floraison des cultivars de la collection.

Différents paramètres de floraison ont été analysés sur les 101 cultivars issus de la collection nationale du Bénin : le taux global de floraison (TFg), le sex-ratio et le taux de floraison au sein de chaque cultivar (TFc).

Le comptage de cultivars florifères et non florifères a été réalisé pour déterminer le taux de floraison global avec : TFg = nombre de cultivars ayant fleuri / le nombre total de cultivars *100.

Le sex-ratio a également été déterminé. Il correspond au pourcentage d'expression de chaque sexe (mâle, femelle ou monoïque) pour l'ensemble des cultivars. Certains cultivars montrent un sexe instable avec certaines plantes qui changent de sexe d'une génération à la suivante. Ce constat a été fait en comparant les phénotypes sexuels observés en 2019 aux données de la littérature entre 1999 et 2018 et les observations personnelles faites lors d'une campagne de prospection dans les champs des producteurs d'ignames du Bénin (saison 2017-2018) (tableau S1). On a donc distingué les cultivars qui fleurissent toujours mâle (M), ceux qui fleurissent toujours femelle (F), les mâles instables (M+) qui ont fleuri mâle mais présentent parfois une variation du sexe, les femelles instables (F+) qui ont fleuri femelles mais présentent parfois une variation du sexe, les monoïques (O) qui portent des fleurs mâles et femelles sur un même pied, et les non-florifères (N) qui n'ont pas fleuri.

Le taux de floraison par cultivar (TFc) a également été évalué avec : TFc = nombre de pieds fleuris par sexe / nombre total de plantes germées par cultivar *100.

Les comptages ont été effectués du début jusqu'à la fin du mois d'octobre.

2.4. Etude histologique de la transition florale et de la morphogenèse florale

L'apex de la tige principale et d'axes secondaires ont été prélevés toutes les semaines (de l'apparition des premières feuilles à la floraison, c'est-à-dire de 10 à 100 jours après germination selon les cultivars) sur 10 plantes de 6 cultivars de la collection nationale du Bénin. Trois groupes de cultivars ont été sélectionnés :

1) des cultivars mâles (Alakissa et Flou) qui produisent essentiellement des plantes mâles ;

2) des cultivars femelles (Gnidou et Anago) qui produisent essentiellement des plantes femelles ;

3) des cultivars monoïques (Katala et Agatou), qui produisent des plantes soit monoïques, soit mâles, soit femelles.

Une fois les prélèvements faits, les organes ont été conservés dans du FAA (70% éthanol : acide acétique : formaldéhyde 18:1:1, par vol.) afin d'être observés ultérieurement sous stéréomicroscope. La transition florale a été définie comme l'apparition des premiers méristèmes inflorescentiels. Le temps de floraison microscopique a été calculé par le nombre de jours séparant la germination de l'apparition des premiers méristèmes inflorescentiels.

Par ailleurs, des apex végétatifs, des apex inflorescentiels, des fleurs mâles et des fleurs femelles à différents stades de développement ont également été prélevés et conservés dans du FAA. Notons que les apex végétatifs ont été échantillonnés tous les 7 jours à partir du stade de 2 feuilles (environ 10 jours après la germination) jusqu'à la floraison. Les apex inflorescentiels ont été collectés entre 60 et 70 jours après la germination chez les cultivars male Flou, Katala et Agatou; entre 70 et 80 jours après la germination chez le mâle Alakissa et entre 70 et 90 jours après la germination chez les cultivars femelles et monoïques (Gnidou, Anago, Agattou et Katala). Pour l'analyse histologique, les échantillons ont été déshydratés dans une série graduée d'éthanol, enrobés dans de la paraffine et des coupes de 5 µm ont été réalisés au microtome selon Quinet et al. (2004). Les sections obtenues ont été colorées avec de l'hématoxyline-fast green et observées au microscope optique (Quinet et al. 2004).

2.4. Suivi de la floraison en champ

Pour les 6 cultivars sélectionnés (Alakissa, Flou, Gnidou, Anago, Katala et Agatou), 10 plantes par cultivar ont été suivies en champ afin de caractériser leur phénologie florale et le développement de leurs structures reproductrices. Le sexe de chaque plante a été déterminé.

Le temps de floraison macroscopique a été calculé pour chaque plante comme le nombre de jours entre la germination et l'apparition macroscopique du premier bouton inflorescentiel.

Pour chaque plante, le nombre d'inflorescences produites par plante a été compté 80 à 120 jours après germination selon les variétés.

La longueur de l'inflorescence et le nombre de fleurs par inflorescence ont été comptés sur 10 inflorescences choisies au hasard au sein des 10 plantes suivies par cultivar.

2.2.4. Analyse statistique

Les données collectées au cours de cette étude ont été encodées avec le logiciel Excel version 2016 et les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel JMP Pro 16 version 2020. Des analyses de variances (ANOVA 1) ont été faites pour quantifier l'impact du sexe et des cultivars sur les paramètres de floraison à savoir le temps de floraison, le nombre d'inflorescences par plante, la longueur des inflorescences, le nombre de fleurs par inflorescence. Le test de Tukey a été utilisé pour comparer ces paramètres entre les différents sexes et les différents cultivars concernés. Avant les ANOVAs, la normalité a été vérifiée sur base des graphiques (box plot et qq plot). L'homogénéité des variances a été également vérifiée sur base du test de Levene.

3. Résultat

3.1. Paramètres de floraison des cultivars *Dioscorea rotundata* du Bénin

Les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin ont montré une diversité florale importante. En 2019, 97% des cultivars de la collection nationale étaient florifères (Tableau S1). Parmi eux, 65% ont fleuri mâle (Figure 1 a), 29% ont fleuri femelle (Figure 1 b) et 3% étaient monoïques (Figure 2 a). Chez ces derniers, les fleurs mâles et femelles pouvaient se mélanger sur un même axe inflorescentiel (inflorescence mixte) ou être séparées en inflorescences mâles et femelles. Dans ce cas, les inflorescences mâles et femelles sont généralement regroupées à un même nœud (Figure 1 c).

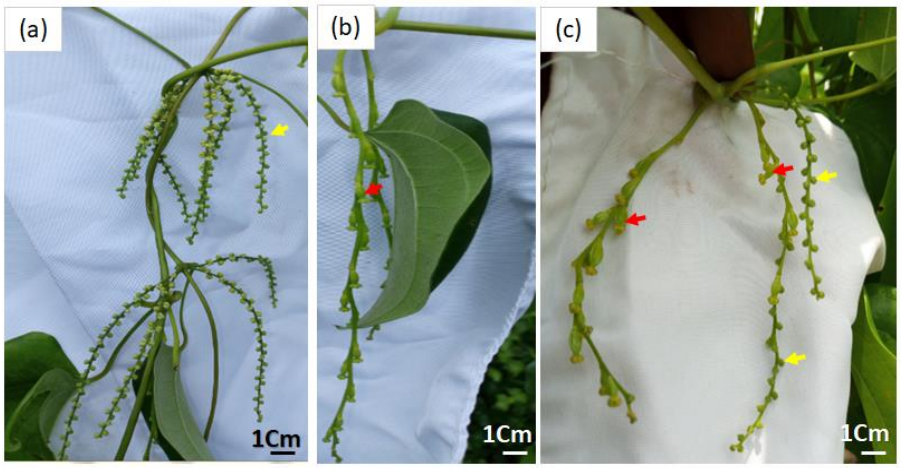


Figure 1: Inflorescences mâles (**a**), femelles (**b**) et monoïques (**c**) de plantes d'ignames cultivées *D. rotundata*. les flèches jaunes et rouges indiquent respectivement les fleurs mâles et femelles.

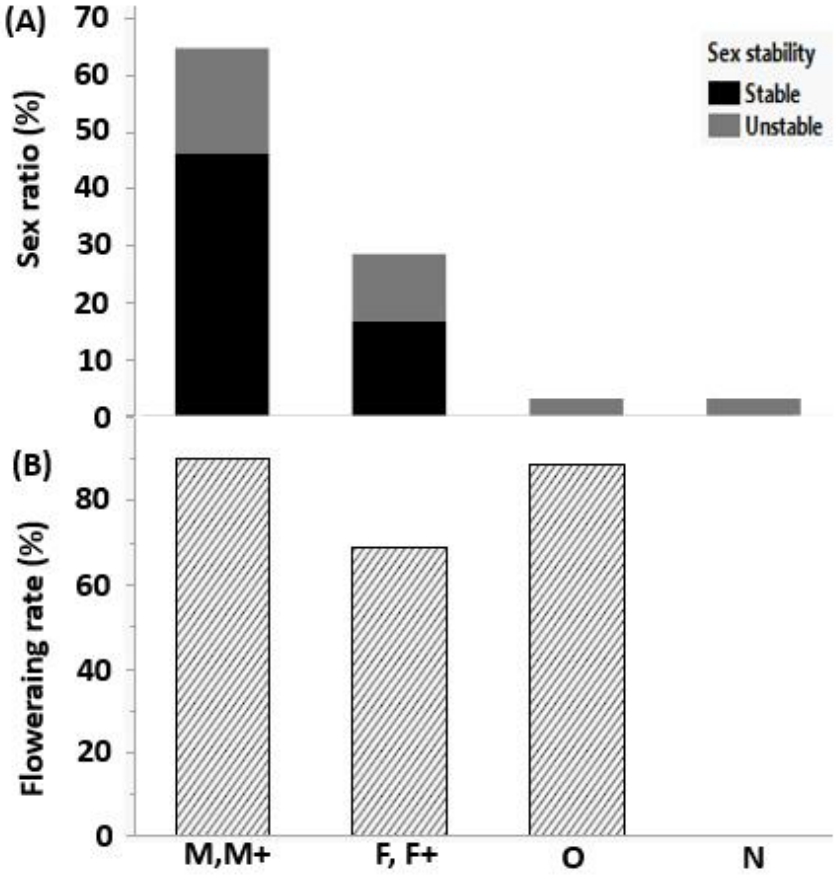


Figure 2: Sex-ratio (A) et taux de floraison rate (B) des *D. rotundata* of Benin. M = mâle; M+ = male instable; F = femelle; F+ = femelle instable O = monoïque et N = non-florifère.

Le sexe des cultivars n'est pas toujours stable d'une année à l'autre chez *D. rotundata*. Certains des cultivars connus pour une floraison généralement mâle montraient de rares pieds femelles ou monoïques. D'autres ont montré une floraison mâle, alors qu'ils avaient été décrits comme femelles, monoïques voire non florifères dans d'autres régions du pays par le passé (tableau 1). De même, des cultivars connus pour une floraison femelle montraient de rares pieds mâles ou monoïques et des cultivars montraient des pieds femelles alors qu'ils étaient décrits par le passé comme mâles ou

monoïques dans d'autres régions du pays (tableau 1). Parmi les cultivars identifiés comme mâles en 2019, 19% étaient mâles instables (M+) et 12% des cultivars femelles étaient des femelles instables (F+) (Figure 2). Tous les cultivars monoïques observés montraient également quelques pieds mâles et femelles dans leur rang (Tableau S1). Il ressort donc que 65% des cultivars avaient un sexe stable et 35% avaient un sexe instable en 2019.

Le taux de floraison a varié de 20 à 100 % en fonction des cultivars en 2019 avec une moyenne de 83,73% (Tableau S1). Par ailleurs, le taux de floraison dépendait du sexe des cultivars ($F = 31,14$; $P< 0.0001$, Figure 2B). : il était plus élevé chez les cultivars mâles (90%) et monoïques (89%) que chez les cultivars femelles (69%) (Figure 2 B).

3.2. Analyse histologique de la morphogenèse inflorescenctielle et florale

Etant donné la variabilité du sexe observée chez certains cultivars, nous avons réalisé une analyse histologique de la transition florale et des morphogenèses inflorescentielle et florale de cultivars mâles, femelles et monoïques afin de voir à quel stade leur développement diffère.

3.2.1. Transition florale et morphogenèse inflorescentielle

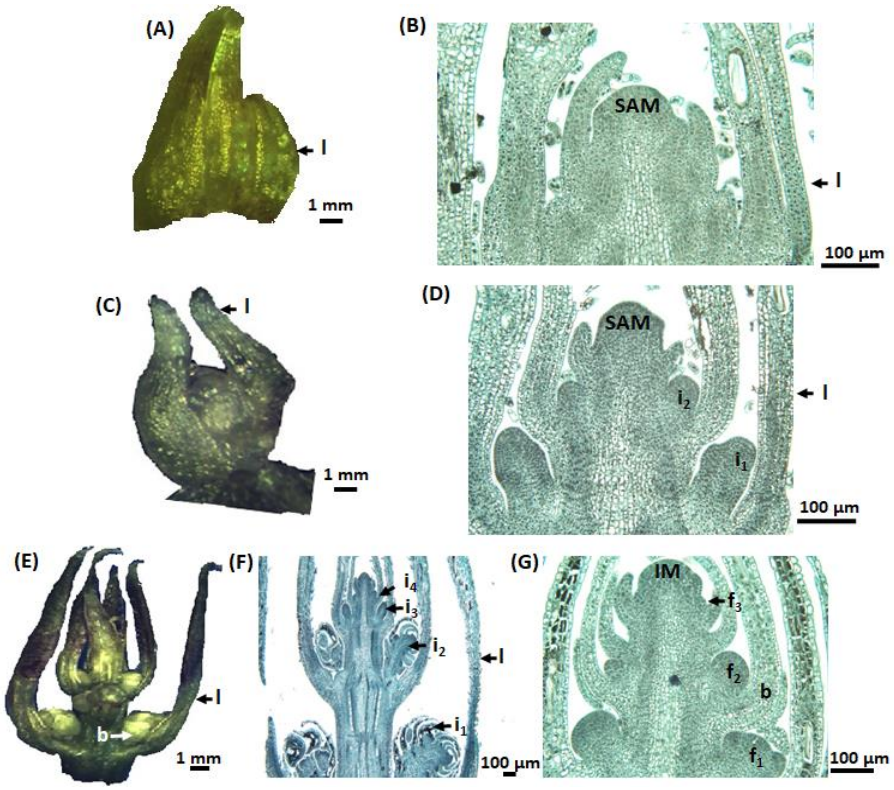


Figure 3: Coupes histologiques montrant les changements morphologiques externes et internes du méristème apical pendant les phases végétative et florale et l'évolution des boutons inflorescentiels et floraux chez le cultivar monoïque Katala. Aspects externe (A) et interne (B) du méristème apical en phase végétative (50 jours après la germination); aspects externe (C) et interne (D) du méristème apical au moment de la transition florale (73 jours après la germination) ; aspects évolutifs externe (E) et interne (F et G) des boutons inflorescentiels (85 jours après la germination). SAM = méristème apical; i = inflorescence ; f = fleur ; b = bractée et l = feuille.

Au cours de la phase végétative, le méristème apical (SAM) est entouré d'un grand nombre de feuilles (Figure 3 A) et initie régulièrement des primordia foliaires sur ses flancs (Figure 3 B). Lorsque les primordia foliaires grandissent, des méristèmes axillaires sont formés à leur aisselle (Figure 3 C). Les méristèmes axillaires initiés sont pour la plupart dormants, mais d'autres développent des axes secondaires selon le cultivar. Dans l'apex en

transition florale (entre 41et 83 jours après germination selon le cultivar et le sexe des plantes), on observe une réduction considérable du nombre de feuilles qui entourent le méristème apical (toujours végétatif) et l'apparition des premiers boutons inflorescenciels (se formant à l'aisselle des feuilles) donne un aspect plus ou moins volumineux à l'apex (Figure 3 C). Au niveau microscopique, le SAM continue à initier des primordia foliaires tout en produisant un méristème inflorescentiel à l'aisselle de chaque feuille (Figure 3 D). Les observations en champ ont montré que le SAM reste végétatif jusqu'à la fin du cycle. Les inflorescences sont de type racèmes. Les méristèmes inflorescentiels s'allongent à leur tour et initient, de façon acropète, sur leurs flancs, des méristèmes floraux sous-tendus par des bractées (Figure 3 D, F, G). Les méristèmes floraux forment des boutons floraux à l'aisselle de bractées aux couleurs jaunâtres qui deviennent visibles à l'œil nu (Figure 3 E et F). Ce stade correspond à ce qu'on appelle le stade de floraison en champ (entre 63 et 94 jours après germination selon le cultivar et sexe des plantes). Pendant ce même temps, les méristèmes axillaires initiés par le SAM au cours de la phase végétative se développent. Les méristèmes axillaires qui se trouvent au-delà du tiers inférieur de la plante se différencient généralement en méristèmes inflorescentiels tandis que ceux qui se trouvent en dessous demeurent généralement à l'état végétatif jusqu'à la sénescence. Les plantes produisent généralement entre 30 et 117 inflorescences (selon le cultivar et le sexe des plantes) et l'étalement de la floraison dure entre 20 et 30 jours selon le cultivar et le sexe des plantes.

3.2.2. Morphogenèse florale

L'analyse histologique de jeunes inflorescences de plantes mâles, femelles et monoïques (Figure 4 A-C), nous a permis de suivre le développement des boutons floraux. Le méristème floral initiait les différents primordia des organes floraux de l'extérieur vers l'intérieur. Les premiers primordia initiés étaient les sépales et ce quel que soit le sexe de la fleur (Figure 4 D-F). Les primordia de pétales étaient initiés à la suite des sépales. Ce deuxième cycle très fréquent chez les mâles (Figure 4 D) et les monoïques (figure 4 F) était généralement absent chez les plantes femelles (Figure 4 E). En ce qui concerne le troisième cycle, celui des étamines, les primordia étaient initiés non seulement chez les plantes mâles (Figure 4 D) et les monoïques (Figure 4 F) mais également chez les plantes femelles (Figure 4 E). Enfin les primordia pistillaires étaient eux aussi initiés non seulement chez les plantes

femelles (Figure 4 E) et les monoïques (Figure 5 F) mais également chez les mâles (Figure 4 D).

Arrivées à maturité, les fleurs mâles (Figure 4 G) étaient constituées d'un cycle de 3 sépales, d'un cycle de 3 pétales et d'un troisième cycle généralement composé de 5 à 6 étamines. Généralement, le quatrième cycle régressait donnant lieu à une fleur unisexuée (Figure 4 H). Toutefois, chez les cultivars mâles instables (M+), il est très fréquent de rencontrer des restes de style rudimentaire au centre de la fleur (Figure 4 I).

Chez les cultivars femelles, l'évolution des primordia conduisait à une fleur femelle mature généralement apétale (Figure 4 J). Il existe tout de même de rares fleurs femelles portant des pétales. Généralement, les fleurs femelles des plantes femelles portaient un cycle de 6 sépales (Figure 5 J). Le cycle central, le pistil, vu de l'extérieur était composé de 3 stigmates mesurant chacun entre 3 et 3,5mm. On pouvait également observer de l'extérieur un ovaire infère triquètre (Figure 4 J). A l'intérieur, 3 styles soudés à la base (Figure 4 K) reliaient les stigmates à 3 carpelles soudés, chaque loge contenant chacun 2 ovules à placentation axillaire (Figure 4 L). La régression des primordia staminaires était généralement incomplète donnant lieu à des fleurs femelles staminodées. En effet, la plupart des fleurs femelles comportaient 3 à 6 staminodes parfois très développés (Figure 4 K et L).

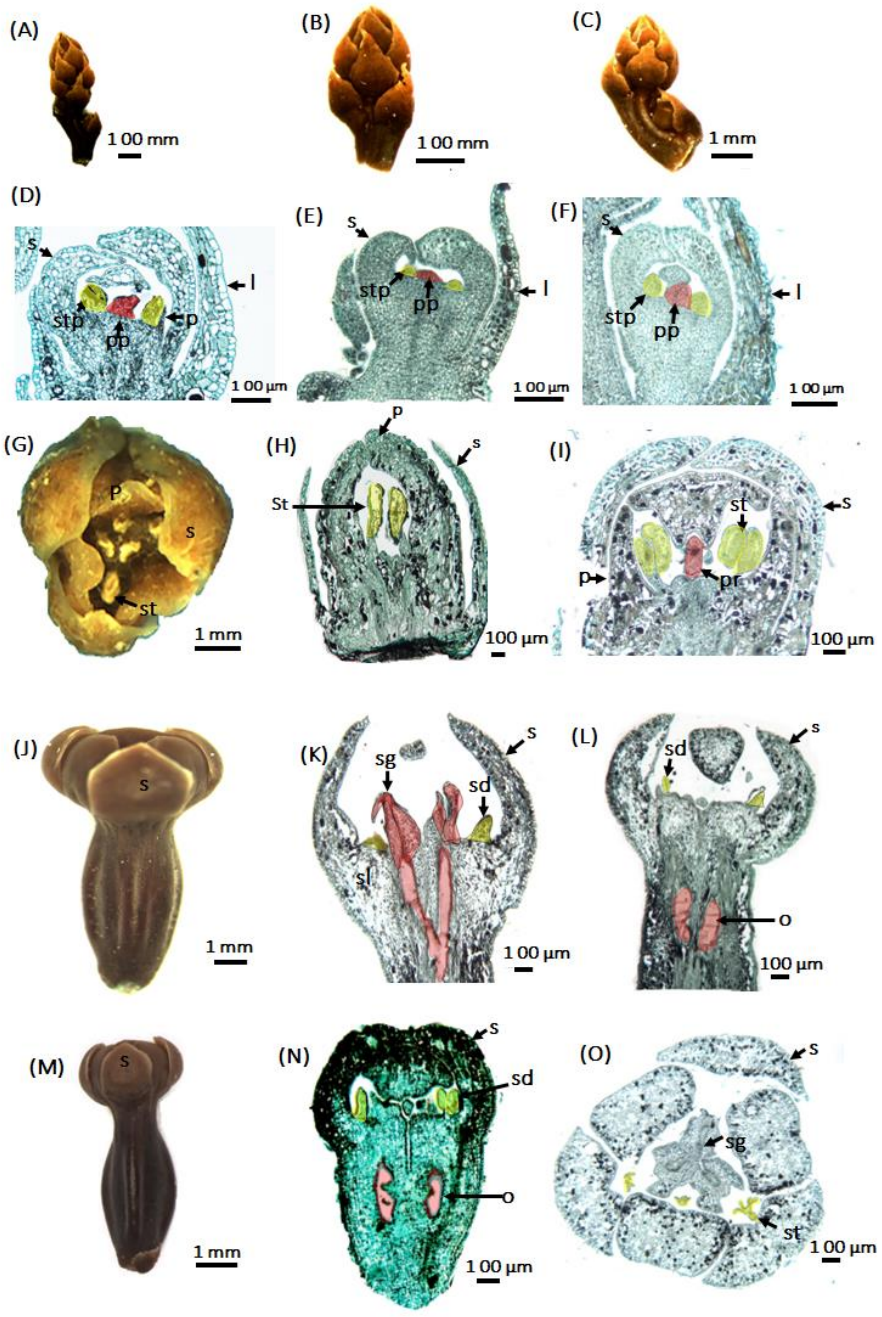


Figure 4 : Coupes histologiques (longitudinales et transversales) montrant l'organogenèse et la structure des fleurs chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Aspects externe (A-C) et interne (D-F) de jeunes bourgeons de

plantes au début de la floraison ; fleur mâle, aspects externe (G) et interne (H : mâle stable Flou et I : mâle instable Katala); fleur femelle, aspects externe (J) et interne (K : femelle stable, Anago et L : femelle instable Agatou) ; aspects externe (M) et interne d'une fleur potentiellement bisexuée issue d'une plante monoïque (Katala) en coupe longitudinale (N) et transversale (O). s = sépale ; stp = primordium de l'étamine ; pp = primordium du pistil ; p = pétale ; l = feuille ; st = étamine ; sl = style ; sg = stigmate ; sd = staminode ; pr = pistil rudimentaire ; o = ovaire. Au niveau des coupes histologiques, les organes sexuels et leurs primordia sont colorés, les mâles en jaune et les femelles en rouge.

Chez les cultivars monoïques, les fleurs mâles et femelles sont généralement identiques à celles des cultivars mâles et femelles, à quelques exceptions près. Les fleurs mâles de plantes monoïques présentaient le plus souvent des restes de style rudimentaire au centre de la fleur comme précédemment décrit chez les cultivars mâles instables (M+). Certaines des fleurs femelles de plantes monoïques avaient une taille particulièrement petite (Figure 4 M et N), avec des staminodes parfois très développés (Figure 4 N), voire une formation complète d'étamines (Figure 4 O) de sorte qu'on pouvait qualifier certaines de ces fleurs de bisexuées, étant donné qu'elles avaient développé un pistil structurellement identique à celui des fleurs femelles.

3.3 Caractérisation de la floraison en champ des 6 variétés étudiées

La floraison a été suivie en champ de façon plus détaillée pour deux cultivars mâles (Alakissa et Flou), deux cultivars femelles (Gnidou et Anago) et deux cultivars monoïques (Katala et Agatou).

3.3.1. Temps de floraison

Comme décrit plus haut, le début de la floraison en champ est caractérisé par le développement des boutons inflorescentiels visibles à l'œil nu (Figure 3 e). Le temps qui sépare la germination et l'apparition macroscopique des boutons inflorescentiels est le temps de floraison en champ. Par ailleurs, nous avons également analysé le temps séparant la germination de l'apparition des premiers méristèmes inflorescentiels au niveau microscopique. Nous appellerons ce délai, temps de floraison microscopique. Ces deux temps de floraison sont fortement corrélés (r^2 =

0,96) et le nombre de jours séparant la floraison microscopique de la floraison en champ était de 16 jours en moyenne.

Le temps de floraison en champ des 6 cultivars d'ignames cultivées *D. rotundata* était en moyenne de 78 jours (Figure 5). Ce temps était fortement influencé par le sexe de la plante (F = 35,66 ; P< 0.0001) et le cultivar (F = 9,07 ; P< 0.0001). Indépendamment du cultivar, les plantes de sexe mâle montraient une floraison plus précoce (70 jours en moyenne) par rapport aux monoïques (78 jours) et aux femelles (84). Chez le cultivar Agatou où les trois sexes se sont exprimés, on a constaté que le temps de floraison des pieds mâles était significativement plus faible (70 jours) que celui des monoïques (81 jours), lui-même plus faible que celui des plantes femelles (93 jours). Les mêmes observations ont été faites chez Katala où les mâles étaient plus précoces (63 jours) par rapport aux monoïques (75 jours) et aux femelles (84 jours). Au niveau des différences entre cultivars, les cultivars Katala et Flou étaient les premiers à fleurir (63 et 65 jours respectivement). Le cultivar Alakissa (84 jours) présentait un temps floraison très élevé pour des plantes mâles. Parmi les plantes femelles, Agatou avait un temps de floraison plus élevé (94 jours) que les autres cultivars Katala (84 jours), Anago (80 jours) et Gnidou (79 jours). Chez les monoïques, le cultivar Agatou (82) fleurissait plus tardivement que Katala (75 jours).

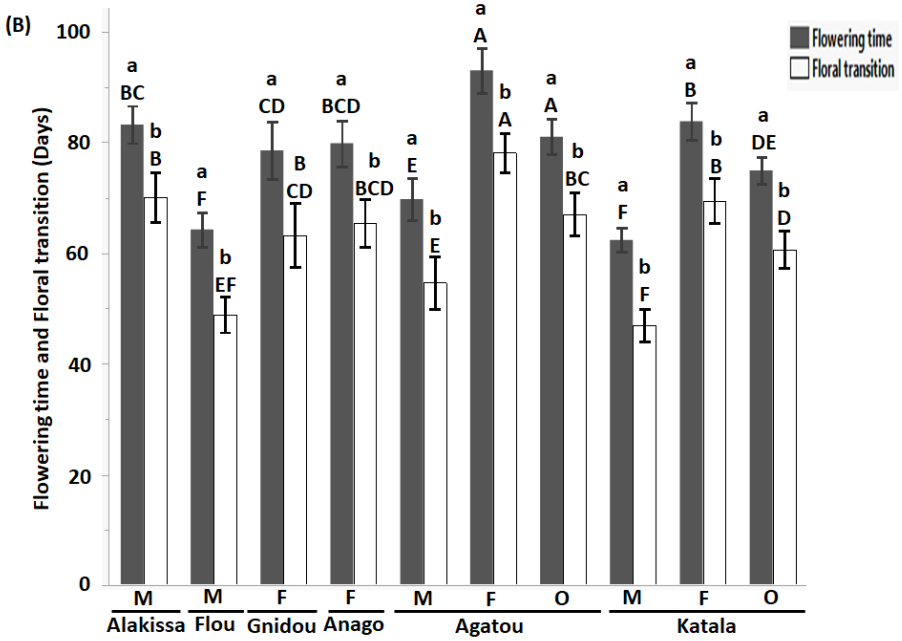


Figure 5: Temps de floraison en champ (nombre de jours qui séparent la date de germination de l'apparition du premier bouton inflorescentiel identifiable à l'œil nu) et transition florale (nombre de jours qui séparent la date de germination de la formation du premier bouton inflorescentiel identifiable au microscope) chez les ignames cultivées *D. rotundata* (Alakissa, Flou, Gnidou, Anago, agatou et Katala). M = mâle ; F = femelle ; O = monoïque. Pour un même paramètre, les sexes qui ne partagent pas la même lettre majuscule sont significativement différents au seuil de 5%. Pour le même sexe, les temps de floraison en champ et les temps de transition florale qui ne partagent pas la même lettre minuscule sont significativement différents au seuil de 5%. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± S*D.*

Le temps de floraison microscopique (transition florale) variait entre 41 et 83 jours avec une moyenne de 63 jours. Comme le temps de floraison en champ, il variait en fonction du sexe ($F = 29,95$; $P< 0.0001$) et du cultivar ($F = 9,37$; $P< 0.0001$). Indépendamment du cultivar, la transition florale avait lieu 56 jours après la germination chez les plantes mâles contre 64 jours chez plantes monoïques et 70 jours chez les plantes femelles. En comparant les 3 sexes chez les cultivars Agatou et Katala, on retrouve également une transition florale plus précoce chez les plantes mâles que chez les plantes monoïques et une floraison plus tardive chez les plantes femelles (Figure 5). Comme pour le temps de floraison en champ, la transition florale était plus tardive chez le cultivar Alakissa pour les plantes mâles (71 jours), chez le cultivar Agatou (68 jours) pour les plantes monoïques, et chez le cultivar Agatou (79 jours) pour les plantes femelles.

3.3.2. Nombre et description des inflorescences

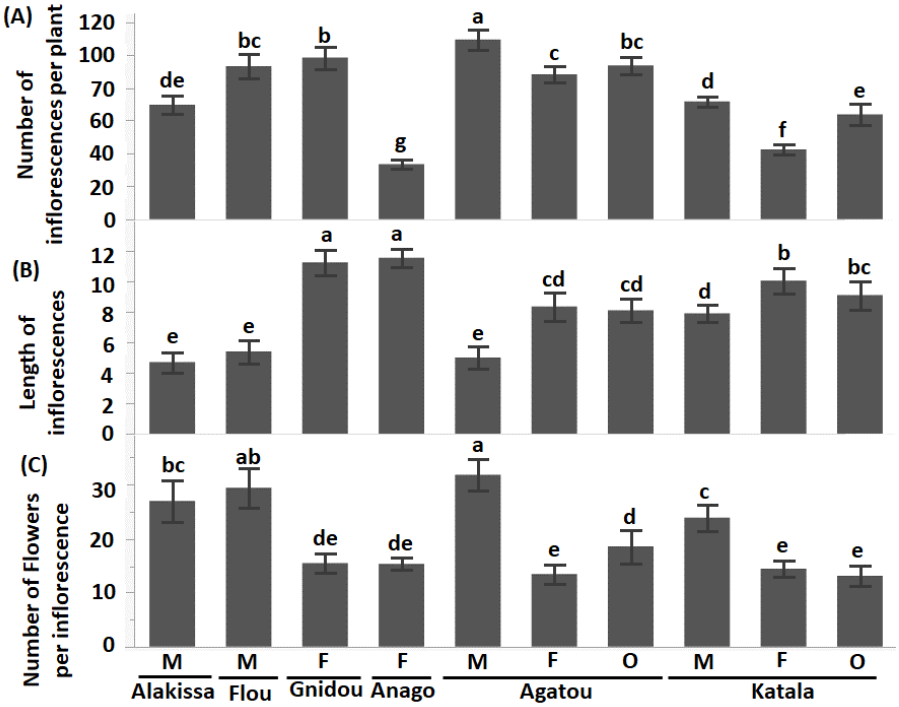


Figure 6: Nombre d'inflorescences par plante (A), longueur des inflorescences (B) et nombre de fleurs par inflorescence (C) chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Les valeurs qui ne partagent pas les mêmes lettres sont significativement différentes au seuil de 5%. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± S*D.*

D'après la figure 6A, le nombre d'inflorescences portées par plante variait entre 30 et 117 avec une moyenne de 77 inflorescences. Ce nombre variait avec le sexe de la plante (F = 31,14 ; P = 0,0005) : les plantes de sexe mâle portaient beaucoup plus d'inflorescences (87) que les monoïques (79) et les femelles (66). Le cultivar influençait également le nombre d'inflorescences par plante (F = 94,42 ; P< 0.0001) Ainsi, le cultivar Anago produisait particulièrement peu d'inflorescences (33) comparé aux autres cultivars femelles qui produisaient de l'ordre de 100 inflorescences par plante. Pour les plantes monoïques, le nombre d'inflorescences par plante était plus faible

chez Katala (60 inflorescences par plante) et pour les plantes mâles, il était plus faible chez Alakissa (70 inflorescences par plante).

En ce qui concerne la longueur des inflorescences (Figure 6B), elle variait entre 4 cm et 12,5 cm. Elle était fortement impactée par le sexe de la plante ($F = 108,64$; $P< 0.0001$) et par le cultivar ($F = 40,07$; $P< 0.0001$). Les plantes femelles avaient des inflorescences beaucoup plus longues (11 cm) que les monoïques (9 cm) et les mâles (6 cm). Au niveau des cultivars, Anago présentait des inflorescence relativement plus longue (11,55 cm) que ces homologues femelles Gnidou (11,25 cm), Katala (10,05 cm) et Agatou (8,35 cm). Chez les mâles, Katala, montrait des inflorescences plus longues (7,9 cm) que celle observées chez Flou (5,4 cm) et Alakissa (4,7 cm).

Les plantes florifères présentaient entre 10 et 36 fleurs par inflorescence (Figure 6C). Le nombre de fleurs par inflorescence variait également avec le sexe de la plante ($F = 178,20$; $P< 0.0001$) et entre cultivars ($F = 12,74$; $P< 0.0001$). En général, les inflorescences des plantes mâles portaient plus de fleurs (28 fleurs par inflorescence) que celles des plantes monoïques (16 fleurs par inflorescence) et femelles (15 fleurs par inflorescences). Par ailleurs, les inflorescences mâles du cultivar Agatou portaient plus de fleurs (32 fleurs par inflorescence) que les inflorescences de Flou (30 fleurs par inflorescence), Alakissa (27 fleurs par inflorescence) et Katala (24 fleurs par inflorescence).

4. Discussion

4.1.Expression du sexe et sex-ratio chez *D. rotundata*

Les résultats de cette étude ont montré que 97% des cultivars d'ignames cultivées *D. rotundata* de la collection nationale du Bénin étaient florifères. Des études menées dans les champs de producteurs d'ignames du Nord et du centre Bénin (Assaba, 2013; Tostain et al., 2005; Yolou et al., 2015) avaient rapporté un taux de floraison avoisinant les 70% ; une valeur qui serait similaire dans toutes les zones de production selon Yolou (2016). Le fort taux de floraison observé sur notre station de recherche comparativement aux valeurs qui sont évoquées dans les champs des producteurs serait probablement lié à l'environnement et aux soins apportés aux plantes lors de la culture. En effet la vigueur de de la plante, le tuteurage offrant un accès suffisant aux rayonnements solaires, les conditions pédoclimatiques, l'année de culture, et la période de germination sont autant de facteurs qui

conditionnent l'induction florale et donc le taux de floraison (Abraham, 1997; Akoroda et al., 1984; Doku, 1985; Edem, 1975; Hamadina et al., 2009; Okereke, 1978; Yolou, 2016). Selon Hamadina et al. (2009), les semis précoces sont soumis à des températures plus élevées. La longue durée du stress affecte le développement végétatif et perturbe la floraison des plantes. Or on sait qu'au Bénin le semis des tubercules en champ se fait très précocement (entre janvier et février) comparativement aux stations de recherche de CREFIISDA où les semis sont généralement faits pendant la période de pluie (entre avril et mai) afin que le développement végétatif des plantes coïncide avec les pluies consécutives (mai-juillet) Par ailleurs, en station de recherche comme au CREFIISDA, les soins apportés aux plantes (sarclage, tuteurage et traitements phytosanitaires) sont meilleurs qu'en culture paysanne. Autant de raisons qui peuvent expliquer les différences de taux de floraison observés sur les stations de recherche et les données rapportées en situation de culture en champ chez les producteurs.

Il a été également constaté que les plantes mâles étaient fortement représentées (65%) par rapport aux femelles (29%) et aux monoïques (3%) dans la collection. Certaines études menées dans le centre du Bénin (Tostain et al., 2005; Yolou, 2012) avaient déjà montré que la floraison mâle est dominante (environ 70%) chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin. Toutefois d'autres travaux effectués dans le centre du Bénin ont plutôt évoqué une floraison équitable entre mâle et femelle mais s'accordent sur la rareté des cultivars monoïques (Assaba, 2013; Dossou-Yovo, 2013; Yolou et al., 2015). On a aussi constaté que les cultivars de sexe mâle présentaient des taux de floraison beaucoup plus importants que les monoïques et les femelles. Ces mêmes observations ont été faites chez des variétés sélectionnées d'ignames cultivées *D. rotundata* du Nigéria (Hamadina et al., 2009). Selon Abraham (1997), la floraison mâle des ignames cultivées *D. rotundata* serait beaucoup moins exigeante que la floraison femelle en matière d'investissement de ressources. Le sexe mâle est considéré comme le sexe par défaut (Tamiru et al., 2017). Par ailleurs, bon nombre de cultivars de la collection nationale qui ont exprimé le sexe mâle, femelle ou monoïque dans notre étude ont été décrits dans d'autres régions du pays comme étant du sexe opposé ou non florifères. Ceci montre que le sexe d'un cultivar n'est pas stable et peut varier. Certains auteurs ont rapporté que l'expression du sexe variait en fonction de la génération (plantes issues de graines ou plantes clonales) (Sadik et Okereke, 1975) et de l'année (Abraham et Nair, 1979; Doku, 1985; Sadik et Okereke, 1975; Segnou et al., 1992), ou encore en

fonction de l'environnement (Hamadina et al., 2009; Tamiru et al., 2017). On peut conclure que les variations fréquentes du sexe ratio sont liées à l'instabilité d'expression du sexe chez certains cultivars.

4.2.Morphogenèse florale et différenciation sexuelle chez *D. rotundata*

Les études morphologiques et histologiques de la morphogenèse florale ont montré que les primordia floraux des deux sexes coexistaient au début de la phase de différenciation sexuelle chez *D. rotundata*. Différents travaux ont montré que chez les *Pistacia* par exemple, le méristème floral initie des primordia d'étamines et de carpelles quel que soit le sexe de la fleur mais que leur développement s'arrête à des stades précoces ou tardifs du développement en fonction du sexe final de la fleur (Cheng, 2011; Wang, 2005). Ceci suggère que la détermination du sexe peut avoir lieu à différents stades du développement (Bai et al., 2019). Chez les ignames *D. rotundata* nous avons observé que si les primordia femelles régressaient totalement chez les cultivars mâles stables (M), les mâles instables (M +) conservaient pour la plupart les restes de ces primordia sous forme de style rudimentaire. Quant aux femelles, elles présentaient un développement important des primordia mâles qui évoluaient en staminodes. Ces observations sont la preuve d'une différenciation sexuelle tardive voire incomplète chez les ignames cultivées *D. rotundata* contrairement à d'autres espèces comme *Pistacia chinensis* et *P. vera* chez qui la détermination du sexe est plutôt précoce (Bai et al., 2019; Hormaza et Polito, 1996). Il a été démontré que la suppression précoce ou tardive des primordia de sexes opposés chez les plantes à fleurs unisexuées repose sur une expression différentielle des gènes MADS-box du modèle ABC (Khadka et al., 2019). D'après ce modèle, l'identité des organes floraux dépend de 3 classes de gènes : les gènes de classe A qui déterminent l'identité des sépales et des pétales, les gènes de classe B qui déterminent l'identité des pétales et des étamines et les gènes de classe C qui déterminent l'identité des étamines et des carpelles (Coen et Meyerowitz, 1991). Une expression différentielle des gènes de classe B et C en fonction du sexe de la fleur a été observée chez *Silene latifolia S. oleracea* et *Rumex acetosa* (Ainsworth et al., 1995; Hardenack et al., 1994; Sather et al., 2010). Chez certaines espèces comme le Kaki (*Diospyros kaki*), le peuplier (*Populus alba*) le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et l'asperge (*Asparagus officinalis*), des études transcriptomiques ont permis d'isoler des gènes spécifiques de la différenciation sexuelle (Akagi et al.,

2019; Carey et al., 2021; Harkess et al., 2020; Müller et al., 2020) tandis que chez d'autres espèces comme *Silene oleracea* les mêmes travaux n'ont pas abouti à l'identification de gènes clés responsables de la différenciation sexuelle (Bai et al., 2019). Chez les ignames cultivées *D. rotundata*, des études récentes basées sur l'approche transcriptomique ont identifié quelques gènes exprimés de manière différentielle entre sexe mâle et femelle (Asfaw et al., 2022; Girma et al., 2019) mais aucune preuve de gènes spécifiques intervenant dans le mécanisme de différenciation sexuelle n'a été rapportée.

Du fait qu'il existe des plantes monoïques et de fleurs bisexuées chez les *Pistacia* dioiques (Bai et al., 2016), Bai et al. (2019) ont supposé que ces espèces auraient évolué à partir d'ancêtres hermaphrodites et qu'elles ont le potentiel de devenir monoïques, voire hermaphrodites, si l'avortement des organes sexuels opposés peut être arrêté. Par comparaison aux *Pistacia*, de rares cultivars monoïques ont été observés chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Nos observations ont également montré que certaines fleurs d'apparence femelle observées chez les plantes monoïques étaient parfois porteuses d'étamines bien développées même si leur fertilité n'a pas été certifiée. De rares fleurs hermaphrodites ont été observées au sein des ignames cultivées *D. rotundata* par le passé (Abraham et Nair, 1979; Burkill, 1960; Coursey, 1967; Degras, 1993; Hamadina et al., 2009; Sadik et Okereke, 1975), tout comme chez le manioc (*Manihot esculenta*) qui est une espèce monoïque (Ceballos et al., 2020). On peut donc supposer que les ignames cultivées *D. rotundata* auraient elles aussi évolué à partir d'un ancêtre hermaphrodite et que la production de fleurs unisexuées dépendrait du potentiel d'avortement des organes sexuels opposés. Selon que la suppression des organes de sexes opposés soit précoce ou tardive, des facteurs environnementaux ou hormonaux peuvent influencer la transition sexuelle (Bai et al., 2019). Le sexe de certaines espèces dioïques peut alors être modifié par l'utilisation de certains régulateurs de croissance ou par des mesures techniques (Hormaza et Polito, 1996; Pineda et al., 2020). Les travaux de Tamiru et al. (2017) ont montré l'existence d'un système de détermination sexuelle homogamétique mâle ZZ/ZW dans lequel les mâles seraient ZZ et les femelles ZW mais n'excluent pas l'implication de facteurs environnementaux dans l'expression du sexe chez les ignames *D. rotundata*. Il serait donc intéressant d'approfondir non seulement les questions liées au déterminisme génétique du sexe mais également explorer l'implication de facteurs environnementaux et hormonaux dans l'expression du sexe au sein de l'espèce.

4.3.Temps de floraison et développement inflorescentiel chez *D. rotundata*

Les résultats de cette étude ont montré que la transition florale est tardive chez les ignames cultivées *D. rotundata*, de l'ordre de 2-3 mois après la germination. A l'exception de quelques cultivars qu'on peut qualifier de tardifs (cas de Alakissa), la floraison des plantes mâles précède la floraison des plantes monoïques et des plantes femelles et s'étend sur plusieurs semaines. D'autres travaux réalisés sur les ignames cultivées *D. rotunda* du Bénin (Scarcelli, 2005; Yolou et al., 2015) et du Nigéria (Darkwa et al., 2020; Hamadina et al., 2009; Mondo et al., 2022) montrent qu'il existe un écart minimum de deux semaines entre les floraisons mâles et femelles. Selon Yolou (2016), l'étalement de la floraison sur une longue période facilite la disponibilité de grains de pollen pour assurer la fécondation des ovules portés par des fleurs femelles à leur parution. Le caractère asynchrone de la floraison serait également en faveur d'une allogamie dirigée. Chez les cultivars qui donnent des plantes mâles et femelles (par exemple Katala), la floraison mâle est généralement sénescente au moment de la maturité des fleurs femelles. Une source extérieure de pollen est donc nécessaire pour que la pollinisation soit assurée. La floraison asynchrone est également observée chez d'autres espèces dioïques comme le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) (El Kadri et Ben Mimoun, 2020). Le décalage du temps de floraison et/ou la maturation asynchrone des organes reproducteurs mâles et femelles sont des phénomènes largement répandus chez les espèces hermaphrodites (ex. *Lonicera oblata*) et les monoïques allogames (ex. *Zea mays*) pour éviter l'autopollinisation (Wang et al., 2022; Wu et al., 2022).

En ce qui concerne l'intensité de la floraison, on a constaté que les plantes mâles et monoïques portaient beaucoup plus d'inflorescences par plante que les plantes femelles. Aussi, même si les inflorescences de plantes femelles étaient généralement plus longues que les inflorescences de plantes mâles et monoïques, elles portaient beaucoup moins de fleurs que ces dernières. Autrement, les inflorescences mâles et monoïques étaient plus denses que les inflorescences femelles. Ces observations sont conformes à celles de Scarcelli (2005), Hamadina et al. (2009) et Yolou (2016). Les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin peuvent être classées en trois catégories selon le type de floraison. On distingue les cultivars à floraison perfuse (abondante), moyenne et pauvre (Dansi et al., 1999). Chez l'igname, l'intensité de la floraison peut varier avec plusieurs facteurs à savoir la

vigueur des plantes, l'endroit, l'année la date de semis, l'intensité lumineuse, la température et la photopériode (Hamadina et al, 2009). L'abondance de la floraison mâle par rapport aux monoïques et aux femelles peut être liée à une sensibilité relative à la disponibilité de ressources nutritives. Il a été rapporté que chez les ignames comme chez d'autres espèces dioïques, le développement du gynécée serait plus exigeant en ressources nutritives que l'androcée (Abraham, 1997). Il est alors possible que les écarts de temps de floraison observés entre les plantes mâles et femelles d'ignames cultivées *D. rotundata* soient également, en partie liés à cette différence d'exigence en ressources nutritives. Dans ce sens, El Kadri et Ben Mimoun (2020) ont rapporté que les changements climatiques ont entraîné un écart plus important entre les temps de floraison mâle et femelle chez le palmier dattier (*P. dactylifera*).

5. Conclusions

Au total, notre étude a montré que les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin sont pour la plupart florifères. Majoritairement dioïques, elles présentent quelques rares cultivars monoïques parfois porteurs de fleurs bisexuées. Par ailleurs, le sexe des plantes n'est pas toujours stable au sein d'un même cultivar et une variation du sexe peut être observée en fonction de l'année ou de la région. Une analyse précise de la morphogenèse florale a montré que toutes les fleurs présentent des primordia d'organes floraux mâles et femelles qui se développent ou non en fonction du sexe de la plante. De plus, nous avons montré que les primordia du sexe opposé sont parfois conservés à l'état plus ou moins évolué, surtout chez les cultivars au sexe instable. Par ailleurs, l'expression du sexe ne se limite pas aux seules fleurs vu que le temps de floraison, le nombre d'inflorescence, leur longueur et le nombre de fleurs par inflorescence dépend du sexe de la plante. La floraison est plus précoce et les inflorescences plus nombreuses avec plus de fleurs chez les plantes mâles que chez les plantes femelles. Il serait intéressant d'approfondir les questions relatives au contrôle de l'expression du sexe afin de mieux comprendre la variabilité du sexe observée chez certains cultivars

Références

Abraham, K. (1997). Flowering deficiencies and sterility preventing natural seed set in *Dioscorea alata* cultivars. *Tropical Agriculture* **74**, 272-276.

Abraham, K., and Nair, S. (1979). Anomalies in sex expression of *Dioscorea rotundata* Poir. *Journal of Root Crops* **5**, 19-24.

Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Thangavelu, M., and Parker, J. (1995). Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *The Plant Cell* **7**, 1583-1598.

Akagi, T., Pilkington, S. M., Varkonyi-Gasic, E., Henry, I. M., Sugano, S. S., Sonoda, M., Firl, A., McNeilage, M. A., Douglas, M. J., Wang, T., Rebstock, R., Voogd, C., Datson, P., Allan, A. C., Beppu, K., Kataoka, I., and Tao, R. (2019). Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nature Plants* **5**, 801-809.

Akoroda, M., Wilson, J., and Chheda, H. (1984). The association of sexuality with plant traits and tuber yield in white yam. *Euphytica* **33**, 435-442.

Asfaw, A., Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., and Akoroda, M. O. (2022). Association mapping of plant sex and cross-compatibility related traits in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) clones. *BMC Plant Biology* **22**, 294.

Assaba, E. I. (2013). Diversité génétique et Biologie de la reproduction des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* et *Dioscorea dumetorum* : cas de la Commune de Dassa. Mémoire de Master, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Bai, Q., Su, S., Lin, Z., Leng, P., and Wang, W. (2016). The variation characteristics and blooming phenophase of monoecious Pistacia chinensis Bunge. *HortScience* **51**, 961-967.

Bai, Q., Zhu, C., Lei, X., Cao, T., Su, S., and Leng, P. (2019). Sex determination during inflorescence bud differentiation in monoecious Pistacia chinensis Bunge. *Forests* **10**, 202.

Bernier, G., Kinet, J.-M., and Sachs, R. M. (2018). "The Physiology of Flowering: Transition to reproductive growth," CRC press.

Burkill, I. H. (1960). The organography and the evolution of Dioscoreaceae, the family of the yams. *Journal of the Linnean Society* **56**, 319-412.

Bürli, S., Pannell, J. R., and Tonnabel, J. (2022). Environmental variation in sex ratios and sexual dimorphism in three wind-pollinated dioecious plant species. *Oikos*, e08651.

Carey, S., Yu, Q., and Harkess, A. (2021). The diversity of plant sex chromosomes highlighted through advances in genome sequencing. *Genes* **12**, 381.

Ceballos, H., Rojanaridpiched, C., Phumichai, C., Becerra, L. A., Kittipadakul, P., Iglesias, C., and Gracen, V. E. (2020). Excellence in cassava breeding: perspectives for the future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics* **2**.

Charlesworth, *D.* (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* **88**, 94-101.

Charlesworth, *D.* (2022). Some thoughts about the words we use for thinking about sex chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **377**, 20210314.

Cheng, S. P. (2011). Tissue Culture and Rapid Propagation of Cotyledonary Nodes and Sex Identification of Pistacia chinensis Bunge. Master's Thesis, Henan University of Science and Technology, Luoyang, China.

Coen, E. S., and Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.

Coursey, *D.* G. (1967). Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. Longmans, London. pp. 244.

Cronk, Q. (2022). The distribution of sexual function in the flowering plant: from monoecy to dioecy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **377**, 20210486.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Darkwa, K., Olasanmi, B., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020). Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp*.) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

Degras, L. (1993). "The yam: a tropical root crop". edited by R. Coste. London, UK: Macmillan Press Ltd. p.408.

Doku, E. (1985). Sex expression and tuber yields of seedlings and clones derived from seedling tubers of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Legon Agricultural Research Bulletin* **1**, 13-17.

Dossou-Yovo, R. (2013). Possibilités d'amélioration des ignames africaines cultivées *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* par voie sexuée : Cas de la Commune de Djidja. Mémoire de Master Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Edem, E. U. (1975). Preliminary investigation into the effect of planting dates and types of setts on flowering of white yam varieties. Mémoire, Federal Department of Agricultural Research, Ibadan, Nigeria.

El Kadri, N., and Ben Mimoun, M. (2020). In vitro germination of different date palm (Phoenix dactylifera L.) pollen sources from Southern

Tunisia under the effect of three storage temperatures. *International Journal of Fruit Science* **20**, S1519-S1529.

FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *In* "Production", Vol. 2022.

Fornara, F., de Montaigu, A., and Coupland, G. (2010). SnapShot: control of flowering in Arabidopsis. *Cell* **141**, 550-550. e2.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Hardenack, S., Ye, *D.*, Saedler, H., and Grant, S. (1994). Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell* **6**, 1775-1787.

Harkess, A., Huang, K., van der Hulst, R., Tissen, B., Caplan, J. L., Koppula, A., Batish, M., Meyers, B. C., and Leebens-Mack, J. (2020). Sex Determination by Two Y-Linked Genes in Garden Asparagus[OPEN]. *The Plant Cell* **32**, 1790-1796.

Heikrujam, M., Sharma, K., Prasad, M., and Agrawal, V. (2015). Review on different mechanisms of sex determination and sex-linked molecular markers in dioecious crops: a current update. *Euphytica* **201**, 161-194.

Hormaza, J., and Polito, V. (1996). Pistillate and staminate flower development in dioecious *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* **83**, 759-766.

Käfer, J., Méndez, M., and Mousset, S. (2022). Labile sex expression in angiosperm species with sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **377**, 20210216.

Khadka, J., Yadav, N. S., Guy, M., Grafi, G., and Golan-Goldhirsh, A. (2019). Epigenetic aspects of floral homeotic genes in relation to sexual dimorphism in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Journal of experimental botany* **70**, 6245-6259.

Leijten, W., Koes, R., Roobeek, I., and Frugis, G. (2018). Translating flowering time from *Arabidopsis thaliana* to Brassicaceae and Asteraceae crop species. *Plants* **7**, 111.

Matsunaga, S., and Kawano, S. (2001). Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biology* **3**, 481-488.

Miège, J. (1952). Contribution à l'étude systématique des *Dioscorea* d'Afrique Occidentale. *These de doctorat, faculté des sciences, Paris*.

Mignouna, H. D., Abang, M. M. and Asiedu, R. (2007). Yams. In: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Pulses, Sugar and

Tuber Crops. Volume 3. Kole, C. (ed.) Springer- Verlag Berling Heidelberg. pp. 271-296.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022). Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp*.). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Müller, N. A., Kersten, B., Leite Montalvão, A. P., Mähler, N., Bernhardsson, C., Bräutigam, K., Carracedo Lorenzo, Z., Hoenicka, H., Kumar, V., Mader, M., Pakull, B., Robinson, K. M., Sabatti, M., Vettori, C., Ingvarsson, P. K., Cronk, Q., Street, N. R., and Fladung, M. (2020). A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nature Plants* **6**, 630-637.

Obidiegwu, J. E., and Akpabio, E. M. (2017). The geography of yam cultivation in southern Nigeria: Exploring its social meanings and cultural functions. *Journal of Ethnic Foods* **4**, 28-35.

Okereke, O. (1978). Prospects of yam seed industry in Nigeria. *In* "Proceedings of the First National Seminar on Root and Tuber Crops", pp. 195-197.

Pannell, J. R. (2017). Plant sex determination. *Current Biology* **27**, R191-R197.

Pineda, M., Morante, N., Salazar, S., Cuásquer, J., Hyde, P. T., Setter, T. L., and Ceballos, H. (2020). Induction of earlier flowering in cassava through extended photoperiod. *Agronomy* **10**, 1273.

Quinet, M., Cawoy, V., Lefèvre, I., Van Miegroet, F., Jacquemart, A.-L., and Kinet, J.-M. (2004). Inflorescence structure and control of flowering time and duration by light in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Experimental Botany* **55**, 1509-1517.

Quinet, M., and Kinet, J.-M. (2007). Transition to flowering and morphogenesis of reproductive structures in tomato. *Int. J. Plant Dev. Biol* **1**, 64-74.

Renner, S. S. (2014). The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of botany* **101**, 1588-1596.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975). Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* **39**, 597-604.

Sather, *D.* N., Jovanovic, M., and Golenberg, E. M. (2010). Functional analysis of B and C class floral organ genes in spinach demonstrates their role in sexual dimorphism. *BMC plant biology* **10**, 1-14.

Scarcelli, N. (2005). Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative: le cas des ignames au Bénin

(*Dioscorea* sp.). Thèse de doctorat, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.

Segnou, Fatokun, C. A., Akoroda, M. O., and Hahn, S. K. (1992). Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica* **64**, 197-203.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tostain, S., Agbangla, C., Scarcelli, N., Mariac, C., Daïnou, O., Berthaud, J., and Pham, J.-L. (2007). Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Genetic Resources* **5**, 71-81.

Tostain, S., Scarcelli, N., Noyer, J.-L., Agbangla, C., Marchand, J.-L., and Pham, J.-L. (2005). Diversité, origine et dynamique évolutive des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* Poir. au Bénin. Les Actes du BRG **5**, 465-482.

Wang, J., Cao, Y., Wang, K., and Liu, C. (2022). Development of Multiple-Heading-Date mtl Haploid Inducer Lines in Rice. *Agriculture* **12**, 806.

Wang, T. (2005). Situation and prospect of major woody energy plants resources for biomass fuel oil in China. *Sciences and Technology* **23**, 12-14.

Wu, Y.-M., Shen, X.-L., Tong, L., Lei, F.-W., Xia, X.-F., Mu, X.-Y., and Zhang, Z.-X. (2022). Reproductive biology of an endangered lithophytic shrub and implications for its conservation. *BMC Plant Biology* **22**, 1-13.

Yolou, M. (2012). Biologie de la reproduction sexuée des ignames africaines cultivées *Dioscorea cayenensis - D. rotundata* : Cas de la Commune de Ouaké. Mémoire de Master, Université d'Abomey Calavi, Bénin.

Yolou, M. (2016). Diversité génétique des ignames africaines cultivées (Complexe *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* et *D. dumetorum*) et perception des paysans du Centre-Bénin des questions des droits de propriété intellectuelle. Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. *D.*, and Zoundjihekpon, J. (2015). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Annexe

Tableau S1 : Taux de floraison, expression du sexe précocité des cultivars de la collection nationale du Bénin.

N°	Cultivars	Taux de floraison (%)	[a]Sexe observé	[b]Historique de la floraison	[c]Classe sexuelle	[d]Précocité
1	Adigbiri (Djikpiri)	65	F	F (1)	F	E
2	Adjouadjere	100	M	M (4,C)	M	E
3	Agatou (issou)	78	M, F, O	F (1); F (3,C) ; (4,C); NF (5,Be)	O+	L
4	Ahimon	63	F	F,M,O (1) ; F (2,B&C); F (3,C); M,O (4,C)	F+	E
5	Ala n'Kodjewe	60	M, F	M (1); NF (2,Z); M,F(4,C)	M+	E
6	Alakissa	100	M	M (1); M (2,B); (3,C); M (5,Be)	M	L
7	Amoula	75	M, O	M (4,C)	M+	E
8	Androki	70	M	NF (1) ; F (4,C)	M+	E
9	Ankpoloman (Anklouman)	70	F	F (1); F (4,C)	F	E
10	Assina	100	M	M (4,C)	M	L
11	Bakarko		M	M (4,C)	M	E

12	Baniakpa	90	M	M (1) ; M (2,B); M (4,C)	M	L
13	Banioure Bagarou	90	M	F (1), M (4,C)	M+	E
14	Banioure Montogue	100	M	F (1), M (2,B); M,O (4,C)	M+	E
15	Banioure Oloukobi	65	F	F (1) ; (2,B); M, O (4,C)	F+	L
16	Baridjo	95	M	M (1) ; M (4,C)	M	E
17	Bobatchinga	100	M	O (4,C), NF (5,Be)	M+	E
18	Bobo	100	M	M (4,C), M (5,Be)	M	E
19	Brizi	100	M	M (1) ; M (4,C)	M	L
20	Ceteboua	88	F	F (4,C)	F	E
21	Dambani	90	M	M (4,C)	M	E
22	Damboura	66	F	F (4,C)	F	E
23	Danmoula	90	M	M (4,C)	M	E
24	Dantekewo	100	M	M (2,A) ; M (4,C)	M	E
25	Deba	100	M	M (1) ; M (4,C)	M	L
26	Dietouba (Nindouin)	95	M	M (1) ; M (4,C)	M	E
27	Dodo (Nonforwou)	80	M, F	F (1) ; F(2,Z); O (3,C) ; M,F (4,C) ; M,F (5,Be)	M+	E
28	Doundoua	100	M	M (1)	M	E

29	Effourou	65	F	F (1)	F	E
30	Feetina (Feni)	70	F	M (1) ; M (4,C)	F+	E
31	Flou	100	M	M (3,C); M (4,C) ; M (5,Be)	M	E
32	Gnalabo	66	M, F, O	F (1); NF (2,C); F (3,C); M,F,O (4,C) ; NF (5,Be)	F+	L
33	Gnidou	80	F,O	M,F,O (1); NF (2,C)	F+	E
34	Gnifokpado	60	F	F (1); F(2,Z); M (4,C)	F+	E
35	Guirisaa	50	F	M (1) ; M (4,C)	F+	E
36	Gourouko	80	M	M(1) ; M (4,C)	M	L
37	Heapala	70	M	F (3,C); M (4,C) ; NF (5,Be 2019)	M+	E
38	Idoro	77	M	M (4,C)	M	E
39	Inimbo	88	M	M (1) ; M (4,C)	M	E
40	Itchankoe	85	M	M (4,C)	M	L
41	Kagourou	100	M	M (1); M (2,B); M (4,C)	M	L
42	Kain	60	M,F	M (4,C) ;	M+	L
43	Kangni	66	F	F (1); F (2,C); F (4,C)	F	E
44	Katala	88	M,F,O	F (2,C); M,F,O	O+	E

				(4,D); NF (5,Be 2019)		
45	Kinkerekou	100	M	M (1) ; F (4,C)	M+	L
46	Kodjewe	90	M	M (2,C&Z); M (4,C)	M	E
46	Kokone	88	M	M (1); M (4,C)	M	L
47	Kouroukpana	100	M	F (4,C)	M+	T
48	Kpagninan	77	F	M (4,C)	F+	T
49	Kpakara (Danwari)	90	M,F,O	F (1); F (2,B); F (3,C); M,F,O (4,C)	M+	E
50	Kpanhoura	100	M	M (1) ; M,F,O (4,C)	M+	E
51	Kpiedje (piedje)	88	M	F (1) ; M,F,O (4,C)	M+	E
52	Kpika	90	M	M (1) ; F, O (4,C)	M+	L
53	Kpokpowoun da	95	M	M (4,C).	M	E
54	Kpona	88	F	M (1), M (2,B);F (4,C)	F+	E
55	Kpona anye	95	M	M (2,B); M (4,C)	M	E
56	Kratchi (Klachi)	90	F	F (1); F (2,C); F (3,C); F (4,C)	F	L
57	Laboko Nord	100	M,F,O	M (1); MFO (4,D)	O+	E
58	Laboko sud	100	M	M (1); M (2,C); M (3,C); M (4,C)	M	E

59	Mafobo	80	F	F (1); F (2,C); F (3,C); F (4,C)	F	E
60	Monji	100	M	F (1); F (2,B); F (3,C); F (4,C)	M+	E
61	Mororokrou (Anago)	20	F	F (1); F (2,B); F (3,C); F (4,C); F	F	E
62	Nangangambina	90	M	M (4,C)	M	E
63	N'dorsi	66	F	F (4,C)	F	E
64	Nonninan	90	M	M (4,C)	M	E
65	Noualai pangui	100	M	M (4,C)	M	E
66	Noualai Poua	90	M	M (4,C)	M	E
67	Noualaye	80	M	M (1); M (2,B); M,F,O (4,C)	M+	E
68	Okogan (klogan, Klogo)	95	M	M (1); M (3,C); M (4,C)	M	L
69	Orou (Yinsingue, Orouguiwa)	100	M	M (1); (2,B)	M	E
70	Oroutanai	75	M	M (1)	M	L
71	Ossoukpana (Ossousouhoun)	70	F	M (1)	F+	L

72	Ouwompeotina		NF	M (1)	NF+	L
73	Parayoubou	45	F	F (4,C)	F	L
74	Porchehbim	90	M	M (1); M (4,C)	M	L
75	Reguede*	95	M,F	F (4,C)	F+	L
76	Singou	95	M	M (1); M (2,B)	M	L
77	Sobanouaga (Sobasson)	100	M	M (1) M (4,C)	M	L
78	Sounoudounou	90	M	M (2,B); M (4,C)	M	L
79	Sousounin	90	M	M (1)	M	E
80	Souanbou	55	F	F (1); (2,A); F (4,C)	F	E
81	Soussouka*	70	M,F	M (1); M (2,B)	M+	E
82	Tatimanin (Tabane)	80	M	M (1); M (4,C)	M	L
83	Tchindjounga	80	M	M (3,C); M (4,C)	M	E
84	Tinondati	95	M	M (4,C)	M	E
85	Tounihle		NF	M (2,B);NF (3,C); NF (4,D)	NF+	E
86	Walassi		NF	NF (1); NF (4,C)	NF+	L
87	wolouchahabim	70	M	M (1); M (4,C)	M	L

88	wonigeenan	80	M	M (4,C)	M	L
89	Wonkaabou (Douba)	90	M	F (1); F (2,A); F (4,C)	M+	L
90	Wourou	66	F	F (2,B); F (4,C)	F	L
91	Yaka	70	F	M (1); F (4,C)	F+	L
92	Yakarango	90	M	M (1); M (2,B); M (4,C)	M	L
93	Yobore (Yoble)	95	F	F (1); F (4,C)	F	E
94	Yombini	100	M	M (4,C)	M	L
95	Yombiri	100	M	M (4,C)	M	L
96	Yonmonwou	90	M	M (4,C)	M	L
97	Yonouan	75	F	F (4,C)	F	L
98	Yorouba doun	60	F	F (4,C)	F	L
99	Zaafoun	88	M	M (4,C)	M	L
100	Zambe	100	M	M (4,C)	M	L
101	Zaminin	70	F	F (4,C)	F	L

[a]Sexes observés dans la collection du Bénin sur le site de CREFIISDA (Saison 2018-2019) ;

[b]Sexe des cultivars selon : 1 = (Dansi et al., 1999) ; 2 = (Tostain et al., 2007) ; 3 = (Yolou et al., 2015) ; 4 = observations personnelles lors d'une campagne de prospection dans les champs des producteurs d'ignames du Bénin (saison 2017-2018) ; 5 = observations personnelles lors d'expérimentations en serre en Belgique en 2019 ; Lorsque l'information est disponible, la région

du Bénin où l'observation a été réalisée est réalisée est précisée : A = Atacora (10°45'0"N ,1°40'0"E) ; B= Borgou (9°45'0''N, 2°45"E), C = Collines (8°0'0"N, 2°10'0"E), D = Donga (9°19'59'N, 1°46'59"E) et Z = Zou (7°15'0"N, 2°10'0"E) ;

[c]Sexe (M, F, O, NF) de la plante utilisée dans cette étude. Le signe (+) indique qu'un autre sexe a été signalé au moins une fois pour ce cultivar sur la base d'observations antérieures (littérature ou observations personnelles ; M = Mâle, F = Femelle, O = Monoïque et NF = Non-floraison) ;

[d]Précocité des cultivars par rapport à la maturité de leurs tubercules : E = précoce et L = tardive.

Inter-chapitre Chapitre I-Chapitre II

Ce qu'on sait déjà :

Dans le chapitre I, nous avons constaté que la majorité des cultivars fleurissent avec une dominance de la floraison mâle. Les femelles sont peu représentées et les monoïques très rares. Certains cultivars présentent une variation du sexe alors que d'autres sont généralement stables. On a alors regroupé les cultivars en deux grands groupes selon qu'ils présentent une expression sexuelle stable ou instable. Cette variation du sexe s'observe chez des plantes mâles, femelles et monoïques.

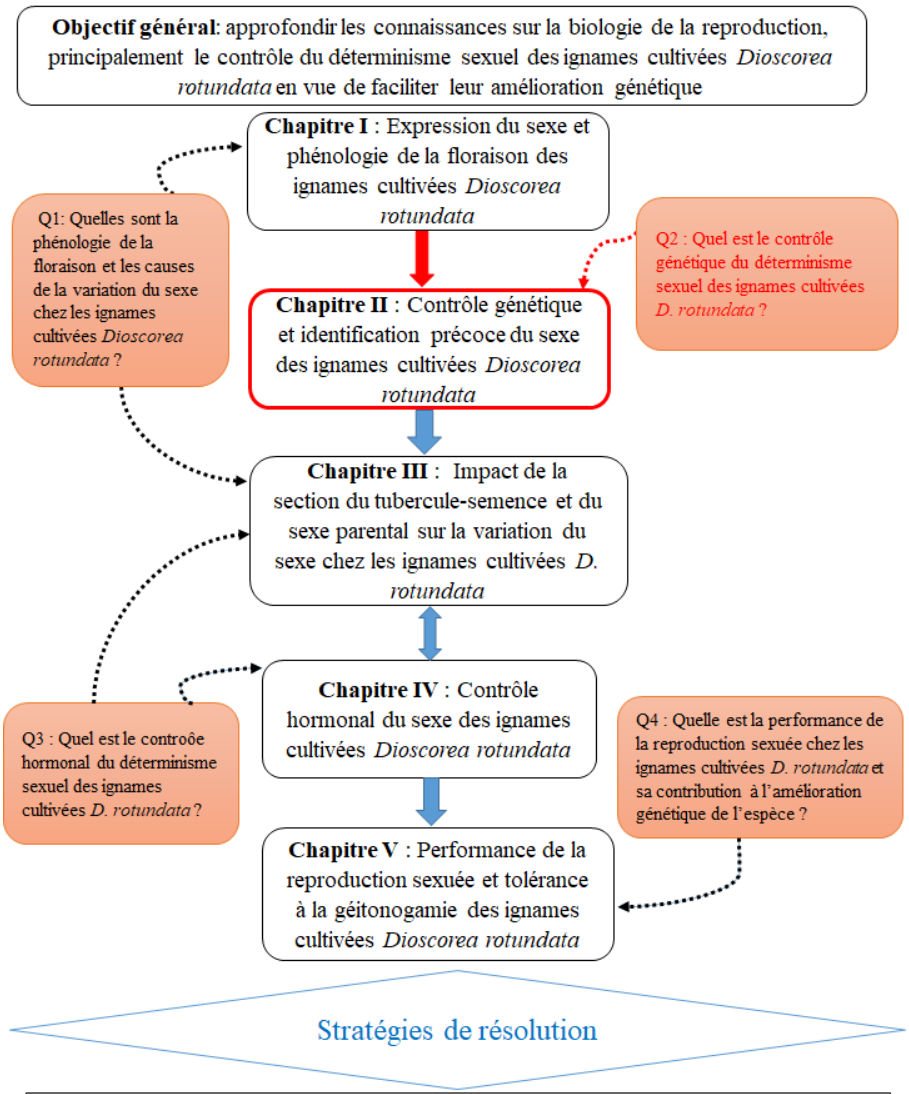
Par ailleurs, la littérature rapporte que le contrôle génétique du sexe des ignames cultivées *D. rotundata* est déterminé par un système hétérogamétique femelle ZZ/ZW ; un système mis en évidence à l'aide d'un marqueur génétique CAPS « pour Cleaved Amplified Polymorphic Sequences » (SP1) (Tamiru et al. 2017). Dans ce système, le génotype homozygote ZZ donnerait un phénotype mâle tandis qu'un génotype hétérozygote ZW donnerait un phénotype sexuel instable produisant soit des pieds femelles, soit des pieds mâles ou encore des pieds monoïques ou stériles (Tamiru et al. 2017). Ces auteurs ont également mis au point un second marqueur génétique SNP « pour Single Nucleotide Reapeat » (SP16) à partir d'un locus spécifique au sexe femelle qui serait capable de discriminer les phénotypes sexuels (mâle et femelle) des plantes au plus jeune âge.

Le but visé dans ce deuxième chapitre

Etant donné la variation du sexe qui caractérise les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin, ce deuxième chapitre a évalué la possibilité de prédire le sexe des accessions béninoises à l'aide des marqueurs SP1 et SP16.

La stratégie utilisée

Les marqueurs génétiques SP1 et SP16 ont été testés sur les 101 cultivars utilisés dans le chapitre précédent. Etant donné que le marqueur SP16 est un marqueur présence/absence, nous avons par ailleurs séquencé les amplicons obtenus chez des plantes mâles et femelles.



Aperçu des relations inter-chapitres et stratégies de résolution.

Chapitre II. Plant Sex Prediction Using Genetic Markers in Cultivated Yams (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin

adapted from
Agronomy 2020, 10(10), 1521; https://doi.org/10.3390/agronomy10101521

Narcisse Denadi[1,2,3], Christophe Gandonou[2], Missihoun Antoine Abel[4], Jeanne Zoundjihékpon[3] and Muriel Quinet[1*]

[1]Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, Belgium; narcisse.denadi@uclouvain.be, muriel.quinet@uclouvain.be

[2]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; ganchrist@hotmail.com

[3]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; agboyinou@gmail.com

[4]Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Analyse des Génomes ; Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin ; missihoun_antoine@yahoo.fr

* Correspondence: muriel.quinet@uclouvain.be

Abstract

Dioscorea rotundata Poir. is mainly dioecious but it also produces monoecious individuals. Recently two genetic markers were proposed to determine the sex in this species. We tested them in 119 individuals from 101 different cultivars of the national collection of Benin to verify whether they can predict the sex observed in the field. Among the analyzed individuals, 72 were male, 37 were female, 7 were monoecious and 3 were non-flowering. Our results showed that the marker sp16, associated with the W allele (female allele), was present in all female individuals but also in more than 42% of male individuals. Thus, while the absence of sp16 confirmed the male sex of the individuals, its presence did not allow sex discrimination. The marker sp1 allowed the identification of four genotypes (AA, AB, BB and AC) in the analyzed individuals with AA and AB being the most represented. Although AA was observed in 62.16% of female individuals and AB in 83.33% of male individuals, we did not observe a clear correlation between sp1 genotypes and sex identity. We concluded that the tested markers did not allow a clear sex discrimination in Beninese *Dioscorea rotundata* cultivars. Our results also suggest that Beninese *D. rotundata* cultivars have adopted a male XX/XY heterogametic system that is undergoing reorganization.

Keywords: dioecy; monoecy; sex determination; sexual chromosome; yam.

.

1. Introduction

The species *Dioscorea rotundata* Poir. is one of 600 species of the genus *Dioscorea* in the family Dioscoreaceae (Coursey, 1972). This genus is commonly known as yam and *D. rotundata* is described as white Guinea yam (Fakorede et al., 2020; Tostain et al., 2007). This species is also named *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir. J. Miège or *Dioscorea cayenensis—D. rotundata*, depending on the authors (Dansi et al., 2000; Lim, 2016; Yolou et al., 2015b; Zoundjihekpon et al., 1990). *Dioscorea rotundata* is mainly dioecious, bearing male and female flowers on separate individuals, while some monoecious plants, bearing male and female flowers on the same individual, could be observed (Darkwa et al., 2020; Girma et al., 2019). It is the most cultivated species in Benin (Dansi et al., 2000) , and Benin is the fourth largest producer of this species worldwide after Nigeria, Ghana and Côte d'Ivoire (FAOSTAT, 2019). It is cultivated for tuber production and is an important source of food and income in Benin where yam is the staple food of the population (Loko et al., 2013). However, despite its economic importance, this species remains largely disregarded by breeding programs (Loko et al., 2013). The species still suffers from phytosanitary problems and is sensitive to environmental stress such as drought or flooding (Amusa et al., 2003; Bousalem et al., 2000; Degras, 1986; Egesi et al., 2009). In sensitive cultivars, anthracnose, fungal or viral attacks may cause yield losses of about 15–25% (Amusa et al., 2003; Asala et al., 2012; Ayisah and Gumedzoe, 2012; Egesi et al., 2009; Ogaraku and Usman, 2008; Thouvenel and Dumont, 1990).

Even though they are mainly multiplied by clonal propagation, more than 73% of Beninese *D. rotundata* cultivars flower (Yolou et al., 2015b) and produce fruits and seeds that allow sexual reproduction (Assaba et al., 2018; Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b). Although sexual reproduction offers opportunities for genetic improvement, breeders have to face several difficulties inherent to the species, such as a relatively long cultivation cycle (8 to 12 months), low germination and flowering rates, low flower fertility, heteroploidy (Darkwa et al., 2020) and especially spontaneous variations in sex from year to year (Girma et al., 2019). These spontaneous variations in sex from year to year have not been clearly investigated yet, but they were observed in some cultivars by growers and researchers (Girma et al., 2019; Tamiru et al., 2017). For example, clonal propagation of a bisexual plant

could sometimes result in the next generation giving bisexual, unisexual or non-flowering plants. Similarly, clonal propagation of a unisexual plant may sometimes give unisexual, bisexual or non-flowering plants in the next generation. Spontaneous variations in sex have caught the attention of many researchers since it undermines experimental designs, particularly those involving cross-pollination. This sex variation has also raised the question on the control of sex determination in *D. rotundata* (Agre et al., 2020; Girma et al., 2019; Tamiru et al., 2017).

Over the last decades, much research has focused on identifying phenotypic traits (stem and leaf color, presence or absence of wax, stains on stems, leaf shape, etc.) that would make it possible to predict the sex of plants before flowering (Girma et al., 2014). Furthermore, correlations between sex and ploidy level were also sought, as the species is characterized by a strong heteroploidy (Girma et al., 2014; Girma et al., 2019). In Benin, cultivars previously described as tetraploid, hexaploid and octoploid for a base chromosome number X = 10 (Dansi et al., 2000; Zoundjihekpon et al., 1990) are actually described as, respectively, diploids, triploids and tetraploids with a base chromosome number X = 20 (Arnau et al., 2009; Daïnou et al., 2002; Girma et al., 2014; Scarcelli et al., 2005; Tamiru et al., 2017). With the development of high-throughput sequencing, the genome of *D. rotundata* has been sequenced, making it possible to identify a sex-linked candidate chromosomal region and to develop genetic markers for sexual identification (Tamiru et al., 2017). Based on a cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS, sp1) marker, Tamiru et al. (2017) demonstrated that in *D. rotundata* sex determination was under the control of a ZZ/ZW (female heterogametic) system as opposed to the XX/XY (male heterogametic) system described in other *Dioscorea* species such as *D. alata* (Cormier et al., 2019), *D. floribunda* (Martin, 1966) or *D. tokoro* (Cormier et al., 2019). Tamiru et al. (2017) also identified a female specific chromosomic region, which led them to develop the marker sp16 to discriminate male plants from female, monoecious and non-flowering plants. This marker allowed identifying the sex of several *D. rotundata* breeding accessions from the collection of the International Institute of Tropical Agriculture (IITA) in Nigeria (Tamiru et al., 2017). SuperSAGE transcriptomic and genome-wide association (GWAS) studies were also undertaken to identify genes linked to flowering and sex in this species and identified candidate genes whose expression differed according to sex (Asfaw et al., 2022; Girma et al., 2019).

In this context, our study aimed to investigate whether the markers sp16 and sp1 allow sex discrimination in cultivated *D. rotundata* yams from Benin. These markers were tested in 119 yam individuals from 101 different cultivars grown in Benin and compared to the sex observed in the field. The relationship between the level of ploidy, sex and genetic markers was also investigated. We further discussed whether cultivars of the species *D. rotundata* in Benin are regulated by a ZZ/ZW (heterogametic female) or XX/XY (heterogametic male) system based on the sp1 marker.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

We analyzed 119 yam individuals from 101 different cultivars of *D. rotundata* from the national collection of the Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA, Zogbodomey, Benin, 6°56′–7°08 N, 1°58'–2°24' E). Of the 119 analyzed individuals, 72 were male, 37 were female, 7 were monoecious and 3 were non-flowering based on field observations. As some cultivars have differential sex, individuals of certain cultivars showing different sex based on historical data/personal observations over years and locations were analyzed separately, while only one individual per cultivar was analyzed for cultivars with stable sex (Table S1). The different cultivars were named according to Dansi et al. (1999) to avoid any redundancy due to synonymy. Plants were grown in Benin under field condition at CREFIISDA. Sowing was performed on 8 May 2019. For each individual, young healthy leaves were collected for DNA extraction. Leaf harvesting was performed after flowering to clearly identify the sex of each individual.

Cultivars were classified as having stable or unstable sex based on the literature (Dansi et al., 1999; Dansi et al., 2000; Tostain et al., 2007; Yolou, 2016; Yolou et al., 2015a), previous personal observations made during survey campaigns (2017–2018) and observations made during this study (2019). A cultivar was considered as having unstable sex if the described or observed sex varied across years and/or locations. A cultivar was considered to have stable sex if the sex described or observed was always the same whatever the year and location. The flowering history of the studied cultivars is summarized in Table S1. The ploidy level of the cultivars is also mentioned in Table S1 when available (adapted from Dansi et al. (2000),

with X = 20 (Scarcelli et al., 2005; Tamiru et al., 2017) instead of X = 10 (Dansi et al., 2000)). Dansi et al. (2000) determined ploidy level by chromosome counting and flow cytometry.

2.2. DNA Extraction, Amplification of the Genetic Markers and Sequencing

Genomic DNA was extracted from frozen grounded leaves according to Fulton et al. (1995). The concentration and quality of DNA were checked using the NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, De Meern, The Netherlands). For specific amplification of sp1, sp16 and Dr-Actine (Tamiru et al., 2017), we used GoTaq DNA polymerase (Promega, Leiden, The Netherlands), 25 ng of plant DNA as a template and specific primers (Table 1) according to the manufacturer's instructions. After an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, each cycle consisted of 20 s at 95 °C, 30 s at an annealing temperature depending on the primer combination and 1 min extension at 72 °C, followed by a final extension of 5 min at 72 °C. The primer pairs, annealing temperature and number of cycles used for each amplification are presented in Table 1. Dr-Actine was used as a positive control (housekeeping gene, used for normalizing the PCR amplifications). PCR amplifications were performed in triplicates. For the sp1 marker, the PCR products were cut with EcoRI (New England Biolabs Inc., Frankfurt, Germany). The PCR products were then resolved on agarose gels.

Table 1: List of primers used in this work.

Marker	Primer Sequences	Tm	Cycles
Dr-Actine	F : 5′-CAGGGAAAAGATGACCCAAATC-3 R : 5′-CCATCACCAGAATCCAGCAC-3	55° C	35
sp1	F : 5'-GATCTGGCTTCCTCCATCTTG-3' R : 5'-GCTTGGGTGGTTAGTTTATTGTTTG-3'	52° C	40
sp16	F: 5′-AATGTGTTTAACAGGGTGAATTC-3′ R: 5′-GAATTCAGCCGAATATACTTATTC-3′	52° C	40

Amplified fragments for sp16 were sequenced in five cultivars (two females and three males) in order to compare the nucleotide sequences (three independent sequencings per cultivar). The PCR products were either directly sequenced or sequenced after cloning using the TOPO™ TA Cloning™ Kit for sequencing (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and TOP10 chemically competent cells according to the manufacturer's instructions. Transformed colonies were identified by PCR and transformed plasmids were extracted using GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). PCR products and plasmids were sequenced with Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Big Dye Terminator V1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and sp16F and R or T3 and T7 primers. Sequences were aligned using BioEdit 7.2 software.

2.3. Data Analysis

All statistical analyzes were performed with R Software Version 3.6.1 (RDevelopment and C.TEAM, 2009). Descriptive analyzes were performed to associate the sex of the cultivars with the genotypes observed for the markers sp16 and sp1. A bivariate distribution of the genotypes of sp16 and sp1 (before digestion) conditional to the sex allowed us to measure the impact of secondary amplifications generated by sp1 on the sex change in some individuals carrying sp16. Finally, a multiple component analysis (MCA) was performed using the MCA function of the FactoMineR package to evaluate possible associations between the sex of the cultivars and the genotypes obtained for the different markers.

3. Results

3.1. Floral Characteristics of Beninese Yam Cultivars

The 119 investigated individuals were grouped into six categories based on their sexual phenotypes in the field (Table S1). Differences between male, female and monoecious inflorescences are presented in Figure 1. Forty-eight individuals were male and belonged to cultivars that produced only male inflorescences whatever the location and season based on the literature and personal observations (Table S1). We described them as stable or typical males (M). Twenty-four individuals were male and belonged to cultivars with unstable sex, since sex variation was reported for these cultivars based on the literature and personal observations (Table S1). We described them as

unstable or atypical (M+) males. Eighteen individuals were female and belonged to cultivars with a stable female sex based on the literature and personal observations (Table S1). We described them as stable or typical females (F). Nineteen individuals were female and belonged to cultivars that changed sex depending on location or season based on the literature and personal observations (Table S1). They were called unstable or atypical females (F+). Seven individuals were monoecious and belonged to cultivars that flowered generally or were occasionally monoecious (O) (Table S1). The last three individuals were non-flowering (NF).

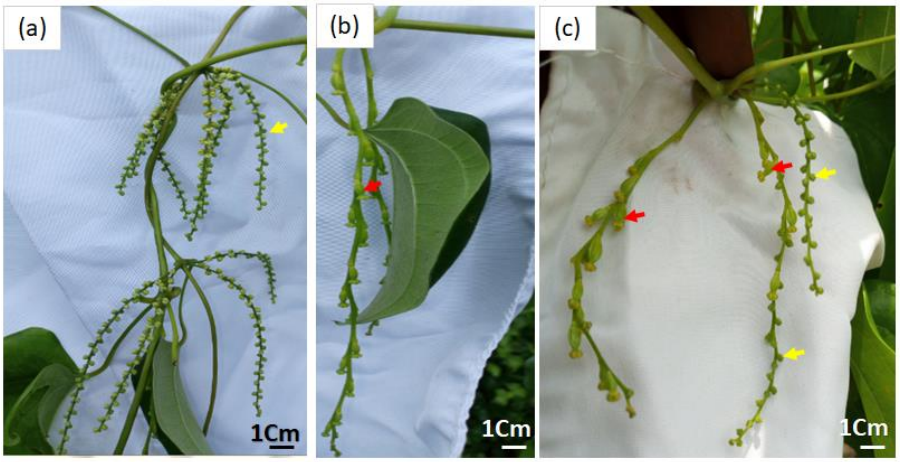


Figure 1: Inflorescences of (a) male, (b) female and (c) monoecious individuals of *D. rotundata* grown under field condition at the Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole (CREFIISDA) (Zogbodomey, Benin) four months after sowing (three months after tuber germination). Yellow arrows and red arrows indicate, respectively, male and female flowers.

3.2. Use of the Marker sp16 to Discriminate Sex in Beninese Yam Cultivars

According to Tamiru et al. (2017), the sp16 marker corresponds to the W allele which is present in female individuals. Our results showed that within cultivars of the species *D. rotundata* from Benin, the marker sp16 amplified mainly in female and monoecious individuals compared to male and non-flowering individuals (Figure 2a, Table S1). Indeed, 36 of the 37 female individuals (F and F+) amplified the sp16 marker including all the F individuals (Figure 2b). The F+ individual without sp16 amplification

belonged to the cultivar Ossousouhoun (syn. Ossoukpana). All monoecious (O) individuals also amplified the sp16 marker (Figure 2b). Thus, the W allele was present in all female (F) and monoecious (O) cultivars studied. For male (M and M+) individuals, 34 out of 72 showed amplification for the sp16 marker (Figure 2b, Table S1), suggesting that 47.22% of male individuals carried the W allele. When considering only male cultivars with stable sex (M), sp16 amplification was observed in 35.42% of the individuals (Figure 2b, Table S1). However, 70.83% of M+ individuals showed amplification for sp16 and carried the W allele.

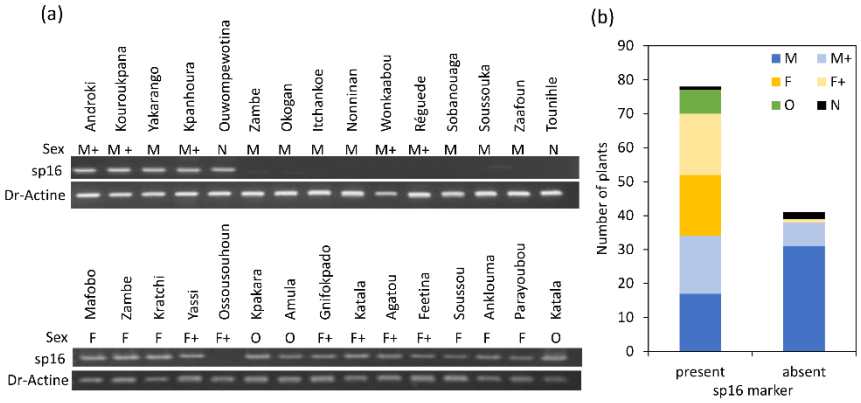


Figure 2: Analysis of the genetic marker sp16 in cultivars of *D. rotundata* from Benin. (a) PCR amplification for sp16 and Dr-Actine in a few cultivars. Dr-Actine is used as a positive control. (b) Distribution of individuals according to their sex identity and the presence or absence of the sp 16 marker. M, stable male; M+, unstable male; F, stable female; F+, unstable female; O, monoecious; and N, non-flowering. The gels with markers are available in the (Supplemental data Figure S2).

The amplified sequences for sp16 were compared between two female and three male individuals from different cultivars, and the nucleotide sequences were identical whatever the sex and the cultivar (Figure S1), suggesting that this fragment of the W allele is the same in female and male individuals, when present.

3.3. Use of the Marker sp1 to Discriminate Sex in Beninese Yam Cultivars

The CAPS marker sp1 was developed by Tamiru et al. (2017) and allowed discrimination between homozygous male (ZZ) and heterozygous female (ZW) individuals in *D. rotundata*. Digestion of the sp1 fragment by the EcoRI enzyme showed four different genotypes in cultivated *D. rotundata* yams from Benin, namely AA, AB, BB and AC (Figure 3a,b). AA and BB genotypes were the most frequent and were observed in 60.5% and 31.1% of individuals, respectively, while BB and AC genotypes were observed in only 5.9% and 2.5% of the individuals, respectively. As shown in Figure 3c, 62.16% of female (F and F+) individuals were of AA genotype and 83.33% of male (M and M+) individuals were of AB genotype. The six individuals of genotype BB were male. The AC genotype was rare and distributed among different sexual types (present in one female, two males and two monoecious individuals). We observed that the male sex was more often associated with the genotype AB (or BB but low frequency), while female sex was more often associated with the genotype AA. Nevertheless, the marker sp1 did not allow systematic discrimination between male and female sex in cultivated *D. rotundata* yams from Benin.

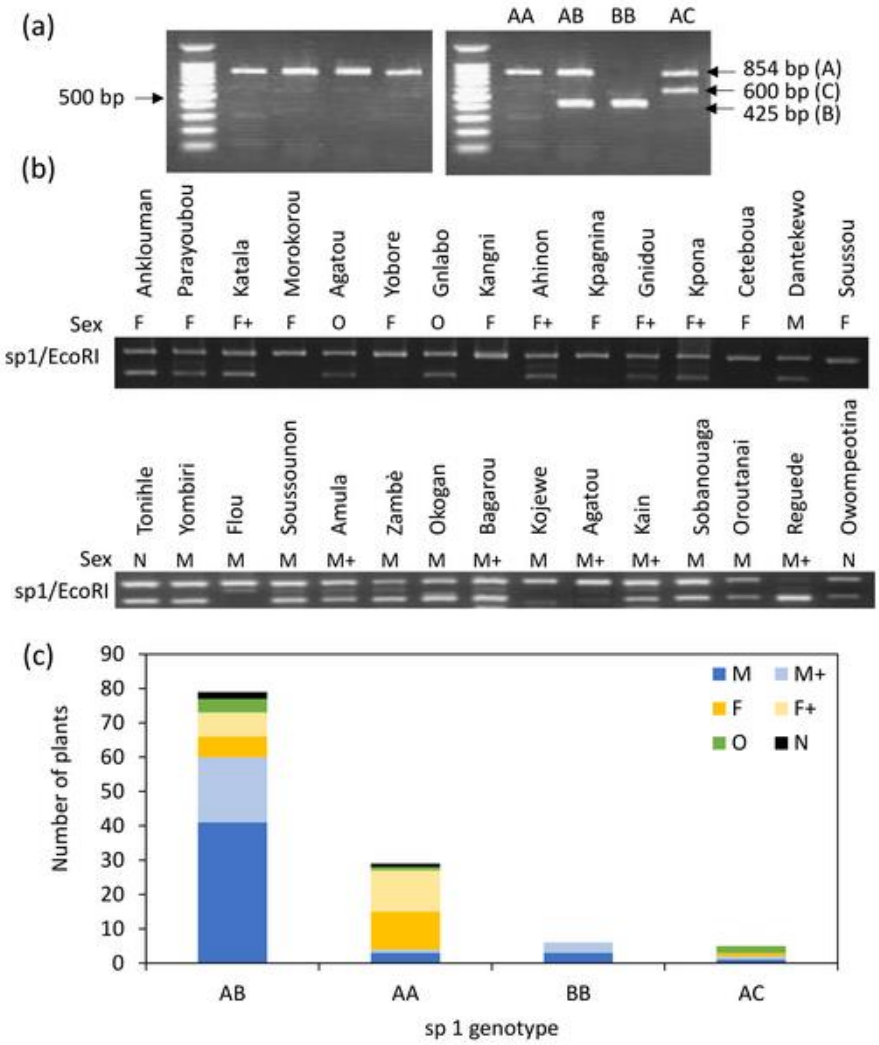


Figure 3: Analysis of the genetic marker sp1 in cultivars of the *D. rotundata* species of Benin. (a) The four profiles obtained before (left) and after (right) restriction with EcoRI. (b) PCR amplification and restriction for sp1 in a few cultivars. (c) Distribution of individuals according to their sex identity and the genotypes (AB, AA, BB, AC) for the sp1 marker. M, stable male; M+, unstable male; F, stable female; F+, unstable female; O, monoecious; and N, non-flowering.

Amplification of the sp1 marker led to secondary amplifications in some cultivars of *D. rotundata* in addition to the 854 bp band that was present in all individuals (Figure 4a). Secondary amplifications of low intensity and

variable size (sp1OA) were indeed observed in 60% of studied individuals (Figure 4). The frequency of these secondary amplifications was particularly high in unstable male (M+) and female (F+) individuals which showed a band for the sp16 marker (Figure 4, Table S1). As shown in Table 2, 57.17% of the unstable male (M+) individuals carried the W allele (sp16 marker) and showed sp1OA. Similarly, 63.16% of the unstable female (F+) individuals carried the W allele (sp16 marker) and showed sp1OA. Thus, the combined presence of the W allele and sp1OA could be a sign of sexual instability.

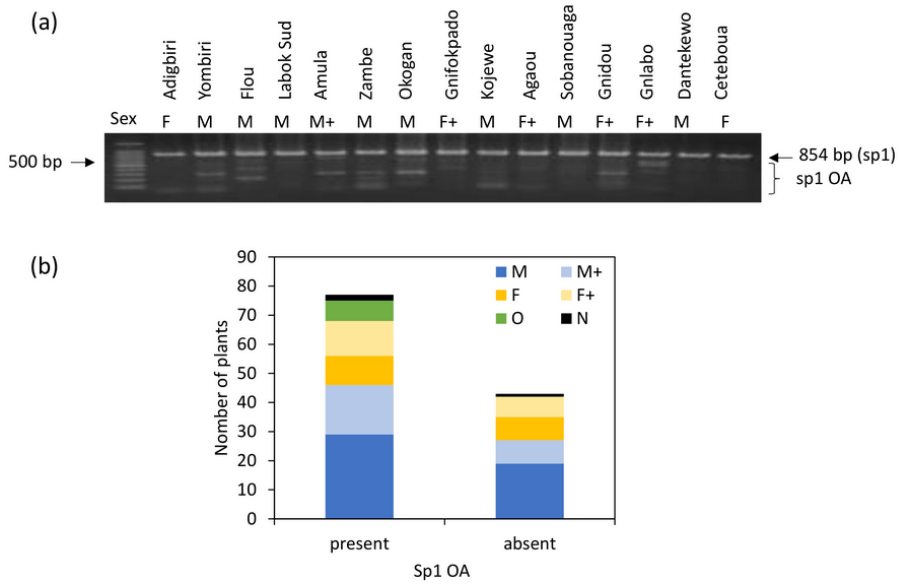


Figure 4: Presence of multiple amplifications for the sp1 marker before restriction in some cultivars of *D. rotundata* from Benin. (a) PCR amplification of sp1 before restriction in a few cultivars. (b) Distribution of individuals according to their sex identity and the presence or absence of multiple bands for the sp1 marker (sp1 OA) before restriction. M, stable male; M+, unstable male; F, stable female; F+, unstable female; O, monoecious; and N, non-flowering.

Table 2. Impact of the presence of the sp16 marker and the secondary amplifications for the sp1 marker (sp1 OA) on the frequency of unstable male (M+) and female (F+) individuals of *D. rotundata* from Benin.

		Male (M+)		Female (F+)
	sp1OA absent	**sp1OA present**	**sp1OA absent**	**sp1OA present**
sp16 absent	12.50%	16.67%	5.26%	0.00%
sp16 present	16.67%	57.17%	31.58%	63.16%

3.4. Relative Importance of sp16 and sp1 Markers in Sex Identification in Beninese Cultivars

In order to understand the extent to which each of the two markers explain the sex of *D. rotundata* cultivars from Benin, a multiple component analysis was carried out (Figure 5). The first two dimensions explained 25.7% and 16.4% of the variability, respectively. The first dimension separated male and female individuals according to the sp16 marker. The absence of the sp16 marker was more associated with male individuals and especially with stable male individuals (M) compared to unstable ones (M+). The second dimension distinguished stable male (M) and female (F) individuals from unstable (M+ and F+) individuals based on the presence or absence of sp1 OA. Unstable individuals (F+ and M+) were most often associated with the presence of sp1OA so that, combined with the presence of sp16, secondary amplification at sp1 increased the frequency of male and female cultivars of unstable sex. With respect to the sp1 marker, the AA genotype was more often associated with female individuals while the AB and BB genotypes were more often associated with male individuals. From this analysis, it appears that the best determinant of stable male cultivars is the absence of the sp16 marker and that the best determinant of stable female cultivars is the AA genotype of the sp1 marker.

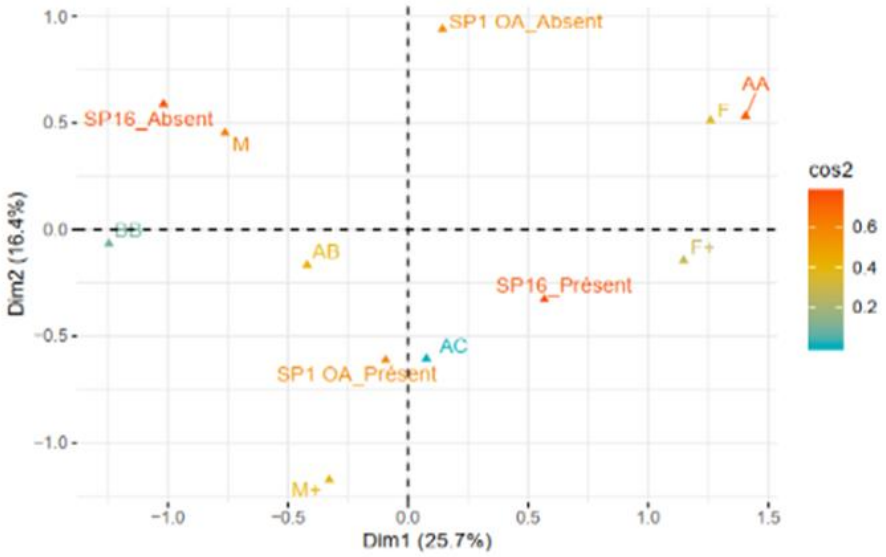


Figure 5: Multiple component analysis (MCA) of the relationship between the sex of *D. rotundata* cultivars from Benin and the markers sp16 and sp1. M, stable male; M+, unstable male; F, stable female; F+, unstable female; O, monoecious; N, non-flowering; and sp1 OA, presence of multiple amplifications for the sp1 marker. The color codes from red to blue (for a cos2 from the highest to the lowest) indicate the decreasing representativeness of the variables.

3.5. Ploidy Level and Sex Expression

The majority of cultivated *D. rotundata* yam individuals analyzed in this study were diploid with a base number X = 20 (Arnau et al., 2009; Dansi et al., 2000; Girma et al., 2014; Scarcelli et al., 2005; Tamiru et al., 2017) (Table S1). Among the 119 individuals analyzed, 2 were triploid and 2 were tetraploid (revised from Dansi et al. (2000), Table S1). All individuals tested with a ploidy level greater than 2X were male or non-flowering and showed amplification for the marker sp16 and the genotype AB for the sp1 marker (Table 3). Although the number of triploid and tetraploid individuals was too small to assess the interference of ploidy level on the W allele, our results suggest that cultivars with ploidy greater than 2X are male or non-flowering despite the presence of the W allele.

Table 3. Impact of polyploidy on sex identity and genotypes for the sp16 and sp1 markers.

Cultivar	Ploidy level	Sex[1]	sp16 marker	sp1 marker
Baridjo	3X	M	Present	AB
Doundoua	4X	M	Present	AB
Owompeotina	3X	N	Present	AB
Alakissa	4X	M	Present	AB

[1]M, Male; N, non-flowering

4. Discussion

4.1. Discriminating Power of the sp16 Marker and Link between the W Allele and Sex Determination

Analysis of our results showed that absence of the sp16 marker could be associated with male identity, but its presence did not systematically imply a specific sex. These results are in agreement with those of Tamiru et al. (2017). Indeed, for Tamiru et al. (2017), there is a specific region linked to the female sex characterized by the W allele that is able to partially (partial dominance) or totally (complete dominance) suppress the effect of the male Z allele. These authors hypothesized that this Z-suppressing function can be affected by the environment (Tamiru et al., 2017). As a result, the ZW genotype determines generally female or monoecious identity but may also identify, in some cases, non-flowering phenotypes, while the ZZ genotype always leads to male identity. However, when the Z-suppressor effect of the W allele fails completely, a male individual could be obtained with a ZW genotype (Tamiru et al., 2017). According to these authors, male sex is the default sex and the W allele could be influenced by the environment (Tamiru et al., 2017). The importance of environment on the sexual control of yams has indeed been repeatedly stated (Alam et al., 2014; Hamadina et al., 2009; Lebot et al., 2019; Nwankwo and Bassey, 2013). However, according to our results, the W allele was present in female individuals but also in more than 42% of the male individuals of *D. rotundata* from Benin. In addition, the sequence of the marker was identical between male and female individuals and therefore did not allow sex discrimination. Thus, the sp16 marker did

not allow clear sex discrimination in cultivated white Guinea yam from Benin, while it allowed sex discrimination of improved IITA *Dioscorea rotundata* varieties from Nigeria (Tamiru et al. 2017). If the environment is responsible for modulations of the Z-suppressive effect of the W allele as proposed by Tamiru et al. (2017), it would play a significant role in sex determination in *D. rotundata* cultivated yams from Benin. Indeed, some Beninese cultivars change spontaneously from sex identity depending on the year and region as we have observed (Table S1). However, no formal proof of the impact of the environment on the W allele has been obtained yet. Further studies will thus be required to analyze sex-switch from year to year and the impact of the environment on sex determination in *D. rotundata*. Moreover, individuals with different sex were observed for a same cultivar in the frame of this study, although they were cultivated in the same conditions (Table S1). This suggests that sex instability could not only be explained by environmental conditions.

However, given that more than 35% of stable male individuals carried the W allele, we may not exclude that more than one locus are involved in sex determination in white Guinea yam. In their SuperSAGE transcriptome profile, Girma et al. (2019) identified 88 tags that were differently expressed between male, female and monoecious individuals. Eighteen of them corresponded to genes known for their involvement in sex determination or floral development in other species (Girma et al., 2019). In particular, DnaJ-like protein and Transketolase were specific for sex determination (Girma et al., 2019). The latter is located on the chromosomal region linked to the sp1 marker and Z and W alleles (Girma et al., 2019; Tamiru et al., 2017). On this basis, we cannot exclude that the presumed W allele corresponds to one gene among many others that interact to determine sex expression. Asfaw et al. (2022) identified indeed three SNP markers associated to plant sex and five genes considered to be directly related to sex expression or regulating the balance of hormones directly influencing sexual orientation in their genome-wide association studies (GWAS) in *D. rotundata*.

Furthermore, genomic analyzes of Tamiru et al. (2017) were carried out on diploid cultivars whereas polyploid cultivars were also observed in *D. rotundata* (Girma et al., 2014; 2019). The ploidy level can also affect sex determination. We observed that individuals with a ploidy level higher than 2X flowered male or were non-flowering despite the presence of the W allele (sp16). Girma et al. (2014; 2019) also observed that cultivars with a high ploidy level were always male or non-flowering. Further investigations

are required to understand the interaction between ploidy level and genetic control of sex identity.

4.2. Homo/heterogametic System in *D. rotundata*

The sp1 marker is a CAPS marker associated with a region close to the Z allele, which allowed Tamiru et al. (2017) to demonstrate that sex identity of *D. rotundata* is governed by a ZZ/ZW (heterogametic female) system. The use of this marker in our study revealed four genotypes (AA, AB, BB and AC) in cultivated white Guinea yam from Benin with a very low frequency of BB and AC genotypes. These results contrasted with the observations of Tamiru et al. (2017). Such a discrepancy could be explained by the difference of analyzed material. Indeed, Tamiru et al. (2017) investigated the progeny of a biparental cross while this study investigated several cultivars. The marker sp1 allowed Tamiru et al. (2017) to observe two types of genotypes, one homozygous AA and one heterozygous AB, which respectively corresponded to the male and the female phenotype. Contrary to this description, our results showed that the homozygous AA genotype was rather associated with the female sex and the heterozygous AB genotype with the male sex in the Beninese cultivars of *D. rotundata*. Thus, our results suggested that cultivated white Guinea yam from Benin showed rather a heterogametic male XX/XY system based on sp1 marker analysis. Our hypothesis is in accordance with the genetic control of other yam species. Indeed, according to Martin (1966), males are characterized by a heterogametic XY system in the genus *Dioscorea*. The male heterogametic XY system was confirmed in *D. floribunda* (Cormier et al., 2019; Martin, 1966) and in *D. tokoro* (Terauchi and Kahl, 1999). More recently, the heterogametic XY system was also confirmed in *D. alata* (Cormier et al., 2019), a species that belongs to the Enantiophylum section of the *Dioscorea* genus, such as *D. rotundata.* (Cormier et al., 2019). However, recent studies have confirmed a female heterogamous ZZ/ZW system in Nigerian accessions (Asfaw et al., 2022; Sugihara et al., 2021).

Some authors suggested that the presence of a few homozygous males and heterozygous females is due to a transition from a heterogametic male XX/XY system to a heterogametic female ZZ/ZW system (Cormier et al., 2019), while others suggested that it is more the result of rare spontaneous hybridizations that the species has undergone in the past (Chair et al., 2010; Scarcelli et al., 2006). Both hypotheses are plausible in our case. On the one hand, the fact that the sp1 marker co-segregates with the male sex favors the

second hypothesis. On the other hand, the presence of the genotypes BB and AC, although very infrequent and of little-known origin to be informative, suggests that there is a beginning of reorganization of the heterogametic XX/XY system within *D. rotundata* from Benin, which thus favors the first hypothesis. In addition, the presence of the W allele (sp16) in 66% of analyzed individuals (including 42% of male individuals) and the fact that the sp16 marker did not allow good sex discrimination in our study for cultivars from Benin also favor the idea of a system in transition in white Guinea yam from Benin. Furthermore, we observed secondary amplifications for the sp1 marker in 60% of the individuals, mainly in cultivars with unstable sex identity. Even if the source of such amplifications is still unknown, they could reflect the strong recombination of this locus and could suggest a process in transition. Tostain et al. (2007) investigated the genetic diversity of white Guinea yam cultivars of Benin, including most cultivars analyzed in this study, using simple sequence repeat (SSR) markers. They observed that, in Benin, yam genetic diversity is organized according to cropping regions (Tostain et al., 2007). They also observed genetic differentiation according to the sex of the cultivars although this relationship requires further investigation. Recent studies based on molecular (SNP marker) and phenotypic data have revealed high genetic diversity in *D. rotundata* yam cultivars within the different cropping regions (Atakora, Borgou, Collines and Donga) of Benin (Agre et al., 2021); a diversity that is sometimes important within the same cultivar (Yolou, 2016). This partially explains the variability that we observed at the sexual locus through the SP1 marker tests. Also, the differences observed with the results from Tamiru et al. (2017) may lie on the one hand in the size of the population (relatively small) and on the other hand in the fact that they tested the SP1 marker on progeny from biparental crosses, in other words, individuals that are genetically very close, contrary to the populations of cultivated yams *D. rotundata* from Benin. It would be interesting to compare the chromosome organization between lines with stable sexual identity and lines with unstable sexual identity in order to see if the clue of sexual identity is in the chromosome makeup. In the same vein, comparing the sequences of pseudo chromosome 11 in line with stable and unstable sex (F vs. F+ and M vs. M+) could identify key genes and alleles in sexual determination. Our observations and the existence of sexual variations over years and locations in some cultivars suggested that sexual determination is not exclusively under genetic control. It would thus also be necessary to investigate

genotype–environment interactions in sex expression and explore whether sex determination of *D. rotundata* could be partly under epigenetic control.

5. Conclusions

After analysis of 119 individuals with sp16 and sp1 markers, our results showed that neither the sp16 nor the sp1 markers allowed a clear sex discrimination in the cultivated *D. rotundata* yams from Benin. We nevertheless observed that the best determinant of stable male cultivars was the absence of the sp16 marker and that the best determinant of stable female cultivars was the AA genotype of the sp1 marker. However, several cultivars had an unstable sex identity. Moreover, high ploidy level was associated with male or non-flowering phenotype, despite the presence of the female W allele. Analysis of the sp1 marker suggested that cultivated white Guinea yam from Benin showed a heterogametic male XX/XY system. However, the variability of our results pushes in favor of the possibility of a reorganization of this system and its transition to a ZZ/ZW system, but this hypothesis remains to be verified. Therefore, further and in-depth studies are required to elucidate the systems governing sexual chromosomes for a better understanding of sex determination in cultivated *D. rotundata* yams.

References

Agre, P., Nwachukwu, C., Olasanmi, B., Obidiegwu, J., Nwachukwu, E., Adebola, P., De Koeyer, *D.*, and Asrat, A. (2020). Sample preservation and plant sex prediction in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Agre, P. A., Dassou, A. G., Loko, L. E., Idossou, R., Dadonougbo, E., Gbaguidi, A., Mondo, J. M., Muyideen, Y., Adebola, P. O., and Asiedu, R. (2021). Diversity of white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivars from Benin as revealed by agro-morphological traits and SNP markers. *Plant Genetic Resources* **19**, 437-446.

Alam, S., Shylla, E., Bora, B., and Saud, B. (2014). Genetic variation in different cultivars of greater yam (*Dioscorea alata*). *Journal of root crops* **40**, 39-43.

Amusa, N., Adigbite, A., Muhammed, S., and Baiyewu, R. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* **2**, 497-502.

Arnau, G., Némorin, A., Maledon, E., and Abraham, K. (2009). Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L.(Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1239-1249.

Asala, S., Alegbejo, M., Kashina, B., Banwo, O., Asiedu, R., and Kumar, P. L. (2012). Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea spp*.) in Nigeria. *Glob. J. Biotechnol. Biosci* **1**, 163-167.

Asfaw, A., Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., and Akoroda, M. O. (2022). Association mapping of plant sex and cross-compatibility related traits in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) clones. *BMC Plant Biology* **22**, 294.

Assaba, E. I., Yolou, M., Totin Vodounon, H., Quenum, G. A., and Zoundjihekpon, J. (2018). Caractéristiques des graines d'ignames cultivées du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis—Dioscorea rotundata* et évolution du taux de germination des graines. *Afr. Sci* **14**, 195-208.

Ayisah, K. *D.*, and Gumedzoe, Y. M. *D.* (2012). Genetic diversity among yam mosaic virus (YMV) isolates infecting yam of the complex *Dioscorea cayenensis rotundata* in Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **6**, 1090-1101.

Bousalem, M., Dallot, S., and Guyader, S. (2000). The use of phylogenetic data to develop molecular tools for the detection and genotyping of

Yam mosaic virus. Potential application in molecular epidemiology. *Journal of virological methods* **90**, 25-36.

Chair, H., Cornet, *D.*, Deu, M., Baco, M. N., Agbangla, A., Duval, M.-F., and Noyer, J.-L. (2010). Impact of farmer selection on yam genetic diversity. *Conservation Genetics* **11**, 2255-2265.

Cormier, F., Lawac, F., Maledon, E., Gravillon, M.-C., Nudol, E., Mournet, P., Vignes, H., and Arnau, G. (2019). A reference high-density genetic map of greater yam (*Dioscorea alata* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **132**, 1733-1744.

Coursey, *D.* G. (1972). The civilizations of the yam: interrelationships of man and yams in Africa and the Indo-Pacific region. *Archaeology & Physical Anthropology in Oceania* **7**, 215-233.

Daïnou, O., Agbangla, C., Berthaud, J., and Tostain, S. (2002). Le nombre chromosomique de base des espèces de *Dioscorea* constituant la section Enantiophyllum pourrait être égal à x= 20. Quelques preuves. *In* "Annales des Sciences Agronomiques du Bénin", Vol. 3, pp. 21-43.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Dansi, A., Pillay, M., Mignouna, H., Daïnou, O., Mondeil, F., and Moutairou, K. (2000). Ploidy level of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata* complex) from Benin Republic as determined by chromosome counting and flow cytometry. *African Crop Science Journal*, **8**, 355-364.

Darkwa, K., Olasanmi, B., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020). Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp*.) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

Degras, L. (1986). L'igname: plante à tubercule tropicale.

Egesi, C. N., Onyeka, T., and Asiedu, R. (2009). Environmental stability of resistance to anthracnose and virus diseases of water yam (*Dioscorea alata*). *African Journal of Agricultural Research* **4**, 113-118.

Fakorede, J., Faouziath, S., Estelle, L. Y. L., Anicet, *D.* G., Célestin, T., Oladeinde, O., Innocent, B. Y., and Alexandre, *D.* A. (2020). Evaluation of proximate, sugars and mineral compositions of 48

yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars used as parents in a breeding program in Republic of Benin. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* **9**, 1663-1682.

FAOSTAT (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available on line: http://www.fao.org/faostat/en/#home (Accessed on 15th April 2019).

Fulton, T. M., Chunwongse, J., and Tanksley, S. *D.* (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant molecular biology reporter* **13**, 207-209.

Girma, G., Hyma, K. E., Asiedu, R., Mitchell, S. E., Gedil, M., and Spillane, C. (2014). Next-generation sequencing based genotyping, cytometry and phenotyping for understanding diversity and evolution of guinea yams. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1783-1794.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Lebot, V., Abraham, K., Kaoh, J., Rogers, C., and Molisalé, T. (2019). Development of anthracnose resistant hybrids of the Greater Yam (*Dioscorea alata* L.) and interspecific hybrids with *D. nummularia* Lam. *Genetic Resources and Crop Evolution* **66**, 871-883.

Lim, T. (2016). *Dioscorea rotundata*. *In* "Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants", pp. 291-300. Springer.

Loko, Y., Dansi, A., Agre, A., Akpa, N., Dossou-Aminon, I., Assogba, P., Dansi, M., Akpagana, K., and Sanni, A. (2013). Perceptions paysannes et impacts des changements climatiques sur la production et la diversité variétale de l'igname dans la zone aride du nord-ouest du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **7**, 672-695.

Martin, F. W. (1966). Sex ratio and sex determination in *Dioscorea*. *Journal of Heredity* **57**, 95-99.

Nwankwo, I., and Bassey, E. (2013). A study of variability and heritability for yield and yield related traits in guinea white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) genotypes in Umudike, Southeastern Nigeria. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* **2**, 122-127.

Ogaraku, A., and Usman, H. (2008). Storage Rot of Some Yams (*Dioscorea spp*) in Keffi and Environs, Nasarawa State, Nigeria. *Patnsuk J* **4**, 22-27.

RDevelopment, and C.TEAM (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2012; Available online: http://www.R-project.org (accessed on 30 June 2019).

Scarcelli, N., Daïnou, O., Agbangla, C., Tostain, S., and Pham, J.-L. (2005). Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* (2n= 40). *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 226-232.

Scarcelli, N., Tostain, S., Vigouroux, Y., Agbangla, C., Daïnou, O., and Pham, J. L. (2006). Farmers' use of wild relative and sexual reproduction in a vegetatively propagated crop. The case of yam in Benin. *Molecular ecology* **15**, 2421-2431.

Sugihara, Y., Kudoh, A., Oli, M. T., Takagi, H., Natsume, S., Shimizu, M., Abe, A., Asiedu, R., Asfaw, A., Adebola, P., and Terauchi, R. (2021). Population Genomics of Yams: Evolution and Domestication of *Dioscorea* Species. Springer International Publishing, Cham. pp. 1-28.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Terauchi, R., and Kahl, G. (1999). Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome* **42**, 752-762.

Thouvenel, J.-C., and Dumont, R. (1990). Perte de rendement de l'igname infectee par le virus de la mosaique en Côte d'Ivoire.

Tostain, S., Agbangla, C., Scarcelli, N., Mariac, C., Daïnou, O., Berthaud, J., and Pham, J.-L. (2007). Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Genetic Resources* **5**, 71-81.

Yolou, M. (2016). Diversité génétique des ignames africaines cultivées (Complexe *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* et *D. dumetorum*) et perception des paysans du Centre-Bénin des questions des droits de propriété intellectuelle. Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. *D.*, and Zoundjihekpon, J. (2015a). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., Zoundjihekpon, J., Assaba, E. I., Anizehou, I., and Akoegninnou, A. (2015b). La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et *D. dumetorum*) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492.

Zoundjihekpon, J., Essad, S., and Toure, B. (1990). Dénombrement chromosomique dans dix groupes variétaux du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*. *Cytologia* **55**, 115-120.

Supplementary data

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        10         20         30         40         50         60         70
Female           AATGTGTTTA ACAGGGTGAA TTCAAGAAAA CATACAATTC ACTTAAAAGA CAATCTCACC GCTCAAAAAA
Male             AATGTGTTTA ACAGGGTGAA TTCAAGAAAA CATACAATTC ACTTAAAAGA CAATCTCACC GCTCAAAAAA
Clustal Co       ********** ********** ********** ********** ********** ********** **********

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        80         90        100        110        120        130        140
Female           AAAAATGAAA AAAATCACTA TCTGAATATC CTTGTCATCA AAATTCAAGA TGTTCAATGG GATGAATTCA
Male             AAAAATGAAA AAAATCACTA TCTGAATATC CTTGTCATCA AAATTCAAGA TGTTCAATGG GATGAATTCA
Clustal Co       ********** ********** ********** ********** ********** ********** **********

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       150        160        170        180        190        200        210
Female           AAAAGATGTA CAATCAACTT AAAAGATGCA ATTATCAACC AAATAAAAAA AAAAAAGGAA TCAAAATCTT
Male             AAAAGATGTA CAATCAACTT AAAAGATGCA ATTATCAACC AAATAAAAAA AAAAAAGGAA TCAAAATCTT
Clustal Co       ********** ********** ********** ********** ********** ********** **********

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
                       220        230        240        250        260
Female           ACTATCTTAG TGTACAATTG TCAAAATTGA ATAAGTATAT TCGGCTGAAT TC
Male             ACTATCTTAG TGTACAATTG TCAAAATTGA ATAAGTATAT TCGGCTGAAT TC
Clustal Co       ********** ********** ********** ********** ********** **
```

Figure S1: Comparison of the sp16 marker sequence in female and male individuals of *D. rotundata* from Benin. The aligned sequences are consensus sequences of the sequencing of respectively two female and three male cultivars.

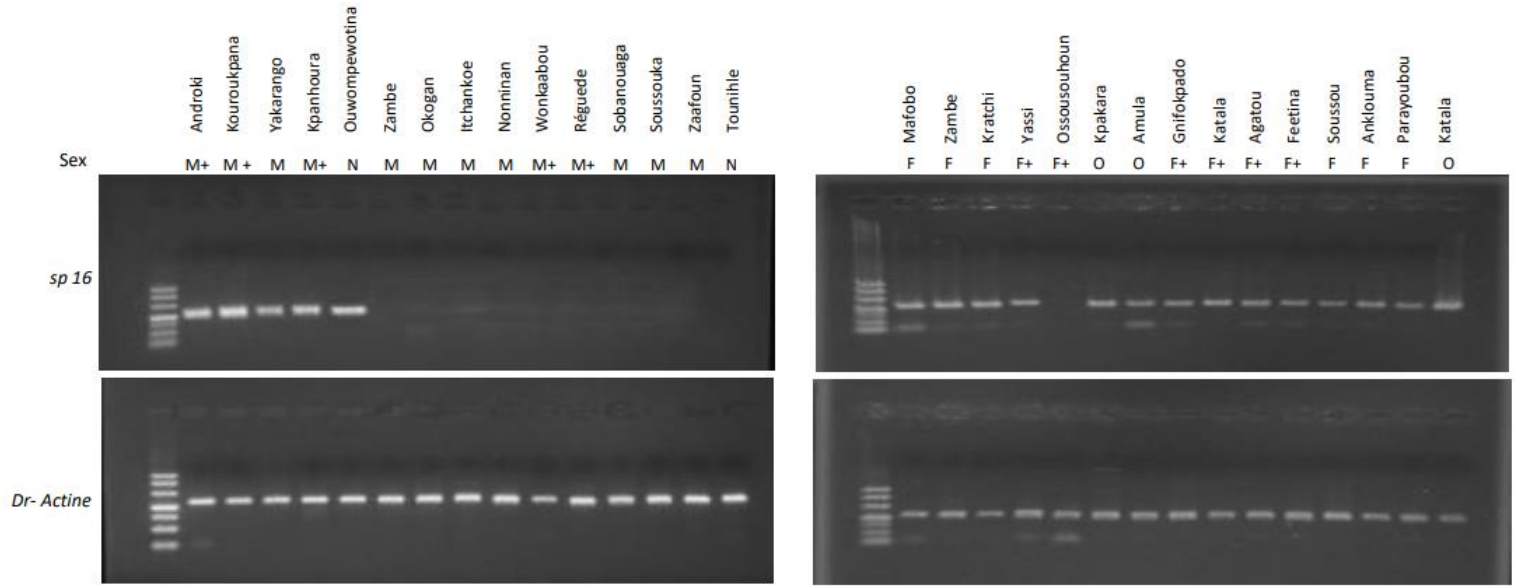


Figure S2: Analysis of the genetic marker sp16 in a few cultivars of *D. rotundata* from Benin. Dr-Actine is used as a positive control. These gels are the same as shown in Figure 2. M, stable male; M+, unstable male; F, stable female; F+, unstable female; O, monoecious; and N, non-flowering

Table S1: List of the cultivars analyzed with indication of the sex, flowering history, ploidy level, and results for sp16 and sp1 markers.

N°	Cultivars[a]	History of flowering[b]	Sex[c]	ploidy level[d]	sp16 marker	sp1 genotype	sp1 OA
1	Adigbiri (Djikpiri)	F (1) ; F (6,Z)	F	2X	Present	AA	Absent
2	Adjouadjere	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Absent	AB	Absent
3	Agatou (issou)*	F (1); F (3,C) ; (4,C); NF (5,Be); F,M,O (6,Z).	M+	2X	Present	AB	Absent
4	Agatou (issou)*		F+	2X	Present	AA	Absent
5	Agatou (issou)*		O	2X	Present	AB	Present
6	Ahimon	F,M,O (1) ; F (2,B&C); F (3,C); M,O (4,C); F (6,Z)	F+	2X	Present	AB	Present
7	Ala n'Kodjewe	M (1); NF (2,Z); M,F(4,C); M,F (6,Z)	M+	2X	Present	AB	Present
8	Ala n'Kodjewe*		F+	2X	Present	AA	Absent
9	Alakissa	M (1); M (2,B); (3,C); M (5,Be) M (6,Z).	M	4X	Present	AB	Present
10	Amoula*	M (4,C) ; M,O (6,Z)	M+	-	Absent	AB	Present
11	Amoula*		O	-	Present	AB	Present
12	Androki	NF (1) ; F (4,C), M (6,Z)	M+	2X	Present	AB	Present
13	Ankpoloman (Anklouman)	F (1); F (4,C), F (6,Z)	F	2X	Present	AB	Absent

14	Assina	M (4,C), M (6,Z)	M	-	Present	AB	Present
15	Bakarko	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Present	AB	Present
16	Baniakpa	M (1) ; M (2,B); M (4,C), M (6,Z)	M	2X	Present	AA	Present
17	Banioure Bagarou	F (1), M (4,C) M (6,Z)	M+	2X	Absent	AB	Present
18	Banioure Montogue	F (1), M (2,B); M,O (4,C) M (6,Z)	M+	2X	Absent	BB	Absent
19	Banioure Oloukobi	F (1) ; (2,B); M, O (4,C) F (6,Z)	F+	2X	Present	AA	Absent
20	Baridjo	M (1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	3X	Present	AB	Absent
21	Bobatchinga	O (4,C), NF (5,Be); M (6,Z).	M+	-	Present	AB	Absent
22	Bobo	M (4,C), M (5,Be); M (6,Z).	M	-	Present	AB	Present
23	Brizi	M (1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Present	AB	Present
24	Ceteboua	F (4,C) ; F (6,Z)	F	-	Present	AA	Absent
25	Dambani	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Present	AB	Present
26	Damboura	F (4,C) ; F (6,Z)	F	-	Present	AA	Absent
27	Danmoula	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Absent	AB	Absent
28	Dantekewo	M (2,A) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Absent	AB	Absent
29	Deba	M (1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Absent	AB	Absent
30	Dietouba	M (1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Absent	AB	Absent

	(Nindouin)						
31	Dodo (Nonforwou)*	F (1) ; F(2,Z); O (3,C) ; M,F (4,C) ; M,F (5,Be); M,F (6,Z).	M+	2X	Present	AB	Absent
32	Dodo (Nonforwou)*		F+	2X	Present	AA	Present
33	Doundoua	M (1); M (6,Z)	M	4X	Present	AB	Absent
34	Effourou	F (1); F (6,Z)	F	2X	Present	AA	Absent
35	Feetina (Feni)	M (1) ; M (4,C) ; F (6,Z)	F+	2X	Present	AB	Present
36	Flou	M (3,C); M (4,C) ; M (6,Z); M (5,Be)	M	-	Absent	AB	Present
37	Gnalabo*	F (1); NF (2,C); F (3,C); M,F,O (4,C) ; NF (5,Be); M,F,O (6,Z);	F+	2X	Present	AA	Present
38	Gnalabo*		O	2X	Present	AB	Present
39	Gnalabo*		M+	2X	Present	AB	Present
40	Gnidou*	M,F,O (1); NF (2,C);F,O (6,Z)	O	2X	Present	AC	Present
41	Gnidou*		F+	2X	Present	AB	Present
42	Gnifokpado	F (1); F(2,Z); M (4,C); F (6,Z).	F+	2X	Present	AA	Present
43	Guirisaa	M (1) ; M (4,C) ; F (6,Z)	F+	2X	Present	AB	Present
44	Gourouko	M(1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Absent	AB	Present
45	Heapala	F (3,C); M (4,C) ; NF (5,Be 2019); M (6,Z)	M+	-	Present	AB	Present
46	Idoro	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Absent	AB	Absent
47	Inimbo	M (1) ; M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Absent	BB	Present
48	Itchankoe	M (4,C) ; M (6,Z)	M	-	Absent	AB	Present

49	Kagourou	M (1); M (2,B); M (4,C) ; M (6,Z)	M	2X	Absent	AB	Absent
50	Kain*	M (4,C) ; M,F (6,Z)	M+	-	Present	AB	Present
51	Kain*		F+	-	Present	AB	Present
52	Kangni	F (1); F (2,C); F (4,C) ; F (6,Z)	F	2X	Present	AA	Absent
53	Katala*	F (2,C); M,F,O (4,D); NF (5,Be 2019); F,M,O (6,Z).	M+	-	Present	AC	Present
54	Katala*		F+	-	Present	AA	Present
55	Katala*		O	-	Present	AB	Present
56	Kinkerekou	M (1) ; F (4,C) ; M (6,Z).	M+	2X	Present	AB	Present
57	Kodjewe	M (2,C&Z); M (4,C) ; M (6,Z).	M	-	Absent	AA	Absent
58	Kokone	M (1); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	AA	Present
59	Kouroukpana	F (4,C); M (6,Z).	M+	-	Present	AB	Present
60	Kpagninan	M (4,C); F (6,Z).	F+	-	Present	AA	Absent
61	Kpakara (Danwari)*	F (1); F (2,B); F (3,C); M,F,O (4,C); M,F,O (6,Z).	M+	2X	Present	AA	Absent
62	Kpakara (Danwari)*		F+	2X	Present	AA	Absent
63	Kpakara (Danwari)*		O	2X	Present	AA	Present
64	Kpanhoura	M (1) ; M,F,O (4,C); M (6,Z).	M+	2X	Present	BB	Present
65	Kpiedje (piedje)	F (1) ; M,F,O (4,C); M	M+	2X	Present	AB	Present

		(6,Z).					
66	Kpika	M (1) ; F, O (4,C) ; M (6,Z)	M+	2X	Present	AB	Present
67	Kpokpowounda	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
68	Kpona	M (1), M (2,B);F (4,C); F (6,Z).	F+	2X	Present	AB	Present
69	Kpona anye	M (2,B); M (4,C); M (6,Z).	M	-	Present	AB	Present
70	Kratchi (Klachi)	F (1); F (2,C); F (3,C); F (4,C); F (6,Z).	F	2X	Present	AA	Present
71	Laboko Nord*	M (1); MFO (4,D); MFO (6,Z).	F+	2X	Present	AA	Absent
72	Laboko Nord*		O	2X	Present	AC	Present
73	Laboko Nord*		M+	2X	Present	AB	Present
74	Laboko sud*	M (1); M (2,C); M (3,C); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	AC	Absent
75	Mafobo	F (1); F (2,C); F (3,C); F (4,C); F (6,Z).	F	2X	Present	AA	Absent
76	Monji	F (1); F (2,B); F (3,C); F (4,C); M (6,Z).	M+	2X	Absent	AB	Present
77	Mororokrou (Anago)	F (1); F (2,B); F (3,C); F (4,C); F (6,Z).	F	2X	Present	AA	Present
78	Nangangambina	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Present	AB	Present
79	N'dorsi	F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AA	Absent
80	Nonninan	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present

81	Noualai pangui	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	BB	Absent
82	Noualai Poua	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Absent
83	Noualaye	M (1); M (2,B); M,F,O (4,C); M (6,Z).	M+	2X	Present	AB	Present
84	Okogan (klogan, Klogo)	M (1); M (3,C); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Present
85	Orou (Yinsingue, Orouguiwa)	M (1); (2,B); M (6,Z).	M	2X	Present	AB	Present
86	Oroutanai	M (1); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Absent
87	Ossoukpana (Ossousouhoun)	M (1); F (6,Z).	F+	2X	Absent	AB	Absent
88	Ouwompeotina	M (1); NF (6,Z).	NF	3X	Present	AB	Present
89	Parayoubou	F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AB	Absent
90	Porchehbim	M (1); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Present	AB	Present
91	Reguede*	F (4,C); M,F (6,Z).	M+	-	Absent	BB	Present
92	Reguede*		F+	-	Present	AA	Present
93	Singou	M (1); M (2,B); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Absent
94	Sobanouaga (Sobasson)	M (1) M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Absent
95	Sounoudounou	M (2,B); M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
96	Sousounin	M (1); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Present
97	Souanbou	F (1); (2,A); F (4,C); F	F	2X	Present	AA	Present

		(6,Z).					
98	Soussouka*	M (1); M (2,B); MF (6,Z).	M+	2X	Absent	AB	Absent
99	Soussouka*		F+	2X	Present	AA	Absent
100	Tatimanin (Tabane)	M (1); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Present	AA	Present
101	Tchindjounga	M (3,C); M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Absent
102	Tinondati	M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	BB	Present
103	Tounihle	M (2,B);NF (3,C); NF (4,D); NF (6,Z).	NF	-	Absent	AB	Present
104	Walassi	NF (1); NF (4,C); NF (6,Z).	NF	2X	Absent	AA	Absent
105	wolouchahabim	M (1); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Absent	AB	Present
106	wonigeenan	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
107	Wonkaabou (Douba)	F (1); F (2,A); F (4,C); M (6,Z).	M+	2X	Absent	AB	Absent
108	Wourou	F (2,B); F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AB	Present
109	Yaka	M (1); F (4,C); M (6,Z).	F+	2X	Present	AA	Present
110	Yakarango	M (1); M (2,B); M (4,C); M (6,Z).	M	2X	Present	AB	Present
111	Yobore (Yoble)	F (1); F (4,C); F (6,Z).	F	2X	Present	AB	Present
112	Yombini	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Present	AB	Present
113	Yombiri	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
114	Yonmonwou	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Present	AB	Absent

115	Yonouan	F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AC	Present
116	Yorouba doun	F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AB	Present
117	Zaafoun	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
118	Zambe	M (4,C); M (6,Z).	M	-	Absent	AB	Present
119	Zaminin	F (4,C); F (6,Z).	F	-	Present	AB	Present

a*= repeated cultivars, individuals of different sex were harvested when present for cultivars with variable sex,

[b]Sex of cultivars according to: 1 = Dansi et al., 1999 ; 2 = Tostain et al., 2007 ; 3 = Yolou et al., 2015a ; 4 = personal observations during a prospecting campaign in the fields of yam producers in Benin in 2017-2018 ; 5 = personal observations in greenhouse experiments in Belgium in 2019 ; 6 = personal observations in the field of CREFISDA in Benin in 2018-2019 (plants used for this study); When the information is available, the region of Benin where the observation was carried out is specified: A = Atacora (10°45'0''N ,1°40'0''E); B= Borgou (9°45'0''N, 2°45''E), C = Collines (8°0'0''N, 2°10'0''E), D = Donga (9°19'59'N, 1°46'59''E) and Z = Zou (7°15'0''N, 2°10'0''E)

[c]Sex (M, F, O, NF) of the plant used in this study. The sign (+) indicates that another sex was reported at least once for this cultivar based on previous observations (literature or personal observations); M = Male, F = Female, O = Monoic and NF = Non-flowering);

[d]Ploidy level as revised from Dansi et al. (2000), with X = 20 (Tamiru et al., 2017) instead of X = 10 (Dansi et al., 2000)

Inter-chapitre Chapitre II-Chapitre III

Ce qu'on sait déjà.

Les travaux précédents ont montré que les ignames cultivées *D. rotundata* sont sujets à une variation spontanée de sexe d'une année à l'autre ou d'un milieu à l'autre (chap I et II). Bien qu'il existe un contrôle génétique, les marqueurs génétiques SP1 et SP16 mis au point par Tamiru et al. (2017) n'ont pas permis de prédire le sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin de façon efficace (chap II). Les paramètres responsables de la variation du sexe restent donc à déterminer.

Les ignames se propagent végétativement à partir de tubercule-semences qui sont généralement des fragments issus d'un long tubercule. Selon la taille des tubercules, ils sont coupés le plus souvent en 3 sections (tête, milieu et base) ou dans une moindre mesure en 2 (tête et base). Certains auteurs ont observé que deux fragments (tête et base) issus d'un même tubercule de plante femelle ont généré deux plantes dont l'une ayant exprimé le sexe mâle et l'autre, le sexe femelle (Dansi et al, 1999). On observe également des variations de sexe dans les champs des producteurs d'igname qui, pour la plupart, obtiennent les tubercule-semences par sectionnement de longs tubercules (observations personnelles, 2018). L'origine du tubercule semence pourrait-il impacter le sexe de la plante ? Elle semble en effet impacter le développement des plantes chez l'igname. Par exemple, Miège (1957) a observé un gradient de concentration en grains d'amidon le long de tubercule d'ignames *D. alata* et *D. cayenensis* et confirme l'impact d'une telle différence de gradient sur la germination des fragments de tubercules.

Le but visé dans ce troisième chapitre

Le chapitre III vise à rechercher les causes physiologiques de la variation du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin. Il s'agira de :

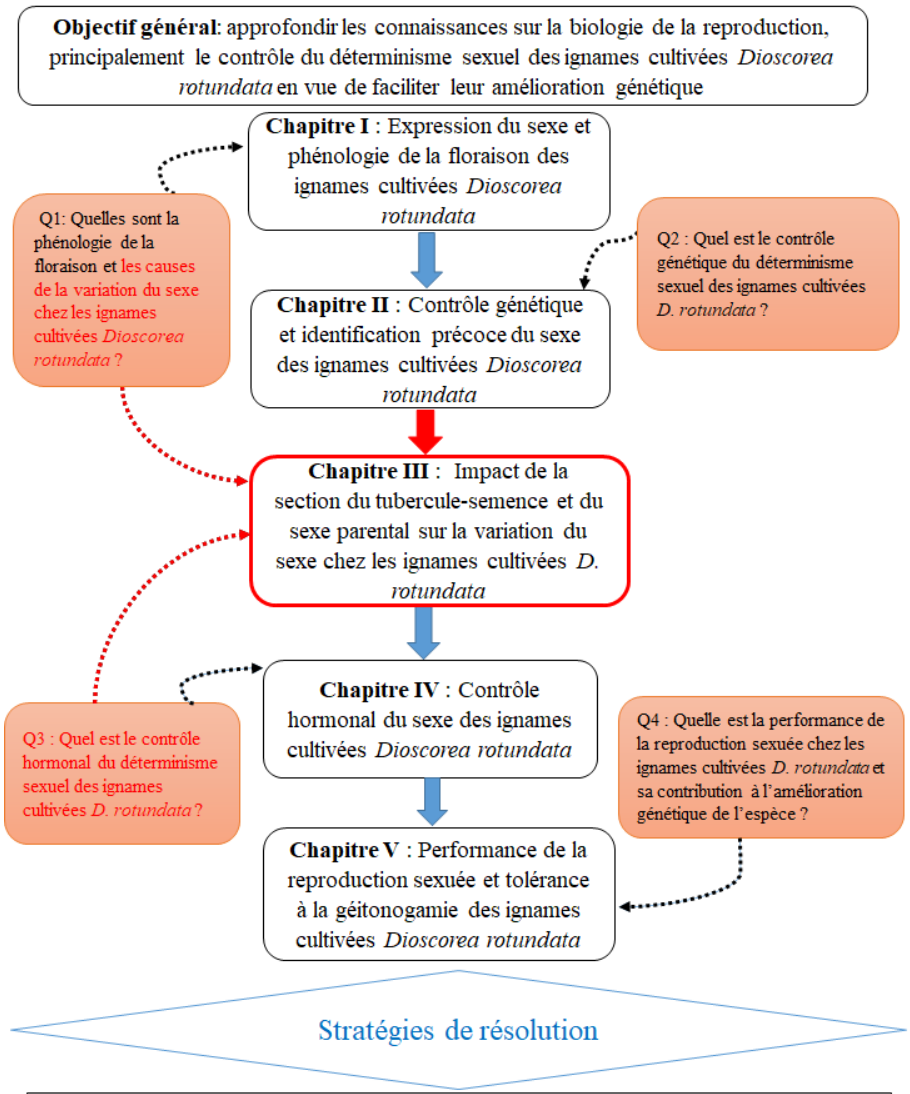
- Analyser l'impact des fragments de tubercule-semence et du sexe parental sur l'expression du sexe ;
- Rechercher un éventuel gradient hormonal le long des tubercules et sa corrélation avec l'expression du sexe.

La stratégie utilisée

Six cultivars (2 mâles, 2 femelles et 2 monoïques), les mêmes qui ont fait l'objet d'évaluation de paramètres floraux dans le chapitre 1 ont été utilisés

pour une culture en champ (conditions naturelles). Les tubercules-semences étaient issus de fragments (tête, milieu et base) de longs tubercules et un suivi de la germination et de la floraison (temps et taux) a été fait. L'expression du sexe a été particulièrement suivie en fonction des fragments de tubercule-semences et du sexe parental afin de voir si l'un et/ou l'autre peut expliquer la variation du sexe observée chez *D. rotundata*.

Par ailleurs, le profil hormonal a été analysé dans les différentes tranches de tubercules de deux cultivars sub-dioïques (qui ont montré le plus de variabilité du sexe) afin de voir si la variation du sexe pourrait être liée à une différence de concentration en phytohormones.



Aperçu des relations inter-chapitres et stratégies de résolution.

Chapitre III. The sex of the mother plant affects the sex variation in the offspring in *Dioscorea rotundata*

Narcisse Denadi[1,2,3], Gabin Agban[2,3], Aline Vanhove[1], Elie Assaba[3], Petre I. Dobrev[4], Václav Motyka[4], Jeanne Zoundjihékpon[3] Christophe Gandonou[2] and Muriel Quinet[1]

1Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-laNeuve Belgium

[2]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP526, Benin;

[3]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP4521, Benin.;

[4]Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojova 263, Prague 6, 16502, Czech Republic.

Abstract

In cultivated yams *Dioscorea rotundata*, spontaneous sex variation occurs in the offspring despite vegetative propagation. In this study, sex variation was examined as a function of the region (head, middle, or base) of the seed-tuber and the sex of the mother plant. Seeds were sown from the head, middle, and base regions of tubers of 6 cultivars, and germination, flowering and sex of the offspring were examined. To determine a possible relationship between the hormone content of the mother tuber and sex variation, the phytohormone profile of the head, middle, and base regions was compared in tubers from male, female, and monoecious plants. Our results showed that the region of the seed-tuber affected the germination rate and time as well as flowering time, but not the sex of the offspring. Sex variations in the offspring were more related to the sex of the parents. Male and female cultivars had stable offspring, while monoecious cultivars had high sex variation in their offspring. The hormone profile of tubers indicated a relationship between hormones and sex identity. Jasmonates and salicylic acid were more concentrated in the tubers of male and monoecious plants, while abscisic acid types, cytokinins, and benzoic acid were more concentrated in the tubers of female plants. Further work is needed to clarify the role of these hormones in the control of sex expression in cultivated yam *D. rotundata*.

Key words: *Dioscorea rotundata*, sex variation, seed-tuber region, phytohormones.

1. Introduction

Yam is one of the main crops in the tropics and subtropics. The genus *Dioscorea* contains more than 630 species (Sugihara et al. 2021), but very few are cultivated. The cultivated yam species differs from one region to another but *D. rotundata* (Poir.) (syn. *Dioscorea cayenensis-rotundata* (L.)) is widely cultivated in West Africa (Price et al. 2018) and in Benin in particular (Dansi et al. 1999). In Benin, it is cultivated in the Centre and North of the country where it represents the staple food for the populations (Aboudou and Auriole 2006). It is an important source of income for more than 75% of the rural population (Loko et al. 2013) and contributes to more than a third of the caloric intake in the production areas (Adejumo et al. 2013). Yam production has almost doubled in the last decade thanks to the new agricultural technologies and the high demand due to population increase (FAOSTAT 2021). However, yields remain 5 times lower than expected (FAOSTAT 2021). Phytosanitary problems, drought or floods linked to climate change (Akagha et al. 2021; Ntui et al. 2021; Ignatius et al. 2019; Pwakem et al. 2020; Nwadili et al. 2017; Mani et al. 2016; Padhan and Panda 2020) are all causes of these low yields. Moreover, little research has been done on the genetic improvement of cultivated yams *D. rotundata* (Denadi et al. 2022). The vegetative reproduction adopted as the main mode of propagation could be one of the reasons for the low genetic improvement. Nevertheless, several studies have shown that flowering and fruiting have been preserved in yam so that sexual reproduction could generate flowering plants with tubers (Mondo et al. 2020; Mondo et al. 2022; Assaba et al. 2018; Yolou et al. 2015a; Yolou et al. 2015b). *Dioscorea rotundata* is essentially characterised by dioecy, although monoecious plants bearing male and female flowers on the same plant are observed (Darkwa et al. 2020; Mondo et al. 2020).

Even though sexual reproduction gives a possibility of genetic improvement and/or of seed production, vegetative reproduction by tubers remains the only option used by yam producers until now. Apart from *D. esculenta*, *D. trifida* and *D. bulbifera*, which are grown from whole tubers (micro-tubers), the other species of the genus *Dioscorea* are generally propagated from tuber fragments (Mathurin and Degras 1975; Brice et al. 2016). In *D. rotundata*, growers use small tubers from the second harvest (for early two-harvest

cultivars). However, in late single-crop cultivars or in absence of a second harvest for the early cultivars, growers use relatively long tubers that are usually cut to generate seed-tuber sections (head, middle and base) or sometimes "minisetts" (Brice et al. 2016). The use of these long tubers for propagation is at the detriment of the tuber yield.

Research focusing on the characterisation of flowering in yam has repeatedly mentioned spontaneous variations in sex with sometimes a difference in sex between individuals coming from the same tuber (Dansi et al. 1999; Girma et al. 2019). For instance, Dansi et al. (1999) obtained both a female and a male individual from two fragments of a same tuber produced by a female plant. These observations have motivated research focusing on the question of genetic sex determination in yam in recent years (Tamiru et al. 2017; Cormier et al. 2019; Denadi et al. 2020; Alabi et al. 2019). These studies showed that sex identity is genetically determined in *D. rotundata* but that sex determination is also strongly influenced by the environment, as are most traits within the species (Hamadina et al. 2009; Alabi et al. 2019; Alam et al. 2014; Nwankwo and Bassey 2013). Spontaneous sex modifications due to environmental factors were observed in other monoecious and dioecious cultivated species such as *Zea mays*, *Elaeis guineensis*, *Rumex hastatulus*, *Humulus japonicus* and *Cannabis sativa* (Freeman et al. 1980; Adam et al. 2011; Orozco-Arroyo et al. 2012). For a plant like yam that reproduces from the tuber, it would be unwise to ignore the influence of the intrinsic environment of the seed-tuber when considering the environmental factors that impact on the physiological functions of the plant. In 1952, Sawada observed in *D. batatas* that fragments from the head of the tubers germinated earlier than fragments from the middle or the base of the tubers (Sawada 1952). In 1957, Miège observed that starch grains were not evenly distributed along the tuber in *D. cayenensis* and *D. alata* and that this unequal distribution influenced the germination of the seed-tuber fragments and the yield of the daughter plants (Miège 1957). In *D. rotundata*, research has also been done on the impact of the size of the seed-tuber (whole tuber or fragment) and its origin (head, middle or base) on germination (Kalu et al. 1989; Zoundjihekpon et al. 1995; Ayankanmi et al. 2005; Ondo Ovono et al. 2007). However, none of these studies has examined the influence of the seed-tuber on the frequently observed sex variations.

Considering that the fragmentation of the tubers is a main method of seed-tuber production in *D. rotundata*, this study aims to evaluate the influence of

the seed-tuber fragment (head, middle and base) and the sex of the parent plant on germination, flowering and sex variation in the offspring. We also considered whether a possible phytohormonal gradient along a tuber could explain the observed modifications.

Thus, this study aims to evaluate the influence of the seed-tuber fragment (head, middle and base) and the sex of the parent plant on germination, flowering and sex variation in the offspring. We also considered whether a possible hormonal gradient along a tuber could explain the observed modifications.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Seven cultivars (Laboko, Agatou, Katala, Alakissa, Gnidou, Flou et Anago) of yams *Dioscorea rotundata* grouped in 3 categories were used in this study:

- Male (M): Alakissa and Flou ; plants of these cultivars usually produce male flowers.
- Female (F): Gnidou and Anago; plants of these cultivars usually produce female flowers.
- Mix (Mx): Agatou, Laboko and Katala; plants of these cultivars produce either male, or female or monoecious plants.

Six of them (Agatou, Katala, Alakissa, Gnidou, Flou and Anago) were used for the field experiments and two (Katala and Laboko) were subsequently used for hormonal quantification.

2.2. Experimental site

Field trials were performed at the 'Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole' (CREFIISDA). This center covers an area of 24 ha and is located in the commune of Zogbodomey (village of Lomey, 6°56' -7°08' North, 1°58' - 2°24' East). This region has an herbaceous vegetation on a clay soil characterised by good water retention, which is favorable to yam cultivation. The average annual temperature was 26.8°C, the annual rainfall was 1244 mm and the average photoperiod was 12/12h.

2.3. Seed-tuber production, sowing and experimental design

The field experiment covered two consecutive years. The first year mainly investigated the impact of the tuber fragment on the germination, flowering and sex identity of the offspring and the second year mainly investigated the impact of the sex of the mother plant on the sex identity of the offspring.

At the end of the 2017-2018 agricultural season, mother plants were selected for the different cultivars at full bloom in the field and their sex identity was determined. The selected plants were weaned in December 2018 and their tubers were kept on site in bute for one month before being dug up and transferred to the attic of CREFIISDA where they spent a further 3 months of dormancy. Thus, the origin and sex of the mother plant was known for each tuber.

In the first year of field experiment, seed production was based on healthy mother tubers with an average weight of 800 to 2000 g. Tubers were cut transversely to obtain three pieces per tuber from the nodal (head), proximal (middle) and distal (base) regions (Figure 1). These fragments were healed with dry ash for 3 days in the shade. Twenty fragments per tuber region and cultivar were used as seed-tubers (Table S1). For the cultivars Alakissa and Flou, all tuber fragments came from male plants; for the cultivars Gnidou and Anago, all tuber fragments came from female plants; for the cultivars Agatou and Katala, tuber fragments came from 12 monoecious, 4 female and 4 male plants to fit with the sex ratio naturally observed in the field (2017-2018 survey). For sowing, mounds were designed in a single block with 12 mounds per line for a total of 32 lines. A distance of 1.5 m separated the ridges. Sowing was performed on 11 May 2019 according to a split-plot design.

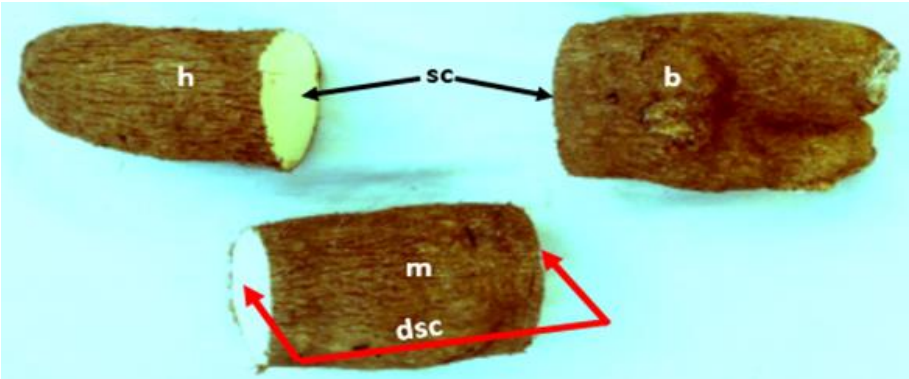


Figure 1: Seed-tuber production by cutting a whole tuber into three pieces, the head (h) and base (b) with a single scar (sc) and the middle (m) with a double scar (dsc).

In the second year of field experiment, whole tubers from the first year cultivation were used as seed-tubers. Between 26 and 32 tubers were used for male (Alakissa, Flou) and female (Gnidou, Anago) cultivars and 37 tubers (8 from males, 18 from females and 11 from monoecious) and 47 tubers (13 from males, 9 from females and 25 from monoecious) were used for Katala and Agatou, respectively (Table S1). Sowing was performed on 15 May 2020 following the same design as previously described.

2.4. Measured parameters

In the first year, the germination date, the flowering date and the sex (male, female or monoecious) were identified for each plant. The germination rate (GR, %) was calculated as the ratio between the number of germinated and seeded tubers. The flowering rate (FR, %) was calculated as the ratio between the number of flowering and germinated plants. The germination time (GT) was calculated as the number of days between the sowing and the germination dates. The flowering time (FT) was calculated as the number of days between the germination and the flowering dates. In the second year, only the sex of the plant was identified.

2.5. Hormonal quantification in the tubers

The phytohormone profile along the tuber was determined in freshly harvested tubers of male, female, and monoecious plants of *D. rotundata* cultivars Katala and Laboko. These cultivars were chosen because of their ability to produce male, female and monoecious plants. Analyses were carried out in three biological replicates for each variant. Concentrations of endogenous cytokinins (CKs), auxins (indole-3-acetic acid, IAA, and its derivatives), salicylic acid (SA), benzoic acid (BzA), jasmonates (jasmonic acid, JA, and its derivatives), abscisic acid (ABA) and its derivatives, and ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), were determined. From each tuber, 100 to 300 mg of fresh material was taken from each region (head, middle, and base) with 3 replicates per region. Sampling was performed at the Centre of each tuber slice, maintaining a 120° angle between sampling points. A total of 54 samples were analysed, 27 per cultivar. Phytohormones were extracted with methanol/formic acid/water (15:1:4, by volume) from tissues frozen and homogenized in liquid nitrogen and then purified by the dual-mode solid-phase method of (Dobrev and Kamınek). Two phytohormone fractions were obtained;

fraction A (eluted with methanol) containing the acidic and neutral hormones (auxins, SA, BzA, jasmonates, ABA-types) and fraction B (eluted with 0.35 M NH_4OH in 70% methanol) containing the hormones of basic character (CKs, ACC). The hormonal analysis and quantification were performed by HPLC (Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) coupled to a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (3200 Q TRAP; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) set in selected reaction-monitoring mode. Phytohormones were quantified using a multilevel calibration graph with 2H-labelled internal standards (as described in detail by Dobrev and Vankova (2012) and Djilianov et al. (2013)). Unfortunately, the tuber fractions did not germinate, so determination of the sex of the offspring was not possible.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the JNP Pro 14 software (version 2019). A logistic regression was performed to measure the impact of cultivar, gender and tuber region on germination and flowering rates. Next, a 3-way ANOVA was performed to measure the impact of cultivar, gender and tuber region and their interactions on germination and flowering times. Also, a linear regression was performed to estimate flowering time from germination. Prior to these analyses, the normality of the residuals was checked on the basis of graphs (box plot and qq plot) as well as the homogeneity of the variances on the basis of Levene's test. A Tukey HSD test was performed to compare the mean germination and flowering times between tuber regions within the same cultivar and between cultivars within the same region. A logistic model was used to measure the effect of tuber region, flowering time, sex of the parents and possibly their different interactions on sex variations in the offspring.

For the hormonal profile, a 3-way ANOVA was performed to highlight the effects of region, sex and cultivar and their interactions on hormone concentrations. Prior to the analyses, the normality of the residuals was checked on the basis of the graphs (box plot and qq plot) as well as the homogeneity of the variances on the basis of Levene's test. The Tukey HSD test was used to compare the hormone concentrations between regions and sexes within a same cultivar.

3. Results

3.1.Effect of tuber region and cultivar on tuber germination

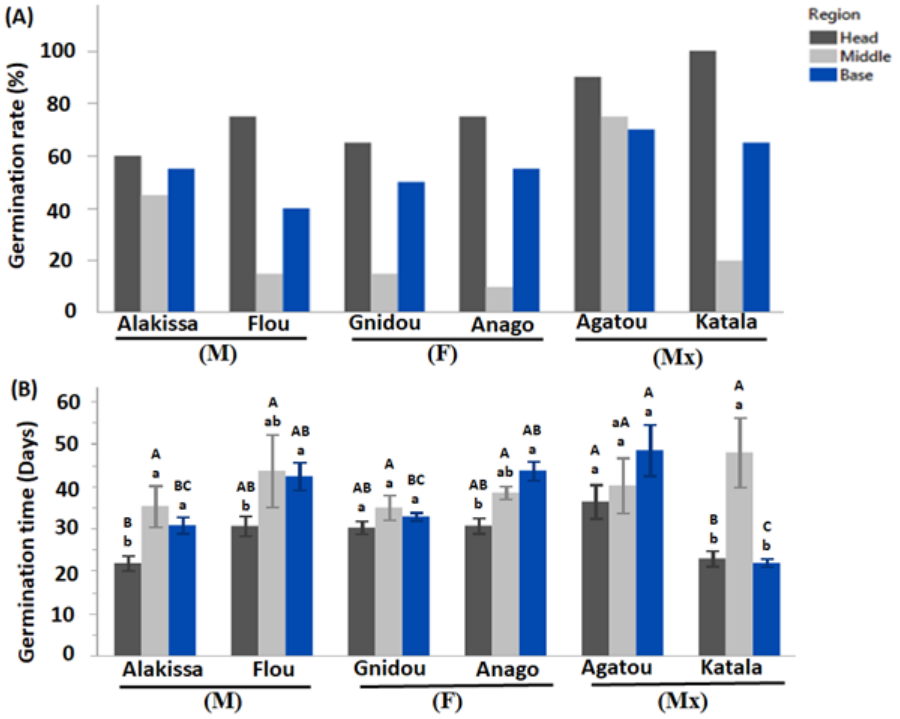


Figure 2: Impact of the tuber section (head, middle, base) on the tuber germination of six cultivars of *D. rotundata*. (A) Germination rate. (B) Time from sowing to germination. In (B), tuber regions with a same lower case letter for a same cultivar are not significantly different at the 5% level; cultivars with a same capital letter for a same tuber region are not significantly different at the 5% level. Data are means ± SE. M: male cultivars, F: female cultivars, Mx: cultivars with male, female or monoecious plants.

Overall, 54.44% of the tuber fragments germinated (Figure 2 A). Neither the cultivar (χ^2 = 10.24, P = 0.0685), nor the sex of the mother plant (χ^2 = 0.22, P = 0.8663) affected the germination rate. However, the germination rate varied among the tuber sections (χ^2 = 61.29, P < 0.0001, Figure 2 A): seed-tubers from the head had a higher germination rate (78%) than those from the base (56%) and the middle (30%) of the tubers. The effect of the tuber section depended on the cultivar (χ2 = 24.35, P = 0.0067). The difference in germination rate among tuber region was indeed significant for the cultivars

Flou (χ^2 = 14.79, P = 0.0006), Anago (χ^2 = 17.81, P < 0.0001), Gnidou (χ^2 = 10.72, P = 0.0047) and Katala (χ^2 = 27.21, P < 0.0001) but not for Alakissa (χ^2 = 0.93, P = 0.6258) and Agatou (χ^2 = 0.55, P = 0.2790). Seed-tubers from the middle of the tuber had a particularly low germination rate (< 20%) in the cultivars Flou, Anago, Gnidou, and Katala (Figure 2 A).

The germination time varied with the cultivar (F = 4.49, P = 0.0003) and the tuber section (F = 1.76, P < 0.0001) but not with the sex of the mother plant (F = 1.72, P = 0.1807, Figure 2 B). Overall, seeds from the head of the tuber germinated much earlier (28 days) than those from the base (36 days) and middle (40 days) of the tuber. However, germination times were relatively similar between tuber regions in the cultivars Gnidou (F = 1.74, P = 0.1970) and Agatou (F =1.25, P = 0.1949) (Figure 2 B). As for the germination rate, the effect of the tuber section depended on the cultivar (F = 2.79, P = 0.0031). For the head region, the cultivars Alakissa and Katala showed a lower germination time (22 and 23 days respectively) than Agatou (35 days) (Figure 2 B). For the base, Katala germinated significantly earlier (22 days) than Anago (44 days), Flou (44 days) and Agatou (49 days). No difference of germination time was observed between cultivars for the middle region.

3.2.Effect of tuber region and cultivar on flowering

The flowering rate varied according to the cultivar (χ^2 = 88.34, P < 0.0001, Table 1): Alakissa showed the highest flowering rate (94%) while Anago did not flower. The tuber section also affected the flowering rate (χ^2 = 22.08, P < 0.0001, Table 1).

Table 1 : Impact of the tuber section (head, middle, base) on the flowering parameters of six cultivars of *D. rotundata*.

Region	**Head**			**Middle**			**Base**		
Cultivar	n	rate (%)	flowering time (days)	n	rate (%)	flowering time (days)	n	rate (%)	flowering time (days)
Alakissa (M)	12	100	86.67±0.64	9	88.9	79.75±1.78	11	100	79.09±1.49
Flou (M)	15	100	64.60±1.80	3	66.7	59.50±0.5	8	100	60.50±1.00
Gnidou (F)	13	92.3	75±2.08	3	100	76.67±4.41	10	100	81.20±1.68
Anago (F)	11	0	-	2	0	-	11	0	-
Agatou (Mx)	18	77.8	64.86±3.03	15	6.7	81	14	50	70.50±2.92
Katala (Mx)	20	95	74.32±1.8	4	50	64.00±12	13	53.9	67.57±2.69

M: male cultivars, F: female cultivars, Mx: cultivars with male, female or monoecious plants.

The cultivars Agatou and Katala (Mx) showed relatively higher flowering rates in plants from head regions (78% and 95% respectively) than in those from basal regions (71% and 68% respectively). In contrast, the cultivars Alakissa, Flou (M) and Gnidou (F) had similar flowering rates between tuber regions ($\chi 2 = 4.49$, $P = 0.1056$). It is important to recall that the germination rate of the middle tuber region was low so that there are few plants issued from this region compared to plants from the head and base regions (Table 1). However, in Agatou, where all regions showed a germination rate above 50%, the flowering rate of plants from the middle tuber region was very low (6.67%) compared to plants from the head (64.86%) and base (70.50%) regions. Furthermore, the sex of the parents also showed a significant effect on flowering rate ($\chi 2 = 34.91$, $P < 0.0001$). Flowering rate of male cultivars was higher (92.54%) compared to monoecious (60.87%) and female plants (44.26%). Very few plants from both male and female parents flowered for the cultivars Agatou and Katala.

Flowering time was affected by the cultivar ($F = 20.84$, $P < 0.0001$) but not by the tuber region ($F = 0.37$, $P = 0.1575$) although the interaction between region and cultivar was significant ($F = 7.18$, $P < 0.0001$). When the cultivars were compared to each other independently of tuber region, Alakissa had a significantly longer flowering time (82 days) than Agatou (68 days) and Flou (62 days) while Gnidou (71 days) flowered at the same time than Katala (78 days) and Agatou (68 days). The sex of the plants did not particularly affect flowering time ($F = 0.41$, $P = 0.6601$). However, female plants flowered slightly later (78 days) compared to males (72 days) and monoecious plants (70 days).

Furthermore, the analyses also showed a significant effect of germination time on flowering time ($F = 22.94$, $P < 0.0001$) such that, for most cultivars, flowering time decreased with increasing germination time ($r^2 = 0.70$).

3.3.Effect of tuber region and cultivar on sex variation in the offspring.

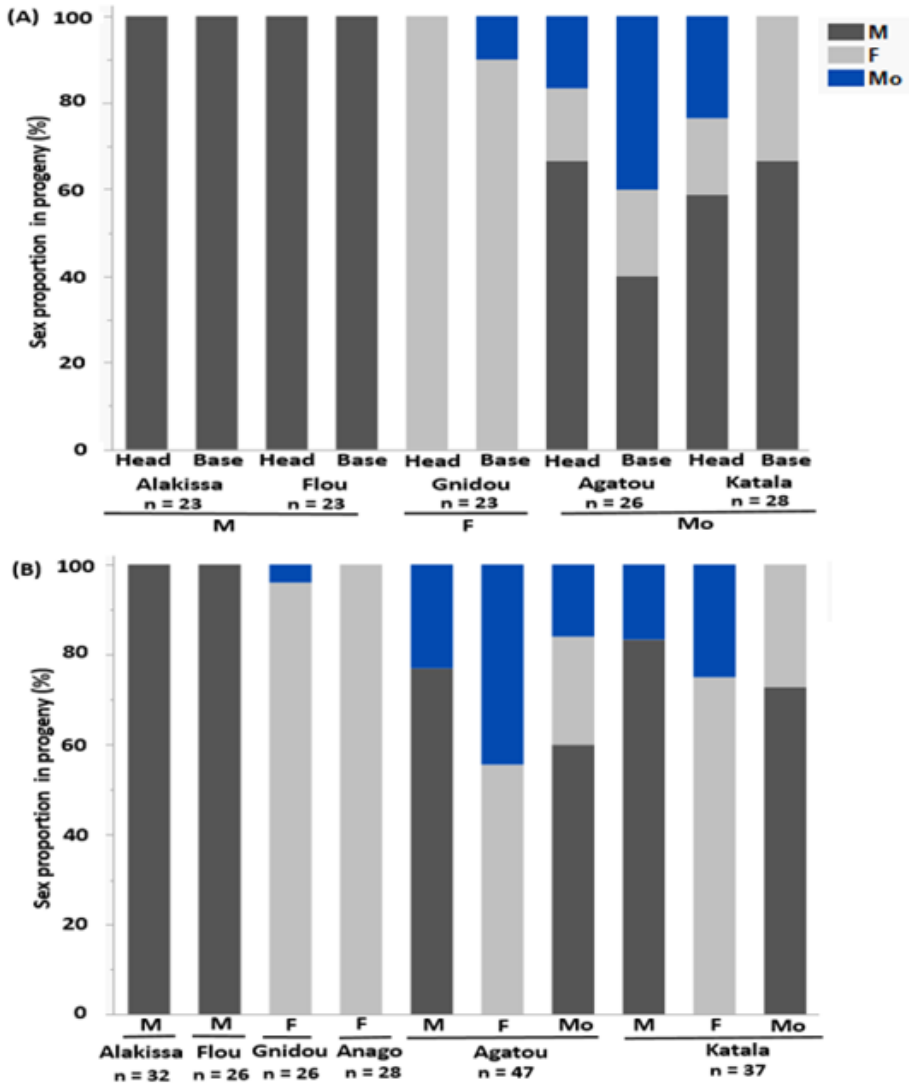


Figure 3: Sex expression in the offspring as a function of the seed-tuber section and the sex of the mother plants in six cultivars of *D. rotundata*. (A) Results of the first trial comparing the seed-tuber sections (head, base) and the sex of the mother plants. (B) Results of the second trial comparing the sex of the mother plants. M: male plants, F: female plants, Mo: monoecious plants.

Overall, the sex variation in the offspring did not depend on the tuber section (χ^2 = 0.01, P = 0.9053, Figure 3 A) but rather on the sex of the mother plant (trial 1: χ^2 = 85.951, P < 0.0001, trial 2: χ^2 = 107.65, P < 0.0001, Figure 3). All plants of the male cultivars Alakissa and Flou produced male flowers like their parents in both trials; no sex variation was observed in these male cultivars. Similarly, the female cultivars Gnidou and Anago mainly produced female plants as their parents (Figure 3). We only observed one exception in Gnidou where one monoecious plant was observed in both trials. In contrast, sex variation was important in the monoecious cultivars (Agatou and Katala) whatever the seed-tuber section (Figure 3): both the offspring from head seed-tubers and those from base seed-tubers expressed very little parental sex. In the cultivar Agatou, the percentage of sex variation in the offspring was about 80% for plants from the head region and 83% for plants from the base region of the tuber (Figure 3 A). In Katala, these percentages where respectively 76.5% and 100% for the head and base regions of the tuber (Figure 3 A). The flowering rate of plants from the middle region was too low to allow comparisons. During the first field trial (Figure 3A), 75% of the plants of Agatou and Katala that changed sex produced male flowers and 25% produced female flowers. During the second field trial (Figure 3 B), 80% of the monoecious plants of Agatou and Katala changed sex in the offspring; 69% of them produced male flowers and 31% produced female flowers. We also observed sex variation for male (23%) and female (44%) plants of Agatou and Katala, which all produced monoecious plants in the offspring (Figure 3 B). Thus, sex variation in the offspring was more related to the sex of the parent plants and the cultivars subject to sex variation were those with mixed flowering (Agatou and Katala). Also, it should be noted that the observed variations did not depend on the flowering time of the cultivars (χ2 = 0.83, P = 0.3596).

3.4.Phytohormone profile in tubers depending on the sex of the mother plant

In search of intrinsic factors underlying sex variation in the offspring, a phytohormone profile was established in three regions (head, middle and base) of tubers of male, female and monoecious plants. This analysis was performed on two cultivars, Katala and Laboko. About thirty hormones and their metabolites were identified and grouped by hormone type: abscisic acid (ABA) and its derivatives, auxins, phenolic compounds salicylic acid (SA), benzoic acid (BzA), jasmonates (JA), and cytokinins (CKs). The complete

data are in Table S2 No ACC was detected as the concentrations were probably below the threshold value.

Overall, the concentration of ABA-types was not affected by tuber region ($F = 1.00$, $P = 0.3783$) but varied with sex of the mother plant ($F = 11.75$. $P < 0.0001$, Figure 4 A-B). Thus, regardless of tuber regions, concentrations of ABA-types were higher in tubers of female plants than in tubers of male and monoecious plants, irrespective of cultivar (Figure 4 A-B). However, differences were observed among tuber regions when each sex was analysed separately. In Katala, the highest concentration of ABA-types was found in male plants in the middle region, in female plants in the head region, and in monoecious plants in the base region (Figure 4 A). In Laboko, no differences were found between tuber regions in male and monoecious plants, but ABA-types concentration was higher in female plants in the middle region than in the head regions of the tubers.

In contrast, auxin concentration was not affected by tuber region ($F = 1.14$, $P = 0.3160$) or sex of the mother plant ($F = 1.19$, $P = 0.3160$, Figure 4 C- D) in either cultivar.

For SA, total concentration was not influenced by tuber regions ($F = 2.29$, $P = 0.1187$) but rather by sex of the mother plant ($F = 4.00$, $P = 0.0008$), although there was a significant effect of sex-region interaction ($F = 3.31$, $P = 0.0231$; Figure 4 E - F). In Katala, the concentration of SA was higher in the tubers of monoecious plants than in the tubers of male and female plants (Figure 4 E), while in Laboko, the concentration of SA was higher in the male plants than in the female plants (Figure 4 F).

Regarding BzA, another phenolic compound besides SA, concentrations were not dependent on tuber region ($F = 3.35$, $P = 0.0584$) but could vary with mother plant sex depending on cultivar ($F = 5.31$, $P = 0.0105$; Figure 4 G – H). Indeed, total BzA concentration was higher in female compared to male and monoecious plants in Laboko (Figure 4 H), while no difference in BzA concentration between sexes was observed in Katala (Figure 4 G). In addition, a significant effect of interaction between sex and region was observed ($F = 3.13$, $P = 0.0288$), although no differences were detected among tuber fragments when sexes and cultivars were analyzed separately (Figure 4 G – H).

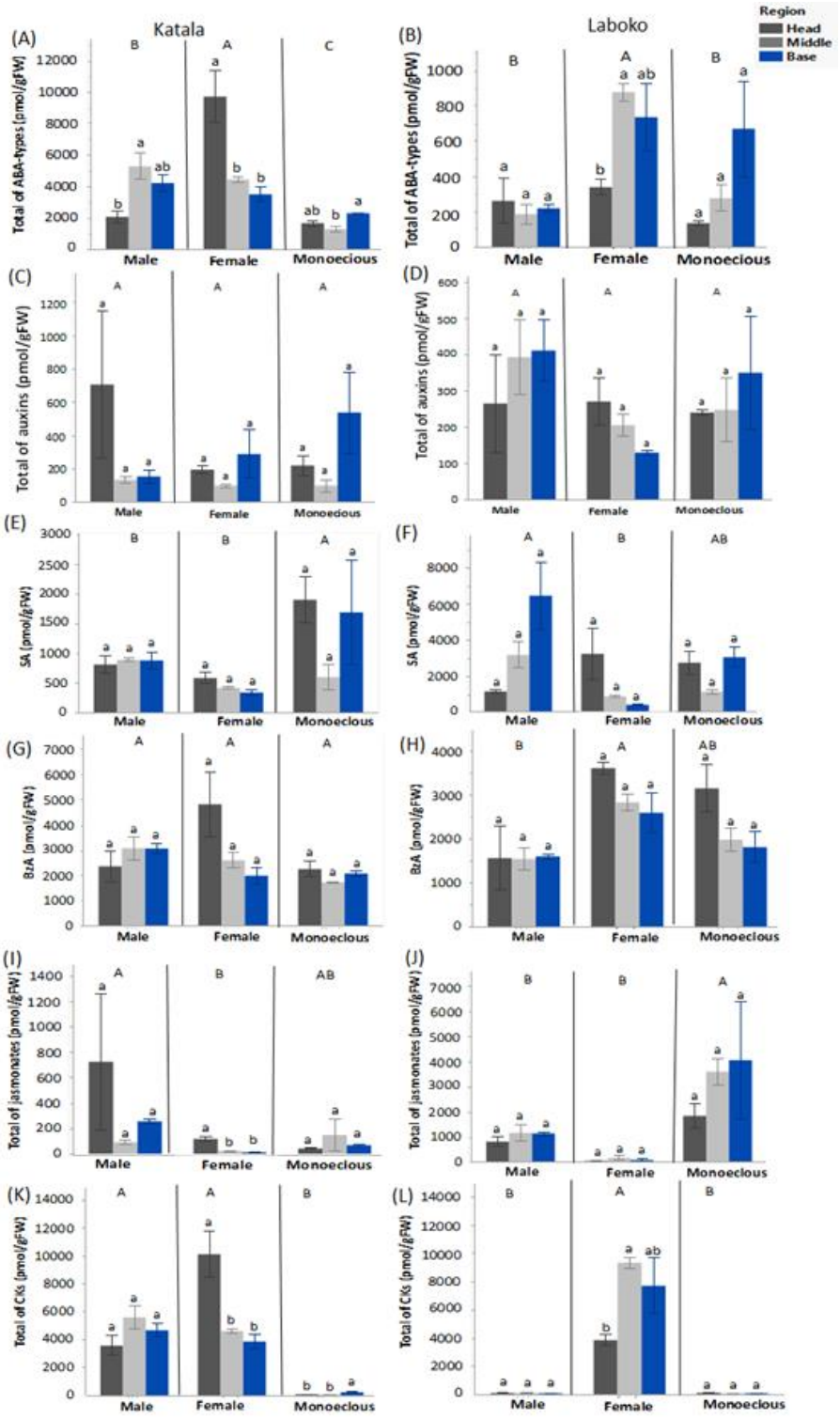

Katala
Laboko
Region
Head
Middle
Base
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
Total of ABA-types (pmol/gFW)
Total of auxins (pmol/gFW)
SA (pmol/gFW)
BzA (pmol/gFW)
Total of jasmonates (pmol/gFW)
Total of CKs (pmol/gFW)
Male
Female
Monoecious

Figure 4: Influence of tuber region (head, middle, base) and sex of mother plant on hormonal profile of yam tubers of *D. rotundata* cv. Katala and Laboko. Concentrations of (A - B) abscisic acid-types (Total of ABA-types), (C - D) auxins (Total of auxins), (E - F) salicylic acid (Total of SA), (G - H) benzoic acid (Total of BzA), (I - J) jasmonates (Total of jasmonates), (K - L) cytokinins (Total of CKs). For the same sex, regions having the same lowercase letter are significantly similar at the 5% level. For the same cultivar, sexes having the same uppercase letter are significantly similar at the 5% level. Data are means ± SE.

Concentration of jasmonates (JA and its derivatives) was not affected by tuber region ($F = 0.93$, $P = 0.4043$), but was strongly influenced by sex of mother plant ($F = 16.18$, $P < 0.0001$). In Katala, tubers from male plants had significantly higher concentration of jasmonates than tubers from female plants, and monoecious plants had intermediate jasmonates concentration (Figure 4 I). In Laboko, concentration of jasmonates was higher in tubers from monoecious plants than in tubers from both male and female plants (Figure 4 J). Comparison between cultivars showed that the concentration of jasmonates was 3-fold, 2.5-fold and 37-fold higher in Laboko tubers than in Katala tubers in male, female and monoecious plants, respectively ($P = 0.0010$; 0.0112 and < 0.0001, respectively). A significant effect of interaction between sex and region ($F = 5.31$, $P = 0.0105$) was also observed. In Katala, the concentration of jasmonates in the head was higher than in the other tuber regions in female plants, whereas no differences were observed among tuber regions in male and monoecious plants (Figure 4 I). In Laboko, no differences were observed among tuber regions regardless of the sex of the plant (Figure 4 J).

Finally, total CKs concentration, like that of the other hormones, did not depend on the region of the tuber ($F = 1.14$, $P = 0.3160$, Figure 4 K - L). On the other hand, sex had a significant effect on CKs tuber concentration ($F = 39.96$, $P < 0.0001$), and the interaction between sex and region was significant ($F = 7.48$, $P = 0.0023$). In fact, CKs concentration was higher in tubers of female plants than in those of monoecious plants in both cultivars, although CKs concentration was similar in tubers of male and female plants in Katala and in tubers of male and monoecious plants in Laboko (Figure 4 K and L). Moreover, CKs concentration was higher in the head region of female plants and in the base region of monoecious plants in Katala than in the other tuber regions (Figure 4 K), while it was higher in the middle region

than in the head region of female plants in Laboko (Figure 4 L). However, tuber region had no effect on CKs concentration in male plants, regardless of cultivar (Figure 4 K - L).

4. Discussion

4.1. The tuber region affected the germination and the flowering of *D. rotundata*

This study showed that the region of the tuber used as seed-tuber influenced the germination rate and germination time in *D. rotundata*. Overall, seed-tubers from the head region germinated earlier with a higher germination rate than the middle and base sections. The same observation was made by Zoundjihekpon et al. (1995) in this species. These authors observed the existence of a germination gradient from the head to the base of the tuber, even though the difference was not always significant between the middle and base sections for all cultivars. Kossou (1990) noted also a difference in viability between micro-fragments depending on whether they came from the apex or the basal part of the tuber. Moreover, the viability of these micro-fragments was affected by environmental factors including the chemical composition of the soil and the presence of organic matter (Kossou 1990). A similar germination gradient along the tuber was also observed in the related yam species *D. batatas*, *D. trifida*, *D. cayenensis* and *D. alata* so that fragments from the apex of the tuber germinated always earlier than those from the middle and base (Sawada 1952; Miège 1957; Mathurin and Degras 1975). In *D. cayenensis* and *D. alata*, Miège (1957) explained this germination gradient by an unequal distribution of starch grains and sometimes raphids along the tuber. Mathurin and Degras (1975) confirmed the longitudinal heterogeneity of the tubers in *D. trifida* and *D. alata* and its impact on the germination of the fragments (tuber-seeds). Apart from these factors, the high germination rate and early emergence of the nodal region could be explained by the fact that tuber head generally initiates buds mostly before sowing. These buds, which sometimes develop even before sowing (under certain temperature and humidity conditions), allow tuber germination in a few days after sowing with little risk of rotting even though the tuber has been cut. Sawada (1952) made a similar observation in *D. batatas* and found that tuber size could also influence the development of these buds. It has to be noticed that the middle tuber sections have to deal with the stress of the double scar (Figure 1), leading to a high rate of rotting, unlike the other sections that have only one scar. Pre-germination could help

to manage the stress of the double scar and increase the germination rate of seed-tubers from the middle region, as it was observed for the germination of minisetts (Morse and McNamara 2017).

Regarding flowering, our results showed an average flowering rate of 33% with a flowering rate ranging from 50% to 100% depending on the cultivar, at the exception of Anago that did not flower. This average value was lower than the average flowering rate of 70% observed in other studies for *D. rotundata* from Benin (Tostain et al. 2005; Yolou et al. 2015a). However, it is in the range of 25% to 56% of flowering observed by Zoundjihekpon et al. (1995) for this species in Côte d'Ivoire. Our results showed that the flowering rate was affected by the tuber region but that it mainly varied among cultivars. Indeed, depending on the cultivar and the sex, flowering can be weak or even absent. This was the case for Anago (female cultivar) that did not flower in the first trial of this study. This female cultivar has been described as very demanding in terms of environmental factors (luminosity, soil quality, staking, etc.) for floral induction - as are most female plants - and may produce very few flowers depending on the region of Benin where it is cultivated (Dansi et al. 1999; Yolou et al. 2015a). We neither observed flowering in this cultivar during our 2017-2018 field trial at the national collection field (N. Denadi, personal observation). Overall, Zoundjihekpon et al. (1995) reported flowering in females to be about 2 times less than in males in *D. rotundata*. Our results showed that flowering time also varied among cultivars but not among tuber regions. Although flowering time was not affected by the plant sex in our study, it is known that in the cultivated yams *D. rotundata*, *D. alata*, and *D. dumetorun*, there is a lag between male and female flowering (Zoundjihekpon et al. 1995; Yolou et al. 2015a; Nwoke 1991; Némorin 2012). The observation made in our study can however be justified by the fact that the cultivar Alakissa is one of the few late flowering male cultivars. We also observed that the flowering time was negatively correlated with the germination time. Zoundjihekpon et al. (1995) also observed that the seed-tubers that germinated last were rather the first to flower in cultivated yams *D. rotundata* from Côte d'Ivoire. According to Lafon (1987), in late germinating plants, the vegetative buds are still growing when the environmental conditions allowed flowering and so they did not compete with the flowering buds. However, in early germinating plants, plants flowered when their vegetative growth is almost finished and the vegetative organs draw the maximum of their sap to the detriment of the potentially flowering apices (Lafon 1987).

4.2.Sex variation in the offspring depended on the sex of the parent plant

Our results showed a variation in sex in the offspring. This variation was related neither to the tuber region, nor to the time of germination or flowering. It was rather related to the sex of the mother plants: the offspring of male and female plants showed little or no variation in sex while the offspring of monoecious plants showed high sex variation. Moreover, we observed that when sex variation occurred in the offspring, monoecious plants turned mainly male in the offspring while male and female plants turned mainly monoecious in the offspring. Sex variation was previously reported in *D. rotundata* although the reason was not clear. Dansi et al. (1999) discussed the problem of sporadic sex variation in cultivated yams *D. rotundata*. They observed that two fragments of the same tuber of a female cultivar (Ahimon) gave male and female plants in the offspring (Dansi et al. 1999). We also observed sex variation in the offspring of the monoecious cultivars Katata and Laboko using minisetts - coming from the same tuber - as seeds-tubers, meaning that all plants of the offspring were clones and shared the same genetic background (data not shown). Thus, our results suggested that the sex identity is not only genetically determined in *D. rotundata*, at least in the monoecious cultivars.

Tamiru et al. (2017) identified a genomic region associated with female heterogametic (male = ZZ, female = ZW) sex determination in *D. rotundata.* Plants with ZZ genotype are male while plants with ZW genotype could be females, monoecious or not flowering; W being dominant over Z would exert a so-called Z-suppressor effect on the latter (Tamiru et al. 2017). According to these authors, in females, if the Z-suppressor effect is complete, the offspring will be female, but if it is partial or null, the offspring will be monoecious or even male or non-flowering (Tamiru et al. 2017). Following this hypothesis (Tamiru et al. (2017), the sex variation we observed in the offspring of the monoecious plants would be explained by the strength of the Z-suppressor effect. Moreover, it has been shown that plants with the ZW genotype always flowered male if their ploidy level was higher than 2X (Girma et al. 2014; Denadi et al. 2020). This could explain the lack of sex variation in the offspring of the male cultivars used in this study since Flou has a ZZ genotype and Alakissa is tetraploid (Denadi et al. 2020). It has however to be mentioned that other *Dioscorea* species such as *D. alata, D. floribunda* or *D. tokoro* showed a male heterogametic (male = XY, female = XX) sex determination (Cormier et al. 2019; Sugihara et al.

2021) and that our previous results suggested that Beninese *D. rotundata* cultivars have rather adopted a male heterogametic system that is undergoing reorganization (Denadi et al. 2020). Further studies are thus required to identify clearly the sexual chromosome determination in *D. rotundata*. According to Perrin et al. (2009), and Rodrigues et al. (2017), occasional recombination between X and Y chromosomes could occur, allowing periodic sex reversal. For example, homologies was shown between the X chromosomes of monoecious hemp (*Cannabis sativa*) and the X and Y chromosomes of dioecious hemp (Faux et al. 2016). Hemp is a diploid species including both dioecious and monoecious cultivars that displays a high plasticity of sex expression (Faux et al. 2016), as we observed for *D. rotundata*.

Whether the sex identity is homo or heterogametic in *D. rotundata*, other internal and external factors must modulate sex expression. Golenberg and West (2013) proposed a model that can explain the evolution of dioecy through monoecy, and the mechanisms of environmental sex determination. According to them, key sex-determining genes must exist in monoecious species, but independent cues, either external environmental or internal physiological, must regulate their expression (Golenberg and West 2013). Sex variation (masculinisation or feminisation) due to environmental factors (water stress, light intensity, shading, abundance of nutritive resources) has been reported in several monoecious and sometimes even dioecious species, including those with well differentiated sex chromosomes such as *Elaeis guineensis*, *Zea mays*, *Rumex hastatulus*, *R. nivalis*, *Cannabis sativa*, (Orozco-Arroyo et al. 2012; Minina 1938; Westergaard 1958; Rood et al. 1980; Freeman et al. 1980; Adam et al. 2011). In *D. rotundata*, Tamiru et al. (2017) proposed that the Z-suppressing function could be affected by the environment, explaining that plants with ZW genotypes could be female, monoecious, non-flowering or even male. Agre et al. (2020) confirmed that in ZW genotypes, male or monoecious phenotypes could be observed instead of the female phenotype depending on growth environment. Numerous studies have also recorded the effects of hormones on alternative or plastic sexual development (Leite Montalvão et al. 2022; Niu et al. 2022).

As with environmental effects, many phytohormones have similar masculinising or feminising effects in independent species (Golenberg and West 2013). The balance between gibberellins (GAs) and IAA plays an important role in sex determination in monoecious and dioecious species (de Jong and Bruinsma 1974). Lee et al. (2019) reported that IAA and CKs play a key role in the formation of the gynoecium, while GAs and JA or their

combination are actively involved in stamen development and function (Marciniak and Przedniczek 2019). It is also known that in some species hormonal treatment can influence the sex of flowers. This is the case in cucumber (*Cucumis sativus*), hemp (*Cannabis sativa*), spinach (*Spinachia oleracea*), or bitter melon (*Momordica charantia*), where IAA is feminising and GAs are more masculinising (Iwahori et al. 1970; Galoch 1978; Akter and Rahman 2010; Zhang et al. 2017; West and Golenberg 2018). In this study, we observed changes in the phytohormone profile of tubers in relation to the sex of the parent plant. However, we could not examine the sex of the offspring because the seed-tubers did not germinate (probably a lack of dormancy or stress due to scars). According to our results, jasmonates, SA, BzA, ABA-types, and CKs were potential candidates for sex modulation in cultivated yams *D. rotundata*. In the same cultivar, jasmonates and SA were more concentrated in monoecious and male plants, whereas ABA-types, CKs, and BzA were more concentrated in female plants. It would be interesting to see if a correlation could be made between the concentration of these hormones in the tuber and the sex of the plants produced and if these hormones could affect sex expression in *D. rotundata*. It is also possible that hormone levels in tubers change depending on the earliness of the tubers (early or late harvest) and therefore a potential sex variation depending on the type of tuber (early or late) used as seed-tuber. The potentially antagonistic effects of SA and BzA could also be investigated when it is known that BzA is a precursor of SA.

5. Conclusions

Our study has shown that in *Dioscorea rotundata* yams from Benin, spontaneous sex variation occurs in the offspring. To understand the cause of this instability, we investigated the impact of the tuber region used as seed-tuber, the cultivar, and the sex of the mother plant. Our results showed that plants originating from the tuber head germinated faster and that germination time affected flowering time. However, neither the region of the tuber nor the germination and flowering time were responsible for the sex variation in the offspring. Only the cultivar and sex of the mother plant influenced the sex of the offspring. Indeed, in cultivated yam *D. rotundata*, sex variation was observed mainly in monoecious cultivars. When sex variation occurred in the offspring, monoecious plants preferentially produced male plants, whereas male and female plants produced monoecious plants. Examination

of the phytohormone profile of tubers revealed differences between the sexes in the same cultivar. Tubers from male and monoecious plants had higher overall concentrations of jasmonates and SA, while tubers from female plants had higher concentrations of ABA-types, CKs and BzA. Therefore, our results suggest a relationship between the hormone profile of tubers and the sex of daughter plants, although this needs further investigation.

Acknowledgements

The authors are grateful to the 'Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole' (CREFIISDA, Benin) for access to their site. We are also grateful to Yolou Mounirou, Sonon-Biti Jacques and Dadonougbo Eric for their technical assistance.

Funding

This work was supported by the International Action Committee (CAI) of UCLouvain and the Czech Science Foundation (grant No. 19-12262S), and the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic from the European Regional Development Fund, Project "Center for Experimental Plant Biology" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000738). N.D. is grateful to the International Action Committee (CAI) of UCLouvain for the funding of his PhD grant.

References

Aboudou, R., and L. Auriole. 2006. Impact de la croissance urbaine sur les filières agricoles en Afrique de l'Ouest: cas de l'igname à Parakou au Bénin. *Ifeas, Lares, document de travail Ecocité* **13**, 1-51.

Adam, H., M. Collin, F. Richaud, T. Beulé, D. Cros, A. Omoré, L. Nodichao, B. Nouy, and J. W. Tregear. 2011. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. *Annals of botany* **108**, 1529-1537.

Adejumo, B., R. Okundare, O. Afolayan, and S. Balogun. 2013. Quality attributes of yam flour (Elubo) as affected by blanching water temperature and soaking time. *Int J Eng Sci* **2**, 216-221.

Agre, P., C. Nwachukwu, B. Olasanmi, J. Obidiegwu, E. Nwachukwu, P. Adebola, D. De Koeyer, and A. Asrat. 2020. Sample preservation and plant sex prediction in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Akagha, N., U. Onyegbule, C. Nwaiche, and J. Aju. 2021. Impact of Climate Variability on Rainfall and Temperature Distribution on Yam Yield (*Dioscorea alata*) in Ngor-Okpala Local Government Area of Imo State, South-Eastern Nigeria. *MC Microbiology* **1**, 01-06.

Akter, P., and M. Rahman. 2010. Effect of foliar application of IAA And GA on sex expression, yield attributes and yield of bitter gourd (*Momordica Charantia* L.). *Chittagong University Journal of Biological Sciences*, 55-62.

Alabi, T. R., P. O. Adebola, A. Asfaw, D. De Koeyer, A. Lopez-Montes, and R. Asiedu. 2019. Spatial multivariate cluster analysis for defining target population of environments in West Africa for yam breeding. *International Journal of Applied Geospatial Research (IJAGR)* **10**, 1-30.

Alam, S., E. Shylla, B. Bora, and B. Saud. 2014. Genetic variation in different cultivars of greater yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Root Crops* **40**, 39-43.

Assaba, E. I., M. Yolou, H. Totin Vodounon, G. A. Quenum, and J. Zoundjihekpon. 2018. Caractéristiques des graines d'ignames cultivées du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis*—

Dioscorea rotundata et évolution du taux de germination des graines. *Afr. Sci* **14**, 195-208.

Ayankanmi, T., H. Shiwachi, and R. Asiedu. 2005. Sprouting and yield of yam (*Dioscorea spp.*) minisetts in relation to sett size, soil moisture and agro-ecology. *Tropical Science* **45**, 23-27.

Brice, D. K. E., K. A. Michel, C. Brahima, N. z. Boni, and Z. G. Pierre. 2016. Inventaire des méthodes de production de semenceaux d'igname (*Dioscorea spp*): une revue de la littérature. *Journal of Animal &Plant Sciences* **29**,4496-4514.

Cormier, F., F. Lawac, E. Maledon, M.-C. Gravillon, E. Nudol, P. Mournet, H. Vignes, and G. Arnau. 2019. A reference high-density genetic map of greater yam (*Dioscorea alata* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **132**, 1733-1744.

Dansi, A., H. Mignouna, J. Zoundjihekpon, A. Sangare, R. Asiedu, and F. Quin. 1999. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Darkwa, K., B. Olasanmi, R. Asiedu, and A. Asfaw. 2020. Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp.*) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

de Jong, A. W., and J. Bruinsma. 1974. Pistil development in Cleome flowers IV. Effects of growth-regulating substances on female abortion in Cleome spinosa Jacq. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **73**, 152-159.

Denadi, N., C. Gandonou, A. A. Missihoun, J. Zoundjihékpon, and M. Quinet. 2020. Plant sex prediction using genetic markers in cultivated yams (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin. *Agronomy* **10**, 1521.

Denadi, N., M. Yolou, A. Dadonougbo, Eric, J. Zoundjihekpon, A. Dansi, C. Gandonou, and M. Quinet. 2022. Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Displays Prezygotic and postzygotic barriers to Prevent Autogamy in monoecious cultivars. *Agronomy*, 872.

Djilianov, D. L., P. I. Dobrev, D. P. Moyankova, R. Vankova, D. T. Georgieva, S. Gajdošová, and V. Motyka. 2013. Dynamics of endogenous phytohormones during desiccation and recovery of the resurrection plant species Haberlea rhodopensis. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**, 564-574.

Dobrev, P. I., and M. Kamınek. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification

using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29.

Dobrev, P. I., and R. Vankova. 2012. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. In *Plant salt tolerance*: Springer, 251-261.

FAOSTAT. 2021. *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* [cited 15th October 2021]. Available from "http://www.fao.org/faostat/en/data/QL"

Faux, A.-M., X. Draye, M.-C. Flamand, A. Occre, and P. Bertin. 2016. Identification of QTLs for sex expression in dioecious and monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica* **209**, 357-376.

Freeman, D., K. Harper, and E. L. Charnov. 1980. Sex change in plants: old and new observations and new hypotheses. *Oecologia* **47**, 222-232.

Galoch, E. 1978. The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **47**, 153-162.

Girma, G., K. E. Hyma, R. Asiedu, S. E. Mitchell, M. Gedil, and C. Spillane. 2014. Next-generation sequencing based genotyping, cytometry and phenotyping for understanding diversity and evolution of guinea yams. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1783-1794.

Girma, G., S. Natsume, A. V. Carluccio, H. Takagi, H. Matsumura, A. Uemura, S. Muranaka, H. Takagi, L. Stavolone, and M. Gedil. 2019. Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS ONE* 14, e0216912.

Golenberg, E. M., and N. W. West. 2013. Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American journal of botany* **100**, 1022-1037.

Hamadina, E., P. Q. Craufurd, and R. Asiedu. 2009. Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Ignatius, N. A., H. Rachid, N. S. Pierre, and P. N. Achiangia. 2019. Yam (*Dioscorea spp.*) production trends in Cameroon: A review. *African Journal of Agricultural Research* **14**, 1097-1110.

Iwahori, S., J. M. Lyons, and O. E. Smith. 1970. Sex expression in cucumber plants as affected by 2-chloroethylphosphonic acid, ethylene, and growth regulators. *Plant Physiology* **46**, 412-415.

Kalu, B., J. Norman, U. Pal, and D. Adedzwa. 1989. Seed yam multiplication by the mini-sett technique in three yam species in a tropical guinea savanna location. *Experimental Agriculture* **25**, 181-188.

Kossou, D. 1990. Evaluation de practiques culturales relatives à la production de semenceaux et tubercules d'ignames (*Dioscorea rotundta*) au Bénin. *Tropicultura* 8, 69-73.

Lafon, J.-P. 1987. *Biologie des plantes cultivées. Physiologie du développement génétique et amélioration*. L'A.R.E.P.E ed. Vol. **2**.

Lee, Z. H., T. Hirakawa, N. Yamaguchi, and T. Ito. 2019. The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. *International journal of molecular sciences* **20**, 4065.

Leite Montalvão, A. P., B. Kersten, G. Kim, M. Fladung, and N. A. Müller. 2022. ARR17 controls dioecy in Populus by repressing B-class MADS-box gene expression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **377**, 20210217.

Loko, Y., A. Dansi, A. Agre, N. Akpa, I. Dossou-Aminon, P. Assogba, M. Dansi, K. Akpagana, and A. Sanni. 2013. Perceptions paysannes et impacts des changements climatiques sur la production et la diversité variétale de l'igname dans la zone aride du nord-ouest du Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **7**, 672-695.

Mani, M., M. Kalyanasundaram, C. Jayaprakas, E. Harish, R. Sreerag, and M. Nedunchezhiyan. 2016. Tuber Crops. In *Mealybugs and their Management in Agricultural and Horticultural crops*: Springer, 471-494.

Marciniak, K., and K. Przedniczek. 2019. Comprehensive insight into gibberellin-and jasmonate-mediated stamen development. *Genes* **10**, 811.

Mathurin, P., and L. Degras. 1975. Effets des modalités de division des tubercules de semences sur la germination et la production des ignames (*D. alata*, *D. trifida*). *Nouvelles Agronomiques des Antilles et de la Guyane* **1**,139-152.

Miège, J. 1957. Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées.

Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée **4**, 315-342.

Minina, E. 1938. On the phenotypical modification of sexual characters in higher plants under the influence of the conditions of nutrition and other external factors. *CR Acad. Sci. URSS* **2**, 298-301.

Mondo, J. M., P. A. Agre, A. Edemodu, P. Adebola, R. Asiedu, M. O. Akoroda, and A. Asfaw. 2020. Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp.*). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., P. A. Agre, A. Edemodu, R. Asiedu, M. O. Akoroda, and A. Asfaw. 2022. Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp.*). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Morse, S., and N. McNamara. 2017. Impact of the Adapted Yam Minisett Technique on ware yam (*Dioscorea rotundta*) production under farmer-managed conditions in Nigeria. *Experimental Agriculture* **53**, 131-143.

Némorin, A. 2012. Acquisition de connaissances sur la génétique de l'espèce *Dioscorea alata* L. pour la production de variétés polyploïdes, Thèse de doctorat, Univerité Antilles-Guyane.

Niu, H., H. Wang, B. Zhao, J. He, L. Yang, X. Ma, J. Cao, Z. Li, and J. Shen. 2022. Exogenous auxin-induced ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 (ESR2) enhances femaleness of cucumber by activating the *CsACS2* gene. *Horticulture research* 9.

Ntui, V. O., E. A. Uyoh, E. E. Ita, A. A. A. Markson, J. N. Tripathi, N. I. Okon, M. O. Akpan, J. O. Phillip, E. A. Brisibe, and E. O. E. Ene-Obong. 2021. Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology* **22**,1302-1314.

Nwadili, C. O., J. Augusto, R. Bhattacharjee, J. Atehnkeng, A. Lopez-Montes, T. J. Onyeka, P. L. Kumar, R. Asiedu, and R. Bandyopadhyay. 2017. Comparative reliability of screening parameters for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). *Plant disease* **101**, 209-216.

Nwankwo, I., and E. Bassey. 2013. A study of variability and heritability for yield and yield related traits in guinea white yam (*Dioscorea rotundta* Poir.) genotypes in Umudike, Southeastern Nigeria. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* **2**, 122-127.

Nwoke, F. 1991. Bourgeons axillaires et multiplication végétative de Dioscorea. Paper read at Plantes racines tropicales: les plantes racines et la crise alimentaire en Afrique; compte rendu du Troisième symposium triennal de la Société internationale pour les plantes racines tropicales-Direction Afrique, 17-23 août 1986, Owerri, Nigéria.

Ondo Ovono, P., C. Kevers, and J. Dommes. 2007. Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis*–D. rotundata complex. *Plant cell, tissue and organ culture* **91**, 107-114.

Orozco-Arroyo, G., S. Vázquez-Santana, A. Camacho, J. G. Dubrovsky, and F. Cruz-García. 2012. Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus Opuntia stenopetala. *Planta* **236**, 225-238.

Padhan, B., and D. Panda. 2020. Potential of Neglected and Underutilized Yams (*Dioscorea spp.*) for Improving Nutritional Security and Health Benefits. *Frontiers in Pharmacology* 11.

Perrin, A., E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer, and F. Morel. 2009. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertility and sterility* **92**, 583-589.

Price, E. J., R. Bhattacharjee, A. Lopez-Montes, and P. D. Fraser. 2018. Carotenoid profiling of yams: Clarity, comparisons and diversity. *Food Chemistry* **259**:130-138.

Pwakem, D., E. Sowley, and F. Kankam. 2020. Evaluation of Efficacy of some Plant Extracts for the Control of Anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides) of White Yam (*Dioscorea rotundta* Poir). *Agricultural and Food Science Journal of Ghana* **13**, 1268-1281.

Rodrigues, N., T. Studer, C. Dufresnes, W. J. Ma, P. Veltsos, and N. Perrin. 2017. Dmrt1 polymorphism and sex-chromosome differentiation in Rana temporaria. *Molecular ecology* **26**, 4897-4905.

Rood, S. B., R. P. Pharis, and D. J. Major. 1980. Changes of endogenous gibberellin-like substances with sex reversal of the apical inflorescence of corn. *Plant Physiology* 66, 793-796.

Sawada, E. 1952. Ueber die Wahre Natur der Erd-und Luftknollen von Dioscorea Batatas DECNE. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University* **47**, 267-314.

Sugihara, Y., A. Kudoh, M. T. Oli, H. Takagi, S. Natsume, M. Shimizu, A. Abe, R. Asiedu, A. Asfaw, P. Adebola, and R. Terauchi. 2021. Population Genomics of Yams: Evolution and Domestication of Dioscorea Species. Cham: Springer International Publishing, 1-28.

Tamiru, M., S. Natsume, H. Takagi, B. White, H. Yaegashi, M. Shimizu, K. Yoshida, A. Uemura, K. Oikawa, and A. Abe. 2017. Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tostain, S., N. Scarcelli, J.-L. Noyer, C. Agbangla, J.-L. Marchand, and J. L. Pham. 2005. Diversité, origine et dynamique évolutive des ignames cultivées *Dioscorea rotundta* Poir. au Bénin. 5e Colloque National BRG - ISARA, Lyon, France. ISBN 2-908447-33-9.

West, N. W., and E. M. Golenberg. 2018. Gender-specific expression of GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE is critical for unisexual organ initiation in dioecious Spinacia oleracea. *New Phytologist* **217**,1322-1334.

Westergaard, M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. In *Advances in genetics*: Elsevier, 217-281.

Yolou, M., I. Anizehou, R. Dossou-Yovo, A. Akoegninnou, J. D. Zongo, and J. Zoundjihekpon. 2015a. Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundta* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., J. Zoundjihekpon, E. I. Assaba, I. Anizehou, and A. Akoegninnou. 2015b. La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et ***D. dumetorum***) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492.

Zhang, Y., Zhao, G., Li, Y., Mo, N., Zhang, J., and Liang, Y. (2017). Transcriptomic analysis implies that GA regulates sex expression via ethylene-dependent and ethylene-independent pathways in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science* **8**, 10.

Zoundjihekpon, J., Hamon, P., Hamon, S., and Tio-Toure, B. (1995). Relation entre germination, mise à fleurs et niveau de prélèvement des semenceaux d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*. *Agronomie Africaine* **7**, 223-235.

Appendix

Table S1: Total of tubers sown per cultivar, sex and tuber part during the tow experiments 2019 and 2020.

Experiments	**Tuber Part**	**Cultivars**									
		Alakissa	Flou	Gnidou	Anago	Katala			Agatou		
		M	M	F	F	M	F	Mo	M	F	Mo
1st (May 2019)	Head	20	20	20	20	4	4	12	4	4	12
	Middle	20	20	20	20	4	4	12	4	4	12
	Base	20	20	20	20	4	4	12	4	4	12
2nd (May 2020)	whole tuber	32	26	26	28	8	18	11	13	9	25

M: male, F: female, Mo: monoecious.

Table S2: Endogenous hormone concentration (pm/gFW) in different part of tuber (head, middle and base) in sub-dioecious cultivars *Dioscorea rotundata* Katala and Laboko (male, female and monoecious).

Hormones		**Sex**	**Cultivars**					
			Katala			Laboko		
			Head	Middle	Base	Head	Middle	Base
ABA-types	ABA	M	595 ± 196	2136 ± 704	1742 ± 454	353 ± 273	642 ± 151	878 ± 112
		F	2706 ± 125	1205 ± 101	899 ± 154	1201 ± 191	2938 ± 397	1661 ± 426
		Mo	936 ± 178	818 ± 165	1456 ± 60	426 ± 173	860 ± 522	3237 ± 2283
	DPA	M	129±75	283±149	188±49	1810±1198	899±488	980±137
		F	77±9	87±41	154±91	122±29	68±55	74±43
		Mo	332.±91	221±100	461±30	519±81	1065±105	1862±708
	PA	M	312±133	643±139	182±100	205±174	214±113	165±2
		F	1055±300	549±97	508±145	209±54	627±146	750±172
		Mo	266±36	160±50	251±80	146±49	482±385	1021±690
	ABA-GE	M	971±345	2107±461	2043±258	161±110	63±13	121±21
		F	5564±2521	2456±82	1761±633	1783±831	4895±1345	4730±1581
		Mo	86±35	85±25	100±27	218±16	280±1	371±231
	NeoPA	M	8.03±2.33	15.09±6.10	10.09±0.38	-	-	-
		F	63±14	32±1	28.64±7	25±8	66±3	118±24
		Mo	-	-	-	-	-	-
	9OH-ABA	M	74±23	120±44	61±29	80±48	41±18	41±9
		F	266±63	124±33	165±103	46±3	194±39	180±47
		Mo	56±10	24±6	42.±0.9	36±12	81±26	220±68
Auxins	IAA	M	46±30	25±8	8±4	37±6	55±1	85.±29
		F	12±3	7.23±2.49	3.93±4.45	4.21±5.62	13±14	17±13
		Mo	25±17	10±3	53±12	31±11	24±3	59±22
	IAA-	M	-	-	-	4.77±2.43	23±15	18±0.9

	ASP	F	-	-	-	-	-	-
		Mo	0.99±0.63	3.17±0.20	18±21	1.24±0.43	2.19±0.94	20±24
	OxIAA	M	56±31	7.57±4	39±58	12±7	39±18	46±26
		F	23±9	11±2	12±6	64±38	109±61	45±10
		Mo	4.78±2.79	5.47±5.43	27±2	1.79±0.62	7.11±0.77	2.39±2.00
	OxIAA-GE	M	20±18	7.17±3.87	7.25±6.31	-	-	-
		F	52±29	29±15	186±198	22±15	4.27±3.74	17±16
		Mo	-	-	-	-	-	-
	PAA	M	543±778	51±16	73±14	88±77	160±42	149±8
		F	55±10	32±6	18±5	141±103	63±16	47±3
		Mo	158±38	57±41	153±50	164±2	200±130	249±158
	IAM	M	40±8	44±9	26±15	122±98	115±67	113±57
		F	52±38	21±18	68±51	38±36	15±2	22±13
		Mo	31±30	23±0.9	286±362	41±0.7	14±10	19±16
Jasmonates	JA	M	207±329	10±10	9.77±2.49	274±68	610±182	707±22
		F	4.09±3.46	3.29±2.24	1.88±1.18	5.78±3.34	8.00±3.82	21±31
		Mo	9.87±4.41	3.31±3.41	20±1	1115±326	2744±583	3426±3038
	JA-Ileu	M	202±337	2.71±2.17	0.67±0.40	213±40	506±265	406±95
		F	0.36±0.39	0.66±0.67	0.16±0.14	1.04±0.99	4.75±5.98	2.80±1.75
		Mo	0.68±0.24	1.01±1.17	4.32±5.25	557±231	607±110	430±282
	cisOPDA	M	316±271	78±18	245±29	343±168	61±13	40±10
		F	112±32	17±11	8.83±7.82	60±32	180±139	62±38
		Mo	30±11	143±173	42±11	188±95	265±37	211±17
Cytokinins	tZ	M	4.85±2.85	9.68±9.71	0.40±0.70	7.19±5.38	5.62±1.66	8.47±7.19
		F	8.60±2.44	2.95±3.20	0.58±1.01	0.68±0.67	12±1	1.74±1.03
		Mo	5.42±1.99	3.01±1.69	6.03±2.43	8.99±0.31	6.70±3.71	8.96±4.30
	tZR	M	3.33±1.94	2.20±0.72	0.50±0.05	36±32	40±16	23±3
		F	14±6	6.13±0.68	2.56±0.43	6.10±2.41	6.21±1.37	1.92±0.29

	Mo	4.71±1.14	6.35±0.62	7.98±2.14	39±2	16±9	5.69±2.25
tZ9G	M	0.82±0.01	0.23±0.40	0.87±0.61	-	-	-
	F	0.25±0.14	0.39±0.14	0.88±0.63	0.12±0.21	0.39±0.18	0.55±0.14
	Mo	-	-	-	-	-	-
tZRMP	M	1.93±1.16	1.09±0.44	0.29±0.35	5.24±5.23	2.48±1.16	1.38±1.05
	F	0.72±0.81	0.19±0.09	0.11±0.09	1.40±0.39	1.40±1.43	0.58±0.23
	Mo	5.52±0.22	3.90±1.23	12±9	11±0.9	2.63±0.68	2.090.74
DZ	M	3.23±2.29	2.69±1.69	1.79±1.46	5.48±4.60	8.44±5.73	7.90±0.56
	F	1.69±1.32	0.82±0.72	0.15±0.26	2.69±0.71	3.71±0.72	2.99±1.02
	Mo	2.69±0.13	2.58±0.60	4.68±0.25	10.87±1.75	7.92±3.29	11±7
DZR	M	2.83±1.28	1.15±0.14	1.45±0.50	18±15	20±6	11±1
	F	2.47±0.94	1.62±0.78	0.29±0.50	1.09±1.00	2.46±1.21	1.24±0.38
	Mo	0.67±0.17	0.51±0.24	0.95±0.32	7.94±0.28	4.56±1.97	1.80±0.23
DZ7G	M	-	-	-	0.17±0.04	0.38±0.33	0.84±0.30
	F	-	-	-	-	-	-
	Mo	2.50±0.52	1.82±0.31	16±15	4.33±1.70	2.06±1.94	2.45±0.93
DZ9G	M	3.81±0.16	4.67±1.98	2.73±1.17	3.91±2.73	4.16±1.69	3.28±0.07
	F	6.92±1.73	3.14±0.39	6.64±2.24	28±3	17±2	25±5
	Mo	6.84±0.20	4.59±1.73	9.89±2.10	8.74±2.86	6.98±4.86	8.91±1.90
DZROG	M	7.35±3.38	7.79±4.02	14±5	-	-	-
	F	8.58±3.92	10±5	16±9	90±22	94±29	71±30
	Mo	-	-	-	-	-	-
DZRMP	M	-	-	-	2.21±1.69	1.92±0.79	1.14±0.03
	F	-	-	-	-	-	-
	Mo	0.31±0.44	0.42±0.21	1.28±0.31	2.56±0.15	1.74±0.57	1.36±0.49
cZ	M				3.16±2.24	3.65±3.50	4.72±0.83
	F						
	Mo	2.30±0.91	0.53±0.27	3.66±2.68	2.36±1.78	0.77±0.59	5.42±3.63

	cZR	M	7.86±1.61	10±3	8.35±4.72	3.84±2.38	11±3	16±2
		F	4.53±0.69	3.32±0.41	3.71±1.43	5.69±0.45	5.67±0.26	3.54±0.45
		Mo	2.74±0.22	2.22±0.83	4.32±1.12	11±1	12±4	19±8
	cZOG	M	1.85±0.40	0.69±0.23	1.01±0.29	-	-	-
		F	1.27±0.84	0.12±0.10	0.18±0.07	1.73±0.39	4.34±0.37	3.99±0.89
		Mo	-	-	-	-	-	-
	cZ9G	M	0.57±0.12	0.75±0.27	1.38±0.51	-	-	-
		F	0.20±0.16	0.19±0.15	0.07±0.06	0.00±0.00	0.20±0.25	0.36±0.19
		Mo	-	-	-	-	-	-
	cZROG	M	3.86±1.37	2.96±2.18	0.00±0.00	-	-	-
		F	0.00±0.00	0.38±0.66	0.00±0.00	0.22±0.38	0.61±0.56	0.00±0.00
		Mo	-	-	-	-	-	-
	cZRMP	M	1.58±1.39	1.36±0.41	0.21±0.01	-	-	-
		F	0.44±0.27	0.19±0.09	0.11±0.09	1.35±0.55	0.88±0.65	0.92±0.50
		Mo	-	-	-	-	-	-
	iP	M	-	-	-	1.78±1.73	1.55±1.63	1.29±0.96
		F	-	-	-	-	-	-
		Mo	3.45±1.87	1.57±1.37	9.66±9.79	1.30±1.05	0.30±0.00	1.08±0.47
	iPR	M	2.72±2.03	1.73±1.22	0.59±1.03	19±16	6.66±0.88	3.61±0.22
		F	5.88±1.12	3.11±0.85	1.56±1.73	1.73±0.66	2.85±1.37	4.60±1.88
		Mo	10±0.25	23±4	26±1	5.81±3.21	4.11±2.39	2.86±0.00
	iPRMP	M	4.48±3.65	2.71±0.40	0.41±0.46	8.21±9.52	2.44±0.18	1.04±0.27
		F	1.27±0.90	0.26±0.46	0.09±0.16	1.55±0.54	1.94±1.53	2.12±1.50
		Mo	33±0.4	30±3	84±33	6.02±4.04	2.12±1.43	2.08±0.87
	MeS-ZR	M	2.57 ± 0.85	0.72 ± 0.66	4.22 ± 2.03	5.58 ± 5.83	25± 18	24± 14
		F	11± 8	6.20 ± 3.38	8.12 ± 4.16	10± 7	5.37 ± 1.14	4.09 ± 2.59
		Mo	9.41 ± 0.63	3.03 ± 0.76	42.02 ± 12.72	34.13 ± 13.44	30.66 ± 3.77	36.08 ± 1.65

ABA = abscisic acid, DPA = dihydrophaseic acid, PA = phaseic acid, ABA-GE = ABA-glucose ester, 9OH-ABA = 9-hydroxy-ABA, IAA = indole-3-acetic acid, IAA-Asp = IAA-aspartate, NeoPA = Neophaseic acid, OxIAA = oxo-indole-3-acetic acid, PAA = Phenylacetic acid, IAM = Indole-3-acetamide (IAA precursor), SA = salicylic acid, BzA = Benzoic acid, JA = jasmonic acid, BzA : Benzoic acid, JA-Ile = JA-isoleucine, cisOPDA (JA precursor), tZ = trans-zeatin, tZR = trans-zeatin riboside, tZ9G = trans-zeatin-9-glucoside, tZRMP = trans-zeatin riboside monophosphate, cZ = cis-zeatin, cZR = cis-zeatin riboside, cZOG = cis-zeatin-O-glucoside, cZROG = cis-zeatin riboside -O-glucoside, cZRMP = cis-zeatin riboside monophosphate, DZ = dihydrozeatin, DZR = dihydrozeatin riboside, DZ7G = dihydrozeatin-7-glucoside, DZ9G = dihydrozeatin-9-glucoside, DZOG = dihydrozeatin-O-glucoside, DZROG = dihydrozeatin riboside -O-glucoside, DZRMP = dihydrozeatin riboside monophosphate, iP = isopentenyl adenine, iPR = isopentenyl adenosine, iPRMP = isopentenyl adenosine monophosphate, ZR-MeS = 2-methylthio zeatin ribos

Inter-chapitre Chapitre III-Chapitre IV

Ce qu'on sait déjà

Avec pour objectif la recherche de causes probables de la variation du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*, nous avons montré que les variations du sexe ne dépendaient pas de la section (tête milieu ou base) du tubercule-semence mais plutôt du sexe du parent donneur du tubercule surtout chez les cultivars sub-dioïques (chap III). Parallèlement, nous avons observé que les teneurs en hormones des tubercules variaient selon le sexe des plantes (chap III) : l'acide jasmonique et l'acide salicylique étaient plus concentrés chez les mâles et les monoïques alors que l'acide abscissique, les cytokinines et l'acide benzoïque étaient plus concentrés chez les femelles.

Par ailleurs, l'étude histologique (chap I) a montré que les primordia floraux des sexes mâles et femelles étaient présents au début de la morphogenèse florale quel que soit le sexe de la fleur et que chez les cultivars sub-dioïques des reste d'organes de sexes opposés restaient présents à l'état rudimentaire et même parfois très développés. Les organes floraux des deux sexes sont donc initiés mais leur développement est arrêté en fonction du sexe de la plante ; ceci suggère que leur développement peut être poursuivi s'il est stimulé. Nous avons alors formulé l'hypothèse qu'une application exogène d'hormone pourrait favoriser le développement de fleurs femelles ou mâles en fonction de l'hormone utilisée comme cela a été montré chez d'autres espèces monoïques et dioïques.

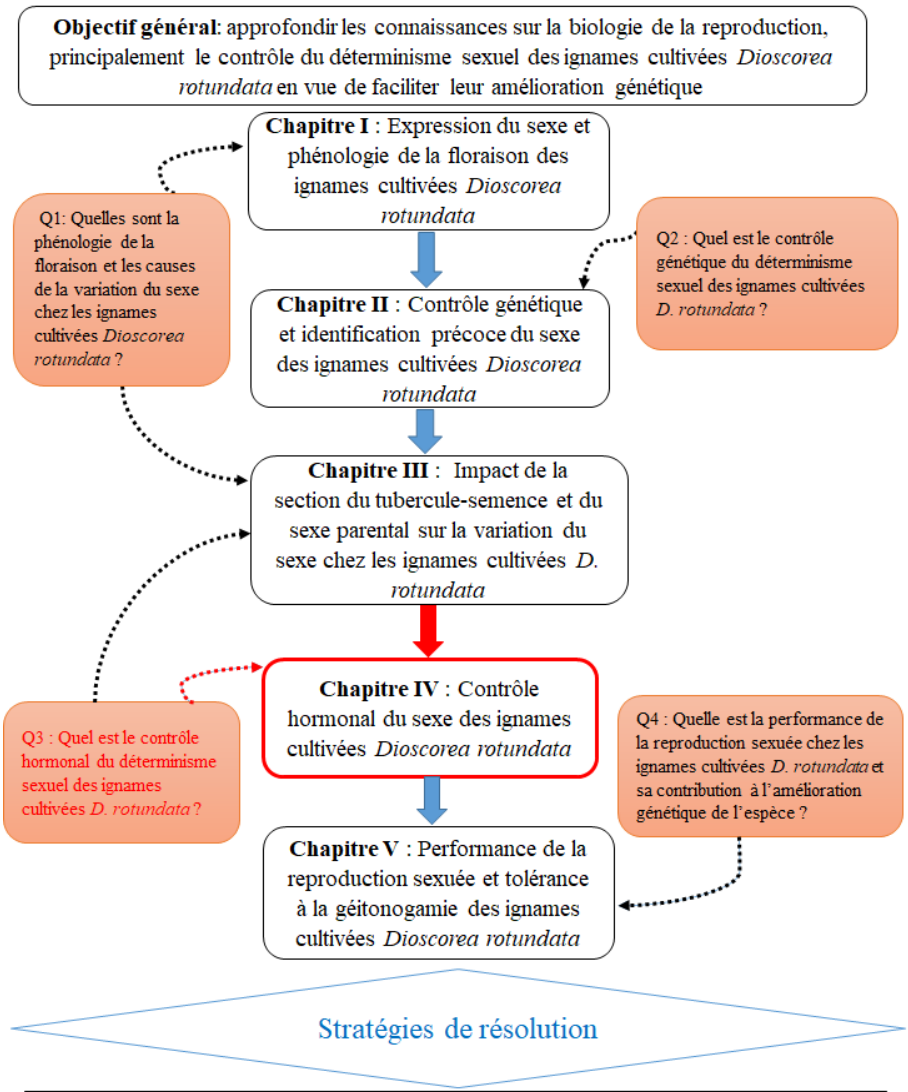
Le but visé dans ce quatrième chapitre

Compte tenu de la forte concentration de jasmonates et d'acide salicylique dans les tubercules de plantes mâles, nous avons postulé que ces hormones pourraient avoir un effet masculinisant chez les ignames *D. rotundata* tandis que les cytokinines, l'acide abscissique et l'acide benzoïque plus concentrées dans les tubercules de plantes femelles, auraient un effet féminisant. Ainsi, ce quatrième chapitre a visé à :

- Evaluer l'effet masculinisant ou féminisant de ces hormones chez les ignames cultivées *D. rotundata*.
- Evaluer l'impact de ces hormones sur l'intensité de la floraison et le développement des fleurs chez les ignames cultivées *D. rotundata*.

La stratégie utilisée

Deux des hormones dont une potentiellement masculinisante (methyl jasmonate) et l'autre potentiellement féminisante (benzylaminopurine) ont été choisies pour effectuer des applications foliaires sur des plantes de 6 cultivars (2 mâles, 2 femelles et 2 monoïques) utilisés dans les études précédentes. Compte tenu de la forte instabilité observée chez les monoïques, un premier essai a d'abord été effectué avec des plantes clones de deux cultivars monoïques (technique de minissetts) pour éviter les effets liés à la variabilité génétique. Par la suite, les résultats obtenus ont été confirmés et élargis en utilisant les 6 cultivars afin de comparer leur effet sur des cultivars à sexe stable et instable. Les pulvérisations ont été réalisées une fois par semaine dès le stade végétatif.



Aperçu des relations inter-chapitres et stratégies de résolution.

Chapitre IV. Cytokinins and Jasmonates affect sex expression, flowering time and flowering intensity in cultivated yam *Dioscorea rotundata* (Poir.)

Narcisse Denadi[1,2,3], Aline Vanhove[1] , Jeanne Zoundjihékpon[2] , Christophe Gandonou[3] and Muriel Quinet[1]

[1]Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-laNeuve Belgium

[2]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP4521, Benin.

[3]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP526, Benin; ganchrist@hotmail.com.

Abstract

Cultivated yam (*Dioscorea rotundata*) is a staple tuber crop in West Africa which is mainly vegetatively propagated. Although the majority of yam cultivars flower, the control of its sexual reproduction remains largely unknown despite its importance for plant breeding programs. While described as a dioecious species, it has several monoecious cultivars that are often subject to spontaneous sex changes. This study aims to evaluate the impact of phytohormones (cytokinins and jasmonates) on sex expression and flower development in cultivated yams *D. rotundata*. Exogenous applications of 1 mM 6-benzylaminopurine (BAP) and 1 mM methyl jasmonate (MeJa) were performed on seedlings of monoecious (Katala and Laboko), female (Gnidou, Anago) and male (Flou) cultivars. Monoecious cultivars produced monoecious, male and female plants while female and male cultivars had rather stable sex. Our results showed that MeJa had a masculinising effect in monoecious cultivars and induced inflorescence and flower malformations in female cultivars (56% in Gnidou and 37% in Anago). Most malformations were inflorescence branching and sterile flowers (non-differentiated ovary) with extra cycles of sepals. Moreover, MeJa reduced flowering time in cultivars of all sexes and increased the number of inflorescences per plant as well as the number of flowers per plant. Our results showed that BAP reduced the flowering time, synchronized flowering in female plants and increased the number of inflorescences per plant in monoecious cultivars. However, our results did not allow strong conclusions regarding the effect of BAP on sex expression due to the high proportion of female flowering in both control and BAP sprayed plants. Further research that would highlight hormone and homeotic gene interactions in flowering could be of key interest in understanding hormonal control of sex in cultivated yams *D. rotundata*.

Key words: *Dioscorea rotundata*, cytokinins, jasmonates, sex expression and flower development.

1. Introduction

The control of the reproductive system of cultivated plants is a key element for their improvement. There is a great diversity of reproductive systems in flowering plants, ranging from hemaphrodism to monoecy and dioecy with intermediate forms (Renner, 2014; Yampolsky, 1922). The diversity of types and forms of sexual polymorphism is controlled by numerous mechanisms (Chuck, 2010; Tanurdzic and Banks, 2004), including phytohormones (Chailakhyan and Khrianin, 2012; Khryanin, 2002). Phytohormones are a class of internal signalling molecules that integrate external or internal signals to regulate plant growth and development processes (Conti, 2017) and they play important regulatory roles in plant physiology (Browse, 2009a; Chen et al., 2006; Wasternack and Hause, 2002). Much research has reported their involvement in floral induction, inflorescence and flower development, and sex identity in several plant species, including tuber and root crops such as taro, cassava and sweet potato (Ceballos et al., 2017; Ceballos et al., 2020; Lebot, 2010; Luthra et al., 2006; Muthoni et al., 2012; Pineda et al., 2020; Quero-Garcia et al., 2010).

Yam is one of the most widely grown edible tuber crops in the tropics. It is the second most important root and tuber crop after cassava (FAOSTAT, 2020). Yam accounts for more than 600 species (Burkill, 1960) but few are cultivated. Most yam species belong to the genus *Dioscorea,* including the species *Dioscorea rotundata, D. cayenensis D. alata, D. esculanta, D. trifida* et *D. pentaphylla* (Lebot, 2019). *Dioscorea rotundata* is indigenous to West Africa and is the most important yam species in terms of production volume (Abang et al., 2003). Yam is mainly propagated vegetatively, although it does flower. Until now, yam cultivation in the field has been done using micro-tubers, sections of long tubers (Zoundjihekpon et al., 1995) or minisetts (Brice et al., 2016). Yam flowering allows research programmes to combine the potential of vegetative propagation with sexual reproduction to optimise varietal selection (Denadi et al., 2022; Girma et al., 2019; Mondo et al., 2020; Mondo et al., 2022).

The species *D. rotundata* is essentially characterised by dioecy (separate sexes carried by different plants) with an often unbalanced sex ratio depending on the region (Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b). However, rare monoecious plants bearing both sexes on the same plant or hermaphrodites bearing both sexes in the same flower can be found

(Abraham and Nair, 1979; Bai and Ekanayake, 1998; Sadik and Okereke, 1975). While the conservation of sexual reproduction offers opportunities for genetic improvement of the species, many useful cultivars that could serve as parents in a hybridisation programme have never flowered or are irregular and sparse in flowering, i.e. few flowering plants, few inflorescences per plant or few flowers per inflorescence (Asiedu et al., 1998; Hamadina et al., 2009). Problems of sex instability have also been reported within the species (Dansi et al., 1999; Denadi et al., 2020; Girma et al., 2019), especially in monoecious cultivars despite the existence of potential genes determining sex expression within the species (Denadi et al., 2020; Tamiru et al., 2017). Plants from monoecious seed tubers could completely change sex, giving male and female offspring (chap. 3). Tamiru et al. (2017) identified a genomic region associated with female heterogametic sex determination in *D. rotundata* so that plants with ZZ genotype are male while plants with ZW genotype could be females, monoecious, male or not flowering (Tamiru et al., 2017). Agre et al. (2020) suggested that sex variation in *D. rotundata* monoecious plants is related to differential expression of the W locus depending on growth environment (Tamiru et al., 2017). Moreover, through genome-wide association studies aiming to dissect the molecular basis of plant sex in *D. rotundata*, Asfaw et al. (2022) identified that most candidate genes associated with sex were involved in the regulation of phytohormones. This suggests a possible involvement of phytohormones and environment in sex expression in *D. rotundata*.

Several studies have reported on the ability of hormones to reverse sex in plant species when applied in required concentrations alone or in combination. In hemp (*Cannabis sativa*) - characterised by a dioecious-monoecious system - or cucumber (*Cucumis sativa*) which is monoecious, short days as well as the exogenous supply of abscisic acid and auxin had a feminising effect whereas long days as well as the exogenous supply of gibberellins had a masculinising effect (Golenberg and West, 2013). In cassava, an essentially monoecious species, trauma (pruning of branches) led to a generalized feminization with a strong transformation of male flowers into hermaphrodite flowers and an application of cytokinins on plants with pruned branches completely transformed these hermaphrodite flowers into females (Pineda et al., 2020). This treatment also reduced flowering time and increased the number of inflorescences and flowers (Mondo et al., 2020). In cultivated yams, studies have shown that sex expression and flowering were often influenced by growing conditions (initial tuber size, plant health, soil

moisture, atmospheric humidity, soil fertility, temperature and photoperiod) and the parts of the propagules (seed or seed tuber) used for planting (Akoroda, 1983, 1985; Akoroda et al., 1984; Bai and Jos, 1986; Hamadina et al., 2009; Lebot et al., 2019; Segnou et al., 1992; Tamiru et al., 2017). However, none of this work had really addressed the involvement of hormones either on sex expression or on the duration and intensity of flowering.

Our previous work showed that the hormonal profile of tubers varied according to the sex of the plant (chap. 3) and suggested that jasmonic acid and salicylic acid might have a masculinising effect while abscisic acid, cytokinins and benzoic acid might have a feminising effect in *D. rotundata*. This study aims to highlight the effect of phytohormones on flowering and sex expression in monoecious *D. rotundata* cultivars to identify whether phytohormone application could control sex determination. Exogenous application of cytokinins and jasmonates were performed on monoecious, male and female cultivars and flowering parameters and flower development were followed. Our results showed that phytohormones affect flowering and sex determination in *D. rotundata* and that jasmonates had a masculinising effect in this species.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Five cultivars (Laboko, Katala, Flou, Gnidou, and Anago) grouped in 3 categories were used in this study:

• Male (M): Flou ; plants of these cultivars usually produce male flowers.

• Female (F): Gnidou and Anago; plants of these cultivars usually produce female flowers.

• Mix (Mx): Laboko and Katala; plants of these cultivars produce either male, or female or monoecious plants.

Two experiments were performed. The cultivars Laboko and Katala were used in the first experiment aiming to identify possible masculinising or feminising effects of methyl jasmonate and cytokinins on monoecious cultivars. The cultivars Gnidou, Anago, Flou and Katala were used in the second experiment to confirm the masculinising effect of methyl jasmonate.

2.2.Experimental site

Field trials were performed at the "Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole" (CREFIISDA). This center covers an area of 24 ha and is located in the commune of Zogbodomey (village of Lomey, 6°56' -7°08' North, 1°58' - 2°24' East). This region has an herbaceous vegetation on a clay soil characterised by good water retention, which is favorable to yam cultivation. The average annual temperature was 26.8°C, the annual rainfall was 1244 mm and the average photoperiod was 12/12h.

2.3.Growing conditions and phytohormone application

2.3.1. Impact of cytokinins and jasmonates on monoecious plants

In the first experiment, clones were obtained by the minisett technique from a single monoecious tuber of the cultivars Laboko and Katala. For each of the two cultivars, a long tuber (Figure 1 A) was cut into 20-25 g slices. About 40 minisetts were obtained for each cultivar. The fragments were dried in the shade (Figure 1 B) for about an hour and then germinated (Figure 1 C) on 20 February 2019 in a shaded area and watered once a day. After germination (Figure 1 D), 45 days after sowing, seedlings were transferred to mounds (Figure 1 E) in two blocks, one block per cultivar. The tubers of the resulting plants were harvested in December 2019 and stored (Figure 1 F) to be used for the experiment with hormonal treatment.

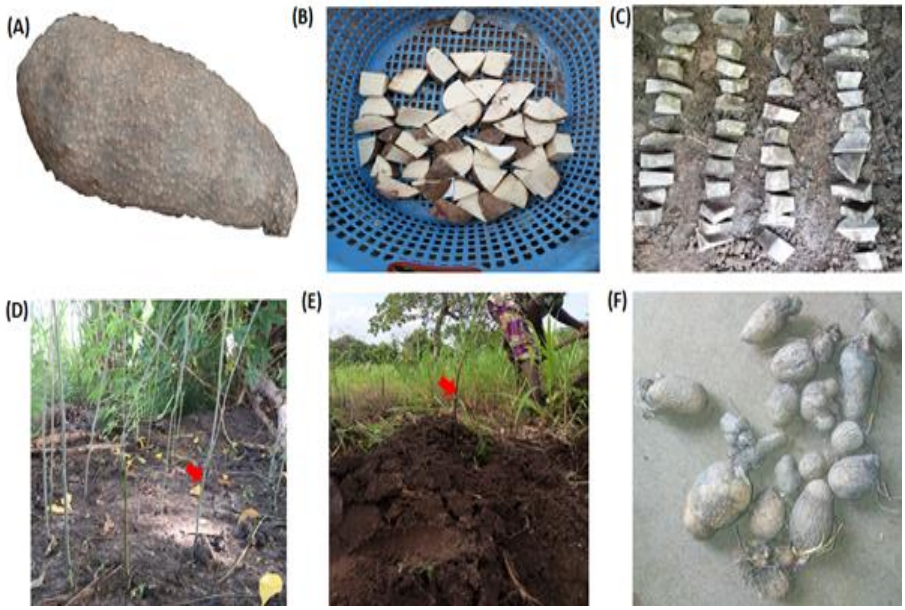


Figure 1: Production of clones by the minisett technique: (A) whole tuber; (B) dried tuber fragments; (C) pre-germination; (D) germinated seedlings; (E) transfer of seedlings into mounds; (F) micro-tubers (clones).

After 5 months of dormancy, the tubers were sown on 13 May 2020 in a Fisher block design with 3 blocks of 4 rows of 10 ridges each. Each block included 20 plants of the Katala cultivar and 20 plants of the Laboko cultivar and corresponded to a different hormonal treatment.

The three phytohormone treatments were: (1) plants sprayed with demineralised water containing 0.004% Tween 20 (control); (2) plants sprayed with a solution of 1mM 6-benzylaminopurine containing 0.004% Tween 20 (BAP); (3): plants sprayed with a solution of 1mM methyl jasmonate containing 0.004% Tween 20 (MeJa). Tween 20 was added as a surfactant. The phytohormone concentration used was chosen based on the work of Quinet et al. (2014). Phytohormone applications started on 15 June 2020 (at about two-leaf stage) at a rate of once a week until complete flower formation and differentiation. For each plant, 2-4 sprays (depending on the development of the plant) were applied to the top of the plant. The experiment ended on 10 October 2020 after 117 days of treatment.

2.3.2. Impact of jasmonates on male, female and monoecious plants

For the second experiment, the same set-up (Fisher block) was used with 2 blocks of 2 lines of 10 mounds each per cultivar. Each block corresponded to a phytohormone treatment. In total, 30 plants of each cultivar (Gnidou, Anago, Flou and Katala) were used per treatment with 120 plants per block, i.e. 240 plants in total. Sowing took place on 13 March 2021. The first spraying started 46 days later (26 April 2021) when the germinated plants had at least two leaves. Two treatments were applied: (1) plants sprayed with demineralised water containing 0.004% Tween 20 (control); (2) plants sprayed with a solution of 1mM methyl jasmonate containing 0.004% Tween 20 (MeJa). The application method, frequency and duration were as previously described. The experiment ended on 25 August 2021 after 120 days of treatment.

2.4. Measured parameters

For both experiments, flowering time, sex of progeny, sex ratio, number of inflorescences per plant, inflorescence length and number of flowers per inflorescence were monitored.

The flowering time was calculated as the number of days between the germination date and the flowering date. The flowering date in the field is characterised by the appearance of the first inflorescence buds visible to the naked eye.

The sex ratio was calculated as the ratio between the number of plants of a given sex (male, female and monoecious) and the total number of flowering plants.

The number of inflorescences per plant was counted on all plants and the length of inflorescences and the number of flowers per inflorescence were counted on 10 inflorescences per plant.

The number of malformed flowers was also analysed (especially in the female cultivars Gnidou and Anago) on 10 inflorescences per plant. The rate of malformed flowers was calculated as the ratio between the number of malformed flowers and the total number of flowers per inflorescence, expressed as a percentage.

2.5. Histological analysis

In order to evaluate the different types of malformations we performed observations under stereomicroscope and histological sections of potentially malformed flowers. For this purpose, mature flowers were harvested and fixed in FAA (70% ethanol : acetic acid : formaldehyde (18:1:1, by vol.). For histological analysis, samples were then dehydrated in a graded ethanol series, embedded in paraffin and 5 µm sections were made following the procedure of Quinet et al. (2004); Quinet et al. (2006). Longitudinal sections were stained with haematoxylin-fast green and observed under a light microscope.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with JMP Pro 16 software. A logistic regression was performed to measure the impact of phytohormonal treatment, parental sex and variety on the sex expression of the progeny. Then, ANOVAs were performed to measure the impact of phytohormonal treatment and variety on flowering parameters, namely flowering time, number of flowers per inflorescence, inflorescence length and number of flowers per inflorescence. Before the ANOVAs, normality was checked on the basis of graphs (box plot and qq plot) and homogeneity of variances on the basis of Levene's test. Post-hoc tests were performed via student's t tests for pairwise comparisons between treatments and between varieties.

3. Results

3.1. Impact of cytokinins and jasmonates on monoecious cultivars

Exogenous application of cytokinins (BAP) and methyl jasmonate (MeJa) were compared in two monoecious cultivars, Katala and Laboko.

As shown in Figure 2, 80% and 82% of the control plants were female for Katala and Laboko, respectively, even though the seed tubers were from monoecious plants. Male and monoecious plants represented about 10% or less of the offspring whatever the cultivar. Similarly, plants sprayed with BAP showed strong female sex expression (85%) in both cultivars, the remaining plants being exclusively monoecious. In contrast, plants sprayed with MeJa were predominantly male (80%) in both cultivars with some monoecious and female plants.

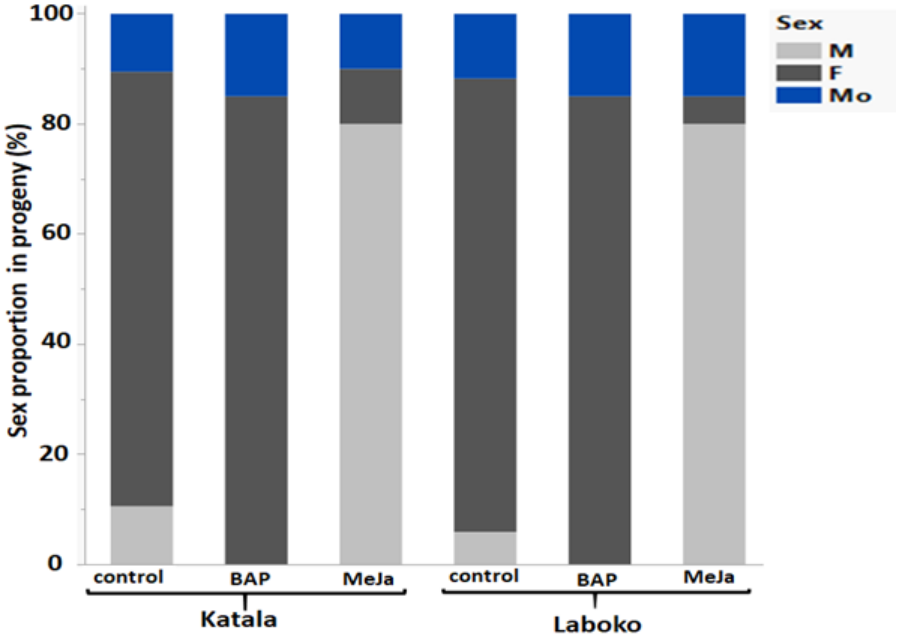


Figure 2: Sex ratio of the offspring of monoecious plants of *D. rotundata* cv. Katala and Laboko treated with exogenous application of water (control), 1 mM benzylaminopurine (BAP) or 1 mM methyl jasmonate (MeJa). M = Male; F = Female and Mo = Monoecious

Table S1 summarized the data of flowering time, number of inflorescence per plant, inflorescence length and number of flowers per inflorescence after phytohormonal treatment according to the plant sex in both cultivars. However, due to the low percentage of male and monoecious plants observed under control conditions, statistical comparison among phytohormonal treatments was only possible for female plants between control and BAP treatments (Figure 3).

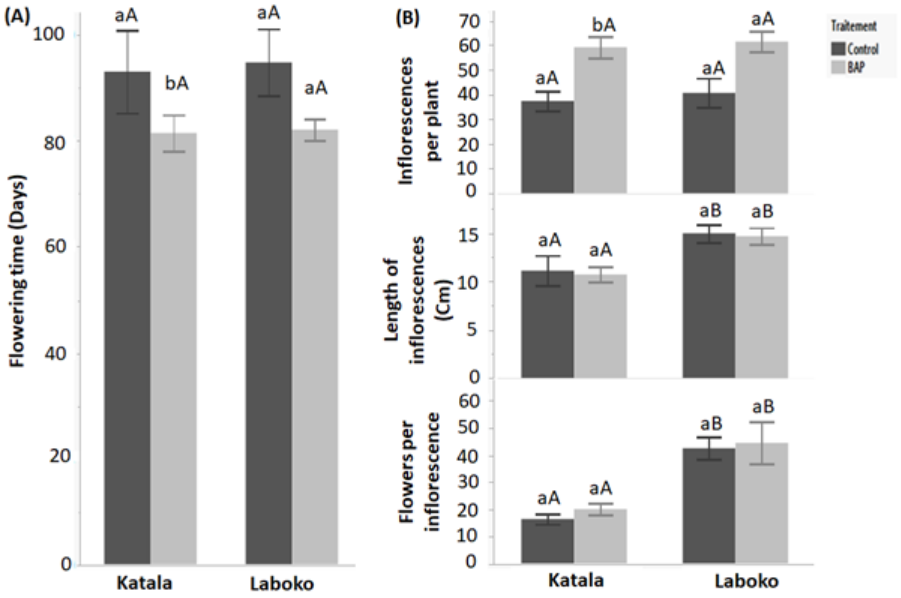


Figure 3: Flowering parameters of the offspring of monoecious plants of *D. rotundata* cv. Katala and Laboko treated with exogenous application of water (control) or 1 mM benzylaminopurine (BAP). (A) flowering time, (B) number of inflorescences per plant, inflorescence length and number of flowers per inflorescence

3.2.Effect of BAP on flowering time and flowering intensity

Overall, male plants flowered before monoecious plants and female plants were the latest to flower whatever the treatment (Table S1). Plants treated with BAP flowered about 12 days earlier than control plants ($F = 84.41$, $P < 0.0001$) and no differences were observed between cultivars ($F = 0.21$, $P = 0.64462$; Figure 3 A). The reduction of flowering time with BAP was observed for both female and monoecious plants (Table S1). Flowering time was also reduced after MeJa treatment compared to control plants whatever the sex of the plant and the cultivar (Table S1).

Regarding inflorescence parameters, female plants produced usually less inflorescences per plant than male and monoecious plants while their inflorescences were longer (Table S1). BAP increased the number of inflorescences per plant (60 vs. 39; $F = 314.06$, $P < 0.0001$; Figure 3 B), mainly in Katala although the cultivar did not affect this number ($F = 1.09$, $P = 0.2990$). However, the inflorescences of Laboko were longer and

contained more flowers than the ones of Katala (14.79 vs. 10.89 cm; F = 212.05, P< 0.0001; 43 vs. 18 flowers; F = 409.37, P< 0.0001; Figure 3 B) but BAP affected neither the inflorescence length (F = 0.24, P = 0.6219) nor the number of flowers per inflorescence (F = 0.71, P = 0.4005). The number of inflorescences per plant increased also with MeJa but inflorescences were shorter with less flowers compared to controls (Table S1).

3.3. Impact of jasmonates on male, female and monoecious cultivars

To confirm the masculinising effect of MeJa, exogenous applications of MeJa were performed on the offspring of male (Flou), female (Gnidou, Anago) and monoecious (Katala) cultivars.

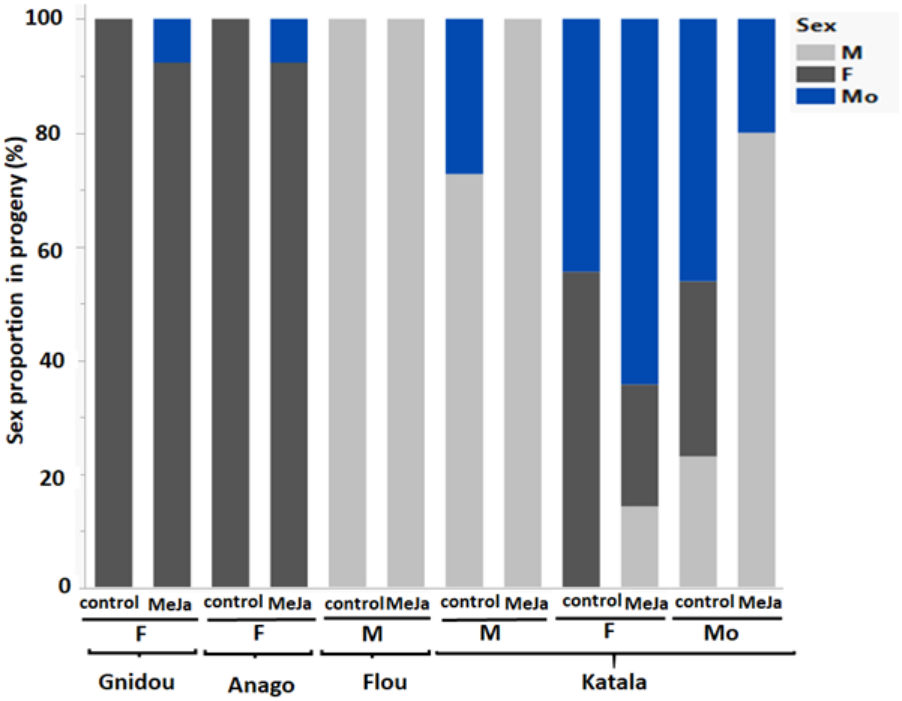


Figure 4: Sex ratio of the offspring of male, female and monoecious plants of *D. rotundata* cv. Gnidou, Anago, Flou and Katala treated with exogenous application of water (control) or 1 mM methyl jasmonate (MeJa). M = Male; F = Female and Mo = Monoecious

Most of the plants of the female cultivars Gnidou and Anago kept their parental sex. Indeed, all control plants and 92% of the MeJa treated plants

were female for these cultivars. The remaining 8% of the MeJa treated plants were monoecious. Similarly, sex remained stable in the male cultivar Flou even after MeJa treatment since all plants of this cultivar were male. However, the sex ratio changed with the MeJa treatment in the Katala cultivar. The impact of MeJa was compared on the three sex types in this cultivar. For male plants, parental sex was retained in 73% of the control plants and 23% were monoecious, whereas all MeJa-treated plants were male (100%). In females, parental sex was retained in 56% of control plants while 44% were monoecious. In MeJa-sprayed females, only 22% of plants retained parental sex; 64% were monoecious and 14% were male. However, the masculinising action of MeJa was not significant in female Katala plants ($\chi 2 = 3.5$, 0,1736). In monoecious plants, 46% of the control plants retained their parental sex; 23% and 31% of them were male and female, respectively. In monoecious plants treated with MeJa, only 20% of the plants retained the parental sex and 80% expressed the male sex. In monoecious plants, the masculinising effect of MeJa was highly significant ($\chi 2 = 10.31$, 0.0058).

This experiment also showed the impact of MeJa on flowering time of male, female and monoecious cultivars (Figure 5 A). Irrespective of the sex of the cultivars, MeJa advanced flowering time compared to control plants ($F = 54.82$, $P < 0.0001$). In females, the difference in flowering time between MeJa-treated and control plants was about 18 days in the cultivars Anago and Gnidou and 16 days in Katala. In male plants of Flou and Katala, the difference was 9 and 11 days respectively. In monoecious Katala plants, MeJa treatment advanced flowering by 17 days.

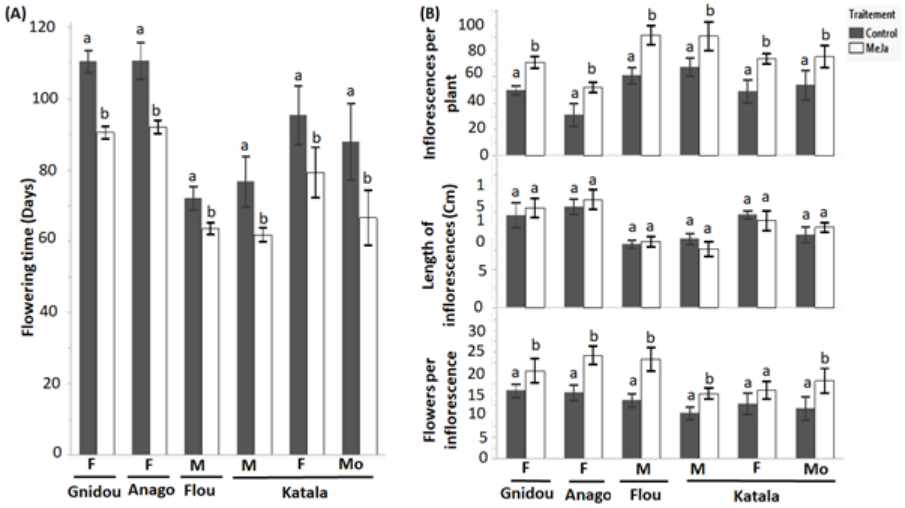


Figure 5: Flowering parameters of the offspring of male, female and monoecious plants of *D. rotundata* cv. Gnidou, Anago, Flou and Katala treated with exogenous application of water (control) or 1 mM methyl jasmonate (MeJa). (A) flowering time, (B) number of inflorescences per plant, inflorescence length and number of flowers per inflorescence. M = Male; F = Female and Mo = Monoecious.

Regarding inflorescence production, MeJa increased the number of inflorescences per plant compared to the control plants (80 vs. 52; $F = 115.41$, $P < 0.0001$) regardless of cultivar (Figure 5 B). In contrast, MeJa had no impact on inflorescence length ($F = 1.99$, 0.1597) but increased the number of flowers per inflorescence ($F = 103.15$, $P < 0.0001$; Figure 5 B).

Although exogenous MeJa increased the number of flowers per inflorescence, significant malformation was observed mainly in the female cultivars Gnidou and Anago. The malformation rate was about 56% in Gnidou and 37% in Anago. In the MeJa sprayed plants, inflorescence branching was observed in contrast to the control plants (Figure 6 A and B). While the female flowers showed a well-formed cycle of sepals and carpels (Figure 6 D, E and I), some MeJa sprayed plants showed flowers with additional cycles of sepals and undifferentiated carpels (Figure 6 E, J, f and K). Some malformed female flowers also had inflorescence-like appearance with sometimes well differentiated sepals but the central cycle was not differentiated into stamens or carpels (Figure E and J). Other malformed female plants showed flowers with a similar structure to the male flowers

except that unlike the well-formed male flowers (Figure 6 C and H), these had central cells that were not differentiated into stamens (Figure 6 G and L).

.

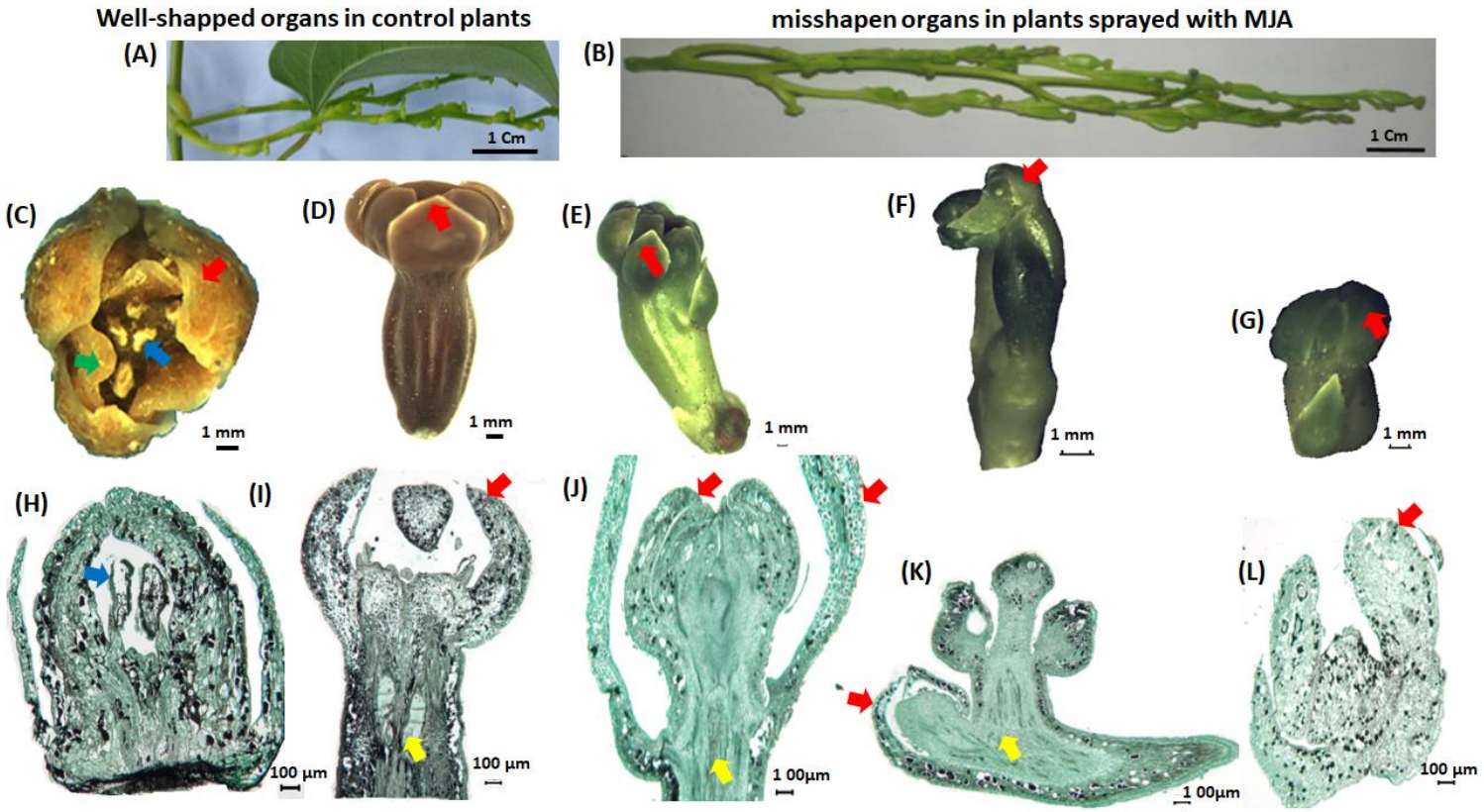

Well-shapped organs in control plants
misshapen organs in plants sprayed with MJA
(A)
(B)
1 Cm
1 Cm
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
1 mm
1 mm
1 mm
1 mm
1 mm
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
100 µm
100 µm
1 00µm
1 00µm
100 µm

Figure 6 : Impact of methyl jasmonate on flower development in female dioecious plants (Gnidou and Anago). (A and B): female inflorescence; (C): well-formed male flower; (D): well-formed female flower; (C-G): poorly formed female flowers; (H): longitudinal section of well-formed male flower; (I): longitudinal section of well-formed female flower; (J-L) longitudinal section of poorly formed female flowers. Red, green, blue and yellow arrows indicate respectively sepal, petal, stamens and ovary.

4. Discussion

4.1.Sex variation in monoecious plants of de *D. rotundata*

In the first experiment with the monoecious Katala and Laboko clones, a strong sex variation was observed in the progeny of monoecious control plants, even though all plants were genetically identical. The progeny showed a strong female sex expression in both the Katala and Laboko cultivars. This sex variation was reconfirmed in the monoecious Katala control plants in the second year with progeny expressing both male and female sex. Sex variations were also observed in male and female Katala plants with a shift towards the monoecious trait. However, the sex of the progeny was stable in the male (Flou) and female (Gnidou and Anago) cultivars. These results confirm our earlier findings that (i) sex variation was mostly observed in mixed flowering cultivars and very little in strict male or female cultivars and that (ii) when sex variation was present, progeny of monoecious plants gave mainly unisexual plants while unisexual plants gave mainly monoecious plants (chap. 3). Spontaneous sex changes make control of sex difficult in cultivated yams *D. rotundata*. We also observed that during flower morphogenesis both stamen and carpel primordia were initiated in *D. rotundata* and that in unisexual flowers the floral organ development of the other sex was arrested earlier in cultivars with stable sex than in cultivars showing sex variability (chap. 1). Genes involved in sex determination, floral organ identity and floral organ development most probably interact to determine sex stability. According to the female heterogametic sex determination hypothesis of Tamiru et al. (2017), the Z-suppressor effect would be under the influence of the environment and result in a female phenotype if the effect is complete or in a monoecious, male or non-flowering phenotype if the effect is partial or nil. We indeed observed that the W allele was present in the cultivars Katala and Laboko (Denadi et al., 2020). Golenberg and West, (2013) suggested that key sex-determining genes must exist in monoecious species, but that independent cues, either external environmental or internal physiological, must regulate their expression. It is indeed known that environmental conditions such as water stress, light intensity, shading, nutrient abundance etc. or phytohormonal treatments may affect sex identity in several monoecious and dioecious species (Campbell et al., 2021; Cossard and Pannell, 2021; Fang et al., 2022; Shahzadi et al., 2022; Singh et al., 2021; Wang et al., 2022). Regarding phytohormonal control, auxins and cytokinins were reported to have rather a

feminising effect (Martínez and Jamilena, 2021; Wang et al., 2019; Wu et al., 2022) while gibberellins and jasmonic acid have rather a masculinising effect (Wang et al., 2021; Zhao et al., 2021) even though differences could be observed among species.

4.2.MeJa has a masculinising effect in *D. rotundata*

The results of this study showed that monoecious plants treated with MeJa had a strong male sex expression in their progeny. In unisexual female cultivars (Gnidou and Anago) sprayed with MeJa, malformations in reproductive structures with branched inflorescences and flowers, suppression of the ovary in female flowers, and transformation of female flowers into sterile male flowers (without stamens) were observed. A possible masculinising effect of MeJa can be deduced, which is total in monoecious cultivars and partial in unisexual females. The feminising effect of BAP could not be confirmed due to the strong expression of the female sex in both control and BAP-treated plants. These results support the hypothesis of a possible masculinising effect of jasmonates in cultivated yams *D. rotundata* (chap. 3). We had previously observed a high concentration of jasmonic acid in tubers from male and monoecious plants in contrast to tubers from female plants in the cultivars Katala and Laboko. It is known that phytohormones (gibberellins, jasmonates, auxins, brassinosteroids cytokinins...) play an important role in the regulation of floral morphogenesis. Their presence and appropriate balance are essential for the proper development of these structures (Song et al., 2013).

While cytokinins are known for their key roles in cell division and their involvement in carpel development and suppression of stamen development (Gordon et al., 2009; Nibau et al., 2011), jasmonates (JA) mainly control late stages of stamen development such as filament elongation, formation of viable pollen and anther dehiscence (Marciniak and Przedniczek, 2019). According to Marciniak and Przedniczek (2019), jasmonates activate a complex of transcription factors crucial for normal stamen development. In *Arabidopsis thaliana*, exogenous applications of jasmonates could restore deficiencies in male fertility, anther dehiscence and filament elongation (Avanci et al., 2010; Caldelari et al., 2011; Sanders et al., 2000; Stintzi and Browse, 2000; von Malek et al., 2002). Given the strong involvement of jasmonates in the formation of male sex organs, it is obvious that the application of this hormone to female *D. rotundata* plants could lead to masculinisation of the flowers. It is known that in some species, hormonal

treatment can influence sex expression. This is the case for cucumbers (*Cucumis sativus*), hemp (*Cannabis sativa*), spinach (*Spinachia oleracea*) or bitter melon (*Momordica charantia*) in which auxin is feminising and gibberellin rather masculinising (Akter and Rahman, 2010; Galoch, 1978; Ishiguro et al., 2001; Ito et al., 2007; Iwahori et al., 1970; West and Golenberg, 2018; Zhang et al., 2017). In cassava, it has been shown that branch pruning leads to generalised feminisation with a strong transformation of male flowers into hermaphrodites and that an application of BAP to plants with pruned branches completely transforms hermaphroditic male flowers into females (Pineda et al., 2020). Foliar application of gibberellins has the same effect in potato (Muthoni et al., 2012). However Browse (2009b) has reported a masculinizing effect of JA in the plant *Zea mays*, showing that JA has a masculinising effect in other plants that yam.

4.3. BAP and MeJa accelerate flowering and increase the number of inflorescences and flowers in *D. rotundata*

Our results showed that exogenous application of BAP and MeJa accelerated flowering and reduced flowering time. In angiosperms, floral induction is under the control of exogenous and endogenous signals and depends on a complex interaction between genetic, environmental and hormonal factors (Amasino and Michaels, 2010; Bernier and Périlleux, 2005; Bouché et al., 2016; Cho et al., 2017; Srikanth and Schmid, 2011; Takeno, 2016). For example, it is known that gibberellins are floral activators in *Arabidopsis thaliana* and that they act through the activation of flowering integrator genes (Achard et al., 2004; Alvey and Harberd, 2005; Bao et al., 2020; Yamaguchi et al., 2014). Also in potato, exogenous foliar application of gibberellins could lead to early flowering (Cheng et al., 2018). Although gibberellins are the main hormones involved in floral transition in *Arabidopsis*, they interact with other phytohormones such as cytokinins, auxin, abscisic acid, ethylene, jasmonic acid and brassinosteroids (Bao et al., 2020). In Arabidopsis, cytokinins could directly activate flowering genes (D'Aloia et al., 2011; Ionescu et al., 2017). Its involvement in floral induction has also been proven in *Sinapsis alba* (Bernier et al., 1993; Bonhomme et al., 2000; D'Aloia et al., 2011). In cassava, exogenous application of BAP leads to early flowering (Muthoni et al., 2012) as we observed in *D. rotundata*. In line with our observations, some studies have reported that jasmonates promote flowering in certain species. In 6 oilseed

rape cultivars, exogenous MeJa induced early flowering (Pak et al., 2009). However, JA had been reported to have rather inhibitory effects on various plant growth and development processes (Griffiths, 2020; Huang et al., 2017; Pan et al., 2020; Pauwels et al., 2010) including flowering time (Zhao et al., 2022). In Arabidopsis, for example, exogenous application of JA suppressed flowering (Wang et al., 2017). In the short-day plant *Pharbitis nil*, exogenous application of MeJa to cotyledons also significantly inhibits flowering (Maciejewska and Kopcewicz, 2002; Maciejewska et al., 2004). A similar floral repressor effect of JA was observed in *Triticum aestivum* (Diallo et al., 2014); *Chenopodium rubrum* (Albrechtova and Ullmann, 1994), or *Zea mays* (Beydler et al., 2016). In other species such as *Lemna minor*, JA regulated floral induction in a concentration-dependent manner: low concentrations of JA (0.475-47.5 nmol) favoured floral induction, while high concentrations (237.5 or 475 nmol) inhibited it (Krajnčič et al., 2006). In cucumber (*Cucumis sativus*), a reduction in endogenous jasmonate levels delayed the flowering of male flowers (Cai et al., 2020). The effect of jasmonates on flowering time therefore differs between species and concentrations (Zhao et al., 2022).

Furthermore, our results showed that BAP and MeJa also increased the number of inflorescences per plant and the number of flowers per inflorescence. In cassava, the application of BAP also strongly increased flowering intensity by promoting flower development and preventing inflorescence abortion (Pineda et al., 2020). Other phytohormones such as gibberellins, auxins, abscisic acid, ethylene, or ascorbic acid could increase the number of inflorescences or flowers in root and tuber crops such as cassava (*Manihot esculenta*), taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum*) (Ceballos et al., 2017; Hyde et al., 2020; Mukherjee et al., 2016; Muthoni et al., 2012; Orozco-Arroyo et al., 2012; Souza et al., 2018). Moreover, application of the anti-ethylene growth regulator, silver thiosulphate (STS) resulted in high production, longevity and reduced early flower abortion in cassava (Hyde et al., 2020). Phytohormones play thus a key role in flowering and reproductive structures development even though their effect could differ among species.

5. Conclusions

The results of this study showed that sex expression in cultivated yams *D. rotundata* can be modulated by exogenous hormone application. In monoecious and female plants, MeJa induced masculinisation of flowers with early and abundant flowering. However, the application of MeJa caused malformations of floral organs in female plants, notably the formation of sterile flowers. Furthermore, our results did not allow a conclusion about the action of BAP on sex expression. Nevertheless, we found that BAP could also cause early and abundant flowering. BAP seems to be able to synchronise flowering in female plants. It would be interesting to explore the mode of action of other hormones on sex expression and floral development in interaction with the cytogenetic status of the cultivars and environmental factors in cultivated yams *D. rotundata*.

References

Abang, M. M., Winter, S., Mignouna, H. D., Green, K. R., and Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* **2**, 486-496.

Abraham, K., and Nair, S. (1979). Anomalies in sex expression of *Dioscorea rotundata* Poir. *Journal of Root Crops* **5**, 19-24.

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., and Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development 131*, 3357–65.

Agre, P., Nwachukwu, C., Olasanmi, B., Obidiegwu, J., Nwachukwu, E., Adebola, P., De Koeyer, D., and Asrat, A. (2020). Sample preservation and plant sex prediction in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Akoroda, M. (1983). Floral biology in relation to hand pollination of white yam. *Euphytica* **32**, 831-838.

Akoroda, M. (1985). Pollination management for controlled hybridization of white yam. *Scientia horticulturae* **25**, 201-209.

Akoroda, M., Wilson, J., and Chheda, H. (1984). The association of sexuality with plant traits and tuber yield in white yam. *Euphytica* **33**, 435-442.

Akter, P., and Rahman, M. (2010). Effect of foliar application of IAA And GA on sex expression, yield attributes and yield of bitter gourd (*Momordica Charantia* L.). *Chittagong University Journal of Biological Sciences*, 55-62.

Albrechtova, J., and Ullmann, J. (1994). Methyl jasmonate inhibits growth and flowering inChenopodium rubrum. *Biologia plantarum* **36**, 317-319.

Alvey, L., and Harberd, N. P. (2005). DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiologia Plantarum* **123**, 153-160.

Amasino, R. M., and Michaels, S. D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology* **154**, 516-520.

Asiedu, R., Ng, S., Bai, K. V., Ekanayake, I., and Wanyera, N. (1998). Genetic improvement. *Food yams: Advances in research, Ibadan, Nigeria: IITA and NRCRI*, 63-104.

Avanci, N., Luche, D., Goldman, G., and Goldman, M. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet Mol Res* **9**, 484-505.

Bai, K., and Ekanayake, I. (1998). Taxonomy, morphology and floral biology. *Food yams: Advances in research*, 13-38.

Bai, K. V., and Jos, J. (1986). Female fertility and seed set in *Dioscorea alata* L. *Tropical agriculture* **63**.

Bao, S., Hua, C., Shen, L., and Yu, H. (2020). New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**, 118-131.

Bernier, G., Havelange, A. e., Houssa, C., Petitjean, A., and Lejeune, P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* **5**, 1147.

Bernier, G., and Périlleux, C. (2005). A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 3-16.

Beydler, B., Osadchuk, K., Cheng, C.-L., Manak, J. R., and Irish, E. E. (2016). The juvenile phase of maize sees upregulation of stress-response genes and is extended by exogenous jasmonic acid. *Plant physiology* **171**, 2648-2658.

Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G., and Jacqmard, A. (2000). Cytokinin and gibberellin activate SaMADS A, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in Sinapis alba. *The Plant Journal* **24**, 103-111.

Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., and Périlleux, C. (2016). FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **44**, D1167-D1171.

Brice, D. K. E., Michel, K. A., Brahima, C., Boni, N. z., and Pierre, Z. G. (2016). Inventaire des méthodes de production de semenceaux d'igname (*Dioscorea spp*): une revue de la littérature. *Journal of Animal &Plant Sciences* **29**, 4496-4514.

Browse, J. (2009a). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 183-205.

Browse, J. (2009b). Jasmonate: preventing the maize tassel from getting in touch with his feminine side. *Sci Signal* **2**, pe9.

Burkill, I. H. (1960). The organography and the evolution of Dioscoreaceae, the family of the yams. *Journal of the Linnean Society* **56**, 319-412.

Cai, Y., Bartholomew, E. S., Dong, M., Zhai, X., Yin, S., Zhang, Y., Feng, Z., Wu, L., Liu, W., and Shan, N. (2020). The HD-ZIP IV

transcription factor GL2-LIKE regulates male flowering time and fertility in cucumber. *Journal of experimental botany* **71**, 5425-5437.

Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. E., and Dong, X. (2011). Arabidopsis lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant molecular biology* **75**, 25-33.

Campbell, S. M., Anderson, S. L., Brym, Z. T., and Pearson, B. J. (2021). Evaluation of substrate composition and exogenous hormone application on vegetative propagule rooting success of essential oil hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plos one* **16**, e0249160.

Ceballos, H., Jaramillo, J., Salazar, S., Pineda, L. M., Calle, F., and Setter, T. (2017). Induction of flowering in cassava through grafting. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **9**, 19-29.

Ceballos, H., Rojanaridpiched, C., Phumichai, C., Becerra, L. A., Kittipadakul, P., Iglesias, C., and Gracen, V. E. (2020). Excellence in cassava breeding: perspectives for the future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics* **2**.

Chailakhyan, M. K., and Khrianin, V. N. (2012). "Sexuality in plants and its hormonal regulation," Springer Science & Business Media. edited by Kennet V. T., Springer Science & Business Media, New York, US.

Chen, H., Jones, A. D., and Howe, G. A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS letters* **580**, 2540-2546.

Cheng, L., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, Q., Gao, H., and Zhang, F. (2018). Comparative proteomics illustrates the molecular mechanism of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization inhibited by exogenous gibberellins in vitro. *Physiologia plantarum* **163**, 103-123.

Cho, L. H., Yoon, J., and An, G. (2017). The control of flowering time by environmental factors. *The Plant Journal* **90**, 708-719.

Chuck, G. (2010). Molecular mechanisms of sex determination in monoecious and dioecious plants. *In* "Advances in botanical research", Vol. 54, pp. 53-83. Elsevier.

Conti, L. (2017). Hormonal control of the floral transition: can one catch them all? *Developmental Biology* **430**, 288-301.

Cossard, G. G., and Pannell, J. R. (2021). Enhanced leaky sex expression in response to pollen limitation in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Journal of Evolutionary Biology* **34**, 416-422.

D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., Coupland, G., and Périlleux, C. (2011). Cytokinin

promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The plant journal* **65**, 972-979.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Denadi, N., Gandonou, C., Missihoun, A. A., Zoundjihékpon, J., and Quinet, M. (2020). Plant sex prediction using genetic markers in cultivated yams (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin. *Agronomy* **10**, 1521.

Denadi, N., Yolou, M., Dadonougbo, A., Eric, Zoundjihekpon, J., Dansi, A., Gandonou, C., and Quinet, M. (2022). Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Displays Prezygotic and postzygotic barriers to Prevent Autogamy in monoecious cultivars. *Agronomy* **12**, 872.

Diallo, A. O., Agharbaoui, Z., Badawi, M. A., Ali-Benali, M. A., Moheb, A., Houde, M., and Sarhan, F. (2014). Transcriptome analysis of an mvp mutant reveals important changes in global gene expression and a role for methyl jasmonate in vernalization and flowering in wheat. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2271-2286.

Fang, S., Duan, Y., Nie, L., Zhao, W., Wang, J., Zhao, J., Zhao, L., and Wang, L. (2022). Distinct metabolic profiling is correlated with bisexual flowers formation resulting from exogenous ethephon induction in melon (*Cucumis melo* L.). *PeerJ* **10**, e13088.

FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *In* "Production", Vol. 2022.

Galoch, E. (1978). The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **47**, 153-162.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Golenberg, E. M., and West, N. W. (2013). Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American journal of botany* **100**, 1022-1037.

Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., and Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 16529-16534.

Griffiths, G. (2020). Jasmonates: biosynthesis, perception and signal transduction. *Essays in Biochemistry* **64**, 501-512.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Huang, H., Liu, B., Liu, L., and Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of experimental botany* **68**, 1349-1359.

Hyde, P. T., Guan, X., Abreu, V., and Setter, T. L. (2020). The anti-ethylene growth regulator silver thiosulfate (STS) increases flower production and longevity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant growth regulation* **90**, 441-453.

Ionescu, I. A., Møller, B. L., and Sánchez-Pérez, R. (2017). Chemical control of flowering time. *Journal of experimental botany* **68**, 369-382.

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 2191-2209.

Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H., and Meyerowitz, E. M. (2007). The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 3516-3529.

Iwahori, S., Lyons, J. M., and Smith, O. E. (1970). Sex Expression in Cucumber Plants as affected by 2-Chloroethylphosphonic Acid,Ethylene, and Growth Regulators, Plant. *Plant Physiology* **46**, 412-415.

Khryanin, V. (2002). Role of phytohormones in sex differentiation in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 545-551.

Krajnčič, B., Kristl, J., and Janžekovič, I. (2006). Possible role of jasmonic acid in the regulation of floral induction, evocation and floral differentiation in Lemna minor L. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 752-758.

Lebot, V. (2010). Sweet potato. *In* "Root and tuber crops", pp. 97-125. Springer.

Lebot, V. (2019). "Tropical root and tuber crops." Edited by Thompson A. Cabi; Wallingford, Oxfordshire, UK..

Lebot, V., Abraham, K., Kaoh, J., Rogers, C., and Molisalé, T. (2019). Development of anthracnose resistant hybrids of the Greater Yam (*Dioscorea alata* L.) and interspecific hybrids with *D. nummularia* Lam. *Genetic Resources and Crop Evolution* **66**, 871-883.

Luthra, S., Pandey, S., Singh, B., Kang, G., Singh, S., and Pande, P. (2006). Potato breeding in India. *Central Potato Research Institute* **3**, 71.

Maciejewska, B., and Kopcewicz, J. (2002). Inhibitory effect of methyl jasmonate on flowering and elongation growth in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 216-223.

Maciejewska, B. D., Kesy, J., Zielińska, M., and Kopcewicz, J. (2004). Jasmonates inhibit flowering in short-day plant Pharbitis nil. *Plant Growth Regulation* **43**, 1-8.

Marciniak, K., and Przedniczek, K. (2019). Comprehensive insight into gibberellin-and jasmonate-mediated stamen development. *Genes* **10**, 811.

Martínez, C., and Jamilena, M. (2021). To be a male or a female flower, a question of ethylene in cucurbits. *Current Opinion in Plant Biology* **59**, 101981.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022). Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp*.). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Mukherjee, A., George, J., Pillai, R., Chakrabarti, S. K., Naskar, S. K., Patro, R., Nayak, S., and Lebot, V. (2016). Development of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) hybrids overcoming its asynchrony in flowering using cryostored pollen. *Euphytica* **212**, 29-36.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R., and Kabira, J. (2012). Reproductive biology and early generation's selection in conventional potato breeding. *Australian Journal of Crop Science* **6**, 488-497.

Nibau, C., Di Stilio, V. S., Wu, H.-m., and Cheung, A. Y. (2011). Arabidopsis and Tobacco *SUPERMAN* regulate hormone signalling

and mediate cell proliferation and differentiation. *Journal of experimental botany* **62**, 949-961.

Orozco-Arroyo, G., Vázquez-Santana, S., Camacho, A., Dubrovsky, J. G., and Cruz-García, F. (2012). Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* **236**, 225-238.

Pak, H., Guo, Y., Chen, M., Chen, K., Li, Y., Hua, S., Shamsi, I., Meng, H., Shi, C., and Jiang, L. (2009). The effect of exogenous methyl jasmonate on the flowering time, floral organ morphology, and transcript levels of a group of genes implicated in the development of oilseed rape flowers (Brassica napus L.). *Planta* **231**, 79-91.

Pan, J., Hu, Y., Wang, H., Guo, Q., Chen, Y., Howe, G. A., and Yu, D. (2020). Molecular mechanism underlying the synergetic effect of jasmonate on abscisic acid signaling during seed germination in Arabidopsis. *The Plant Cell* **32**, 3846-3865.

Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. V., Sewell, J., and Gil, E. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791.

Pineda, M., Morante, N., Salazar, S., Cuásquer, J., Hyde, P. T., Setter, T. L., and Ceballos, H. (2020). Induction of earlier flowering in cassava through extended photoperiod. *Agronomy* **10**, 1273.

Quero-Garcia, J., Ivancic, A., and Lebot, V. (2010). Taro and cocoyam. *In* "Root and tuber crops", pp. 149-172. Springer.

Quinet, M., Cawoy, V., Lefèvre, I., Van Miegroet, F., Jacquemart, A.-L., and Kinet, J.-M. (2004). Inflorescence structure and control of flowering time and duration by light in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench). *Journal of Experimental Botany* **55**, 1509-1517.

Quinet, M., Dubois, C., Goffin, M.-C., Chao, J., Dielen, V., Batoko, H., Boutry, M., and Kinet, J.-M. (2006). Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1381-1390.

Quinet, M., Bataille, G., Dobrev, P. I., Capel, C., Gómez, P., Capel, J., Lutts, S., Motyka, V., Angosto, T., and Lozano, R. (2014). Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by STAMENLESS, the tomato (Solanum lycopersicum L.) orthologue to the B-class *APETALA3* gene. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2243-2256.

Renner, S. S. (2014). The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of botany* **101**, 1588-1596.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975). Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* **39**, 597-604.

Sanders, P. M., Lee, P. Y., Biesgen, C., Boone, J. D., Beals, T. P., Weiler, E. W., and Goldberg, R. B. (2000). The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* **12**, 1041-1061.

Segnou, Fatokun, C. A., Akoroda, M. O., and Hahn, S. K. (1992). Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica* **64**, 197-203.

Shahzadi, I., Ahmad, A., Noreen, Z., Akram, W., Yasin, N. A., and Khan, W. U. (2022). Brassinosteroid and Ethylene-Mediated Cross Talk in Plant Growth and Development. *In* "Brassinosteroids Signalling", pp. 117-136. Springer.

Singh, N. B., Singh, A., Khare, S., Yadav, V., Bano, C., and Yadav, R. K. (2021). Mitigating strategies of gibberellins in various environmental cues and their crosstalk with other hormonal pathways in plants: a review. *Plant Molecular Biology Reporter* **39**, 34-49.

Song, S., Qi, T., Huang, H., and Xie, D. (2013). Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **6**, 1065-1073.

Souza, L. S., Diniz, R. P., de Jesus Neves, R., Alves, A. A. C., and de Oliveira, E. J. (2018). Grafting as a strategy to increase flowering of cassava. *Scientia horticulturae* **240**, 544-551.

Srikanth, A., and Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life sciences* **68**, 2013-2037.

Stintzi, A., and Browse, J. (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10625-10630.

Takeno, K. (2016). Stress-induced flowering: the third category of flowering response. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4925-4934.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the

development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tanurdzic, M., and Banks, J. A. (2004). Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell* **16**, S61-S71.

von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., and Keller, B. (2002). The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**, 187-192.

Wang, H., Li, Y., Pan, J., Lou, D., Hu, Y., and Yu, D. (2017). The bHLH transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 are required for jasmonate-mediated inhibition of flowering in Arabidopsis. *Molecular Plant* **10**, 1461-1464.

Wang, J., Liu, X.-f., Zhang, H.-q., Allan, A. C., Wang, W.-q., and Yin, X.-r. (2022). Transcriptional and post-transcriptional regulation of ethylene biosynthesis by exogenous acetylsalicylic acid in kiwifruit. *Horticulture Research*.

Wang, L., Li, H., Sun, P., Suo, Y., Han, W., Diao, S., Mai, Y., Li, F., and Fu, J. (2021). Effects of plant growth regulators, soil moisture contents, and carbon/nitrogen ratios on sex differentiation in persimmon (Diospyros kaki Thunb.) flowers. *Journal of Plant Growth Regulation* **40**, 1121-1138.

Wang, Y., Yan, C., Zou, B., Wang, C., Xu, W., Cui, C., and Qu, S. (2019). Morphological, transcriptomic and hormonal characterization of trimonoecious and subandroecious pumpkin (*Cucurbita maxima*) suggests important roles of ethylene in sex expression. *International journal of molecular sciences* **20**, 3185.

Wasternack, C., and Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development.

West, N. W., and Golenberg, E. M. (2018). Gender-specific expression of *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* is critical for unisexual organ initiation in dioecious *Spinacia oleracea*. *New Phytologist* **217**, 1322-1334.

Wu, G.-L., Zhu, Z.-J., Qiu, Q., Fan, X.-M., and Yuan, D.-Y. (2022). Transcriptome Analysis Reveals the Regulatory Networks of Cytokinin in Promoting Floral Feminization in *Castanea henryi*. International Journal of Molecular Sciences **23**, 6389.

Yamaguchi, N., Winter, C. M., Wu, M.-F., Kanno, Y., Yamaguchi, A., Seo, M., and Wagner, D. (2014). Gibberellin acts positively then

negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science* **344**, 638-641.

Yampolsky, E. (1922). Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. Bibl. Genet. 3, 1-62.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. D., and Zoundjihekpon, J. (2015a). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., Zoundjihekpon, J., Assaba, E. I., Anizehou, I., and Akoegninnou, A. (2015b). La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et *D. dumetorum*) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492-8480–8492.

Zhang, Y., Zhao, G., Li, Y., Mo, N., Zhang, J., and Liang, Y. (2017). Transcriptomic analysis implies that GA regulates sex expression via ethylene-dependent and ethylene-independent pathways in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science* **8**, 10.

Zhao, L., Li, X., Chen, W., Xu, Z., Chen, M., Wang, H., and Yu, D. (2022). The emerging role of jasmonate in the control of flowering time. *Journal of Experimental Botany* **73**, 11-21.

Zhao, Y., Liu, C., Yan, M., Zhao, X., Baloch, A. M., Baloch, A. W., and YUAN, Z. (2021). Variation of endogenous phytohormone in functional male and bisexual flowers of pomegranate (*Punica granatum* L.) during Development. *Pakistan J. Bot* **53**, 551-558.

Zoundjihekpon, J., Hamon, P., Hamon, S., and Tio-Toure, B. (1995). Relation entre germination, mise à fleurs et niveau de prélèvement des semenceaux d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*-Rotundata. *Agronomie Africaine* **7**, 223-235.

Suplementary data

Table S1: Effect of BAP and MeJa on flowering time and flowering intensity in *D. rotundata*.

Cultivar	Traitement	Sex (%)		Flowering rate (%)	Flowering Time (Days)	Number of inflorescences per plant	Length of inflorescence	Number of flowers per inflorescence
Katala (monoecious)	Control	M	10.5	95	66±3	66.50±4.95	11.50±0.70	19.50±0.71
		F	79		93±8	37.46±4.01	11.10±1.56	16.46±1.96
		Mo	10.5		84±19	54.00±80.48	09.50±0.70	16.00±1.41
	MeJa	M	80	100	59±2	90.81±6.84	08.54±0.50	14.93±0.99
		F	10		65±9	33.00±4.24	12.00±4.83	30.00±8.48
		Mo	10		59±2	89.50±12.02	8.80±0.53	14.50±0.71
	BAP	M	0	100	-	-	-	-
		F	85		82±3	59.35±4.35	10.71±0.78	19.52±3.31
		Mo	15		73±7	69.66±1.15	10.66±1.25	21.00±2.64

Table S1: Effect of BAP and MeJa on flowering time and flowering intensity in *D. rotundata* (continuation)

Cultivar	Traitement	Sex (%)		Flowering rate (%)	Flowering Time (Days)	Number of inflorescences per plant	Length of inflorescence	Number of flowers per inflorescence
Laboko (monoecious)	Control	M	6	85	69	66.00	15.00	43.00
		F	82		94±7	40.78±5.92	14.91±0.92	42.57±4.01
		Mo	12		88±1	59.50±27.57	14±0.70	39.00±4.24
	MeJa	M	80	100	59±2	93.12±7.34	08.71±0.85	26.81±2.76
		F	5		88	84.00	14.50	25.00
		Mo	15		65±4	97.33±2.08	10.00±2.17	23±3.60
	BAP	M	0	100	-	-	-	-
		F	85		82±2	61.58±4.21	14.66±0.87	44.52±7.86
		Mo	15		78±9	64.00±7.21	14.66±1.44	38±6.55

Inter-chapitre Chapitre IV-Chapitre V

Ce qu'on sait déjà

La majorité des ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin fleurissent. Nous avons observé une floraison mâle dominante (chap 1). Toutefois, de rares plantes monoïques existent dans les cultivars sub-dioïques (chap 1 et 2). Malgré les problèmes de variation du sexe qui caractérisent les plantes monoïques (chap 3), nous avons montré que l'apport exogène de jasmonates peut masculiniser le sexe chez les plantes monoïques (chap 4). Les jasmonates et les cytokinines accélèrent la floraison et augmentent la production d'inflorescences et de fleurs. Les cytokinines ont particulièrement favorisées la synchronisation de la floraison femelle (chap 4).

But visé dans ce cinquième chapitre

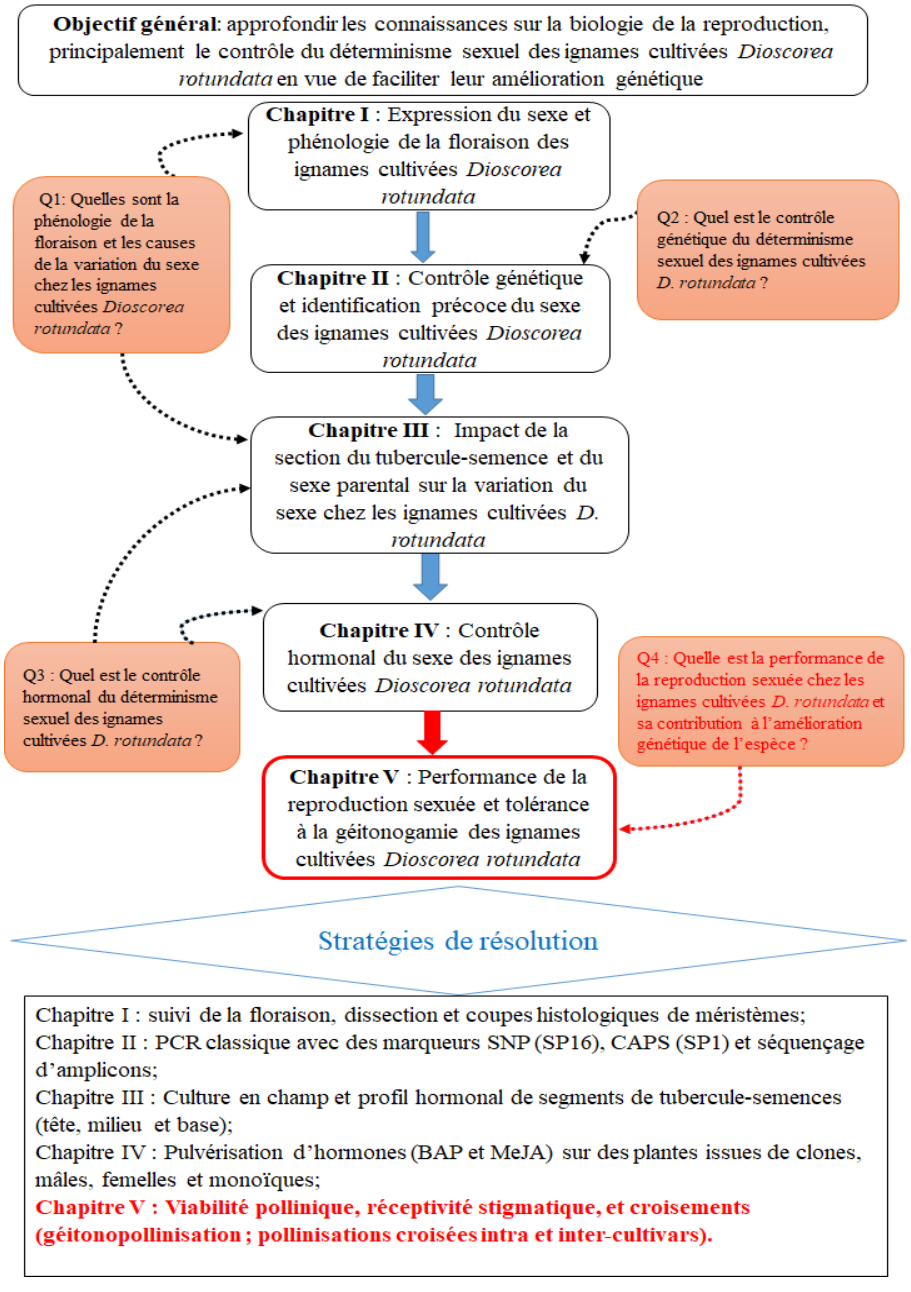
L'amélioration des ignames cultivées *D. rotundata* nécessite la mobilisation de toutes les ressources génétiques disponibles au sein de l'espèce y compris les accessions monoïques. Contrairement aux cultivars dioïques, Les plantes monoïques offrent la possibilité d'opérer des pollinisations intra-individu (géitonogamie) ; ce qui est un atout majeur dans la sélection et la création variétale chez les espèces dioïques à reproduction végétative comme l'igname. En plus, nous venons de montrer que l'expression sexuelle chez les plantes monoïques de *D. rotundata* peut être manipulée par application de phytohormones. Alors, ce cinquième chapitre vise à évaluer la performance de la reproduction sexuée des accessions monoïques pour valoriser leur contribution à l'amélioration de l'espèce. Il s'agira principalement de :

- Evaluer la fertilité des fleurs mâles et femelles de plantes monoïques comparativement aux plantes dioïques. d'ignames cultivées *D. rotundata* ;
- Evaluer le succès reproducteur et les barrières de reproduction potentielles suite à l'auto-pollinisation (géitonogamie) de plantes monoïques comparativement à de l'allo-pollinisation.

La stratégie utilisée

Trois cultivars monoïques ont été sélectionnés selon leur disponibilité au cours de la saison et la qualité (abondance) de leur floraison. La viabilité du pollen et la réceptivité pollinique a été évaluée et comparée à 2 autres

cultivars dioïques. Des auto-pollinisations (géitonopollinisations) et des pollinisations croisées intra et inter-cultivars ont été réalisées pour tester si la géitonogamie est possible, évaluer la dépression de consanguinité et le succès reproducteur de l'igname *D. rotundata*.



Aperçu des relations inter-chapitres et stratégies de résolution.

Chapitre V. Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Displays Prezygotic and Postzygotic Barriers to Prevent Autogamy in Monoecious Cultivars

Agronomy 2022, 12(4), 872; https://doi.org/10.3390/agronomy12040872.

Narcisse Denadi [1,2,4], Mounirou Yolou[2], Ayènan Eric Dadonougbo[3] Jeanne Zoundjihékpon[2], Alexandre Dansi[3], Christophe Gandonou [4] and Muriel Quinet [1]*

[1]Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve Belgium ;

[2]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP4521 Bénin,

[3]Laboratory of Biotechnology, Genetic Ressources and Plant and Animals Breeding (BIORAVE), National University of Sciences Technology, Ingeneering and Mathematics, Dassa-Zoumé. Box 14, Bénin;

[4]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP526, Bénin.

* Correspondence: muriel.quinet@uclouvain.be

Abstract

Cultivated yam (*D. rotundata*) is a staple tuber crop in West Africa whose sexual reproduction control remains largely unknown despite its importance for plant breeding programs. In this paper, we compared self-pollination, intracultivar cross-pollination and intercultivar cross-pollination in three monoecious cultivars (Amoula, Heapala and Yassi). Results showed that pollen viability (49%) and stigma receptivity (40%) were similar in monoecious and dioecious plants, suggesting that autogamy could occur in monoecious plants. However, fruit and seed sets were significantly lower after self-pollination compared to cross-pollination. Overall, autogamy reached 11% and pollen lability was almost zero (<1%). The low percentage of pollen grains germinating on the stigma (37%) and pollen tubes reaching the ovules (25%) after self-pollination partly explained the low seed set. Strong inbreeding depression was observed after self-pollination and almost all fruits and about 75% of the seeds resulting from self-pollination showed malformations. Seed germination was also 20 times lower after self-pollination compared to cross-pollination. Sexual reproduction remained low in *D. rotundata* even after cross-pollination as fruit and seed set did not exceed 18% and 13% respectively. Moreover, comparison between intracultivar cross-pollination and self-pollination revealed intravarietal genetic diversity inside the analyzed yam cultivars. Overall, our results showed that *D. rotundata* has a very low tolerance to autogamy in monoecious cultivars and has developed pre- and postzygotic mechanisms to limit selfing.

Keywords: *Dioscorea rotundata*; allogamy; autogamy; inbreeding depression; monoecy; pollen viability; sexual reproduction; stigma receptivity.

1. Introduction

Root and tuber crops play an essential role in food agriculture in many regions of the world, particularly in Sub-Saharan Africa. Main root and tuber crops cultivated in Africa are yam (*Dioscorea spp*), cassava (*Manihot esculenta*), taro (*Colocasia esculenta*), and sweet potato (*Ipomoea batatas*). Highly prized, yam is grown in tropical regions, and West Africa is its main breadbasket with more than 95% of the world production (FAOSTAT, 2020). The largest producing countries are Nigeria, Ghana, Cote d'Ivoire, Benin, Togo, and Cameroon, and they are referred to as the yam belt (Coursey, 1967; Scarcelli et al., 2019). Yam cultivation constitutes an important source of food (Obidiegwu and Akpabio, 2017; Omohimi et al., 2018; Zannou et al., 2004) and income (Loko et al., 2013; Mignouna et al., 2020; Sonibare et al., 2010) for the rural producing populations. It is an integral part of sociocultural life in West African populations (Norman et al., 1996; Zannou et al., 2004). In Benin, one of the most cultivated species is white Guinea yam *Dioscorea rotundata* Poir. (Dansi et al., 2000). This species is also named *Dioscorea cayenensis–D. rotundata* species complex, depending on the authors (Dansi et al., 1999; Hamon, 1987; Hamon et al., 1986; Miège, 1982; Zoundjihèkpon, 1993). Its cultivation is confronted with phytosanitary problems (Amusa et al., 2003; Asala et al., 2012; Ayisah and Gumedzoe, 2012; Bousalem et al., 2000; Coyne et al., 2006; Egesi et al., 2007; Ogaraku and Usman, 2008), with heavy consequences on yield (Bousalem et al., 2000). Despite this, the plant benefits from little scientific research partly due to the complexity of its reproduction that limits the development of breeding programs. Recognized as a long-cycle plant, it has adopted a mainly vegetative mode of reproduction (Akoroda, 1983; Dumont et al., 2005). However, studies have shown that some cultivars of *D. rotundata* flower and produce seeds capable of a complete reproductive cycle (Dumont et al., 2010; Miège, 1952; Sadik and Okereke, 1975a; Sadik and Okereke, 1975b; Yolou, 2016; Yolou et al., 2015; Zoundjihekpon, 1991; Zoundjihekpon et al., 1995). The species *D. rotundata* is essentially characterized by dioecy and allogamy although monoecious plants bearing both male and female flowers on the same plant are encountered (Akoroda, 1983; Yolou et al., 2015; Zoundjihèkpon, 1993); which would allow self-pollination within monoecious cultivars. However, male flowers usually

flower before female flowers in *D. rotundata* (Martin, 1966), which can naturally limit self-fertilization. Sex identity is genetically controlled in yam with either a female heterogametic (ZZ/ZW) or a male heterogametic (XX/XY) system depending on the species (Cormier et al., 2019; Cormier et al., 2021; Denadi et al., 2020; Martin, 1966; Tamiru et al., 2017). However, spontaneous variations in sex could be observed from year to year (Dansi et al., 1999).

In root and tuber crops, the reduced ability of sexual propagation is directly inherited from domestication and diversification processes and traits related to sexual reproduction are no longer highly maintained (Cormier et al., 2021; Meyer and Purugganan, 2013). However, control of the plant reproductive biology is essential for efficient plant breeding (Cormier et al., 2021; Meyer and Purugganan, 2013). Self-pollination is a key element in the creation of varieties in cross-pollinated plants and is of particular interest for root and tuber crops that reproduce vegetatively. Understanding the sexual reproduction of root and tuber crops is thus fundamental for the improvement of these species (Sedgley and Griffin, 2013). Autogamy and self-compatibility have been observed in monoecious root crops such as cassava (*Manihot esculenta*) and taro (*Colocasia esculenta)* (Alves, 2002; Ivancic and Lebot, 2000; Lebot et al., 2019). In *D. rotundata* yams, the few studies that focused on hybridization have mentioned the problems of pollen viability, the low receptivity of female flowers and, above all, the problems of cross-incompatibility (Akoroda, 1985; Lebot et al., 2019; Sadik and Okereke, 1975a; Sadik and Okereke, 1975b). None of them has really addressed the issue of the possibility of autogamy within the species. While the use of improved varieties is the most effective way to increase yields and make yam production sustainable (Ayisah et al., 2014), it is more than necessary to move towards understanding its sexual reproduction. The aim of this paper is thus to characterize the breeding system of monoecious *D. rotundata* yam cultivars and to compare autogamy and allogamy in this species. We are first interested in whether, apart from natural dispositions (separation of the male and female flowers), *D. rotundata* has established a particular form of male or female sterility in monoecious plants. Secondly, we will analyze whether autogamy is possible in this species and whether there are pre- and/or postzygotic barriers to autogamy.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Growing Conditions

Three yam (*D. rotundata*) cultivars (cv. Amoula, Heapala and Yassi) were used in this study. These cultivars produced monoecious, male and female plants. Tubers of 90 plants (30 monoecious, 30 male and 30 female) of each cultivar were harvested in December 2018 in a field located at Ouaké, Benin (9°39′42″ N, 1°23′5″ E). Tubers were kept on site in a bute for one month before being dug up and transferred to the attic of the 'Centre de Recherche, de Formation, d'Incubation et d'Innovation pour le Développement Agricole' (CREFIISDA, Zogbodomey, Benin, 6°56′08″ N, 1°58'24″ E) where they spent a further 3 months of dormancy. The tubers were planted at the CREFISDA site in three blocks separated by about 700 m, according to the sex of the parent plant (male, female or monoecious). In each block, cultivars were aligned on a line of 10 ridges; each repeated 3 times (fisher block design). Sowing took place on 27 April 2019 for tubers issued from monoecious and female plants and on 11 May 2019 for tubers issued from male plants in order to synchronize the flowering. The germination rate, sex ratio and flowering time of the investigated plants are reported in Table 1. The germination rate was 93.3%, 88.9%, and 90.0% for the cv. Amoula, Heapala, and Yassi, respectively. All the plants flowered. Monoecious plants produced either male and female flowers inside the same inflorescence (mixed inflorescence) or male and female flowers on separated inflorescences (male and female inflorescences) (Figure 1A).

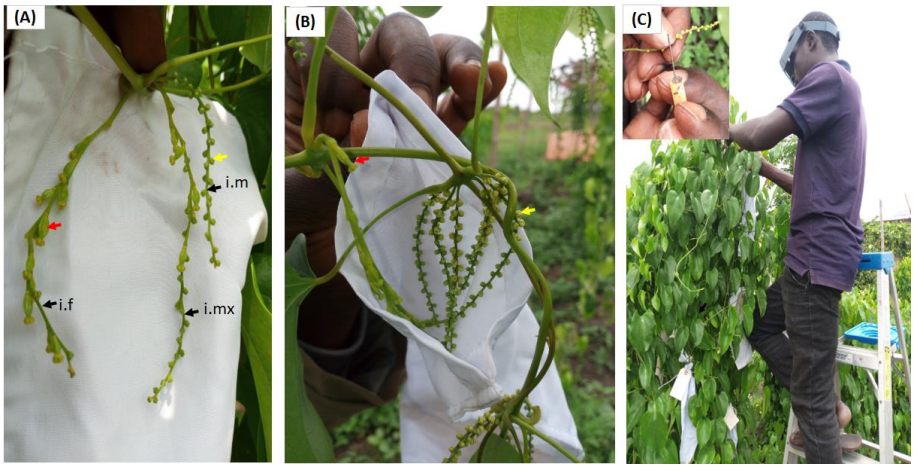


Figure 1. *Dioscorea rotundata* inflorescences and crossings methods. (A) Different types of inflorescences found in monoecious plants: i.f = inflorescence-bearing female flowers; i.mx = inflorescence-bearing male and female flowers; and i.m = inflorescence-bearing male flowers—the yellow and red arrows indicate male and female flowers respectively. (B, C) Different crossing methods used in this study: (B) inflorescence bagging for bagged intraindividual self-pollination and (C) pollen collection for manual pollination.

Table 1: Germination rate, sex ratio and flowering time of the yam (*D. rotundata*) plants used in the study.

Cultivar	**Parental Sex[a]**	**Germination (%)**	**Sex ratio (%)[a]**			**Flowering time (days after germination)[a]**		
			M	F	Mo	M	F	Mo
Amoula	M	93.3	100	0	0	71±4	87±5	80±2
	F	86.7	15.4	84.6	0			
	Mo	100	53.3	33.3	13.3			
Heapala	M	86.7	92.3	0	7.7	68±5	90±4	82±4
	F	83.3	0	100	0			
	Mo	96.7	34.8	20.7	44.8			
Yassi	M	96.7	96.6	0	3.4	69±3	92±5	80±4
	F	73.3	0	86.4	13.6			
	Mo	100	60	3.3	36.7			

2.2. Flower Fertility Measurements

To investigate flower fertility, stigma receptivity and pollen viability were assessed on female and male flowers, respectively, of both unisexual and monoecious plants for the three cultivars. The investigated female plants were offspring of female plants, the investigated male plants were offspring of male plants, and the investigated monoecious plants were offspring of monoecious plants.

Stigma receptivity was estimated by the peroxidase activity using a colorimetric test as described by Dafni et al. (2005), on 500 flowers per cultivar (5 flowers per inflorescence and 5 inflorescences per plant for 10 monoecious and 10 female plants). After dissection under stereomicroscope, pistils were immerged for 5 min in a solution consisting of 25 mL acetate buffer, 16.5 mg $CaCl_2.2H_2O$, 12.5 mg 3-amino-9-ethylcabaole (previously dissolved in 1 mL N-N-dimethylformamide), and 0.125 mL H_2O_2. Stigmas were observed under stereomicroscope and classified as receptive (brown coloration) or not receptive (no coloration).

Pollen viability was estimated by in vitro pollen germination test (Figure 2A) on 400 flowers per cultivar (10 flowers per inflorescence and 2 inflorescences per plant for 10 monoecious plants and 10 male plants). After dissection under stereomicroscope, the anthers were crushed between two microscope slides to release the pollen grains (often very sticky). The pollen was then transferred to microscope slides covered with a culture medium. The culture medium was composed of 4 g sucrose, 1 mg boric acid, 5 mg calcium nitrate, 0.46 g agar in 20 mL distilled water. After boiling, the medium was autoclaved and spread over the slides. The slides containing the pollen grains were then placed in sterile petri dishes containing filter paper soaked in distilled water to saturate the chamber with moisture. The whole set was placed in an oven at a temperature of 28 °C, for 24 h (Zoundjihèkpon, 1993). The slides were then observed under an optical microscope. The number of germinated pollen grains and nongerminated pollen grains were counted on five different microscopic fields per slide and the pollen viability was calculated as the ratio between the number of germinated pollen grains and the total number of pollen grains, expressed as a percentage.

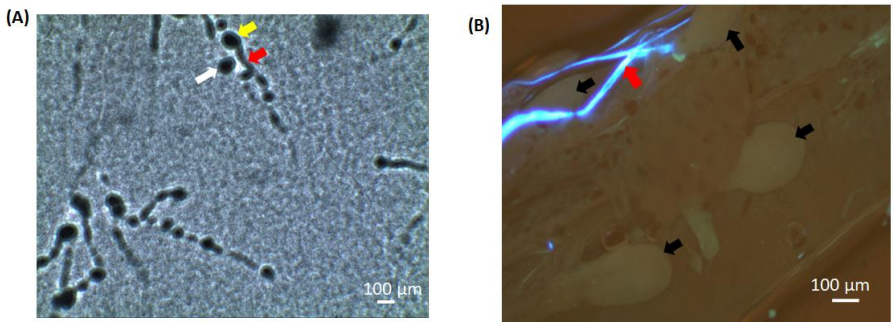


Figure 2: Pollen germination. (A) In vitro pollen germination for pollen viability assessment; (B) pollen tube growth in the style and pollen-reaching ovule. The white, yellow, red, and black arrows show, respectively, an ungerminated pollen grain, a germinated pollen grain, a pollen tube, and ovules.

2.3. Self and Cross Pollination Crossings

For each cultivar, 10 monoecious plants (offspring of monoecious plants) and one male plant (offspring of male plant) were selected for crossings. The plants were chosen according to the quantity of flowers available. Monoecious plants were used as female parent and monoecious or male plants were used as male parent depending on the crosses.

Four types of crosses were performed for each cultivar: (1) bagged intraindividual self-pollination (A_1); (2) intraindividual manual self-pollination (A_2); (3) intracultivar manual cross-pollination (C_1); and (4) intercultivar manual cross-pollination (C_2). Details of the different crosses are presented in Table 2. It has to be mentioned that strict autogamy (pollen coming from the same flower) is not possible in unisexual flowers and that what we consider in this paper as autogamy is in fact geitonogamy (pollen coming from other flowers of the same plant) (Shivanna, 2015). For bagged intraindividual self-pollination, mixed inflorescences (bearing both male and female flowers) or close male and female inflorescences of a same plant (Figure 1A) were bagged together with a mesh to avoid insect pollination (Figure 1B). For manual pollination, a needle and magnifying glass were used to access the anthers and collect the pollen grains (Figure 1C) that were then deposited on the stigmas of the female flowers. The flowers were bagged before anthesis and after pollination with a mesh to avoid insect

pollinations. The cross-pollinations were carried out during the period of the day when the male flowers are open according to Yacouba et al. (2019). For each of the 21 cross types, a total of 110 female flowers, from an average of 10 inflorescences, were randomly selected and pollinated.

Table 2: The different types of crosses carried out.

Type of crosses	Parents (female x male)[a]	Number of pollinated flowers[b]
bagged intra-individual self-pollination (A_1)	Amoula (Mo) x Amoula (Mo)	-
	Heapala (Mo) x Heapala (Mo)	-
	Yassi (Mo) x Yassi (Mo)	-
intra-individual manual self-pollination (A_2)	Amoula (Mo) x Amoula (Mo)	110
	Heapala (Mo) x Heapala (Mo)	110
	Yassi (Mo) x Yassi (Mo)	110
intra-cultivar manual cross-pollination (C_1)	Amoula (Mo) x Amoula (M)	110
	Heapala (Mo) x Heapala (M)	110
	Yassi (Mo) x Yassi (M)	110
inter-cultivar manual cross-pollination (C_2)	Amoula (Mo) x Heapala (M)	110
	Amoula (Mo) x Heapala (Mo)	110

Table 2: The different types of crosses carried out (**Continuation**)

Type of crosses	**Parents (female x male)[a]**	**Number of pollinated flowers[b]**
inter-cultivar manual cross-pollination (C_2)	Amoula (Mo) x Yassi (M)	110
	Amoula (Mo) x Yassi (Mo)	110
	Heapala (Mo) x Amoula (M)	110
	Heapala (Mo) x Amoula (Mo)	110
	Heapala (Mo) x Yassi (M)	110
	Heapala (Mo) x Yassi (Mo)	110
	Yassi (Mo) x Amoula (M)	110
	Yassi (Mo) x Amoula (Mo)	110
	Yassi (Mo) x Heapala (M)	110
	Yassi (Mo) x Heapala (Mo)	110

[a]Mo : monoecious plant, M : male plant, [b] -: no manual pollination

2.4. **Pollen Tube Growth, Fruit Set, Seed Set, and Seed Quality Assessment**

For manual pollinations, 10 female flowers per cross and cultivar were harvested 48 h after pollination and fixed in FAA (ethanol 70%; formaldehyde 35%; acetic acid; 8:1:1) to investigate pollen germination on the stigma and pollen tube growth in the style (Figure 2B). The pistils were stained with 0.1% (w/v) aniline blue solution according to Jacquemart et al. (2006). Flowers were dissected under stereomicroscope, the pistils were water rinsed and softened in 1N NaOH for 4 h before staining with aniline blue for 1 h. The pistils were gently squashed on a microscope slide in a drop of water and observed by means of fluorescence microscopy. Pollen grain germination was calculated as the ratio between the number of germinated pollen grains and the number of deposited pollen grains, expressed as a percentage. The fertilization rate was calculated as the ratio between the number of pollen tubes that reached the ovules and the number of pollen grains that germinated on the stigma, expressed as a percentage.

The remaining pollinated female flowers were left for fruit set and seed set assessment. The fruit set was calculated as the ratio between the number of fruits per inflorescence and the number of flowers per inflorescence (for treatment A_1) or the number of pollinated flowers per inflorescence (for treatments A_2, C_1, C_2), expressed as a percentage. A minimum of 5 inflorescences (average of 100 flowers) was followed per plant for each cultivar and cross type. The seed set was calculated as the ratio between the number of seeds per fruit and the number of ovules per flower (6 ovules per flower), expressed as a percentage. A total of 100 fruits per cross type and cultivar were analyzed for seed set assessment. As some fruit and seed malformations were observed, the proportion of misshaped fruits and seeds was also assessed for each type of cross. Fruit quality was assessed based on their three-lobed structure and seed quality was assessed based on finger palpation (Zoundjihèkpon, 1993). Moreover, seed germination was evaluated for each type of cross. Seeds were sown in germination boxes in a mixture of compost and sand (2/3:1/3) and cultivated in a tropical greenhouse (28 °C, 90% relative humidity, 16 h/8 h photoperiod, watering 3 times a week). A total of 450 well-formed seeds were selected at a rate of 50 seeds per cultivar and type of cross. Germination was monitored for 60 days. Germination rate was calculated as the ratio between the number of

germinated seeds and the number of sown seeds, expressed as a percentage (Ahoton et al., 2011; Assaba et al., 2018; Tiama, 2016).

The self-compatibility index (SCI) and self-fertility index (SFI) were determined according to Lloyd and Schoen (1992). The SCI determines the ability of an individual to produce fruits or seeds following self-fertilization. It was calculated as the ratio between the fruit set (or seed set) obtained after intra-individual manual self-pollination (A_2) and inter-cultivar manual cross-pollination (C2). SFI is the ability of an individual to autonomously (without hand or insect intervention) produce fruits and seeds. It was calculated as the ratio between the fruit set (or seed set) obtained after bagged intraindividual self-pollination (A_1) and intraindividual manual self-pollination (A_2). SCI values above 0.2 indicate self-compatibility and SFI values above 0.2 indicate autonomous selfing (Lloyd and Schoen, 1992; Sinébou et al., 2016).

Inbreeding depression was assessed at different developmental stages (fruit set, seed set and seed germination). It is the ratio of the relative performance of selfed (Ws) to cross-pollinated (Wc) progeny ($\delta = 1-(Ws/Wc)$) (Charlesworth and Charlesworth, 1987). Here, selfed progeny was assessed by the intraindividual manual self-pollination (A_2) and cross-pollinated progeny was assessed by the intercultivar manual cross-pollination (C_2). Values near 0 (for a scale of 0 to 1) indicate the absence of inbreeding depression (Sinébou et al., 2016).

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using JMP Pro.16 version 2020. The normality of the data was graphically checked (box plot and qq plot), and homoscedasticity was verified using Levene's tests. Analyses of variance with the ANOVA, Welch's test or wilcoxon test functions (according to normality and homoscedasticity) were performed to measure the effects of the cultivar and the pollination type (for the fruit and seed set, seed an embryo area, pollen tube growth, SCI, SFI, inbreeding depression) or the effects of the cultivar and the sex of the plant (for pollen viability and stigma receptivity). Post hoc comparisons between cultivars and pollination types were done using Tukey's HSD test, Welch's corrected t-test or the Wilcoxon multiple comparison t-test depending on the normality and homoscedasticity of the data. Data are shown as means ± standard error.

3. Results

3.1. Flower Fertility Was the Same in Unisexual and Monoecious *D. rotundata* Plants

Pollen viability and stigma receptivity were compared in monoecious and dioecious plants. Pollen viability was similar in male and monoecious plants ($F = 0.0345$; $p = 0.8539$) whatever the cultivar ($F = 2.61$; $p = 0.0919$, Figure 3A). In vitro pollen grain germination averaged 49%. Stigma receptivity was also the same in female and monoecious plants ($F = 0.2829$; $p = 0.5968$) whatever the cultivar ($F = 0.1364$; $p = 0.8728$) and averaged 44% (Figure 3B).

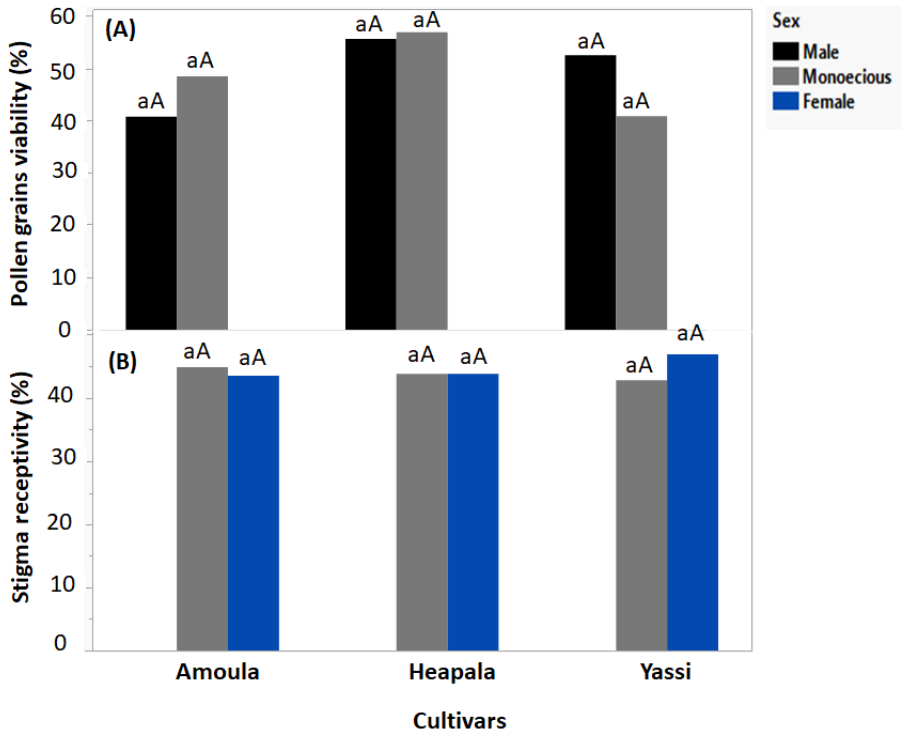


Figure 3: Pollen viability and stigma receptivity of 3 cultivars of cultivated yam (*D. rotundata*). (A) Pollen viability (in vitro pollen germination) in male (black) and monoecious plants (grey). (B) Stigma receptivity in female (blue) and mooecious (grey) plants. Values sharing the same lower-case letter among plant sexes are not significantly different at the 5% level for a

same cultivar; values sharing the same capital letter among cultivars are not significantly different at the 5% level for a same sex.

3.2. Autogamy and Allogamy in Monoecious *D. rotundata* Plants

In order to investigate the breeding system of monoecious *D. rotundata* plants, four pollination treatments were compared: bagged intraindividual self-pollination; intraindividual manual self-pollination; intracultivar manual cross-pollination; and intercultivar manual cross-pollination. For each cultivar, results of the different crosses performed for intercultivar cross-pollination were grouped since fruit sets and seed sets were similar whatever the cultivar used as male parent (Table S1).

The pollination treatments affected both fruit set ($F = 888.73$; $p < 0.0001$) and seed set ($F = 718.68$; $p < 0.0001$, Figure 4). Regardless of the cultivar, fruit and seed sets were higher after intercultivar (18.08% and 12.16%, respectively) and intracultivar (16.35% and 7.23%, respectively) manual cross-pollinations than after intraindividual manual (3.03% and 1.09%, respectively) and bagged (0.27% and 0.2%, respectively) self-pollinations (Figure 4). Regarding intraindividual self-pollination, manual pollination increased both the fruit set ($p < 0.0001$) and the seed set ($p < 0.0001$) compared to bagged inflorescences in the 3 cultivars. Regarding intracultivar and intercultivar cross-pollinations, differences were higher at the seed than at the fruit level (Figure 4). Fruit set was relatively higher after intercultivar than after intracultivar cross-pollinations ($p = 0.0299$) although at the cultivar level, the difference was only significant for cv. Heapala ($p = 0.0008$, Figure 4A). Seed set was also higher after intercultivar than after intracultivar cross-pollinations and the difference was significant for the 3 cultivars ($p < 0.0001$, Figure 4B). Moreover, Heapala showed a lower fruit set after both intracultivar ($p < 0.0001$) and intercultivar cross-pollinations ($p < 0.0001$) and a lower seed set after both intracultivar ($p < 0.0001$) and intercultivar ($p = 0.0023$) cross-pollinations compared to Amoula and Yassi while Yassi showed a lower seed set than Amoula ($p = 0.030$) after intracultivar cross-pollination (Figure 4).

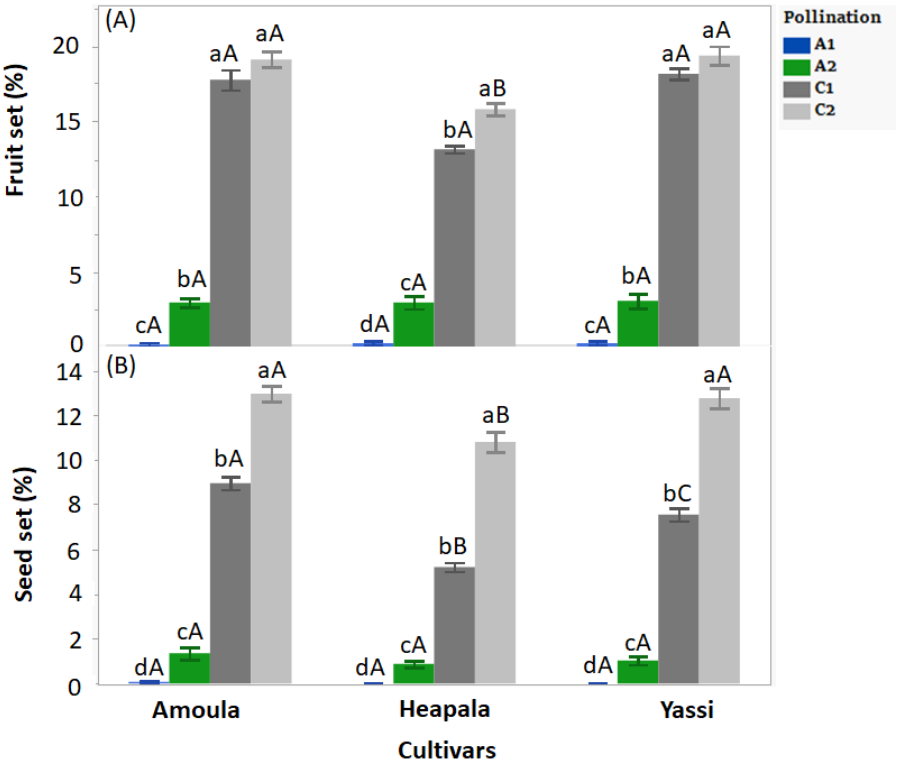


Figure 4: Fruit sets (A) and seed sets (B) after bagged intraindividual self-pollination (A1, blue); intraindividual manual self-pollination (A2, green); intracultivar manual cross-pollination (C1, dark grey); and intercultivar manual cross-pollination (C2, light grey) in monoecious yam *D. rotundata* plants. Values sharing the same lower-case letter between pollination treatments are not significantly different at the 5% level for a same cultivar; values sharing the same upper-case letter among cultivars are not significantly different at the 5% level for a same pollination treatment.

Comparison between intraindividual self-pollination and intercultivar cross-pollination showed that the self-compatibility index was below 0.2 for both fruit set (SCIf) and seed set (SCIs) whatever the cultivar (Table 3). In the same way, comparison between manual and bagged intraindividual self-pollinations showed that the self-fertility index was also low for both the fruit set (SFIf) and seed set (SFIs) in the three cultivars (Table 3). Overall, autogamy reached 11% and pollen lability was almost zero (<1%). We observed a high inbreeding depression when comparing manual self-pollination and intercultivar cross-pollination for both fruit set ($\delta > 0.8$) and seed set ($\delta > 0.9$) whatever the cultivar (Table 3).

Table 3: Self-compatibility (SCI), self-fertility (SFI) and inbreeding depression (δ) index at fruit and seed set levels in cultivated yam *D. rotundata*.

		Amoula	**Heapala**	**Yassi**	**ANOVA (A) and Wilcoxon (W) tests**	
SCI[a]	Fruit Set (SCI_f)	0,16 ± 0,02**a**	0.19 ± 0.03**a**	0.16 ± 0.03**a**	A	F=0,97 P= 0,38
	Seed Set (SCI_s)	0.10 ± 0.02**a**	0.08 ± 0.02**a**	0.09 ± 0.02**a**	A	F= 0,14 P= 0,86
SFI[a]	Fruit Set (SFI_f)	0.01 ± 0.01**a**	0.02 ± 0.01**a**	0.02 ± 0.01**a**	A	F=0,12 P= 0,88
	Seed Set (SFI_s)	0.00 ± 0.00**a**	0.000 ± 0.00**a**	0.00 ± 0.00**a**	W	$\chi 2$ = 6,42 P= 0,08
Inbreeding depression[a]	Fruit set	0.84 ± 0.02**a**	0.81 ± 0.03**a**	0.84 ± 0.03**a**	W	F = 0.61; P = 0.54
	Seed set	0.90 ± 0.02**a**	0.92 ± 0.02**a**	0.91 ± 0.02**a**	A	F = 0.33; P= 0.71
	Seed germination	0.96 ± 0.01**a**	0.96 ± 0.02**a**	0.95 ± 0.01**a**	A	F = 0.49 P = 0.61

[a] Values sharing the same lower case letters between cultivars are not significantly different at the 5% level.

Fruit and seed set results could be partly explained by the pollen germination on stigma and the pollen tube growth in the style. Pollen tube growth analyses showed that the pollination treatment affected both the germination of pollen grains at the stigma surface ($F = 37.45$; $p < 0.001$) and the percentage of pollen tubes that reached the ovules ($\chi 2 = p < 0.0001$) (Figure 5). Pollen germination was lower after manual self-pollination (37%) than after cross-pollination (76%) ($p < 0.0001$) but it was similar for intra- and intercultivar cross-pollinations in the three cultivars (Figure 5A). No differences were observed for the pollen germination percentage among the three cultivars ($F = 0.02$; $p = 0.97$, Figure 5A). Only 25% of the pollen tubes that germinated reached the ovules after self-pollination while about 75% of the pollen tubes reached the ovules after intra- and intercultivar cross-pollinations (Figure 5B). However, the percentage of pollen tubes reaching the ovules was significantly higher after intercultivar than after intracultivar cross-pollinations ($p < 0.001$) whatever the cultivar (Figure 5B). As previously observed for seed set, Heapala showed a lower percentage of pollen tubes reaching the ovules after intracultivar ($p = 0.0006$) and intercultivar ($p = 0.0017$) cross-pollinations compared to Amoula and Yassi, and Yassi showed a lower percentage of pollen tubes reaching the ovules than Amoula ($p= 0.030$) after intracultivar cross-pollination (Figure 5B).

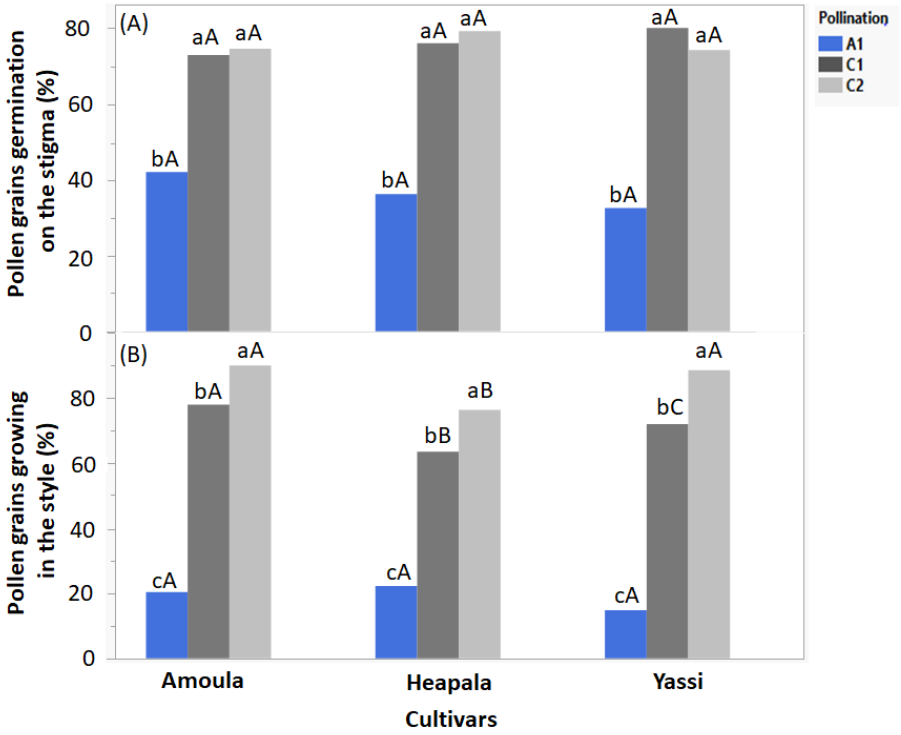


Figure 5: Pollen germination on stigma and pollen tube growth after intraindividual manual self-pollination (A_2, blue), intracultivar manual cross-pollination (C_1, dark grey) and intercultivar manual cross-pollination (C_2, light grey) in monoecious yam *D. rotundata* plants. (A) Percentage of pollen grains on the stigma that initiated a pollen tube. (B) Percentage of germinating pollen grains which pollen tube reached the ovules. Values sharing the same lower-case letter between pollination treatments are not significantly different at the 5% level for a same cultivar; values sharing the same upper-case letter among cultivars are not significantly different at the 5% level for a same pollination treatment.

Fruit set and seed set evaluation were based on the total number of fruits and seeds produced. However, misshapen fruits and seeds were also observed (Figure 6). Almost all fruits and about 75% of the seeds resulting from self-pollination (A_1 and A_2) were misshaped while 66% of the fruits and 50% of the seeds from intracultivar cross-pollination (C_1) and 50% of the fruits and 37% of the seeds from intercultivar cross-pollination (C_2) were misshaped (Table S2). Well-shaped fruits have 3 lobes (Figure 6A) and well-shaped seeds have large wings with an ovate and smooth embryo (Figure 6D). Two

types of malformations were observed within the fruits and the seeds. The first type concerned fruits having only one or two lobes (Figure 6B) and seeds with a rough embryo (Figure 6E). The second type concerned globular fruits without lobes (Figure 6C) and often without seeds or with seeds with small wings and small round and dark embryo (Figure 6F). Misshapen fruits and seeds of the first type were mainly observed after cross-pollination and misshapen fruits and seeds of the second type were mainly observed after self-pollination. Pollination treatment affected both seed ($F = 405.61$; $p < 0.0001$, Figure 7A) and embryo ($F = 55.7$; $p < 0.0001$, Figure 7B) area. Seeds and embryos resulting from self-pollination were smaller than the ones resulting from intracultivar and intercultivar cross-pollinations ($p < 0.0001$). However, the size of seeds ($p = 0.058$) and embryos ($p = 0.46$) were similar between intracultivar and intercultivar cross-pollinations. Furthermore, Yassi produced smaller seeds than Amoula and Heapala after intra- ($p = 0.0141$) and intercultivar ($p < 0.0001$) cross-pollinations (Figure 7A) and smaller embryos than the other cultivars after self-pollination ($p = 0.0011$) and intracultivar cross-pollination ($p = 0.0218$, Figure 7B). Regarding seed germination (Figure 7C), most of the seeds resulting from self-pollination did not germinate (<4%) compared to intracultivar (62.96%) and intercultivar cross-pollinations (85.16%) ($F = 5659.10$; $p < 0.0001$). Strong inbreeding depression ($\delta = 0.96$) was also observed for germination rate (Table 3). The germination percentage was also higher after intercultivar than after intracultivar cross-pollinations ($p < 0.0001$), whatever the cultivar. Although the seed germination percentage was similar among cultivars for self-pollination and intercultivar cross-pollination, Heapala had a significantly lower seed germination rate compared to Amoula and Yassi ($p < 0.0001$, Figure 7C) after intracultivar cross-pollination.

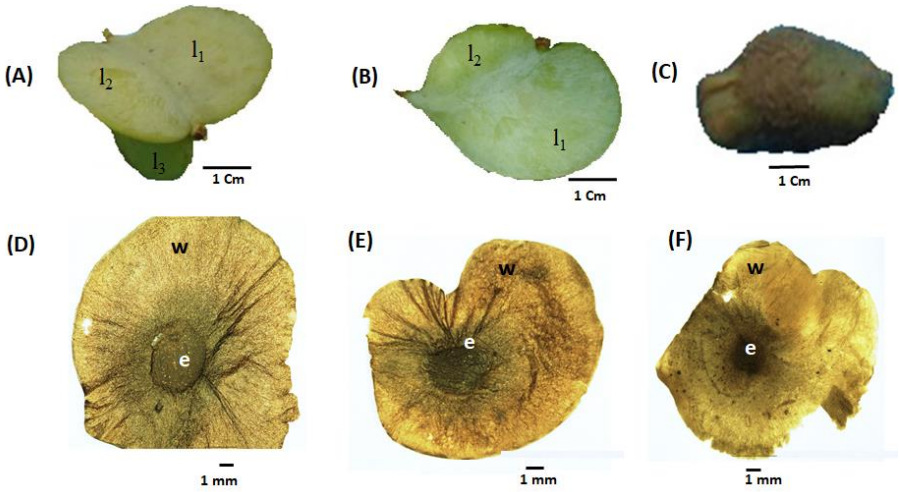


Figure 6: Structure of well-shaped (**A**,**D**) and misshapen (**B**,**C**,**E**,**F**) fruits (**A**–**C**) and seeds (**D**–**F**). w = wing; e = embryo; l = lobe.

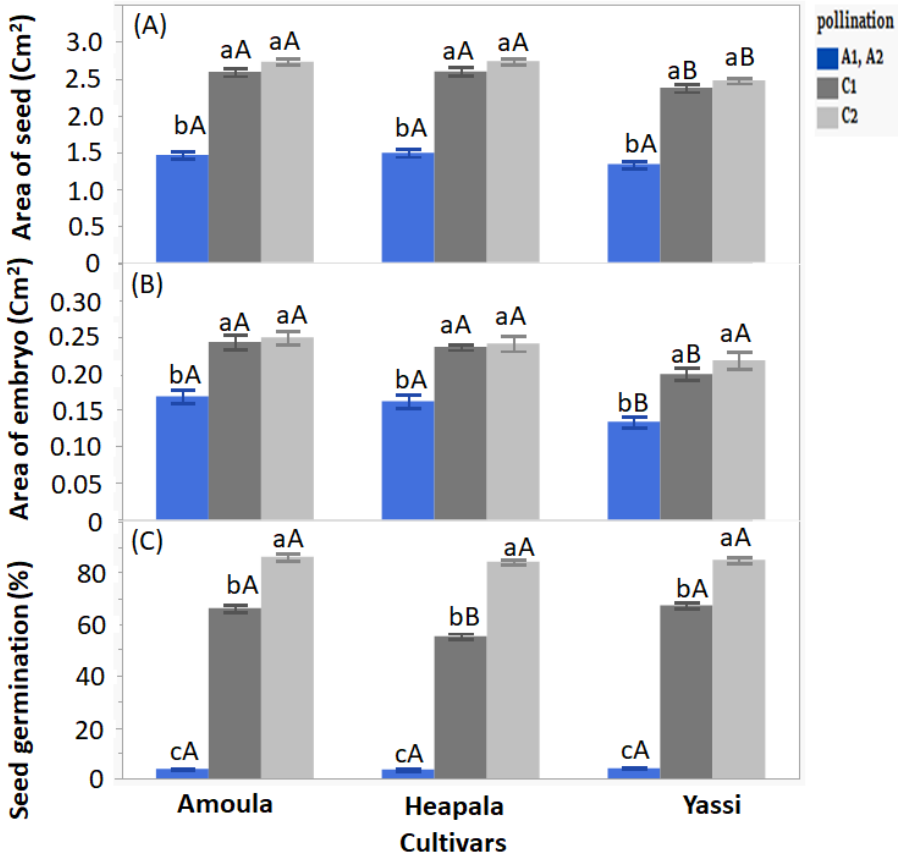


Figure 7: Quality of seeds after intraindividual self-pollination (A_1 + A_2, blue), intracultivar manual cross-pollination (C_1, dark grey) and inter-cultivar manual cross-pollination (C_2, light grey) in monoecious yam *D. rotundata* plants. (**A**) Seed area, (**B**) embryo area, (**C**) seed germination. Values sharing the same lower-case letter between pollination treatments are not significantly different at the 5% level for the same cultivar; values sharing the same upper-case letter among cultivars are not significantly different at the 5% level for the same pollination treatment.

4. Discussion

Sex determination is not stable in *D. rotundata* and although it is mainly characterized by dioecy, monoecious individuals are encountered (Akoroda, 1983; Yolou et al., 2015; Zoundjihèkpon, 1993). In this paper, we focused on the reproduction of monoecious plants, investigated their fertility and analyzed their breeding system. Our results showed that male and female flowers of monoecious individuals were as fertile as the flowers of male and female individuals. Low pollen viability was often reported as a limitation to sexual reproduction in yam (Lebot et al., 2019). In addition to pollen viability, the timing and limited duration of opening of male flowers during the day is another factor that may limit the pollination process of *D. rotundata* yams (Yacouba et al., 2019; Zoundjihèkpon, 1993). In our study, pollen viability was assessed by in vitro pollen germination and averaged 49%. This value was similar to the pollen viability observed by Zoundjihèkpon (1993) using the same method; she showed that the pollen germination rate averaged 45% in West African *D. rotundata* cultivars collected in Côte d'Ivoire (Zoundjihèkpon, 1993). Other studies showed very wide ranges for yam pollen viability among cultivars. For example, pollen viability ranged from 0.3% to 85% in *D. cayenensis* from Nigeria (Akoroda, 1985), from 9% to 62% for cultivars of *D. rotundata* from Côte d'Ivoire (Kouakou, 1987) or from 20% to 98% in *D. alata* (Bai and Jos, 1986). In contrast to these studies, pollen viability was quite stable among cultivars in our study. Female fertility was less investigated than pollen viability in yam. Stigma receptivity averaged 40% in our study whatever the cultivar. Previous works also reported low stigma-receptivity rates within *D. rotundata* cultivars (Lebot et al., 2019; Zoundjihekpon, 1991). Our results showed that there was no particular male or female sterility problem in monoecious individuals compared to male or female individuals in the

analyzed cultivars. This contrasts with the observations of Akoroda (1985) who rather observed that pollen from monoecious individuals had a lower viability compared to that of dioecious individuals. Although the pollen viability and the stigma receptivity remained low, our results suggested that monoecious yam plants could be used both as male and female parents in crosses.

Despite the flower fertility of monoecious plants, the observed fruit and seed sets were lower after self-pollination than after cross-pollination and self-compatibility and self-fertility index were below the threshold of 0.2 (Lloyd and Schoen, 1992) in our study, suggesting that the cultivated yam *D. rotundata* had almost no self-fertilization capacity (<1%). However, a low tolerance to autogamy of 18% for fruit set and 11% for seed set was observed, showing that autogamy was not completely prevented. Autogamy has been observed in monoecious cross-pollinated plants such as cassava and taro (Alves, 2002; Ivancic and Lebot, 2000; Lebot et al., 2019). The low rate of self-compatibility observed in *D. rotundata* suggests that there are prezygotic and/or postzygotic barriers directed against autogamy. Plants have evolved a number of devices to limit autogamy (Shivanna, 2015). In yam, autogamy is naturally limited by the development of unisexual flowers and the delay between the male and female flowering (Lebot et al., 2019). In addition, our results revealed a lower pollen germination on the stigma and a lower pollen tube growth in the style after self-pollination compared to cross-pollination. Indeed, more than 75% of the pollen tubes failed to reach and penetrate the ovule after self-pollination which may explain the low seed set. This observation shows that yam develops prezygotic barriers to autogamy. Nongermination of pollen grains on the stigma and cessation of pollen tube growth in the style are observed in self-incompatible plants (De Nettancourt, 1997). Self-incompatibility has been reported in more than 100 plant families and occurs in approximately 40% of species (Igic et al., 2008). Genetic self-incompatibility is a well-described mechanism preventing self-pollination and, in most angiosperms, it is controlled by a single multiallelic locus, termed S-locus, though systems controlled by two (or more) loci have also been described in certain species (Muñoz-Sanz et al., 2020). The genetic control of prezygotic barriers to autogamy are not known in yam to the best of our knowledge. With the release of yam draft genome sequence, several studies were developed to better understand the genetic control of sexual reproduction in yam (Cormier et al., 2021; Girma et al., 2019; Mondo et al., 2021a; Tamiru et al., 2017). Genome-wide association approach in *D. alata*

identified major genetic barriers to reproduction in yam on chromosomes 1 and 6 (Cormier et al., 2021) and genomic regions linked to sex and cross-compatibility on chromosomes 1, 6 and 17 (Mondo et al., 2021a). Moreover, Super-SAGE transcriptome profiling in *D. rotundata* identified 88 tags differently expressed in male, female and monoecious yam plants (Girma et al., 2019). To the best of our knowledge, no genetic sequence similar to the S-locus has been described in yam up to now. Despite prezygotic barriers, we observed that some pollen grains succeeded to germinate on stigmas of the same plant and resulting pollen tubes reached the ovules. The probability of these two events occurring simultaneously was about 9.25%, a value close to the degree of autogamy (11%) observed within cultivars in terms of seed production. This suggests that there are pathways to bypass the prezygotic mechanisms that prevent autogamy in *D. rotundata*. Plant species have evolved autogamous self-pollination as a means of reproductive assurance under pollination-uncertain environments (Shivanna, 2015). Such reproductive assurance seems to have evolved across all sexual and breeding systems including monoecy, dioecy, and self-incompatibility (Shivanna, 2015).

In addition to prezygotic barriers, we also observed postzygotic barriers to autogamy in monoecious *D. rotundata* cultivars. Indeed, most of the fruits and the seeds resulting from self-pollination were misshaped with a high percentage of seedless fruits. These results suggested that there were problems during seed development. Moreover, seeds resulting from self-pollination had a very low germination percentage. Our results also showed a strong inbreeding depression in relation to fruit and seed set and seed germination (δ = 0.81, 0.87 and 0.95, respectively). Autogamy and geitonogamy lead to homozygosity and could thus lead to inbreeding depression because of the accumulation of lethal alleles (De Nettancourt, 1997). Autogamy is observed in monoecious and dioecious species and often resulted in inbreeding depression (Shivanna, 2015). Similar to yam, hemp (*Cannabis sativa*) is a dioecious species but there are also monoecious cultivars (Mishchenko, 2020; Myhal et al., 2020). The control of self-pollination in monoecious hemp cultivars has allowed the development of self-pollinating lines that are valuable from an agronomical point of view (Mishchenko, 2020; Myhal et al., 2020). Monoecious cultivars facilitate the harvest of both stems and seeds by reducing crop heterogeneity (Faux et al., 2013). However, self-pollinated progeny may show inbreeding depression (Carlson et al., 2021), resulting from increased expression of homozygous

recessive traits. Self-pollinated progeny are often smaller with lower yields than cross-pollinated progeny (Kurtz et al., 2020). Similarly, most poplar species are dioecious but andromonoecious and gynomonoecious individuals that showed tolerance to self-fertilization were observed in some poplar species (Populus. alba, P. davidiana, P. simonii et P. deltoids) (Zhang et al., 2019). However, a self-fertilized poplar clone may have little chance to have progeny and survive because of inbreeding depression (Schultz and Ganders, 1996). In their study on *Bidens sandvicensis*, Schultz and Ganders (1996) found a high inbreeding depression ($\delta = 0.94$) in hermaphrodite flowers of this gynodioecious species despite moderate levels of self-fertilization (25–50%). They hypothesized that selective interference might maintain the high level of inbreeding depression found in this species (Schultz and Ganders, 1996). For its part, *Sagittaria latifolia* exhibited both monoecious and dioecious breeding systems and selfing rates were observed in both systems but marker-based estimates of inbreeding depression ($\delta = 0.83–0.84$) indicated strong selection against inbred offspring in both monoecious and dioecious populations (Dorken et al., 2002). However, it has to be mentioned that self-pollination did not always lead to inbreeding depression and that repeated selfing results in purging of deleterious recessive alleles, thereby avoiding inbreeding depression (Shivanna, 2015).

Our results also showed that even after intercultivar cross-pollination, fruit and seed set did not exceed 18% and 13% respectively and that 50% of the fruits and 37% of the seeds were misshaped. This suggests that sexual reproduction remained low in *D. rotundata* even after cross-pollination. Mondo et al. (2022) reported also pre- and postzygotic barriers in intra- and interspecific crosses in *Dioscorea spp*. The reduced ability of sexual reproduction in root and tuber crops could be directly inherited from domestication and diversification processes in which traits related to sexual reproduction were no longer maintained or even counter-selected due to the associated costs (Cormier et al., 2021; Meyer and Purugganan, 2013). Shivanna (2015) reported that a major issue during yam hybridization activities is the low cross-compatibility rates among cultivars (~23 and 31% for *D. rotundata* and *D. alata*, respectively). Indeed, Zoundjihèkpon (1993) showed very high rates of fruit and seed malformation in *D. rotundata*, ranging from 0 to 91.83% and even reaching 100% in some cultivars. In the study of Sadik and Okereke (1975b), fruit and seed abortions ranged from 38 to 86%. In *D. alata*, manual cross-pollinations were performed using 33 parental combinations (Ehounou et al., 2019) and the fruit sets ranged from

0% to 35% with an average of 24% while the seed sets ranged from 0 to 33% with an average of 30%. We did not observe such variation among intercultivar crosses in our study. However, in our study, cross-pollinated seeds showed a size similar to that described by Assaba et al. (2018) and a germination rate of 73%, close to the 68% observed by Yolou (2016) in Benin. Furthermore, the results we observed for fruit set, seed set, pollen tube growth, seed size, and seed germination after intracultivar cross-pollination were closer to the results obtained for intercultivar cross-pollination than for self-pollination, suggesting an intracultivar diversity within *D. rotundata*. Indeed, several studies showed high intracultivar genetic diversity within *D. rotundata* cultivars (Bhattacharjee et al., 2020; Mignouna et al., 2002; Obidiegwu et al., 2009; Scarcelli, 2005; Scarcelli et al., 2011; Tostain et al., 2006). Yolou (2016) confirmed intracultivar diversity in accessions grown in Benin, including the cultivars used in this study. Thus, the idea that each cultivar is composed of genetically related clones (Scarcelli, 2005) should be rethought in yam and plant-breeding programs are required to produce homogeneous varieties.

The breeding process of *Dioscorea spp*. is very long and lasts about 8–10 years because of the low multiplication rate of propagules and the existence of a juvenile phase during the seminal generation (Mondo et al., 2022). Indeed, seed germination is low, and plants issued from seeds show a low flowering rate and need to be propagated clonally before a reasonable assessment of their characteristics can be done. A long breeding process is also observed in other tuber and root crops such as cassava or sweet potato (Bull et al., 2017; Perera et al., 2013; Rudi et al., 2010). In cassava, the need to accelerate flowering and improve reproductive cycles has been raised to facilitate breeding programs (Ceballos et al., 2017; Hyde et al., 2020; Mukherjee et al., 2016; Muthoni et al., 2012; Orozco-Arroyo et al., 2012; Souza et al., 2018). The selection of parental plants with good characteristics (i.e., good tuber quality, pest and virus resistance etc.) is thus essential in breeding programs. Our study revealed that monoecious plants could serve as both male and female parents in *D. rotundata*, allowing the identification of interesting flowering monoecious genotypes that could be used as both male and female parents in crossings. Moreover, the use of monoecious plants could compensate the scarcity of female plants observed in cultivated yam (Mondo et al., 2021b; Mondo et al., 2020; Sadik and Okereke, 1975a).

5. Conclusions

The results of this study showed that, although flowers of monoecious plants are as fertile as flowers of dioecious plants, cultivated yam *D. rotundata* has a very low tolerance of autogamy in monoecious cultivars. In addition to separation of male and female flowers and nonsynchronization of male and female flowering, yam has developed prezygotic and postzygotic mechanisms to limit autogamy. This is one of the factors limiting the genetic improvement of the species apart from the low flowering and fruiting rates. More studies are required to gain a deeper understanding of the reproductive system of this species and of its genetic control, in order to effectively circumvent the obstacles to self-pollination and increase the success of breeding programs.

References

Ahoton, L., Adjakpa, J., Gouda, M., Daînou, O., and Akpo, E. (2011). Effet des prétraitements de semences du prunier des savanes (Vitex doniana Sweet) sur la germination et la croissance des plantules. *Annales des Sciences Agronomiques* **15**.

Akoroda, M. (1983). Floral biology in relation to hand pollination of white yam. *Euphytica* **32**, 831-838.

Akoroda, M. (1985). Pollination management for controlled hybridization of white yam. *Scientia horticulturae* **25**, 201-209.

Alves, A. A. C. (2002). Cassava botany and physiology. *In* "Cassava: biology, production and utilization" (R. J. Hil-locks, J. M. Thresh and A. C. Bellotti, eds.), Vol. 1, pp. 67-89. CABI Publishing, New York, NY, USA.

Amusa, N., Adigbite, A., Muhammed, S., and Baiyewu, R. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* **2**, 497-502.

Asala, S., Alegbejo, M., Kashina, B., Banwo, O., Asiedu, R., and Kumar, P. L. (2012). Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea spp*.) in Nigeria. *Glob. J. Biotechnol. Biosci* **1**, 163-167.

Assaba, E. I., Yolou, M., Totin Vodounon, H., Quenum, G. A., and Zoundjihekpon, J. (2018). Caractéristiques des graines d'ignames cultivées du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis—Dioscorea rotundata* et évolution du taux de germination des graines. *Afr. Sci* **14**, 195-208.

Ayisah, D. K., Banito, A., and Gumedzoe, D. Y. M. (2014). Criblage de clones d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*-rotundata pour la résistance au virus de la mosaïque de l'igname (YMV) au Togo. International Journal of Biological and Chemical Sciences **8**, 2198-2206.

Ayisah, K. D., and Gumedzoe, Y. M. D. (2012). Genetic diversity among yam mosaic virus (YMV) isolates infecting yam of the complex *Dioscorea cayenensis rotundata* in Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **6**, 1090-1101.

Bai, K. V., and Jos, J. (1986). Female fertility and seed set in *Dioscorea alata* L. *Tropical agriculture* **63**.

Bhattacharjee, R., Agre, P., Bauchet, G., De Koeyer, D., Lopez-Montes, A., Kumar, P. L., Abberton, M., Adebola, P., Asfaw, A., and Asiedu, R. (2020). Genotyping-by-sequencing to unlock genetic diversity and

population structure in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Agronomy* **10**, 1437.

Bousalem, M., Dallot, S., and Guyader, S. (2000). The use of phylogenetic data to develop molecular tools for the detection and genotyping of Yam mosaic virus. Potential application in molecular epidemiology. *Journal of virological methods* **90**, 25-36.

Bull, S. E., Alder, A., Barsan, C., Kohler, M., Hennig, L., Gruissem, W., and Vanderschuren, H. (2017). FLOWERING LOCUS T triggers early and fertile flowering in glasshouse cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plants* **6**, 22.

Carlson, C. H., Stack, G. M., Jiang, Y., Taşkıran, B., Cala, A. R., Toth, J. A., Philippe, G., Rose, J. K., Smart, C. D., and Smart, L. B. (2021). Morphometric relationships and their contribution to biomass and cannabinoid yield in hybrids of hemp (*Cannabis sativa*). *Journal of Experimental Botany* **72**, 7694-7709.

Ceballos, H., Jaramillo, J., Salazar, S., Pineda, L. M., Calle, F., and Setter, T. (2017). Induction of flowering in cassava through grafting. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **9**, 19-29.

Charlesworth, D., and Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of ecology and systematics*, 237-268.

Cormier, F., Lawac, F., Maledon, E., Gravillon, M.-C., Nudol, E., Mournet, P., Vignes, H., and Arnau, G. (2019). A reference high-density genetic map of greater yam (*Dioscorea alata* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **132**, 1733-1744.

Cormier, F., Martin, G., Vignes, H., Lachman, L., Cornet, D., Faure, Y., Maledon, E., Mournet, P., and Arnau, G. (2021). Genetic control of flowering in greater yam (*Dioscorea alata* L.). *BMC plant biology* **21**, 1-12.

Coursey, D. G. (1967). Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. *Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae.*

Coyne, D. L., Tchabi, A., Baimey, H., Labuschagne, N., and Rotifa, I. (2006). Distribution and prevalence of nematodes (Scutellonema bradys and Meloidogyne *spp*.) on marketed yam (*Dioscorea spp*.) in West Africa. *Field Crops Research* **96**, 142-150.

Dafni, A., Kevan, P. G., and Husband, B. C. (2005). Practical pollination biology.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Dansi, A., Mignouna, H. D., Zoundjihékpon, J., Sangare, A., Ahoussou, N., and Asiedu, R. (2000). Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis*/*Dioscorea rotundata* complex) cultivars using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution* **47**, 619-625.

De Nettancourt, D. (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 185-199.

Denadi, N., Gandonou, C., Missihoun, A. A., Zoundjihékpon, J., and Quinet, M. (2020). Plant sex prediction using genetic markers in cultivated yams (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin. *Agronomy* **10**, 1521.

Dorken, M. E., Friedman, J., and Barrett, S. C. (2002). The evolution and maintenance of monoecy and dioecy in Sagittaria latifolia (Alismataceae). *Evolution* **56**, 31-41.

Dumont, R., Dansi, A., Vernier, P., and Zoundjihèkpon, J. (2005). "Biodiversité et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest: Pratiques traditionnelles conduisant à *Dioscorea rotundata* Poir," Cirad.

Dumont, R., Zoundjihekpon, J., and Vernier, P. (2010). Origine et diversité des ignames *Dioscorea rotundata* Poir. *Cahiers Agricultures* **19**, 255-261 (1).

Egesi, C. N., Odu, B., Ogunyemi, S., Asiedu, R., and Hughes, J. (2007). Evaluation of water yam (*Dioscorea alata* L.) germplasm for reaction to yam anthracnose and virus diseases and their effect on yield. *Journal of Phytopathology* **155**, 536-543.

Ehounou, A. E., Kouakou, A., N'zi, J., Dibi, K., Bakayoko, Y., Essis, B., N'Zue, B., Arnau, G., Maledon, E., and Asfaw, A. (2019). Production of hybrid seeds by intraspecific crossing in yam *Dioscorea alata* L.

FAOSTAT (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available on line: http://www.fao.org/faostat/en/data/QL (Accessed on 15 October 2021).

Faux, A.-M., Draye, X., Lambert, R., d'Andrimont, R., Raulier, P., and Bertin, P. (2013). The relationship of stem and seed yields to

flowering phenology and sex expression in monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *European journal of agronomy* **47**, 11-22.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Hamon, P. (1987). Structure, origine génétique des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest, Paris 11.

Hamon, P., Hamon, S., and Toure, B. (1986). Les ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* de Côte d'Ivoire. *In* "Inventaire et Description des Cultivars Traditionnels". Faculté des Sciences et Techniques et l'International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Hyde, P. T., Guan, X., Abreu, V., and Setter, T. L. (2020). The anti-ethylene growth regulator silver thiosulfate (STS) increases flower production and longevity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant growth regulation* **90**, 441-453.

Igic, B., Lande, R., and Kohn, J. R. (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 93-104.

Ivancic, A., and Lebot, V. (2000). "The genetics and breeding of taro," Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le ….

Jacquemart, A.-L., Michotte-Van der Aa, A., and Raspé, O. (2006). Compatibility and pollinator efficiency tests on *Pyrus communis* L. cv.'Conference'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **81**, 827-830.

Kouakou, K. C. (1987). La Côte d'Ivoire à la recherche d'un droit de la consommation, Montpellier 1.

Kurtz, L. E., Mahoney, J. D., Brand, M. H., and Lubell-Brand, J. D. (2020). Comparing genotypic and phenotypic variation of selfed and outcrossed progeny of hemp. *HortScience* **55**, 1206-1209.

Lebot, V., Abraham, K., Kaoh, J., Rogers, C., and Molisalé, T. (2019). Development of anthracnose resistant hybrids of the Greater Yam (*Dioscorea alata* L.) and interspecific hybrids with *D. nummularia* Lam. *Genetic Resources and Crop Evolution* **66**, 871-883.

Lloyd, D. G., and Schoen, D. J. (1992). Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International journal of plant sciences* **153**, 358-369.

Loko, Y., Dansi, A., Linsoussi, C., Assogba, P., Dansi, M., Vodouhè, R., Akoegninou, A., and Sanni, A. (2013). Current status and spatial analysis of Guinea yam (*Dioscorea cayenensis* Lam.-*D. rotundata* Poir. complex) diversity in Benin. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* **3**, 219-238.

Martin, F. W. (1966). Sex ratio and sex determination in Dioscorea. *Journal of Heredity* **57**, 95-99.

Meyer, R. S., and Purugganan, M. D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature reviews genetics* **14**, 840-852.

Miège, J. (1952). Contribution à l'étude systématique des *Dioscorea* d'Afrique Occidentale. *These, faculté des sciences, Paris*.

Miège, J. (1982). Notes sur les especes *Dioscorea cayenensis* Lamk. et *Dioscorea rotundata* Poir. *In* "Yams (Ignames)" (J. Miège and S. Lyonga, eds.), pp. 367-375. Oxford University Press, Oxford, UK.

Mignouna, D. B., Akinola, A. A., Abdoulaye, T., Alene, A. *D., Manyo*ng, V., Maroya, N. G., Aighewi, B. A., Kumar, L. P., Balogun, M., and Lopez-Montes, A. (2020). Potential returns to yam research investment in sub-Saharan Africa and beyond. *Outlook on Agriculture* **49**, 215-224.

Mignouna, H., Mank, R., Ellis, T., Van Den Bosch, N., Asiedu, R., Abang, M., and Peleman, J. (2002). A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 726-735.

Mishchenko, S. (2020). Phenotypic manifestation of the traits of presence and content of cannabinoids in the process of self-pollination in monoecious hemp and selection. *Селекція і насінництво*, 58-73.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2021a). Genome-Wide Association Studies for Sex Determination and Cross-Compatibility in Water Yam (*Dioscorea alata* L.). *Plants* **10**, 1412.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2021b). Optimized Protocol for In Vitro Pollen Germination in Yam (*Dioscorea spp*.). *Plants* **10**, 795.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022). Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp*.). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Mukherjee, A., George, J., Pillai, R., Chakrabarti, S. K., Naskar, S. K., Patro, R., Nayak, S., and Lebot, V. (2016). Development of taro (Colocasia *esculenta* (L.) Schott) hybrids overcoming its asynchrony in flowering using cryostored pollen. *Euphytica* **212**, 29-36.

Muñoz-Sanz, J. V., Zuriaga, E., Cruz-García, F., McClure, B., and Romero, C. (2020). Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Frontiers in Plant Science* **11**.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R., and Kabira, J. (2012). Reproductive biology and early generation's selection in conventional potato breeding. *Australian Journal of Crop Science* **6**, 488-497.

Myhal, M., Mishchenko, S., and Laiko, I. (2020). Inbreeding and heterosis of hemp. *Sumy Inc.: Sumy, Ukraine*.

Norman, M. J. T., Norman, M. J. T., Pearson, C., and Searle, P. (1996). "Tropical food crops in their environment," Cambridge University Press.

Obidiegwu, J., Kolesnikova-Allen, M., Ene-Obong, E., Muoneke, C., and Asiedu, R. (2009). SSR markers reveal diversity in Guinea yam (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) core set. *African Journal of Biotechnology* **8**.

Obidiegwu, J. E., and Akpabio, E. M. (2017). The geography of yam cultivation in southern Nigeria: Exploring its social meanings and cultural functions. *Journal of Ethnic Foods* **4**, 28-35.

Ogaraku, A., and Usman, H. (2008). Storage Rot of Some Yams (*Dioscorea spp*) in Keffi and Environs, Nasarawa State, Nigeria. *Patnsuk J* **4**, 22-27.

Omohimi, C., Piccirillo, C., Roriz, M., Ferraro, V., Vasconcelos, M., Sanni, L., Tomlins, K., Pintado, M., and Abayomi, L. (2018). Study of the proximate and mineral composition of different Nigerian yam chips, flakes and flours. *Journal of food science and technology* **55**, 42-51.

Orozco-Arroyo, G., Vázquez-Santana, S., Camacho, A., Dubrovsky, J. G., and Cruz-García, F. (2012). Inception of maleness: auxin

contribution to flower masculinization in the dioecious cactus Opuntia stenopetala. *Planta* **236**, 225-238.

Perera, P. I., Quintero, M., Dedicova, B., Kularatne, J., and Ceballos, H. (2013). Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). *AoB plants* **5**.

Rudi, N., Norton, G. W., Alwang, J. R., and Asumugha, G. N. (2010). Economic impact analysis of marker-assisted breeding for resistance to pests and post harvest deterioration in cassava. *African Journal of Agricultural and Resource Economics* **4**, 110-122.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975a). Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* **39**, 597-604.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975b). A new approach to improvement of yam *Dioscorea rotundata*. *Nature* **254**, 134-135.

Scarcelli, N. (2005). Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative: le cas des ignames au Bénin (*Dioscorea* sp.), Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.

Scarcelli, N., Cubry, P., Akakpo, R., Thuillet, A.-C., Obidiegwu, J., Baco, M. N., Otoo, E., Sonké, B., Dansi, A., and Djedatin, G. (2019). Yam genomics supports West Africa as a major cradle of crop domestication. *Science advances* **5**, eaaw1947.

Scarcelli, N., Tostain, S., Vigouroux, Y., Luong, V., Baco, M., Agbangla, C., Daïnou, O., and Pham, J.-L. (2011). Genetic structure of farmer-managed varieties in clonally-propagated crops. *Genetica* **139**, 1055-1064.

Schultz, S. T., and Ganders, F. R. (1996). Evolution of unisexuality in the Hawaiian flora: a test of microevolutionary theory. *Evolution* **50**, 842-855.

Sedgley, M., and Griffin, A. R. (2013). "Sexual reproduction of tree crops," Academic Press.

Shivanna, K. (2015). Reproductive assurance through autogamous self-pollination across diverse sexual and breeding systems. *Current Science*, 1255-1263.

Sinébou, V., Quinet, M., Ahohuendo, B. C., and Jacquemart, A.-L. (2016). Reproductive traits affect the rescue of valuable and endangered multipurpose tropical trees. *AoB Plants* **8**.

Sonibare, M. A., Asiedu, R., and Albach, *D. C. (20*10). Genetic diversity of *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax using amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and cpDNA. *Biochemical Systematics and Ecology* **38**, 320-334.

Souza, L. S., Diniz, R. P., de Jesus Neves, R., Alves, A. A. C., and de Oliveira, E. J. (2018). Grafting as a strategy to increase flowering of cassava. *Scientia horticulturae* **240**, 544-551.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tiama, D. (2016). Diversité génétique des ignames *Dioscorea* sp du Burkina Faso: yùyà du passore, Thèse de Doctorat unique, Univ Ouaga 1 Pr Joseph KI-ZERBO.

Tostain, S., Scarcelli, N., Brottier, P., Marchand, J. L., Pham, J. L., and Noyer, J. L. (2006). Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.). *Molecular Ecology Notes* **6**, 173-175.

Yacouba, B., Michel, K. A., Brice, D. K. E., Emmanuel, E. A., Sidoine, E. B., Abou Bakari, K., and Patrik, A. (2019). Effet de la Période de Pollinisation Manuelle sur la Fructification de l'igname (*Dioscorea rotundata* Poir; Dioscoreaceae) en Côte d'Ivoire. *Europ. Sci. J* **15**, 1857-7881.

Yolou, M. (2016). Diversité génétique des ignames africaines cultivées (Complexe *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* et *D. dumetorum*) et perception des paysans du Centre-Bénin des questions des droits de propriété intellectuelle. Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. D., and Zoundjihekpon, J. (2015). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Zannou, A., Ahanchédé, A., Struik, P., Richards, P., Zoundjihékpon, J., Tossou, R., and Vodouhè, S. (2004). Yam and cowpea diversity management by farmers in the Guinea-Sudan transition zone of Benin. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* **52**, 393-420.

Zhang, B., Zhu, W., Diao, S., Wu, X., Lu, J., Ding, C., and Su, X. (2019). The poplar pangenome provides insights into the evolutionary history of the genus. *Communications Biology* **2**, 215.

Zoundjihekpon, J. (1991). Differentiation, growth and development. Floral biology of cultivated yams of West Africa *Dioscorea cayenensis-rotundata*. *In* "Plant Sciences Today" (Y. de Kouchkovsky, ed.). Les Colloques de l'INRA Paris (France).

Zoundjihekpon, J. (1993). Biologie de la reproduction et génétique des ignames cultivées de l'Afrique de l'Ouest, Dioscorea cayenensis-rotundata. PhD Thesis, Université Nationale de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Zoundjihekpon, J., Hamon, P., Hamon, S., and Tio-Toure, B. (1995). Relation entre germination, mise à fleurs et niveau de prélèvement des semenceaux d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*-Rotundata. *Agronomie Africaine* **7**, 223-235.

Table S1 : Fruit set and seed set for the different crosses performed.

Type of crosses	Parents (female x male)[a]	Fruit Set (%)[b]	Seed Set	ANOVA (M/Mo)[c]		ANOVA (male cultivar)[d]	
				(Fruit set)	(Seed set)	(Fruit set)	(Seed set)
bagged intra-individual self-pollination (A_1)	Amoula (Mo) x Amoula (Mo)	0.2±0.42a	0.06±0.11a	F = 0.15; P = 0.85	F = 3.22; P = 0.055		
	Heapala (Mo) x Heapala (Mo)	0.30±0.48a	0.00±0.00a				
	Yassi (Mo) x Yassi (Mo)	0.30±0.48a	0.00±0.00a				
intra-individual manual self-pollination (A_2)	Amoula (Mo) x Amoula (Mo)	3.00±0.94a	1.35±0.87a	F = 0.02; P = 0.98	F = 1.30; P = 0.28		
	Heapala (Mo) x Heapala (Mo)	3.00±1.33a	0.86±0.51a				
	Yassi (Mo) x Yassi (Mo)	3.10±1.52a	1.03±0.60a				
intra-cultivar manual cross-pollination (C_1)	Amoula (Mo) x Amoula (M)	17.75±2.11a	8.95±0.89a	F = 35.22; P< 0.0001	F = 53.71; P< 0.0001		
	Heapla (Mo) x Heapala (M)	13.15±0.7b	5.20±0.63b				
	Yassi (Mo) x Yassi (M)	18.15±1.52a	7.55±0.89c				

Table S1 : Fruit set and seed set for the different crosses performed (Continuation)

Type of crosses	Parents (female x male)[a]	Fruit Set (%)[b]	Seed Set	ANOVA (M/Mo)[c]		ANOVA (male cultivar)[d]	
intra-cultivar manual cross-pollination (C_1)	Amoula (Mo) x Amoula (M)	17.75±2.11a	8.95±0.89a	F = 35.22; P< 0.0001	F = 53.71; P< 0.0001		
	Heapla (Mo) x Heapala (M)	13.15±0.7b	5.20±0.63b				
	Yassi (Mo) x Yassi (M)	18.15±1.52a	7.55±0.89c				
inter-cultivar manual cross-pollination (C_2)	Amoula (Mo) x Heapla (M)	18.33±1.52**aA**	12.5±1.32**aA**	F = 2.22 P = 0.21	F = 0.27 P = 0.62	F = 0.19 P = 0.68	F = 1.32 P = 0.31
	Amoula (Mo) x Heapla (Mo)	20.5±2.00**a**	13.00±1.00**a**				
	Amoula (Mo) x Yassi (M)	18.83±1.25**aA**	13.66±1.15**aA**	F = 0.34 P = 0.58	F = 0.86 P = 0.40		
	Amoula (Mo) x Yassi (Mo)	18.36±0.55**a**	12.83±1.04**a**				
	Heapla (Mo) x Amoula (M)	15.50±1.50**aA**	11.00±2.00**aA**	F = 1.44 P = 0.29	F = 0.21 P = 0,67	F = 0.08 P = 0.78	F = 0.05 P = 0.82
	Heapla (Mo) x Amoula (Mo)	16.66±0.75**a**	10.33±1.52**a**				
	Heapla (Mo) x Yassi (M)	15.83±1.25**aA**	11.33±1.52**aA**	F = 0.50 P = 0.51	F = 1.4 P = 0.30		
	Heapla (Mo) x Yassi (Mo)	15.16±1.04**a**	10.16±0.76**a**				
	Yassi (Mo) x Amoula (M)	18.16±1.04**aA**	13.00±1.73**aA**	F = 0.91 P = 0.39	F = 0.15 P = 0.71	F = 1.00 P = 0..37	F = 0.06 P = 0.81
	Yassi (Mo) x Amoula (Mo)	19.66±2.51**a**	12.50±1.32**a**				
	Yassi (Mo) x Heapla (M)	19.00±1.00**aA**	13.33±1.52**aA**	F = 1.08 P = 0.35	F = 1.19 P = 0.33		
	Yassi (Mo) x Heapla (Mo)	20.5±2.29**a**	12.16±1.04**a**				

a M: male plant, Mo: monoecious plant

b Values followed by a same lower case letter are not different at a 5% level for the pollen source a same female (male or monoecious plant) per cross type. Values followed by a same upper case letter are not different at a 5% level according for the cultivar used as male parent for a same female cultivar.

c Statistical comparison of the pollen source (male or monoecious plant) per cross type.

d Statistical comparison of the cultivar used as male pare

Partie III

Discussion générale

Discussion générale

Les ignames cultivées *D. rotundata* sont propagées végétativement et produisent des tubercules comestibles très prisés. Mais, bien qu'elles peuvent fleurir et produire des graines, la reproduction et surtout le contrôle de l'expression du sexe restent mal connus chez cette espèce. Dans une dynamique d'envisager le recours aux méthodes conventionnelles ou leur association aux méthodes ultramodernes (transgéniques) pour l'amélioration de l'espèce, la maîtrise de la reproduction sexuée et le contrôle de l'expression sexuelle chez l'igname apparaissent comme une nécessité. **L'objectif principal de cette thèse était donc de caractériser l'expression du sexe chez *D. rotundata* et d'étudier les mécanismes permettant de le contrôler**. Dans ce cadre, notre étude a montré que les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin fleurissent mais on note une instabilité du sexe notamment chez les populations sub-dioïques. Les marqueurs moléculaires actuellement disponibles pour la prédiction du sexe ont montré peu d'efficacité sur les cultivars du Bénin. Malgré la preuve du contrôle génétique de l'expression sexuelle, notre étude a révélé que le sexe des ignames *D. rotundata* (notamment les monoïques) pouvait être modulé par les hormones végétales. Les plantes monoïques ont montré une compatibilité croisée similaire aux plantes dioïques avec une faible tolérance à la géitonogamie qui pourront être valorisées dans l'amélioration de l'espèce.

Cette discussion générale répondra aux quatre questions de recherche développées dans les objectifs, à savoir :

- Quelles sont la phénologie de la floraison et les causes de la variation du sexe chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* ?

- Quel est le contrôle génétique du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

- Quel est le contrôle hormonal du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

- Quelle est la performance de la reproduction sexuée chez les ignames cultivées *D. rotundata* et sa contribution à l'amélioration génétique de l'espèce ?

Les principaux apports de la thèse seront discutés au regard de la littérature et au regard de leur intérêt pour l'amélioration de la culture de l'espèce.

1- Quelles sont la phénologie de la floraison et les causes de la variation du sexe chez les ignames cultivées *Dioscorea rotundata* ?

Les ignames cultivées *D. rotundata* sont caractérisées par la dioécie mais il existe également quelques populations de cultivars monoïques (Darkwa et al., 2020b; Mondo et al., 2020) qui comprennent également des individus mâles et femelles de sorte qu'on peut les qualifier de « sub-dioiques » à la différence des populations strictement dioïques. Nous avons montré qu'au sein de la collection nationale du Bénin, la majorité des cultivars étaient mâles ou femelles et que les cultivars monoïques ne représentaient que 3% de la population (chap. 1). Les cultivars mâles, femelles et monoïques se différencient par le sexe de leurs fleurs mais également par leur temps de floraison, le nombre d'inflorescences par plante et la longueur des inflorescences. En effet, les cultivars mâles fleurissent généralement plus tôt et produisent plus d'inflorescences et de fleurs que les cultivars monoïques et femelles tandis que ces derniers ont des inflorescences plus longues. Les monoïques présentent des caractéristiques intermédiaires. Ces paramètres varient également entre cultivars. Si certains cultivars présentent un sexe stable d'une année à l'autre, d'autres présentent une variation du sexe d'une année à l'autre ou d'un endroit à l'autre (chap. 1). Cette instabilité du sexe pourrait entraver les programmes de recherche qui s'inscrivent dans l'amélioration de l'espèce. Plusieurs études qui se sont intéressées à la reproduction sexuée chez les ignames cultivées *D. rotundata* avaient déjà évoqué ce problème (Agre et al., 2020; Dansi et al., 1999; Mondo et al., 2020; Tamiru et al., 2017) mais les causes étaient mal connues jusqu'à présent.

Des études effectuées chez *D. cayenensis* et *D. alata* avaient déjà évoqué des différences de gradients de concentration (en grains d'amidon) le long des tubercules et leurs impacts potentiels sur la germination et le rendement (Miège, 1957). En plus, Dansi et al. (1999), partant de deux fragments d'un même tubercule de plante femelle avaient observé deux plantes, l'une mâle et l'autre femelle. Alors l'hypothèse de la section des tubercule-semences comme cause des variations du sexe s'est alors révélée comme une piste

probable. Toutefois, nos travaux effectués dans le cadre de cette thèse (chap. 3) en utilisant des sections de tubercules (tête, milieu ou base) de cultivars dioïques et sub-dioiques ont montré que les changements de sexe ne sont pas liés aux sections de tubercules utilisées comme semence mais plutôt au sexe de la plante mère. En effet, alors que les changements de sexe sont très rares chez les plantes mâles et femelles des cultivars dioïques, ils sont plutôt très fréquents chez les monoïques. Il a été également constaté qu'en cas de changement de sexe chez les monoïques, les descendants mâles et femelles obtenus pouvaient à leur tour se transformer en monoïques au cours du cycle cultural suivant contrairement aux plantes mâles et femelles de cultivars dioïques qui présentent une expression de sexe généralement stable. Cela suggère que l'instabilité du sexe est un phénomène qui concerne spécifiquement les cultivars sub-dioïques (population composée de plantes monoïques, mâle et femelle) de *D. rotundata*. Agre et al. (2020) ont également observé une instabilité du sexe spécialement chez les monoïques de *D. rotundata*. Des changements de sexe ont été évoqués chez des espèces dioïques comme le peuplier (*populus spp*.) et l'oponce (*Opuntia stenopetala*) (Orozco-Arroyo et al., 2012), les espèces monoïques telles que le melon (*Cucumis melo*) et le concombre (*C. sativus*) (Gerashchenkov et Rozhnova, 2013) et d'autres espèces qui comprennent des populations dioïques et sub-dioïques telles que le Nancy précoce (*Wurmbea dioica*) (Vaughton et Ramsey, 2012) ou encore l'eurya du Japon (*Eurya japonica*) (Wang et al., 2017). Chez la plupart de ces espèces les changements du sexe sont le plus souvent associés aux facteurs environnementaux mais dépendent surtout de la capacité des plantes à produire et développer alternativement des organes de sexes opposés (Hobza et al., 2018). En effet, les espèces dioïques, monoïques et sub-dioïques qui présentent des changements de sexe initient souvent les primordia des organes floraux des deux sexes mais leur développement ultérieur est déterminé génétiquement mais également contrôlé par les facteurs environnementaux comme la luminosité, la température, la disponibilité de ressources nutritives etc (Delph et Wolf, 2005; Hobza et al., 2018). C'est ainsi que le traitement au froid supprime les primordia staminaires et favorise le développement du gynécée chez le papayer (Lin et al., 2016).

Nos travaux réalisés sur la morphogenèse florale (chap. 1) ont montré que **le méristème floral initie des primordia d'étamines et de carpelles chez toutes les fleurs indépendamment du sexe tant chez les cultivars dioïques que sub-dioïques d'ignames cultivées *D. rotundata*. Cependant**

si leur développement s'arrête au stade primordia en fonction du sexe de la fleur chez les cultivars dioïques, dans la plupart des cas les fleurs mâles et femelles de population sub-dioïques conservent des restes d'organes de sexes opposés. Ce sont également ces cultivars qui sont les plus sujets aux changements de sexe, contrairement aux cultivars mâles et femelles strictement dioïques (chap. 3). Le contrôle du sexe semble donc moins strict chez ces derniers et il semblerait que plus le développement des primordia de sexes opposés s'arrête tôt lors de la morphogenèse florale, plus le sexe est stable. Parallèlement à ces résultats, Hobza et al. (2018) ont évoqué l'existence d'une asymétrie dans la capacité à développer les organes de sexes opposés chez de nombreuses espèces dioïques et sub-dioïques. Par exemple, Les mâles de populations strictement dioïques de *Wurmbea dioica* (Colchicaceae) n'ont jamais formé de gynécée. En revanche, les mâles de populations sub-dioïques développent le plus souvent le gynécée dans des conditions de ressources nutritives élevées (Vaughton et Ramsey, 2012). Chez l'arbuste sub-dioïque *Eurya japonica* (Pentaphylacaceae), les conditions défavorables de culture occasionnent une tendance à la transformation de l'état bisexué en unisexué (mâle ou femelle) plutôt que l'inverse (Wang et al., 2017). Il est alors possible que les bases génétiques de détermination du sexe entre population strictement dioïque et population sub-dioïque soient différentes mais il est encore plus évident que les conditions de culture impactent fortement sur l'expression du sexe chez les plantes dioïques à caractères monoïques et/ou hermaphrodites. Chez les ignames cultivées *D. rotundata* l'impact de facteurs environnementaux sur l'expression du sexe et l'intensité de la floraison a été évoqué à plusieurs reprises par le passé (Agre et al., 2020; Darkwa et al., 2020b; Hamadina et al., 2009; Mondo et al., 2020; Tamiru et al., 2017). Notre étude vient renforcer cette hypothèse en démontrant l'initiation d'organes de sexes opposés et une transition florale tardive chez les ignames cultivées *D. rotundata* (chap. 1). Autrement, étant donné le long cycle végétatif (environ 3 à 4 mois) qui caractérise l'espèce, les plantes s'exposeraient à une longue période de stress en cas de conditions de culture difficiles (manques de ressources) qui pourrait avantager le développement d'un organe sexuel au détriment d'un autre. Chez les ignames comme d'autres espèces dioïques, le développement du gynécée serait plus demandeur en ressources nutritives que l'androcée (Abraham, 1997). Mais, à notre connaissance, il n'existe pas de preuves d'une relation étroite entre le sexe et le rendement (nombre de tubercules par plante, taille et grosseur des tubercules).

Des travaux de prospection de champs d'ignames effectués entre 2016 et 2018 ont révélé que certains cultivars (Kpakala et Dodo) du Centre-Bénin (Commune de Dassa-Zoumè, Idaho) pouvaient changer complètement de sexe (à l'échelle d'un champ) selon que les producteurs procèdent à une rotation (changement d'espace culturale) ou non (observations personnelle). Des expériences de croisement réalisées au cours de cette étude (chap. 5) ont été perturbées par les changements de sexe. Alors que les cultivars monoïques ont été sélectionnés dans le Nord-Bénin pour la mise en place des plans de croisement dans le Sud (CREFIISDA), plus de 90% des plantes avaient montré une floraison mâle. C'est ce qui a justifié d'ailleurs le changement de cultivars au niveau du chapitre 5 par rapport au reste. Dans ce contexte il est probable que le changement de milieu a un impact conséquent sur l'expression du sexe.

Par ailleurs, en terme de durée et d'intensité de la floraison nous avons également constaté des variations importantes lorsque ces paramètres ont été mesurés au cours de différentes expériences (chap. 1 et chap. 4). En effet, pour les mêmes cultivars (Anago, Gnidou, Flou et Katala), nous avons constaté que la floraison était plus précoce et plus abondante pour les expériences menées en 2019 (chap. 1) comparativement à celles de 2021 (chap. 4) quand bien même le semis en 2021 était précoce (13 Mars) par rapport à celui de 2019 (09 Mai). Cette analyse comparative confirme une fois de plus les observations selon lesquelles les germinations précoces conduisent généralement à une floraison tardive chez les ignames cultivées *D. rotundata* (chap. 3). En comparant les données climatiques (température et pluviosité) entre les années 2019 et 2021, nous avons constaté que dans le cas précis des expériences de 2021 (chap. 4), juste après la germination, les plantes ont passé un mois de mai anormalement sec (Figure 19) et leur période de floraison a coïncidé aussi avec le mois d'août également très peu pluvieux (Figure 19).

Plusieurs travaux ont rapporté l'impact du stress hydrique sur la reproduction chez les plantes (Aubert et al., 2021; Bürli et al., 2022; Descamps et al., 2021; Mesgaran et al., 2021). Chez l'espèce dioïque *Silene latifolia*, il a été prouvé que les plantes en condition de stress hydrique montrent une croissance très lente, sont moins susceptibles de fleurir et mettent plus de temps à fleurir. Elles réduisent considérablement leur production de fleurs en réponse à une faible disponibilité en eau (Delph, 2019). Des applications de stress hydrique ont montré une faible floraison et

une faible production d'inflorescences et de fleurs chez les ignames cultivées *D. rotundata* ; les effets du stress étant d'autant plus forts lorsqu'on associe les stress hydrique et thermique (observation personnelle 2020, données non publiées). Des études réalisées sur les ignames ont rapporté que l'expression du sexe et l'intensité (abondance) de la floraison pouvaient varier selon la génération (plantes issues de graines par rapport aux plantes clonales), l'année (Abraham et Nair, 1979; Doku, 1985; Sadik et Okereke, 1975; Segnou et al., 1992), la température et la photopériode (Hamadina et al., 2009). Il serait important d'entamer des recherches axées essentiellement sur l'implication des conditions de culture dans l'expression du sexe afin de mieux faire face au défi que pose la question de l'expression du sexe. Mais qu'en est-il du contrôle génétique du sexe ?

2- Quel est le contrôle génétique du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

Le contrôle génétique du sexe chez les ignames cultivées a été beaucoup investigué ces dernières années. Chez les ignames cultivées *D. rotundata,* le séquençage du génome en 2017 (Tamiru et al., 2017) a permis de poser les bases de la détermination génétique du sexe chez l'espèce. Tamiru et al. (2017) ont démontré que la régulation du sexe chez *D. rotundata* est contrôlée par une région génomique spécifique aux femelles située sur le pseudo-chromosome 11. Les auteurs ont par la même occasion établi un système de détermination du sexe hétérogamétique femelle (ZZ/ZW) sur la base d'un marqueur génétique CAPS (SP1) qui montrait une hétérozygotie (AB) dans la région spécifique au sexe chez les femelles contrairement aux mâles qui étaient plutôt homozygotes (AA). Un marqueur d'ADN, "SP16", a été développé dans la région génomique spécifique aux femelles (W-) de *D. rotundata* pour la prédiction du sexe de la plante au stade de plantule (Tamiru et al., 2017). Ce marqueur d'ADN a été également testé concluant dans la prédiction du sexe chez plusieurs accessions de *D. rotundata* du Nigéria (Agre et al., 2020). Dans le but d'explorer les déterminants génétiques du contrôle sexuel chez les ignames *D. rotundata* du Bénin, notre étude a expérimenté les marqueurs SP16 et SP1 sur 101 cultivars de populations dioïques et sub-dioïques de la collection nationale du Bénin (chap. 2). Contrairement aux observations de Tamiru et al. (2017) et Agre et al. (2020) sur les ignames *D. rotundata* du Nigéria, notre étude a montré un biais du marqueur SP16 dans la prédiction du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin. En effet, alors que le marqueur SP16

associé à l'allèle W est censé discriminer les plantes de sexe mâle (absence d'amplification) de celles de sexe femelle (une bande amplifiée), nous avons observé l'amplification d'une bande chez 42% des cultivars mâles principalement ceux des populations sub-dioïques. Autrement dit, le marqueur SP16 à lui seul n'est pas efficace dans la prédiction du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin (chap. 2). Toutefois, notre étude a confirmé une corrélation de l'absence du marqueur SP16 avec l'expression du sexe mâle (chez les population strictement dioïques) suggérant l'implication du locus W dans l'expression du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*. L'utilisation du marqueur SP1 sur les mêmes cultivars de la collection nationale (chap. 2) a révélé une hétérozygotie (AB) à hauteur de 85% chez les mâles alors que la majorité des femelles (66%) étaient plutôt homozygotes (AA). **Cela suggère que la prédiction du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin pouvait être optimisée en associant les marqueurs SP16 et SP1 à la fois**. La recherche d'autres marqueurs pourrait également améliorer la prédiction précoce du sexe chez cette espèce. Plusieurs études récentes se sont intéressées au contrôle génétique du sexe chez l'igname et ont permis d'identifier des QTLs, marqueurs génétiques et/ou régions chromosomiques liées au sexe (Cormier et al., 2019 ; Asfaw et al., 2022). Par exemple, Asfaw et al. (2022) ont identifié trois marqueurs SNP associés au sexe chez *D. rotundata* ; ceux-ci restent à tester sur les ignames cultivées du Bénin. L'inefficacité des marqueurs moléculaires dans la prédiction du sexe des plantes du fait de l'influence des facteurs d'environnementaux suscite également l'exploration d'autres méthodes de prédiction précoce du sexe (Fu et al., 2020). En effet, il existe d'autres méthodes d'identification du sexe des plantes basées sur les différences physiologiques et biochimiques avec elles aussi leurs limitations. Elles détectent généralement l'activité de certaines enzymes, les métabolites secondaires et les niveaux d'hormones endogènes dans les plantes (Fu et al., 2020). Par exemple, Jaiswal et al. (1984) après avoir étudié les activités phosphatase acide et alcaline des tissus asexués et reproducteurs du papayer (*Carica papaya*) ont constaté que l'activité enzymatique des mâles était supérieure à celle des femelles. Ces méthodes présentent toutefois des complexités qui limitent leur usage à toutes les espèces végétales (Obbard et al., 2006; Sharma et al., 2010). Une nouvelle technique d'identification électrochimique du sexe basée sur l'association de feuilles de graphène fonctionnalisées à la polydopamine a fait ses preuves chez les plantes d'ignames *D. zingiberensis* et *D. bulbifera* (Fu et al., 2020). D'autres méthodes basées sur des critères agro-morphologiques (couleur de la tige et des feuilles,

présence ou absence de cire et de tâches sur les tiges, la forme des feuilles…) et cytologique (niveau de ploïdie) ont été utilisées chez *D. rotundata* (Agre et al., 2020; Girma et al., 2014; Girma et al., 2019). Chez les igames cultivés *D. rotundata* du Bénin, nous avons constaté que toutes les plantes de niveau de ploïdie supérieur à 2 fleurissent toujours mâle. Les mêmes observations ont été faites par Girma et al. (2014) chez les accessions du Nigéria. Compte tenu des limites présentées par les différentes méthodes, nous pensons qu'une association de plusieurs méthodes permettra d'optimiser l'identification précoce du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*.

Par ailleurs, sur la base de la forte hétérozygotie révélée par le marqueur SP1 chez la majorité des cultivars mâles, nous suggérons un système mâle hétérogamétique chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin contrairement aux observations de Tamiru et al. (2017). Asfaw et al. (2022) ont toutefois confirmé un système ZZ/ZW femelle hétérogamétique chez les accessions nigérianes. Il est important de noter que les résultats de cette étude ne sont pas strictement contraires à ceux de Tamiru et al. (2017) et que les différences observées peuvent résider d'une part dans la taille de la population (relativement petite) et d'autre part dans le fait qu'ils ont testé le marqueur SP1 sur des descendances issues de croisements biparentaux, c'est-à-dire des individus génétiquement très proches, contrairement aux populations d'ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin très diversifiées. En revanche, des études récentes menées chez *D. alata* ont montré un système de détermination du sexe hétérogamétique mâle (XX/XY) (Cormier et al., 2019; Mondo et al., 2021), ce qui est conforme à la majorité des espèces de *Dioscorea* (Sugihara et al., 2021). Nous avons particulièrement observé une diversité génotypique (bien que très faible) au niveau du locus W- sur la base du marqueur SP1 (chap. 2). En effet, en dehors des deux génotypes (AA et AB) observés chez les ignames cultivées du Nigéria (Tamiru et al., 2017) le marqueur SP1 a révélé des génotypes intermédiaires (BB et AC). Cette diversité pourrait être le résultat d'une potentielle recombinaison de la région sexe-spécifique (SDR). Il a été démontré que les ignames cultivées *D. rotundata* ont connu un processus de domestication basée essentiellement sur l'hybridation (Chair et al., 2010; Dumont et Vernier, 2000; Mignouna et Dansi, 2003; Scarcelli et al., 2006) malgré leur mode de propagation végétative et de ce fait fortement diversifiées (Agbangla et al., 2002; Agre et al., 2021; Scarcelli, 2005). Cet évènement majeur est un argument qui justifie la diversité de génotypes sexuels observés. Des études récentes ont rapporté des preuves non ambiguës de translocation de la SDR chez les

plantes à fleurs (Hobza et al., 2018). Chez les *Fragaria* sub-dioïques (*F. virginiana*) et dioïques (*F. chiloensis*), il a été rapporté que la SDR se retrouve à différentes positions et sur différents chromosomes d'un même groupe homéologue (Tennessen et al., 2018; Wei et al., 2017). Tennessen et al. (2018) ont également précisé que la SDR a changé de localisation génomique à plusieurs reprises chez les *Fagarias*. Faux et al. (2016) ont démontré que le chanvre monoïque porte des chromosomes XX, qui présentent des homologies avec les chromosomes X et Y du chanvre dioïque. **Nous pensons donc qu'il y a une réorganisation du système de détermination du sexe avec une transition du système XY à ZW chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin**. Sugihara et al. (2021) ont également approuvé l'hypothèse d'une réorganisation du système et une transition du système mâle hétérogamétique XX/XY vers un système ZZ/ZW femelle hétérogamétique au sein de la section Enantiophyllum à laquelle appartiennent les espèces *D. rotundata* et *D. alata*. Une transition similaire du système de détermination du sexe a été signalée dans le genre *Populus* (Müller et al., 2020). La plupart des espèces de *Populus* ont le système de détermination du sexe XY, tandis que *P. alba* a un système de détermination du sexe ZW (Müller et al., 2020).

Sur le plan fonctionnel de la détermination du phénotype sexuel, la théorie de Tamiru et al. (2017) était basée sur une détermination unilocus (W-) chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Les auteurs stipulent que l'allèle W (sous influence des conditions environnementales) devrait exercer une dominance complète sur l'allèle Z pour une expression complète du sexe femelle et une dominance partielle pour une expression de la monoécie. En cas d'une dominance nulle, on observerait une floraison mâle ou l'absence de floraison. Il y a donc une expression différentielle du locus W-environnement-dépendant (Tamiru et al., 2017). Ce schéma fonctionnel correspond mieux au comportement sexuel des populations sub-dioïques d'ignames *D. rotundata* caractérisées par une forte fréquence de changements de sexe d'une année à l'autre ou d'un endroit à l'autre (chap. 1 et 2). Agre et al. (2020) ont d'ailleurs associé les changements de sexe observés chez des monoïques *D. rotundata* du Nigéria à une expression différentielle de l'allèle W. En revanche, les populations strictement dioïques sont caractérisées par une expression sexuelle plus stable (chap. 1, 2 et 3), un comportement sexuel qui cadre beaucoup moins avec un schéma fonctionnel du système ZW environnement-dépendant tel que décrit par Tamiru et al. (2017). Ainsi on a pu constater que le marqueur sp16 (et donc l'allèle W)

était présent chez les plantes mâles, femelles et monoïques des cultivars Katala, Laboko et Agatou qui ont montré le plus de variabilité du sexe dans notre étude tandis que les cultivars mâles stables (Flou et Alakissa) ne présentaient pas cet allèle (chap. 2,3 et 4). Cette tendance est globalement vérifiée chez la plupart des cultivars de la collection nationale du Bénin lorsqu'on fait un parallélisme entre la présence de l'allèle W et la stabilité du sexe (chap. 1). Nous pensons donc que la réorganisation du système chez *D. rotundata* aurait probablement créer une différence de système de détermination sexuelle entre les populations dioïques et sub-dioïques. Les populations strictement dioïques seraient plus enclines à un système de détermination mâle hétérogamétique (XX/XY) avec une expression sexuelle plus stable (Chap. 1 et 2) par rapport aux populations sub-dioïques qui seraient plutôt plus proches du système ZZ/ZW hétérogamétique femelle avec une expression sexuelle beaucoup plus instable. Le contrôle du sexe à double système chromosomique a été rapporté chez certaines espèces dont *Rumex hestatulus*. Chez cette espèce, le mécanisme de détermination du sexe est intermédiaire entre un système de chromosome Y actif et un système de rapport X : A où les deux mécanismes ont joué un rôle dans la détermination du sexe (Bartkowiak, 1971; Smith, 1963). Alors que les sexes mâles et femelles peuvent être déterminés par un système basé sur le rapport X : A, la détermination de fleurs bisexuées nécessite un mixage de système Y actif et de rapports X : A. (Parker et Clark, 1991; Smith, 1963).

Par ailleurs, nous avons observé au cours de cette étude que les fleurs d'ignames *D. rotundata* avaient des primordia d'organes mâles et femelles au début de la morphogenèse florale chez tous les cultivars et que des restes d'organes de sexes opposés étaient présents chez des fleurs matures de cultivars sub-dioïques avec parfois la possibilité de développement complet des deux sexes notamment chez les plantes monoïques (chap. 1). Chez les espèces dioïques de *Pistacia*, l'initiation d'organes de sexes opposés a été observée et l'émergence de plantes monoïques et de fleurs bisexuées (Bai et al., 2016) a amené Bai et al. (2019) à supposer que ces espèces auraient évolué à partir d'ancêtres hermaphrodites et qu'elles ont le potentiel de devenir monoïques, voire hermaphrodites, si l'avortement des organes sexuels opposés peut être arrêté. Sur la base de leurs observations les auteurs ont également supposé que le contrôle du sexe dans un système pareil devrait avoir une base génétique de fleurs hermaphrodites. La production de fleurs unisexuées dépendrait du potentiel d'avortement des organes sexuels opposés. Par comparaison aux *Pistacia*, les ignames cultivées *D. rotundata*

en plus d'initier des primordia de sexes opposés comportent également des plantes monoïques qui portent parfois des fleurs bisexuées (Abraham et Nair, 1979; Bai et Ekanayake, 1998; Sadik et Okereke, 1975) comme l'on rencontre chez le manioc monoïque (Pineda et al., 2020). Nous pensons que le comportement sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* correspond à un modèle d'évolution partant d'ancêtre hermaphrodite et devrait également avoir une base génétique de fleurs bisexuées. L'asymétrie entre les dioïques stricts et sub-dioïques dans la suppression des organes de sexes opposés évoquée par Hobza et al. (2018) pouvait être liée à une éventuelle différence de système de détermination chez les igames cultivées *D. rotundata*. Plusieurs travaux ont théorisé différentes voies d'évolution de la dioécie. Certaines sont en faveur d'une évolution via la voie de la monoécie (Käfer et al., 2017). D'autres par contre, ont montré que la dioécie a évolué à partir d'un ancêtre hermaphrodite qui aurait subi des mutations doubles dont l'une aurait provoqué la stérilité mâle et l'autre la stérilité femelle (Carey et al., 2021; Charlesworth et Charlesworth, 1978; Westergaard, 1958). La présence de fleurs bisexuées chez les ignames cultivées *D. rotundata* est un argument en faveur d'une évolution au départ d'un ancêtre hermaphrodite. De ce fait, même si le locus W s'est avéré impliqué dans la détermination du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*, nous pensons qu'il ne devrait pas être le seul. Des études ont récemment proposé des modèles de détermination unilocus chez des espèces dioïques telles que *Diospyros kaki* (Akagi et al., 2014) et le *Populus alba* (Müller et al., 2020). Mais un autre modèle émergent soutenant plutôt l'implication de deux gènes pour la dioécie a été également démontré chez *Asparagus officinalis* et *Actinidia chinensis* (Akagi et al., 2019; Harkess et al., 2020) et explique mieux l'expression des gènes dans la différentiation sexuelle. Chez les ignames cultivées *D. rotundata*, plusieurs études récentes ont également été en faveur d'un déterminisme du sexe multilocus (Mondo 2021, sugihara 2021). Une étude basée sur le profilage transcriptomique SuperSAGE d'individus mâles, femelles et monoïques a révélé 88 gènes exprimés différentiellement entre les trois phénotypes sexuels (mâle, femelle et monoïque) et 18 d'entre eux correspondaient à des gènes précédemment impliqués dans le développement des fleurs et la détermination du sexe chez plusieurs espèces végétales. En plus cinq gènes considérés comme directement liés à l'expression sexuelle ou à la régulation de l'équilibre des hormones influençant directement l'orientation sexuelle ont été identifiés chez *D. rotundata* (Asfaw et al., 2022) suggérant que la détermination du sexe chez les ignames

cultivées *D. rotundata* serait certes contrôlée génétiquement mais impliquerait également des facteurs hormonaux.

3- Quel est le contrôle hormonal du déterminisme sexuel des ignames cultivées *D. rotundata* ?

Les ignames cultivées *D. rotundata* se propagent végétativement mais fleurissent également à la fin du cycle cultural. Nous avons montré que les descendants issus de tubercule-semences présentent des variations de sexe (Chap. 1, 2 et 3). Mais les variations observées ne dépendaient pas de la portion de tubercule (tête, milieu ou base) utilisée comme semence mais plutôt du sexe du parent donneur du tubercule-semence (chap. 3). En effet, les cultivars sub-dioïques notamment les plantes monoïques présentent des variations importantes de sexe dans leur descendance. Afin d'identifier un lien possible entre le contenu hormonal du tubercule mère et la variation du sexe, le profil hormonal des régions de la tête, du milieu et de la base a été comparé dans les tubercules de plantes mâles, femelles et monoïques. L'acide jasmonique et l'acide salicylique étaient plus concentrés dans les tubercules des plantes mâles et monoïques, tandis que l'acide abscissique, les cytokinines et les acides benzoïques étaient plus concentrés dans les tubercules des plantes femelles (chap. 3). Cette différence de concentration des hormones répartie suivant le sexe est un argument en faveur de l'idée selon laquelle les différences d'état physiologique dont les teneurs en hormone des plantes peuvent être un outil de prédiction du sexe (Fu et al., 2020). Nous nous sommes donc posés la question de savoir si certaines de ces hormones pourraient avoir un effet masculinisant tandis que d'autres pourraient avoir un effet féminisant chez *D. rotundata*. Des applications exogènes d'hormones ont en effet permis de favoriser le développement de fleurs mâles ou femelles chez des espèces monoïques et dioïques (Khadka et al., 2019; Wang et al., 2021) ou d'inverser le sexe de certains mutants mâles ou femelles chez des plantes hermaphrodites (Kaur et al., 2021). Le fait de pouvoir modifier le sexe des fleurs par un traitement hormonal pourrait en effet s'avérer intéressant en amélioration végétale, particulièrement chez les plantes monoïques et dioïques.

Nos résultats ont confirmé le rôle des hormones dans l'identité du sexe chez *D. rotundata*. **Les applications exogènes de jasmonates (méthyle jasmonate, MeJa) et de cytokinines (6-benzylaminopurine, BAP) ont révélé un effet masculinisant de la MeJa chez les cultivars sub-dioïques de *D. rotundata*, notamment les plantes monoïques (chap. 4).** La

masculinisation des femelles strictement dioïques s'est soldée par une suppression de l'ovaire sans nécessairement favoriser un développement d'anthères. La BAP semble également avoir un effet féminisant des plantes mais la conclusion à ce sujet n'était pas évidente (chap. 4). Les hormones influencent et modifient l'expression du sexe de manière variable selon les espèces végétales (Pannell, 2017; West et Golenberg, 2018). Il a été rapporté que les cytokinines ont une action féminisante chez des espèces dioïques comme *Mercurialis annua, Asparagus officinalis* (Heikrujam et al., 2015). L'auxine a un effet féminisant chez *Cannabis sativus*, *Cucumis melon* mais elle est plutôt masculinisant chez *Mercurialis annua* et *Cleome spinosa* (Orozco-Arroyo et al., 2012). L'acide gibbérellique a un effet masculinisant chez *Asparagus officinalis* et *Cannabis sativus* mais a un effet féminisant chez *Hyoscyamus niger,* et *Zea mays* (Heikrujam et al., 2015).

La capacité d'inversion du sexe par application d'hormones chez les plantes dioïques soulève l'hypothèse que les gènes nécessaires à l'expression des deux sexes sont potentiellement fonctionnels mais sont également régulés par des moyens non génétiques (Khadka et al., 2019). Nous avons observé, que les primordia des organes floraux de sexes opposés sont initiés chez toutes les fleurs de *D. rotundata*, quel que soit le sexe de la fleur (chap. 1), ce qui suggère que les gènes impliqués dans l'identité précoce des organes floraux doivent être actifs lors de la formation de la fleur même si leur expression est arrêtée par la suite. L'application exogène d'hormones peut affecter l'expression des gènes d'identité des organes floraux (Bao et al., 2020 ; Marciniak et Przedniczek, 2019 ; Lee et al., 2019 ; Liu et al., 2021 ; Quinet et al., 2014). Il est donc important que les traitements hormonaux visant à modifier le sexe des fleurs soient effectués au plus tard au début de la morphogenèse florale, ce qui chez les ignames *D. rotundata* du Bénin correspondrait en moyenne à 63 jours après germination (chap. 1). Par ailleurs, étant donné le rôle et l'activation des hormones végétales en réponse aux stress environnementaux, les observations de l'effet des stress environnementaux et des hormones sur le développement et la labilité sexuelle ne peuvent être indépendantes (Gerashchenkov et Rozhnova, 2013). Si nous nous sommes intéressés à l'effet de quelques hormones sur l'identité du sexe chez *D. rotundata* dans le cadre de cette thèse, le contrôle environnemental reste à clarifier.

L'effet masculinisant du MeJA que nous avons mis en évidence chez *D. rotundata* (chap. 4) est cohérent par rapport au rôle décrit pour l'acide

jasmonique (JA) et ses métabolites dans le développement des fleurs. En effet, ces composés interviennent notamment dans la maturation des étamines et du pollen (Ishiguro et al., 2001; Stintzi et Browse, 2000). En outre, le gène d'identité des organes floraux *AG* contrôle le développement tardif des étamines via la biosynthèse du JA en régulant directement le gène *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* (*DAD1*), qui code pour l'enzyme de biosynthèse du JA (Ito et al., 2007). Il a été démontré que, chez le riz, de nombreux gènes régulés par le JA étaient impliqués dans le développement des anthères (Wang et al., 2005).

Bien que nous n'ayons pas pu confirmer le rôle féminisant de la BAP chez *D. rotundata* (chap. 4), l'implication des cytokinines dans le développement des organes femelles a été décrite chez plusieurs espèces. Sachant que les cytokinines sont directement impliquées dans le développement du carpelle et du gamétophyte femelle (Wybouw et De Rybel, 2019), il a été démontré qu'une partie des gènes à expression sexe-biaisée et/ou de détermination du sexe jouent également un rôle dans la voie des cytokinines chez plusieurs espèces dont le peuplier, le saule, le palmier dattier et le kiwi (Akagi et al., 2019; Müller et al., 2020; Torres et al., 2018). A partir des approches transcriptomiques, des travaux récents ont établi des relations directes entre les réversions de sexe par application exogène d'hormones et les interactions hormones-gènes de différenciation sexuelle. Par exemple, chez l'espèce dioïque *Mercurialis annua*, la féminisation des plantes mâles induite par les cytokinines a été associée à une régulation négative des gènes spécifiques aux mâles en même temps qu'à une régulation positive des gènes spécifiques aux femelles (Khadka et al., 2019). Les auteurs n'ont toutefois trouvé aucune corrélation entre l'expression des gènes de classe B et D et les changements de méthylation de l'ADN ou de conformation de la chromatine de ces gènes (Khadka et al., 2019). Ils ont abouti à un modèle dans lequel les fortes concentrations de cytokinines activent les gènes d'identité de sexe femelle (gènes de classe CDE) alors que les fortes concentrations de l'auxine activent plutôt les gènes d'identité de sexe mâle (classe BCE). Chez les ignames cultivées *D. rotundata*, des gènes potentiellement impliqués dans l'expression du sexe ont été identifiés comme associés à la régulation de l'équilibre hormonale (Asfaw et al., 2022). Les changements de sexe que nous avons observés chez les ignames après des traitements hormonaux pourraient donc être liés à une interaction entre les hormones et les gènes de détermination sexuelle.

Notre étude a également révélé que les plantes strictement dioïques ont une très faible plasticité sexuelle par rapport aux plantes sub-dioïques à la suite des traitements hormonaux (chap. 4). En parallèle avec les données histologiques (chap. 1), on dira que les plantes *D. rotundata* strictement dioïques qui procèdent à une suppression précoce et complète des primordia de sexes opposés sont moins sensibles aux phytohormones. Ruddat et al. (1991) ont rapporté un scénario pareil chez l'espèce dioïque *Silene latifolia*. Chez les femelles *S. latifolia*, l'arrêt des étamines chez les femelles de *S. latifolia* est stable et insensible à l'application exogène de phytohormones (Hobza et al., 2018; Ruddat et al., 1991). D'autres travaux ont aussi approuvé l'insensibilité de l'espèce *S. latifolia* aux apports exogènes d'hormones (Grant et al., 1994; Law et al., 2002). Il est fort probable que la différence de statut génétique entre les cultivars dioïques et sub-dioïques *D. rotunata* soit également responsable de la différence de réponse aux hormones observée entre cultivars dioïques et sub-dioïques.

En plus d'affecter le sexe des plantes, nous avons montré que le **MeJA et la BAP favorisaient la floraison chez *D. rotundata* en réduisant le temps de floraison et en augmentant le nombre d'inflorescences (chap. 4)**. Par ailleurs, les applications d'hormones affectaient également la croissance végétative des plantes (Annexe). Par exemple, l'auxine IAA a augmenté la taille et le poids des tubercules. A l'opposé la cytokinine BAP a montré plutôt un effet inhibiteur sur la croissance aérienne et le développement des tubercules (taille et poids).

Notre étude a apporté la preuve d'un contrôle hormonal du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* et que les hormones pouvaient également favoriser la floraison et la production d'inflorescences. Mais la fertilité des fleurs (principalement des plantes dioïques) reste une question fondamentale à résoudre afin de les comptabiliser comme ressource génétique exploitable pour l'amélioration de l'espèce. Il est possible que les réversions du sexe par application d'hormones aboutissent à la production d'organes reproducteurs stériles (Hobza et al., 2018). Chez les monoïques *D. rotundata* aucun signe particulier de malformation de fleurs n'a été observé (chap. 4) et suggère que les plantes monoïques peuvent être valorisées pour leur contribution à l'amélioration de l'espèce. La possibilité de pouvoir modifier le sexe par l'usage des phytohormones permettra également de palier au déséquilibre du sex-ratio chez les ignames cultivées *D. rotundata* (chap. 1). Il existe en effet une plus grande proportion de plantes mâles que de plantes femelles chez les ignames cultivées *D. rotundata* et favoriser le développement de fleurs

femelles chez les plantes monoïques pourrait augmenter la proportion de parents femelles pour les croisements en amélioration végétale. Il serait donc crucial de pouvoir confirmer l'effet féminisant des cytokinines suggérée par notre étude.

4- Quelle est la performance de la reproduction sexuée chez les ignames cultivées *D. rotundata* et sa contribution à l'amélioration génétique de l'espèce ?

La maîtrise de la reproduction sexuée est un élément clé dans l'amélioration des plantes basée sur les méthodes conventionnelles. Les ignames cultivées *D. rotundata* sont essentiellement dioïques mais certains cultivars montrent des floraisons monoïques. Au cours de cette thèse nous avons cherché à comprendre la performance de la reproduction, surtout comment les plantes monoïques pouvaient être utilisées pour contribuer à l'amélioration de l'espèce. La dioécie oblige naturellement les plantes d'igname à l'allogamie stricte alors que leurs pollens sont très collants et la pollinisation ne pouvait être assurée que par des insectes (Hamadina et al., 2009; Mondo et al., 2020). En comparant les viabilités polliniques entre plantes monoïques et dioïques, notre étude a révélé que la viabilité pollinique est globalement faible comme l'ont mentionné d'autres études chez les ignames cultivées *D. rotundata* (Darkwa et al., 2020b; Mondo et al., 2020) et *D. alata* (Lebot et al., 2019) mais les pollens des deux types sexuels sont aussi viables les uns que les autres (chap. 5). Akoroda (1985) avait toutefois observé une viabilité pollinique particulièrement plus faible chez les individus monoïques comparativement aux plantes dioïques. Nous avons également montré que la réceptivité des stigmates ne diffère pas entre plantes monoïques et dioïques d'ignames *D. rotundata* mais était globalement faible (chap. 5) telle que mentionné par Mondo et al. (2020) chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Nigéria. **Les fleurs de plantes monoïques sont aussi fertiles que les fleurs de plantes dioïques chez *D. rotundata* du Bénin**. Les tests de pollinisation croisée réalisés au cours de cette étude ont montré que le succès reproducteur des plantes monoïques était généralement faible (18% de mise à fruit et 11% de mise à graine). Des études récentes ont également rapporté un faible succès reproducteur chez les ignames cultivées *D. rotundata* (20,3% de mise à fruit et 10,5% de mise à graine) et *D. alata* (28% de mise à fruit et 9% de mise graine) (Asfaw et al., 2022; Mondo et al., 2020; Mondo et al., 2022a; Mondo et al., 2022b) bien que la plupart d'entre elles concernaient des cultivars dioïques. Ce faible succès reproducteur suite à une

pollinisation croisée ne serait donc pas lié au caractère monoïque des plantes et serait similaire chez les plantes dioïques. Alors, dans un contexte de la rareté de la floraison femelle (chap. 1) les plantes monoïques peuvent servir de parents femelles dans les programmes de sélection pour ceux qui présentent des intérêts agronomiques recherchés. L'efficacité de la reproduction sexuée chez les ignames cultivées *D. rotundata* est limitée par beaucoup de facteurs propres à la plante elle-même et à d'autres facteurs abiotiques. Une plantation échelonnée, un tuteurage approprié, une gestion de l'humidité et de la fertilité du sol pour une bonne vigueur des plantes, une fenêtre de floraison abondante et longue sont nécessaires à une production élevée de graines dans un bloc de croisement (Mondo et al., 2020). La faible viabilité pollinique, la faible réceptivité stigmatique, la polyploïdie ainsi que les conditions et outils de croisement font également partie des principales causes des faibles productions de fruits et de graines (Darkwa et al., 2020b; Mondo et al., 2020). Les fleurs mâles d'ignames cultivées ont généralement un temps de viabilité très courtes (4 à 5 h). Leur ouverture varie en fonction des moments de la journée, de l'endroit, de la température et de l'humidité relative de l'air (Abraham et Gopinathan Nair, 1990). De ce fait, les moments de récolte de pollens sont déterminants pour optimiser la production de fruits et de graines (Mondo et al., 2020). Les croisements entre cultivars de différents niveaux de ploïdie se sont souvent soldés par un échec (Arnau et al., 2010; Mondo et al., 2022a). Cela constitue une limite majeure pour les flux de gènes au sein et entre les espèces d'ignames cultivées et sauvages (Arnau et al., 2010). Même si les cultivars *D. rotundata* sont majoritairement diploïdes, il existe des cultivars triploïdes parmi les accessions d'Afrique de l'Ouest et du Bénin en particulier (Daïnou et al., 2002; Dansi et al., 2000; Zoundjihekpon et al., 1990). Lebot et al. (2019) ont signalé des variations dans l'efficacité de la pollinisation, la formation des graines et la survie des plantules dans des croisements impliquant des diploïdes × diploïdes, des diploïdes × tétraploïdes, et le même parent pollinisateur dans différentes combinaisons croisées. Abraham et Gopinathan Nair (1991) ont établi une relation entre le statut de ploïdie et la fertilité sexuelle chez *D. alata* ; les plantes femelles avec 2n = 40 forment des graines viables et les clones mâles avec le même nombre de chromosomes (2n = 2x = 40) étaient très fertiles. Les clones femelles avec 2n = 3x = 60 (triploïdes) sont pour la plupart stériles.

Bien que notre étude a montré un faible succès reproducteur (18% de mise à fruit) suite à la pollinisation manuelle (chap. 5), d'autres études menées au

Bénin ont rapporté des taux de mise à fruit de plus de 70% en situation de pollinisation naturelle assurée par les insectes (Assaba, 2013; Dossou-Yovo, 2013; Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b). C'est la preuve que la méthode de pollinisation peut fortement influencer la compatibilité croisée chez les ignames *D. rotundata*. Des variations importantes peuvent être également observées selon la technique utilisée pour les pollinisations manuelles (Akoroda, 1983). Akoroda (1985) a observé un rapport 14:1 en comparant la technique à brosse à celle de compte-goutte (respectivement 41% et 3% de mise à fruit).

Par ailleurs, la planification des plans de croisement pour un succès élevé de la pollinisation devrait s'appuyer sur l'utilisation des marqueurs de prédiction du type de sexe, de la compatibilité croisée et de l'intensité de la floraison des plantes au stade précoce de la croissance (Agre et al., 2020). Notre étude a montré que les marqueurs de prédiction du sexe actuellement disponibles ne sont pas bien adaptés aux cultivars du Bénin mais une association de plusieurs marqueurs reste une option envisageable. En ce qui concerne la prédiction de la compatibilité croisé, Mondo et al. (2021) ont découvert des marqueurs SNP susceptibles de garantir le choix de parents compatibles dans les plans de croisement chez *D. alata*. Norman et al. (2020) ont démontré le potentiel des marqueurs SNP dans l'identification précise des relations de parenté entre descendants d'ignames cultivées *D. rotundata* issus de croisements polycross mais il n'existe pas encore de marqueurs spécifiques pour le choix de parents compatibles chez *D. rotundata*. La seule alternative que nous proposons est l'utilisation de la technique de germination *in vivo* des grains de pollen sur le stigmate de la plante femelle. En effet, nous avons montré au cours de cette étude (chap. 5) qu'il existe une corrélation positive entre la germination des grains de pollen *in vivo* et la quantité de fruits et de graines formés. Autrement, plus les grains de pollen d'un parent mâle seraient aptes à germer et croître aisément dans le style d'une fleur d'un parent femelle, plus ces parents auront un indice de compatibilité élevé. C'est possiblement l'une des meilleures façons de prédire la compatibilité croisée chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Jusqu'à présent il n'existe aucun rapport sur l'application de méthodes d'amélioration de l'efficacité de la floraison chez l'igname (Mondo et al., 2020). **Mais notre étude a apporté la preuve que l'apport exogène d'hormones (MeJa et BAP) pouvait en même temps accélérer et synchroniser la floraison ainsi qu'augmenter de façon considérable la quantité d'inflorescences et de fleurs produites (chap. 4)**. De pareilles observations ont été faites chez d'autres plantes à tubercules et

racines telles que le manioc, le taro et la pomme de terre (Ceballos et al., 2017; Hyde et al., 2020; Mukherjee et al., 2016; Muthoni et al., 2012; Orozco-Arroyo et al., 2012; Souza et al., 2018). Etant donné la longue période de floraison, la faible intensité et la maturation asynchrone des fleurs qui caractérisent les ignames cultivées *D. rotundata* (Hamadina et al., 2009; Zoundjihèkpon, 1993), les hormones se présentent comme une alternative pour accélérer et intensifier la floraison chez les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin. En dehors de leur effet accélérateur de la floraison, les jasmonates masculinisent les fleurs femelles des plantes monoïques (chap. 5). Cela est d'une importance capitale pour les programmes d'amélioration étant donné qu'il offre une possibilité de créer volontairement des d'individus mâles dans une population de sexes opposés. Par exemple, dans une population de clones femelles, il serait possible d'obtenir en partie des individus mâles (par application des jasmonates) capables de fournir du pollen à leurs homologues femelles, une façon indirecte de procéder à une autogamie qui est naturellement impossibles chez les ignames cultivées *D. rotundata*.

Compte tenu des intérêts que présentent les plantes monoïques, nous avons également évalué leur habileté à la géitonogamie. Il a été constaté que les monoïques sont fortement auto-incompatibles mais pouvaient tolérer l'autogamie à hauteur de 11% avec une labilité pollinique quasi nulle (< 1%). L'autoincompatibilité se manifestait par la mise en place de barrières pré-zygotiques et post-zygotiques. Dans le premier cas, les auto-pollens germaient très peu sur les stigmates et présentaient un arrêt de croissance pollinique précoce. Dans le second cas (barrières post-zygotiques), il s'agissait d'une forte dépression de consanguinité manifestée par la production de fruits et graines mal formés et des faibles taux de germination de graines. A la suite de croisements interspécifiques, Mondo et al. (2022a) ont évoqué la mise en place de barrière pré-zygotiques et post-zygotiques chez les ignames cultivées. Avec un approfondissement des connaissances des mécanismes d'auto-incompatibilité et du contrôle hormonal du sexe, **des éventuels succès d'autogamie chez les cultivars monoïques pourraient être utilisés à des fins d'amélioration génétique**.

Nous avons particulièrement observé chez les ignames cultivées *D. rotundata* que **la compatibilité croisée inter-cultivar est largement supérieure à la compatibilité croisée intra-cultivar**. Cela suggère qu'il existe une diversité inter-cultivars plus élevée par rapport à la diversité intra-cultivar. La compatibilité croisée intra-cultivar est aussi très supérieure à la compatibilité

intra-individu. Plusieurs études ont montré que les ignames cultivées *D. rotundata* ont une grande variabilité génétique (Agre et al., 2021; Bhattacharjee et al., 2020; Darkwa et al., 2020a) y compris à l'intérieur d'un même cultivar (Yolou, 2016). Il est possible que la grande diversité observée chez les ignames cultivées *D. rotundata* soit liée à l'incorporation de tubercules issus de semis spontanés (reproduction non gérée). Il s'agit de tubercules récoltés sur de plantes issues de graines généralement involontairement. Bien que ce phénomène n'est pas assez documenté chez les ignames cultivées, il est toutefois très connu chez d'autres plantes à multiplication végétative telles que le manioc (*manihot esculenta*). Chez cette espèce, des études ont montré que les agriculteurs incorporent les plantes de semis spontanés dans le germoplasme existant pour la propagation végétative, et que nombre d'entre elles sont susceptibles d'être attribuées par les agriculteurs à des variétés reconnues (Elias et al., 2001). Ainsi, l'assignation des plantules à une variété reconnue sur la base de la similarité morphologique augmente considérablement la diversité génétique au sein de la variété (Elias et al., 2001). Les mêmes pratiques ont été observées chez les agriculteurs de l'Oca du Pérou (*Oxalis tuberosa*) (Bonnave et al., 2014). Un phénomène similaire est pratiqué par les producteurs d'ignames cultivées d'Afrique connu sous le nom d'ennoblissement, qui consiste en l'incorporation d'espèces sauvages dans les plantes cultivées (Chaïr et al., 2010; Dumont et Vernier, 2000; Mignouna et Dansi, 2003; Scarcelli et al., 2006). Au Nord du Bénin et au Nigéria, des études ont montré que les paysans prélèvent des tubercules d'ignames sauvages dans les forêts et savanes voisines sur base de critères morphologiques et organoleptiques bien déterminés (plantes à grosse tige, pauvres en épines, au feuillage dense, tubercule gros à chair blanche et de bon goût) qu'ils incorporent à leur stock (Baco, 2000; Dumont, 1998, Tostain et al., 2002, Vernier et al., 2003). Au Nord-Bénin l'espèce la plus concernée est *D. abyssinica* (un ancêtre direct de *D. rotundata*) nommée Dika par les populations locales (sacarcelli, 2005). L'ennoblissement se nomme ''Dika gosiyé'', littéralement "transformation du dika". L'objectif de l'ennoblissement est sans doute de « transformer le dika et obtenir de l'igname cultivée » (Baco, 2000). Les tubercules sauvages sont cultivés en appliquant différentes sortes des stress (au bout de 3 à 6 ans) jusqu'à ce que le producteur estime que leur morphologie est de type cultivé et les incorpore à un cultivar existant ou leur attribue un nom selon la ressemblance ou non à un cultivar qu'il possède. Cette pratique augmenterait la diversité intra-cultivar en introduisant dans les cultivars des individus très différents génétiquement et elle augmenterait globalement la diversité du pool d'igname cultivée

(scarcelli, 2005). Ainsi, l'idée selon laquelle chaque cultivar *D. rotundata* serait composé de clones génétiquement voisins (Tostain et al., 2005) serait révolue. Chez d'autres espèces comme *D. alata*, il a été plutôt rapporté une diversité globalement faible qui serait liée à la forte clonalité et les séries d'auto-plyploïdisations qui ont caractérisé la domestication de l'espèce (Sharif et al., 2020). La terminologie de clone pour désigner les cultivars peut donc avoir plus de sens chez *D. alata* que chez *D. rotundata*. Pour s'assurer de la pureté génétique des individus (clones) de *D. rotundata* dans un programme de recherche qui le nécessite, l'idéal serait de les obtenir par des techniques moins coûteuses comme celle des minissetts (chap. 4). Toutefois la pratique de la technique de minisett dans la production de semences pourrait constituer une grande menace à la diversité génétique des ignames cultivées. Il serait donc intéressant de mettre en place des structures de gestion des semences à vocation de sensibiliser des producteurs d'igname sur les techniques de production de semence sans pour autant causer l'érosion génétique.

Conclusions et perspectives

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que les ignames cultivées *D. rotundata* ont une floraison plus ou moins abondante mais largement dominée par les cultivars mâles ; les femelles sont peu représentées et les monoïques sont rares. L'expression du sexe est également très instable dans les populations de cultivars sub-dioïques notamment chez les plantes monoïques. Les méristèmes floraux initient à la fois les primordia pistillaires et staminaires chez les plantes dioïques et sub-dioïques mais une asymétrie dans la suppression de ces primordia chez les deux types sexuels a été notée. Alors que les dioïques suppriment généralement les organes de sexes opposés, les cultivars sub-dioiques les conservent plutôt à l'état rudimentaire ou développé. Il s'agit là sans doute d'une cause histologique de la variation de l'expression sexuelle observées chez les cultivars sub-dioiques.

Face à la question d'instabilité du sexe au sein des ignames cultivées *D. rotundata*, la capacité de prédiction du phénotype sexuel du marqueur SP16 s'est avérée beaucoup moins efficace sur les accessions du Bénin mais notre étude a montré qu'une association des marqueurs SP16 et SP1 pouvaient être une alternative. Des études supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à la mise au point de nouveaux marqueurs plus précis dans la prédiction du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*. L'aboutissement de ces études

dépendra de leur capacité à tenir compte des différences génétiques éventuelles entre les populations dioïques et sub-dioïques.

Nous avons également montré au cours de cette étude que l'expression du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* fait intervenir un contrôle génétique mais les mécanismes moléculaires du contrôle de la détermination sexuelle ne sont toujours pas éclaircis. Notre étude a aussi suggéré que le système de détermination du sexe serait en transition partagée entre le mâle hétérogamétique XX/XY et la femelle hétérogamétique ZZ/W. Cette éventuelle réorganisation du système serait l'une des causes de l'asymétrie observée dans la suppression des organes de sexes opposés entre dioïques stricts et sub-dioïques. En absence de preuves scientifiquement vérifiées pour l'instant, nous suggérons que d'autres investigations soient menées sur le contrôle génétique du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Ces initiatives devront notamment se concentrer sur les mécanismes de différentiation sexuelle en tenant compte des spécificités propres aux cultivars dioïques et sub-dioïques. Compte tenu de la labilité du sexe qui caractérise notamment les cultivars sub-dioïques, explorer les pistes du contrôle épigénétique du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*, serait également une option envisageable.

Sur le plan physiologique notre étude a permis de constater que les variations du sexe observées chez les igames cultivées *D. rotundata* ne dépendaient pas du type de fragment de tubercule (tête, milieu ou base) utilisé comme semence mais plutôt du sexe des parents donneurs du tubercule-semence. Certains cultivars semblent avoir un gradient de concentration d'hormone le long de leur tubercule mais les teneurs en hormone des tubercules variaient surtout en fonction du sexe des plantes mères. Certaines hormones comme les jasmonates ont montré un effet masculinisant chez les cultivars *D. rotundata* (chez les monoïques notamment). Les jasmonates et les cytokinines ont montré une tendance d'accélération de la floraison et favorisent la synchronisation de la floraison et la production d'une grande quantité d'inflorescences et de fleurs. Cette étude a ainsi apporté la preuve que les hormones contrôlent la détermination du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Toutefois l'application d'hormones ne produit pas toujours de fleurs structurellement bien formées. Il serait important de tester d'autres hormones et plusieurs combinaisons d'hormones afin d'optimiser la production de fleurs viables pour la reproduction sexuée et de voir si d'autres hormones sont potentiellement

masculinisantes ou féminisantes chez cette espèce. Des études devraient être également entreprises dans le sens de la compréhension des mécanismes d'interactions entre voies génétiques et hormonales de la détermination de l'expression sexuelle chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Etant donné que les hormones interagissent également avec les facteurs de l'environnement, il serait nécessaire de déterminer spécialement la contribution de l'impact de l'environnement sur l'expression du sexe chez les ignames *D. rotundata* de façon isolée comme en interaction avec les facteurs hormonaux et génétiques.

Enfin, nos investigations sur l'efficacité de la reproduction sexuée ont montré que les ignames cultivées *D. rotundata* du Bénin présentent globalement une faible compatibilité croisée. Les succès reproducteurs au sein d'un même cultivar se sont également avérés plus faibles par rapport aux performances inter-cultivars. Les plantes monoïques ont montré une performance reproductrice relativement proche des dioïques. Elles ont une très faible tolérance à l'autogamie. Il existe toutefois la possibilité de produire de faibles quantités de fruits et graines par autopollinisation mais de fortes manifestions de la dépression de consanguinité ont été observées. Les plantes ont sans doute développé des mécanismes génétiques (pré-zygotiques et post-zygotiques) pour limiter l'autofécondation. Des études devraient donc être menées pour mieux approfondir les connaissances relatives aux mécanismes génétiques qui sont dirigées contre l'autofécondation chez les plantes monoïques. La sélection de variétés auto-compatibles pourrait être envisagée pour des fins d'amélioration génétique.

Références

Abraham, K. (1997). Flowering deficiencies and sterility preventing natural seed set in *Dioscorea alata* cultivars. *Tropical Agriculture* **74**, 272-276.

Abraham, K., and Gopinathan Nair, P. (1990). Floral biology and artificial pollination in *Dioscorea alata* L. *Euphytica* **48**, 45-51.

Abraham, K., and Gopinathan Nair, P. (1991). Polyploidy and sterility in relation to sex in *Dioscorea alata* L.(Dioscoreaceae). *Genetica* **83**, 93-97.

Abraham, K., and Nair, S. (1979). Anomalies in sex expression of *Dioscorea rotundata* Poir. *Journal of Root Crops* **5**, 19-24.

Agbangla, C., Ahanhanzo, C., Tostain, S., Dansi, A., and Daïnou, O. (2002). Evaluation de la diversité génétique par RAPD d'un échantillon de Discorea *alata* d'un region du Bénin, la Sous-préfecture de Savè. *Journal de la Recherche Scientifique de l'Universite de Lome* **6**, 167-172.

Agre, P., Nwachukwu, C., Olasanmi, B., Obidiegwu, J., Nwachukwu, E., Adebola, P., De Koeyer, D., and Asrat, A. (2020). Sample preservation and plant sex prediction in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Agre, P. A., Dassou, A. G., Loko, L. E., Idossou, R., Dadonougbo, E., Gbaguidi, A., Mondo, J. M., Muyideen, Y., Adebola, P. O., and Asiedu, R. (2021). Diversity of white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivars from Benin as revealed by agro-morphological traits and SNP markers. *Plant Genetic Resources* **19**, 437-446.

Akagi, T., Henry, I. M., Tao, R., and Comai, L. (2014). A Y-chromosome–encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* **346**, 646-650.

Akagi, T., Pilkington, S. M., Varkonyi-Gasic, E., Henry, I. M., Sugano, S. S., Sonoda, M., Firl, A., McNeilage, M. A., Douglas, M. J., Wang, T., Rebstock, R., Voogd, C., Datson, P., Allan, A. C., Beppu, K., Kataoka, I., and Tao, R. (2019). Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nature Plants* **5**, 801-809.

Akoroda, M. (1983). Floral biology in relation to hand pollination of white yam. *Euphytica* **32**, 831-838.

Akoroda, M. (1985). Pollination management for controlled hybridization of white yam. *Scientia horticulturae* **25**, 201-209.

Arnau, G., Abraham, K., Sheela, M., Chair, H., Sartie, A., and Asiedu, R. (2010). Yams. *Root and tuber crops. Handbook of plant breeding* **7**, 127-148.

Asfaw, A., Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., and Akoroda, M. O. (2022). Association mapping of plant sex and cross-compatibility related traits in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) clones. *BMC Plant Biology* **22**, 294.

Assaba, E. I. (2013). Diversité génétique et Biologie de la reproduction des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* et *Dioscorea dumetorum* : cas de la Commune de Dassa. Mémoire de Master, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Aubert, L., Konrádová, D., Barris, S., and Quinet, M. (2021). Different drought resistance mechanisms between two buckwheat species *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tataricum*. *Physiologia Plantarum* **172**, 577-586.

Baco, M. (2000). La domestication des ignames sauvages dans la sous-préfecture de Sinendé: savoirs locaux et pratiques endogènes d'amélioration génétique de *Dioscorea Abyssinica* Hochst, Thèse d'ingénieur, Université Nationale du Bénin, Fac. Sc. Agronomie.

Bai, K., and Ekanayake, I. (1998). Taxonomy, morphology and floral biology. *Food yams: Advances in research*, 13-38.

Bai, Q., Su, S., Lin, Z., Leng, P., and Wang, W. (2016). The variation characteristics and blooming phenophase of monoecious Pistacia chinensis Bunge. *HortScience* **51**, 961-967.

Bai, Q., Zhu, C., Lei, X., Cao, T., Su, S., and Leng, P. (2019). Sex determination during inflorescence bud differentiation in monoecious *Pistacia chinensis* Bunge. *Forests* **10**, 202.

Bartkowiak, E. (1971). Mechanism of sex determination in *Rumex hastatulus* Baldw. *Theoretical and Applied Genetics* **41**, 320-326.

Bhattacharjee, R., Agre, P., Bauchet, G., De Koeyer, D., Lopez-Montes, A., Kumar, P. L., Abberton, M., Adebola, P., Asfaw, A., and Asiedu, R. (2020). Genotyping-by-sequencing to unlock genetic diversity and population structure in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Agronomy* **10**, 1437.

Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R., and Weigel, D. (1998). Gibberellins Promote Flowering of Arabidopsis by Activating the LEAFY Promoter. *The Plant Cell* **10**, 791-800.

Bonnave, M., Bleeckx, G., Rojas Beltrán, J., Maughan, P., Flamand, M.-C., Terrazas, F., and Bertin, P. (2014). Farmers' unconscious incorporation of sexually-produced genotypes into the germplasm of a vegetatively-propagated crop (*Oxalis tuberosa* Mol.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **61**, 721-740.

Borthwick, H. A., and Scully, N. J. (1954). Photoperiodic Responses of Hemp. *Botanical Gazette* **116**, 14-29.

Bürli, S., Pannell, J. R., and Tonnabel, J. (2022). Environmental variation in sex ratios and sexual dimorphism in three wind-pollinated dioecious plant species. *Oikos* **2022**, e08651.

Busch, M. A., Bomblies, K., and Weigel, D. (1999). Activation of a Floral Homeotic Gene in "*Arabidopsis*". *Science* **285**, 585-587.

Carey, S., Yu, Q., and Harkess, A. (2021). The diversity of plant sex chromosomes highlighted through advances in genome sequencing. *Genes* **12**, 381.

Ceballos, H., Jaramillo, J., Salazar, S., Pineda, L. M., Calle, F., and Setter, T. (2017). Induction of flowering in cassava through grafting. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **9**, 19-29.

Chair, H., Cornet, D., Deu, M., Baco, M. N., Agbangla, A., Duval, M.-F., and Noyer, J.-L. (2010). Impact of farmer selection on yam genetic diversity. *Conservation Genetics* **11**, 2255-2265.

Chandler, J. W. (2011). The Hormonal Regulation of Flower Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **30**, 242-254.

Charlesworth, B., and Charlesworth, D. (1978). A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* **112**, 975-997.

Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D. E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N. P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**, 1055-1064.

Cormier, F., Lawac, F., Maledon, E., Gravillon, M.-C., Nudol, E., Mournet, P., Vignes, H., and Arnau, G. (2019). A reference high-density genetic map of greater yam (*Dioscorea alata* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **132**, 1733-1744.

Daïnou, O., Agbangla, C., Berthaud, J., and Tostain, S. (2002). Le nombre chromosomique de base des espèces de *Dioscorea* constituant la section Enantiophyllum pourrait être égal à x= 20. Quelques preuves. *In* "Annales des Sciences Agronomiques du Bénin", Vol. 3, pp. 21-43.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjihekpon, J., Sangare, A., Asiedu, R., and Quin, F. (1999). Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 371-388.

Dansi, A., Pillay, M., Mignouna, H., Daïnou, O., Mondeil, F., and Moutairou, K. (2000). Ploidy level of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata* complex) from Benin Republic as determined by chromosome counting and flow cytometry. *African Crop Science Journal*, **8**, 355-364.

Darkwa, K., Agre, P., Olasanmi, B., Iseki, K., Matsumoto, R., Powell, A., Bauchet, G., De Koeyer, D., Muranaka, S., and Adebola, P. (2020a). Comparative assessment of genetic diversity matrices and clustering methods in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata*) based on morphological and molecular markers. *Scientific reports* **10**, 1-14.

Darkwa, K., Olasanmi, B., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020b). Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp*.) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

De Martinis, D., and Mariani, C. (1999). Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* **11**, 1061-1071.

Delph, L. F. (2019). Water availability drives population divergence and sex-specific responses in a dioecious plant. *American Journal of Botany* **106**, 1346-1355.

Delph, L. F., and Wolf, D. E. (2005). Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist* **166**, 119-128.

Descamps, C., Boubnan, N., Jacquemart, A.-L., and Quinet, M. (2021). Growing and Flowering in a Changing Climate: Effects of Higher Temperatures and Drought Stress on the Bee-Pollinated Species Impatiens glandulifera Royle. *Plants* **10**, 988.

Doku, E. (1985). Sex expression and tuber yields of seedlings and clones derived from seedling tubers of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Legon Agricultural Research Bulletin* **1**, 13-17.

Dossou-Yovo, R. (2013). Possibilités d'amélioration des ignames africaines cultivées *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* par voie sexuée : Cas

de la Commune de Djidja. Mémoire de Master Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Dumont, R., and Vernier, P. (2000). Domestication of yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) within the Bariba ethnic group in Benin. *Outlook on Agriculture* **29**, 137-142.

Dumont, R. (1998). Domestication des ignames en Afrique. *In* "L'igname, plante séculaire et culture d'avenir" (Berthaud J., Bricas, N. Marchand, J.L. ed.), pp. 119_125. CIRAD.

Elias, M., Penet, L., Vindry, P., McKey, D., Panaud, O., and Robert, T. (2001). Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. *Molecular Ecology* **10**, 1895-1907.

Faux, A.-M., Draye, X., Flamand, M.-C., Occre, A., and Bertin, P. (2016). Identification of QTLs for sex expression in dioecious and monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica* **209**, 357-376.

Fu, L., Wang, Q., Zhang, M., Zheng, Y., Wu, M., Lan, Z., Pu, J., Zhang, H., Chen, F., and Su, W. (2020). Electrochemical sex determination of dioecious plants using polydopamine-functionalized graphene sheets. *Frontiers in Chemistry* **8**, 92.

Gerashchenkov, G., and Rozhnova, N. (2013). The involvement of phytohormones in the plant sex regulation. *Russian journal of plant physiology* **60**, 597-610.

Girma, G., Hyma, K. E., Asiedu, R., Mitchell, S. E., Gedil, M., and Spillane, C. (2014). Next-generation sequencing based genotyping, cytometry and phenotyping for understanding diversity and evolution of guinea yams. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1783-1794.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Siroky, J., Pan, W. H., Macas, J., and Saedler, H. (1994). Genetics of sex determination in flowering plants. *Developmental Genetics* **15**, 214-230.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Harkess, A., Huang, K., van der Hulst, R., Tissen, B., Caplan, J. L., Koppula, A., Batish, M., Meyers, B. C., and Leebens-Mack, J. (2020). Sex Determination by Two Y-Linked Genes in Garden Asparagus[OPEN]. *The Plant Cell* **32**, 1790-1796.

Heikrujam, M., Sharma, K., Prasad, M., and Agrawal, V. (2015). Review on different mechanisms of sex determination and sex-linked molecular markers in dioecious crops: a current update. *Euphytica* **201**, 161-194.

Hobza, R., Hudzieczek, V., Kubat, Z., Cegan, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E., and Janousek, B. (2018). Sex and the flower - developmental aspects of sex chromosome evolution. *Ann Bot* **122**, 1085-1101.

Hyde, P. T., Guan, X., Abreu, V., and Setter, T. L. (2020). The anti-ethylene growth regulator silver thiosulfate (STS) increases flower production and longevity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant growth regulation* **90**, 441-453.

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 2191-2209.

Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H., and Meyerowitz, E. M. (2007). The Homeotic Protein AGAMOUS Controls Late Stamen Development by Regulating a Jasmonate Biosynthetic Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 3516-3529.

Jaiswal, V., Narayan, P., and Lal, M. (1984). Activities of acid and alkaline phosphatases in relation to sex differentiation in *Carica papaya* L. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **179**, 799-801.

Käfer, J., Marais, G. A., and Pannell, J. R. (2017). On the rarity of dioecy in flowering plants. *Molecular Ecology* **26**, 1225-1241.

Kaur, A., Maness, N., Ferguson, L., Deng, W., and Zhang, L. (2021). Role of plant hormones in flowering and exogenous hormone application in fruit/nut trees: a review of pecans. *Fruit Research* **1**, 1-9.

Khadka, J., Yadav, N. S., Guy, M., Grafi, G., and Golan-Goldhirsh, A. (2019). Epigenetic aspects of floral homeotic genes in relation to sexual dimorphism in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Journal of experimental botany* **70**, 6245-6259.

Lamb, R. S., Hill, T. A., Tan, Q. K.-G., and Irish, V. F. (2002). Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* **129**, 2079-2086.

Latrasse, D., Rodriguez-Granados, N. Y., Veluchamy, A., Mariappan, K. G., Bevilacqua, C., Crapart, N., Camps, C., Sommard, V., Raynaud, C., and Dogimont, C. (2017). The quest for epigenetic regulation underlying unisexual flower development in *Cucumis melo*. *Epigenetics & Chromatin* **10**, 1-17.

Law, T. F., Lebel-Hardenack, S., and Grant, S. R. (2002). Silver enhances stamen development in female white campion (*Silene latifolia* [Caryophyllaceae]). *American Journal of Botany* **89**, 1014-1020.

Lebot, V., Abraham, K., Kaoh, J., Rogers, C., and Molisalé, T. (2019). Development of anthracnose resistant hybrids of the Greater Yam (*Dioscorea alata* L.) and interspecific hybrids with *D. nummularia* Lam. *Genetic Resources and Crop Evolution* **66**, 871-883.

Lee, Z. H., Hirakawa, T., Yamaguchi, N., and Ito, T. (2019). The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. *International journal of molecular sciences* **20**, 4065.

Lin, H., Liao, Z., Zhang, L., and Yu, Q. (2016). Transcriptome analysis of the male-to-hermaphrodite sex reversal induced by low temperature in papaya. *Tree Genetics & Genomes* **12**, 94.

Liu, J., Chen, L.-Y., Zhou, P., Liao, Z., Lin, H., Yu, Q., and Ming, R. (2021). Sex biased expression of hormone related genes at early stage of sex differentiation in papaya flowers. *Horticulture research* **8**.

Llop-Tous, I., Barry, C. S., and Grierson, D. (2000). Regulation of Ethylene Biosynthesis in Response to Pollination in Tomato Flowers1. *Plant Physiology* **123**, 971-978.

Marciniak, K., and Przedniczek, K. (2019). Comprehensive insight into gibberellin-and jasmonate-mediated stamen development. *Genes* **10**, 811.

Mesgaran, M. B., Matzrafi, M., and Ohadi, S. (2021). Sex dimorphism in dioecious Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in response to water stress. *Planta* **254**, 17.

Miège, J. 1957. Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* **4**, 315-342.

Mignouna, H. D., and Dansi, A. (2003). Yam (*Dioscorea* ssp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution* **50**, 519-528.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2021). Genome-Wide Association Studies for Sex Determination and Cross-Compatibility in Water Yam (*Dioscorea alata* L.). *Plants* **10**, 1412.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022a). Cross compatibility in intraspecific and interspecific hybridization in yam (*Dioscorea spp*.). *Scientific reports* **12**, 1-13.

Mondo, J. M., Paterne, A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2022b). Optimum time for hand pollination in yam (*Dioscorea spp*.). *bioRxiv*.

Mukherjee, A., George, J., Pillai, R., Chakrabarti, S. K., Naskar, S. K., Patro, R., Nayak, S., and Lebot, V. (2016). Development of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) hybrids overcoming its asynchrony in flowering using cryostored pollen. *Euphytica* **212**, 29-36.

Müller, N. A., Kersten, B., Leite Montalvão, A. P., Mähler, N., Bernhardsson, C., Bräutigam, K., Carracedo Lorenzo, Z., Hoenicka, H., Kumar, V., Mader, M., Pakull, B., Robinson, K. M., Sabatti, M., Vettori, C., Ingvarsson, P. K., Cronk, Q., Street, N. R., and Fladung, M. (2020). A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nature Plants* **6**, 630-637.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R., and Kabira, J. (2012). Reproductive biology and early generation's selection in conventional potato breeding. *Australian Journal of Crop Science* **6**, 488-497.

Norman, P. E., Paterne, A. A., Danquah, A., Tongoona, P. B., Danquah, E. Y., De Koeyer, D., Ikeogu, U. N., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020). Paternity assignment in white guinea yam (*Dioscorea rotundata*) half-sib progenies from polycross mating design using SNP markers. *Plants* **9**, 527.

Obbard, D. J., Harris, S. A., and Pannell, J. R. (2006). Sexual systems and population genetic structure in an annual plant: testing the metapopulation model. *The American Naturalist* **167**, 354-366.

Orozco-Arroyo, G., Vázquez-Santana, S., Camacho, A., Dubrovsky, J. G., and Cruz-García, F. (2012). Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta* **236**, 225-238.

Pannell, J. R. (2017). Plant sex determination. *Current Biology* **27**, R191-R197.

Parker, J., and Clark, M. (1991). Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science* **80**, 79-92.

Pineda, M., Morante, N., Salazar, S., Cuásquer, J., Hyde, P. T., Setter, T. L., and Ceballos, H. (2020). Induction of earlier flowering in cassava through extended photoperiod. *Agronomy* **10**, 1273.

Ruddat, M., Kokontis, J., Birch, L., Garber, E., Chiang, K., Campanella, J., and Dai, H. (1991). Interactions of *Microbotryum violaceum* (*Ustilago violacea*) with its host plant Silene alba. *Plant Science* **80**, 157-165.

Sadik, S., and Okereke, O. (1975). Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam, *Dioscorea rotundata* Poir. *Annals of Botany* **39**, 597-604.

Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A. B., and Meyerowitz, E. M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 5812-5817.

Scarcelli, N. (2005). Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative: le cas des ignames au Bénin (*Dioscorea* sp.). thèse de doctorat, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc.

Scarcelli, N., Tostain, S., Mariac, C., Agbangla, C., Da, O., Berthaud, J., and Pham, J.-L. (2006). Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**, 121-130.

Segnou, Fatokun, C. A., Akoroda, M. O., and Hahn, S. K. (1992). Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica* **64**, 197-203.

Sharif, B. M., Burgarella, C., Cormier, F., Mournet, P., Causse, S., Van, K. N., Kaoh, J., Rajaonah, M. T., Lakshan, S. R., Waki, J., Bhattacharjee, R., Badara, G., Pachakkil, B., Arnau, G., and Chaïr, H. (2020). Genome-wide genotyping elucidates the geographical diversification and dispersal of the polyploid and clonally

propagated yam (*Dioscorea alata*). *Annals of Botany* **126**, 1029-1038.

Sharma, A., Zinta, G., Rana, S., and Shirko, P. (2010). Molecular identification of sex in Hippophae rhamnoides L. using isozyme and RAPD markers. *Forestry Studies in China* **12**, 62-66.

Smith, B. W. (1963). The mechanism of sex determination in *Rumex hastatulus*. *Genetics* **48**, 1265.

Souza, L. S., Diniz, R. P., de Jesus Neves, R., Alves, A. A. C., and de Oliveira, E. J. (2018). Grafting as a strategy to increase flowering of cassava. *Scientia horticulturae* **240**, 544-551.

Stintzi, A., and Browse, J. (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10625-10630.

Sugihara, Y., Kudoh, A., Oli, M. T., Takagi, H., Natsume, S., Shimizu, M., Abe, A., Asiedu, R., Asfaw, A., Adebola, P., and Terauchi, R. (2021). Population Genomics of Yams: Evolution and Domestication of *Dioscorea* Species. pp. 1-28. Springer International Publishing, Cham.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tennessen, J. A., Wei, N., Straub, S. C., Govindarajulu, R., Liston, A., and Ashman, T.-L. (2018). Repeated translocation of a gene cassette drives sex-chromosome turnover in strawberries. *PLoS biology* **16**, e2006062.

Torres, M. F., Mathew, L. S., Ahmed, I., Al-Azwani, I. K., Krueger, R., Rivera-Nuñez, D., Mohamoud, Y. A., Clark, A. G., Suhre, K., and Malek, J. A. (2018). Genus-wide sequencing supports a two-locus model for sex-determination in Phoenix. *Nature Communications* **9**, 3969.

Tostain, S., Scarcelli, N., Noyer, J.-L., Agbangla, C., Marchand, J.-L., and Pham, J. L. (2005). Diversité, origine et dynamique évolutive des ignames cultivées *Dioscorea rotundata* Poir. au Bénin. BRG.

Tostain, S., Okry, F., Baco, N., Mongbo, R., Agbangla, C., and Daïnou, O. (2002). La «domestication» des ignames Dioscorea abyssinica dans

les sous-préfectures de Sinende et de Bantè au Benin (Afrique de l'Ouest). Annales des Sciences Agronomiques 4, 33-54.

Vaughton, G., and Ramsey, M. (2012). Gender plasticity and sexual system stability in *Wurmbea*. *Annals of Botany* **109**, 521-530.

Vernier, P., Orkwor, G., and Dossou, A. (2003). Studies on yam domestication and farmers' practices in Benin and Nigeria. Outlook on agriculture 32, 35-41.

Wagner, D., Sablowski, R. W. M., and Meyerowitz, E. M. (1999). Transcriptional Activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* **285**, 582-584.

Wang, H., Matsushita, M., Tomaru, N., and Nakagawa, M. (2017). Sex change in the subdioecious shrub *Eurya japonica* (Pentaphylacaceae). *Ecology and evolution* **7**, 2340-2345.

Wang, L., Li, H., Sun, P., Suo, Y., Han, W., Diao, S., Mai, Y., Li, F., and Fu, J. (2021). Effects of plant growth regulators, soil moisture contents, and carbon/nitrogen ratios on sex differentiation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) flowers. *Journal of Plant Growth Regulation* **40**, 1121-1138.

Wang, Z., Dai, L., Jiang, Z., Peng, W., Zhang, L., Wang, G., and Xie, D. (2005). GmCOI1, a soybean F-box protein gene, shows ability to mediate jasmonate-regulated plant defense and fertility in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* **18**, 1285-1295.

Wei, N., Govindarajulu, R., Tennessen, J. A., Liston, A., Ashman, T.-L., and Sayres, M. W. (2017). Genetic mapping and phylogenetic analysis reveal intraspecific variation in sex chromosomes of the Virginian strawberry. *Journal of Heredity* **108**, 731-739.

West, N. W., and Golenberg, E. M. (2018a). Gender-specific expression of *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* is critical for unisexual organ initiation in dioecious *Spinacia oleracea*. *New Phytologist* **217**, 1322-1334.

Westergaard, M. (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *In* "Advances in genetics", Vol. 9, pp. 217-281. Elsevier.

Wybouw, B., and De Rybel, B. (2019). Cytokinin – A Developing Story. *Trends in Plant Science* **24**, 177-185.

Yolou, M. (2016). Diversité génétique des ignames africaines cultivées (Complexe *Dioscorea cayenensis – D. rotundata* et *D. dumetorum*) et perception des paysans du Centre-Bénin des questions des droits

de propriété intellectuelle. Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. D., and Zoundjihekpon, J. (2015a). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., Zoundjihekpon, J., Assaba, E. I., Anizehou, I., and Akoegninnou, A. (2015b). La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et *D. dumetorum*) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492.

Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P., and Meyerowitz, E. M. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 7827-7832.

Zoundjihekpon, J. (1993). Biologie de la reproduction et génétique des ignames cultivées de l'Afrique de l'Ouest, Dioscorea cayenensis-rotundata. PhD Thesis, Université Nationale de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Zoundjihekpon, J., Essad, S., and Toure, B. (1990). Dénombrement chromosomique dans dix groupes variétaux du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*. *Cytologia* **55**, 115-120.

Annexe

Impact des phytohormones sur la croissance végétative des ignames cultivées *D. rotundata* (Poir.)

Narcisse Denadi[1], Aline Vanhove[1], Jeanne Zoundjihékpon2
Christophe Gandonou[3] and Muriel Quinet[1]

[1]Groupe de Recherche en Physiologie végétale – Earth and Life Institute – Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique,

[2]Laboratoire de Génétique Ecologique, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP4521, Bénin.

[3]Laboratoire de Physiologie Végétale et d'Etude des Stress Environnementaux, Faculté des Sciences et Techniques (FAST/UAC), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou 01BP526, Bénin.

Les résultats présentés ont été obtenus dans le cadre du mémoire d'Aline Vanhove et les parties « matériel et méthodes » et « résultats » ont été reprises telles quelles de ce document avec son accord : Vanhove, Aline. Mise au point d'une culture d'igname du complexe d'espèces *Dioscorea cayenensis - rotundata* en serres et étude du contrôle hormonal de l'identité du sexe chez ce complexe d'espèces. Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 2020. Prom. : Quinet Muriel.

http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:27420

Résumé

L'igname *Dioscorea rotundata* est une plante tropicale grimpante cultivée pour ses tubercules. Les phytohormones se sont montrées importantes dans le contrôle du sexe chez l'espèce mais leur importance sur le développement végétative demeure peu connue. Ainsi cette étude s'est fait pour objectif d'étudier l'impact des phytohormones sur la croissance végétative chez les ignames cultivées *D. rotundata*. Des applications exogènes de 1 mM de BAP (6-benzylaminopurine), AIA (Acide indole-acétique) et GA (acide gibbérellique) ont été faites sur une période de 160 jours en conditions contrôlées (serre tropicale) chez les cultivar TDr 1000360 et Dodo. Les résultats ont montré que les hormones n'affectaient ni la taille des plantes, ni le nombre de feuilles produites par plante ni leur poids frais. Par contre, l'AIA a augmenté la surface foliaire - contrairement à la BAP - chez les deux cultivars et a diminué la teneur en eau chez la variété TDr 1000360. Par ailleurs, bien qu'aucun traitement n'a affecté le nombre de tubercules, l'AIA a augmenté la longueur et le poids frais des tubercules contrairement à la BAP. Aucun effet de la GA n'a été observé ni sur la croissance aérienne ni sur l'initiation et la croissance des tubercules.

Mots clés : *Dioscorea rotundata*, auxines, gibbérellines, cytokinines, croissance végétative.

Introduction

L'igname est une monocotylédone multi-espèces largement répandue en Afrique, en Asie, en Océanie et en Amérique du Sud (Darkwa et al., 2020). Parmi plus de 600 espèces de *Dioscorea* (Lebot, 2009), *D. rotundata*, originaire d'Afrique de l'Ouest, est la plus importante en termes de volume de production (Tostain et al., 2007) et la plus prisée en Afrique de l'Ouest en raison de son adéquation avec de nombreux aliments traditionnels (Lebot, 2009). Outre sa valeur alimentaire et économique, l'igname est très importante dans la médecine traditionnelle et contemporaine (Hassan et al., 2020; Mustafa et al., 2018) et revêt une importance sociale, culturelle et religieuse en Afrique de l'Ouest (Obidiegwu and Akpabio, 2017).

L'igname est propagée végétativement mais des études ont montré que certaines espèces dont *D. rotundata* ont conservé la reproduction sexuée après leur domestication (Mondo et al., 2020). Les plantes sont généralement dioïques avec de rares pieds monoïques (Mondo et al., 2020; Yolou et al., 2015a; Yolou et al., 2015b). Chez *D. rotundata* et la plupart des espèces voisines (*D. cayenensis*, *D. alata* …), la floraison et l'expression du sexe peuvent être affectées par les facteurs environnementaux (Denadi et al., 2020; Tamiru et al., 2017) malgré les preuves récentes d'un contrôle génétique du sexe chez ces espèces (Denadi et al., 2020; Girma et al., 2019; Mondo et al., 2021; Sugihara et al., 2021; Tamiru et al., 2017). Les taux de floraison et le sexe des plantes peuvent changer d'un endroit à l'autre ou d'une année à l'autre (Denadi et al., 2020; Hamadina et al., 2009), ce qui constitue un problème technique pour les programmes d'amélioration basés sur les méthodes conventionnelles (Mondo et al., 2020). Chez *D. rotundata*, les cultivars monoïques sont les plus sujets au changement du sexe (chap. 3). Nous avons montré dans nos études précédentes que les apports exogènes de phytohormones pouvaient reverser le sexe chez les cultivars monoïques (chap. 4). Les jamonates se sont révélées masculinisantes chez les plantes monoïques et les femelles (chap.4). D'autres hormones telles que l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide benzoïque, les cytokinines et les gibbérellines se sont également révélées comme d'éventuelles candidates à la modulation du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata* (chap. 3). La réversion du sexe par application de phytohormones a été expérimentée chez plusieurs espèces dioïques et monoïques dont le chanvre (*Cannabis sativa*), le melon amer (*Momordica charantia*), l'épinard (*Spinachia oleracea*), le manioc (*manihot esculenta*) etc. (Akter and Rahman, 2010; Galoch, 1978;

Ishiguro et al., 2001; Ito et al., 2007; Iwahori et al., 1970; Pineda et al., 2020; West and Golenberg, 2018; Zhang et al., 2017).

Chez *D. rotundata* et *D. alata*, des expériences menées en culture *in vitro* sur des variétés sélectionnées ont montré que l'usage de phytohormones synthétiques (l'acide gibbérellique, les auxines, les cytokinines) et de substances analogues naturelles (eau de coco, cendre de bois) impactaient le système racinaire et la formation des tubercules ainsi que la croissance aérienne des plantes (Agele et al., 2010; Igwilo, 2003; Kabeya et al., 2013). L'impact des phytohormones sur la croissance et la production de tubercule a été observé chez d'autres plantes à tubercules dont la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Behera et al., 2009; Kefi et al., 1995).

Dans un contexte où les phytohormones se présentent comme une alternative à la maîtrise de variation spontanée du sexe chez les ignames cultivées *D. rotundata*, cette étude vise à évaluer leur impact sur la croissance végétative et la production de tubercules chez *D. rotundata* .

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal, conditions de culture et application des traitements

Des traitements hormonaux ont été réalisés sur deux cultivars de *Dioscorea rotundata*, un cultivar nigérian (TDr 1000360) et une cultivar béninois (Dodo).

Les graines de TDr 1000360 ont été semées le 14/01/19 dans des bacs de semis et placées en serre tropicale (température moyenne de 29°C/28°C (jour/nuit) ; humidité relative de 65% ; photopériode de 16H ; intensité lumineuse de 180 µmol/m^2s). Quarante plantules de ce cultivar furent repiquées le 09/04/19 individuellement en pots de 14 cm de diamètre (Pöppelmann gamme TEKU, série TO 14 B) dans un mélange terreau : sable. Les graines de Dodo furent semées le 08/04/19 de la même façon et mises dans la même serre. Le 24/05/19, quarante plantules de Dodo furent repiquées en pots individuels. Les graines, plantules et plantes furent arrosées avec de l'eau de pluie 1 à 3 fois par semaine en fonction des conditions extérieures de température. Par manque de place dans la serre tropicale, les plantes de TDr 1000360 furent transférées dans une nouvelle serre (température moyenne de 25°C/25°C (jour/nuit) ; humidité relative de 65% ; photopériode de 16H ; intensité lumineuse de 120 µmol/m^2s) le

21/07/19 tandis que les plantes de Dodo sont restées dans la première serre durant toute l'expérience.

Pour chaque cultivar, les plantes furent réparties en 4 groupes de 10 plantes correspondant aux traitements « Contrôle », « Auxine 1mM », « Cytokinine 1mM » et « Gibbérelline 1mM ». Les plantes ont été pulvérisées respectivement avec (i) de l'eau déminéralisée contenant 0.004% de Tween 20, (ii) une solution d'AIA 1mM contenant 0.004% de Tween 20, (iii) une solution de 6-BA 1mM contenant 0.004% de Tween 20, (iv) une solution de GA3 1mM contenant 0.004% de Tween 20. Les premières pulvérisations hormonales eurent lieu le 08/05/19 pour le cultivar TDr 1000360 et le 05/06/19 pour le cultivar Dodo. Le traitement eut lieu comme suit : une application de 2 pulvérisations au-dessus du sommet de la plante une fois par semaine jusqu'au 05/06/19. Ensuite, l'application se fit toutes les deux semaines. L'expérience pris fin le 15/10/19 après 160 jours de traitement pour le cultivar TDr 1000360 et le 18/10/19 après 135 jours de traitement pour le cultivar Dodo. Suite à l'infection de certaines plantes par une bactérie, les feuilles atteintes ont été coupées pour limiter la propagation sur conseil de la clinique des plantes.

2.2.Mesures non destructives

Le nombre de feuilles fut mesuré régulièrement tout au long de l'expérience. La présence possible de tubercule fut notée lors du comptage des feuilles mais également de manière sporadique lors des arrosages. Lors de chaque coupe de feuilles infectées, le nombre de feuilles coupées par plante fut mesuré.

2..3. Mesures destructives

À la fin de chacune des expériences, cinq plantes furent récoltées dans chaque traitement afin de compter le nombre de feuilles total, le nombre de grandes feuilles (> ± 4 cm), le nombre de méristèmes vivants, le nombre de méristèmes morts (méristème desséché et noircit) et le nombre de tubercules par plante. La longueur de la tige la plus longue et la longueur du plus grand tubercule ont également été mesurées. Pour chaque plant, la feuille la plus grande fut également récoltée et scannée pour en mesurer la surface via le logiciel Mesurim_pro. Le nombre de feuilles et le nombre de méristèmes furent relevés à l'aide d'un compteur. La taille de la plante fut mesurée à l'aide d'un mètre ruban rigide de 5m et la longueur du tubercule fut mesurée

à l'aide d'un mètre ruban souple de 2m. Pour chaque plante, la partie aérienne et les tubercules ont été pesés afin de mesurer le poids frais. Les parties aériennes furent ensuite séchées en étuve à 70°C pendant 72 heures et le poids sec de celles-ci fut déterminé. Grâce au poids frais et au poids sec de chaque plante, la teneur en eau de celle-ci pu être calculée à l'aide de la formule : teneur en eau = ((poids frais – poids sec) / poids frais) * 100.

2.4.Analyses statistiques

Pour chaque cultivar, des analyses des variances (ANOVA 1) furent réalisés sur le logiciel R studio avec différentes fonctions (anova(), kruskal.test() et perm.anova()) par rapport aux résultats obtenus lors des tests de normalité des résidus et d'homogénéité des variances. Ces analyses furent réalisées afin d'analyser l'effet du traitement (variable X à 4 niveaux : « Contrôle », « Auxine 1mM », « Cytokinine 1mM » et « Gibbérelline 1mM ») sur différents Y (le nombre de feuilles, le rapport grandes feuilles/feuilles, la surface foliaire max, la taille, le nombre de méristèmes apicaux vivants, le rapport méristème apicaux vivants/morts, le poids frais de la partie aérienne, la teneur en eau, le nombre de tubercule, la longueur du tubercule, le poids frais du tubercule). Des tests post-hoc (test de Tukey et parfois de Wilcoxon-Mann-Whitney) furent ensuite réalisés si nécessaire afin de vérifier quels traitements sont significativement différents.

3**. Résultats**

3.1. Impact des hormones sur la croissance végétative aérienne

Le nombre de feuilles produites différait entre les deux cultivars et le cultivar Dodo a globalement produit plus de feuilles que le cultivar nigérienne (Figure 1). Cependant comme les deux cultivars n'ont pas poussé dans les mêmes conditions, nous ne les avons pas comparées au niveau statistique. Au niveau de l'impact des traitements hormonaux, celui-ci a varié en fonction des cultivars. En effet, les plantes contrôles avaient un rythme d'initiation foliaire plus élevé que les plantes traitées chez le cultivar Dodo (Figure 1 A) alors que chez le cultivar TDr 1000360, les plantes contrôles avaient un rythme d'initiation foliaire parmi les plus faibles (Figure 1 B). L'effet du traitement ne variait cependant pas en fonction de la date (F = 0,6550, P = 0.8925712 pour TDr et F = 1.0191, P = 0.4385 pour Dodo)

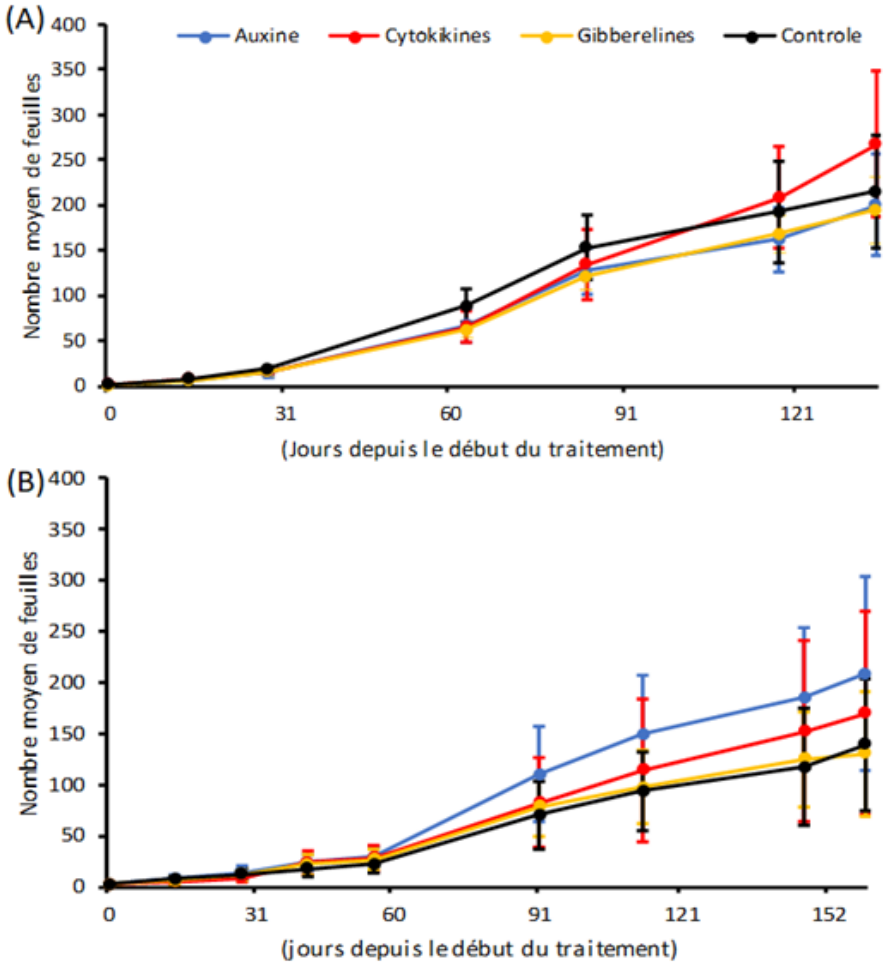


Figure 1 : Evolution du nombre de feuilles en fonction du traitement hormonal (Auxine, Cytokinine, et Gibbérelline) chez deux cultivars de *D. rotundata* (A) TDr 1000360. et (B) Dodo.

En fin de culture, l'effet du traitement hormonal sur le nombre total de feuilles n'était significatif chez aucune des deux cultivars (Tableau 1). La taille des feuilles sur une plante variait fortement entre traitements, ce qui nous a incités à analyser la proportion de grandes feuilles (Tableau 1). Celle-ci était plus petite lorsque les plantes étaient pulvérisées avec de la cytokinine et ce pour les deux cultivars (Tableau 1). Concernant la surface foliaire de la plus grande feuille, elle était maximale chez les plantes traitées à l'auxine et minimale chez les plantes traitées à la cytokinine chez le

cultivar TDr 1000360 mais ne variait pas avec le traitement hormonal chez le cultivar Dodo.

Tableau 1 : Effet de traitements hormonaux (Auxines, Cytokinines, et Gibbérellines) sur le nombre de feuilles par plante, le rapport entre le nombre de grandes feuilles et le nombre total de feuilles par plante, et la surface de la plus grande feuille par plante chez deux cultivars d'igname *D. rotundata*.

Hormone	n	Nombre de feuilles	Rapport feuilles	Surface foliaire max.
TDr 1000360				
Contrôle	5	140,8 ± 77,6 a	0,57 ± 0,05 **b**	75,20 ± 21,82 **ab**
Auxine	5	255,4 ± 144,8 a	0,52 ± 0,09 **ab**	83,40 ± 12,58 **b**
Cytokinine	5	146,7 ± 77,2 a	0,39 ± 0,10 **a**	51,7 ± 14,4 **a**
Gibbérelline	5	115,6 ± 50,1 a	0,55 ± 0,10 **b**	62,8 ± 10,95 **ab**
ANOVA 1		F = 2,2233	F = 4,3974	F = 4,4451
		P = 0,1226	P = 0,0183 *****	P = 0,01763 *****
Dodo				
Contrôle	5	230,2 ± 79,6 a	0,71 ± 0,07 **b**	76,00 ± 14,13 a
Auxine	5	211,6 ± 53,3 a	0,63 ± 0,05 **b**	89,30 ± 32,78 a
Cytokinine	5	262,8 ± 43,5 a	0,36 ± 0,05 **a**	93,10 ± 17,96 a
Gibbérelline	5	190,0 ± 14,4 a	0,66 ± 0,04 **b**	95,20 ± 27,20 a
ANOVA 1 & Kruskal & Perm.anova		KW χ^2 = 5.3086	F = 43,022	F = 0,6361 (perm.anova)
		P = 0,1505	P < 0,001 *******	P = 0,59

Les plantes d'igname sont des plantes grimpantes. La taille des plantes ne différait pas en fonction des traitements hormonaux et ce pour les deux cultivars (Tableau 2). Le poids frais des parties aériennes étaient également similaires entre traitements pour les deux cultivars (Tableau 2). Cependant, les traitements hormonaux ont affecté la teneur en eau des parties aériennes chez le cultivar TDr 1000360 mais pas chez la variété Dodo (Tableau 2). En effet, le cultivar TDr 1000360 présentait une teneur en eau plus faible lorsqu'elle était pulvérisée avec de l'auxine (Tableau 2).

En cours de culture, plusieurs méristèmes de la tige principale et de ramifications ont séché et bruni chez un grand nombre de plantes sans que la cause ait pu être identifiée. Le nombre de méristèmes vivants et le rapport entre méristèmes vivants et morts par plante a donc été analysé et comparé entre les différents traitements. Le nombre de méristèmes apicaux vivants par plante et le rapport méristèmes vivants/méristèmes morts ne différait pas pour le cultivar TDr 1000360 (Tableau 2). Le cultivar Dodo présentait quant-à-elle plus de méristèmes apicaux vivants lorsqu'elle était pulvérisée avec de la cytokinine bien qu'aucune différence significative ne fût observée pour le rapport entre le nombre de méristèmes vivants et morts, probablement étant donné la forte variabilité au sein du traitement cytokinine (Tableau 2).

3.2. Impact des hormones sur la production et le développement des tubercules

Les tubercules produits ont été récoltés en fin d'expérience pour les différentes plantes. En moyenne, les plantes d'igname ont produit 1 à 2 tubercules par plante. Le nombre de tubercules ne différait pas en fonction de l'hormone pulvérisée et ce quelle que soit le cultivar (Tableau 3). En revanche, la longueur et le poids des tubercules variaient avec le traitement hormonal chez les deux cultivars (Tableau 3). Pour le cultivar TDr 1000360, la longueur et le poids frais des tubercules étaient plus élevés lorsque les plantes étaient pulvérisées avec de l'auxine et étaient plus petits lorsque ceux-ci étaient pulvérisés avec de la cytokinine (Tableau 3). Pour le cultivar Dodo, la longueur et le poids frais des tubercules étaient plus élevés lorsque les plantes étaient pulvérisées avec de l'auxine ou avec la solution contrôle et moindre lorsque les plantes étaient pulvérisées avec de la cytokinine (Tableau 3).

Tableau 2 : Effet de traitements hormonaux (Auxine, Cytokinine, et Gibbérelline) sur la taille, le nombre de méristèmes apicaux vivants, le rapport méristèmes apicaux vivants/morts, le poids frais de la partie aérienne et la teneur en eau par plante chez deux cultivars d'igname *D. rotundata*.

Hormone	n	Taille (cm)	Méristèmes apicaux vivants	Rapport méristème apicaux (log)[1]	Poids frais partie aérienne (g)	Teneur en eau
TDr 1000360						
Contrôle	5	129,1 ± 98,5 a	20,6 ± 10,0 a	2,19 ± 10,28 a	71,04 ± 47,04 a	0,83 ± 0,03 **b**
Auxine	5	139,6 ± 79,0 a	26,8 ± 11,4 a	4,63 ± 3,76 a	90,60 ± 46,40 a	0,77 ± 0,03 **a**
Cytokinine	5	54,4 ± 10,7 a	20,3 ± 13,6 a	2,29 ± 1,60 a	40,26 ± 21,66 a	0,85 ± 0,03 **b**
Gibbérelline	5	150,8 ± 31,4 a	20,2 ±5,3 a	1,51 ± 1,03 a	52,57 ± 28,05 a	0,82 ± 0,02 **ab**
ANOVA 1 & Kruskal		KW χ^2 = 6.974 P = 0,07273	F = 0,4577 P = 0,7154	F = 0,6787 P = 0,5771	F = 1,9185 P = 0,1649	F = 7,1305 P = 0,00262 **
Dodo						
Contrôle	5	207,0 ± 104,1 a	28,4 ± 4,7 **ab**	5,07 ± 2,36 a	104,68 ± 33,18	0,84 ± 0,02 a
Auxine	5	220,7 ± 62,8 a	25,6 ± 5,1 **a**	4,75 ± 3,34 a	116,48 ± 24,70	0,83 ± 0,03 a
Cytokinine	5	214,6 ± 54,9 a	38,8 ± 9,8 **b**	12,30 ± 16,33 a	108,49 ± 27,92	0,84 ± 0,02 a
Gibbérelline	5	240,8 ± 95,1 a	23,2 ± 6,2 **a**	7,22 ± 8,56 a	95,49 ± 18,02 a	0,83 ± 0,01 a
ANOVA 1		F = 0,1562 P = 0,9241	F = 5.1868 P = 0,0108 *	F = 0,3568 P = 0,7849	F = 0,5396 P = 0,662	F = 0,3689 P = 0,7765

Tableau 3 : Effet de traitements hormonaux (Auxines, Cytokinines, et Gibbérellines) sur le nombre de tubercule par plante, la longueur du plus grand des tubercules par plante, et le poids frais de l'ensembles des tubercules par plante chez deux cultivars d'igname *D. rotundata*.

Hormones	n	Nombre de tubercules (log)	Longueur du tubercule (cm)	Poids frais tubercules (g)
TDr 1000360				
Contrôle	5	2,0 ± 1,7 a	11,5 ± 5,6 **ab**	101,0 ±88,1 **ab**
Auxine	5	2,0 ± 1,0 a	16,5 ± 4,2 **b**	132,4 ± 42,3 **b**
Cytokinine	5	1,5 ± 0,5 a	8,4 ± 3,8 **a**	39,7 ± 26,7 **a**
Gibbérelline	5	1,4 ± 0,9 a	14,7 ± 2,8 **ab**	125,6 ± 43,5 **ab**
ANOVA 1 & Perm.anova		F = 0,4096	F = 3,9767	F = 3,4619
		P = 0,743	P = 0,02572 *****	P = 0,03968 *****
Dodo				
Contrôle	5	1,4 ± 0,5 a	29,0 ± 6,9 **b**	159,2 ± 30,6 **b**
Auxine	5	1,8 ± 0,8 a	28,8 ± 10,3 **b**	127,8 ± 41,5 **b**
Cytokinine	5	1,2 ± 0,4 a	13,2 ± 5,9 **a**	55,6 ± 28,2 **a**
Gibbérelline	5	1,8 ± 0,4 a	17,6 ± 7,1 **ab**	100,8 ± 35,8 **ab**
ANOVA 1		F = 1,2857	F = 5.3582	F = 8,1293
		P = 0,3132	P = 0,009541 ******	P = 0,001629 ******

4. Discussion

Les résultats de cette étude ont montré que les phytohormones ont eu un effet important sur la phase végétative des ignames cultivées *D. rotundata*. Les hormones ayant montré les effets les plus prononcés étaient la cytokinine (BAP) suivie de l'auxine (AIA). Globalement, la cytokinine avait un effet négatif sur la croissance végétative par rapport aux plantes contrôles tandis que l'auxine a eu un effet positif sur la croissance végétative des plantes de le cultivar TDr 1000360.

Les travaux de Acha et al. (2004) ont montré un effet positif de l'auxine sur le développement des racines et des micro-tubercules chez des plantes issues de boutures aériennes de *D. rotundata* produites en culture in vitro. Ces mêmes observations ont été faites plus tard par Agele et al. (2010). Les auteurs avaient montré que les auxines impactent positivement l'enracinement des plantes et la production de tubercules mais leur effet peut varier selon les cultivars. Des substances naturelles telles que les cendres de bois diluées ont montré des effets analogues chez des variétés sélectionnées d'ignames *D. rotundata* cultivées i*n vitro* (Agele et al., 2010). Chez la pomme de terre par contre, Kolachevskaya et al. (2017) ont montré que l'auxine exogène a partiellement inhibé l'initiation des tubercules, et la cytokinine exogène a réduit le poids moyen des tubercules. Les cytokinines ont eu un effet négatif sur la croissance des tubercules de pomme de terre. Elles ont cependant permis d'augmenter la matière sèche des tubercules en même temps qu'une plus grande accumulation d'amidon et favoriser l'initiation des tubercules en faible concentration (Sarkar et al., 2006).

Alors que cette étude n'a montré aucun effet de la GA sur le développement végétatif et la tubérisation, Behera et al. (2009) ont plutôt observé un effet positif de l'hormone sur la tubérisation des boutures aériennes de *D. rotundata*. Igwilo (2003) a montré que l'association de l'acide gibbérellique avec les auxines et les cytokinines pouvait favoriser l'enracinement et la tubérisation chez des cultivars *D. rotundata*. Toutefois, Kefi et al. (1995) avaient observé un effet inhibiteur de l'acide gibbérellique sur la tubérisation chez l'igname. Moorby and Milthorpe (1975) ont également observé que l'apport exogène d'acide gibbérellique retardait la formation de tubercules voire l'inhibait complètement (Alexopoulos et al., 2017) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

Cette étude a montré que l'auxine et la cytokinine ont des effets opposés sur la croissance végétative en termes de dominance apicale. Suite à des travaux réalisés chez le pois cultivé (*Pisum sativum*), Ferguson et Beveridge (2009) ont montré que la dormance apicale repose sur un modèle qui tient compte du rapport entre auxines et cytokinines ainsi que sur l'expression de gènes

spécifique tels que *RMS* (pour gène *RAMOUS*). Reece et al. (2011) ont confirmé l'importance du rapport auxines/cytokinines dans le maintien de la dominance apicale chez les plantes de façon générale: la dominance apicale est maintenue lorsque la concentration en auxine est élevée tandis qu'elle faiblit ou disparait lorsque la concentration en auxine diminue ou que la concentration en cytokinine augmente. Dans ce dernier cas, l'apparition de nouveaux méristèmes apicaux et la croissance de ramifications latérales se développe. Cet effet sur la dominance apicale pourrait expliquer le nombre plus élevé de méristèmes apicaux chez les plantes traitées à la cytokinine par rapport aux plantes contrôles.

Conclusions

A l'issue de ce travail, il ressort que certaines hormones végétales dont l'AIA pouvait impacter positivement la taille des feuilles et des tubercules chez les ignames *D. rotundata* tandis que d'autres hormones dont la BAP présentaient plutôt l'effet contraire. Dans une dynamique de valoriser le recours aux hormones végétales pour le contrôle de la stabilité du sexe de l'espèce il serait important d'étendre cette étude à d'autres groupes d'hormones en mettant en exergue des combinaisons et des concentrations susceptibles de garantir une croissance végétative appropriée.

Références

Acha, I., Shiwachi, H., Asiedu, R., and Akoroda, M. (2004). Effect of auxins on root development in yam (*Dioscorea rotundata*) vine. *Tropical science* **44**, 80-84.

Agele, S., Ayankanmi, T., and Kikuno, H. (2010). Effects of synthetic hormone substitutes and genotypes on rooting and mini tuber production of vines cuttings obtained from white yam (*Dioscorea rotundata*, Poir.). *African Journal of Biotechnology* **9**, 4714-4724.

Akter, P., and Rahman, M. (2010). Effect of foliar application of IAA And GA on sex expression, yield attributes and yield of bitter gourd (Momordica Charantia L.). *Chittagong University Journal of Biological Sciences*, 55-62.

Alexopoulos, A. A., Karapanos, I. C., Akoumianakis, K. A., and Passam, H. C. (2017). Effect of Gibberellic Acid on the Growth Rate and Physiological Age of Tubers Cultivated from True Potato Seed. *Journal of Plant Growth Regulation* **36**, 1-10.

Behera, K. K., Sahoo, S., and Prusti, A. (2009). Relative agronomic performance of different *Dioscorea* species found in different parts of Orissa. *Nature and Science* **7**, 25-35.

Darkwa, K., Olasanmi, B., Asiedu, R., and Asfaw, A. (2020). Review of empirical and emerging breeding methods and tools for yam (*Dioscorea spp*.) improvement: Status and prospects. *Plant Breeding* **139**, 474-497.

Denadi, N., Gandonou, C., Missihoun, A. A., Zoundjihékpon, J., and Quinet, M. (2020). Plant sex prediction using genetic markers in cultivated yams (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin. *Agronomy* **10**, 1521.

Ferguson, B. J., and Beveridge, C. A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching *Plant Physiology* **149**, 1929-1944.

Galoch, E. (1978). The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **47**, 153-162.

Girma, G., Natsume, S., Carluccio, A. V., Takagi, H., Matsumura, H., Uemura, A., Muranaka, S., Takagi, H., Stavolone, L., and Gedil, M. (2019). Identification of candidate flowering and sex genes in white Guinea yam (*D. rotundata* Poir.) by SuperSAGE transcriptome profiling. *PLoS One* **14**, e0216912.

Hamadina, E., Craufurd, P. Q., and Asiedu, R. (2009). Flowering intensity in white yam (*Dioscorea rotundata*). *The Journal of Agricultural Science* **147**, 469-477.

Hassan, N., Din, M. U., Hassan, F. U., Abdullah, I., Zhu, Y., Jinlong, W., Nisar, M., Iqbal, I., Wadood, S. F., Iqbal, S. S., Shah, S. I., Naeem, I., Sarwar, A., Ihsan, M., Khan, H., and Zeb, U. (2020). Identification and quantitative analyses of medicinal plants in Shahgram valley, district swat, Pakistan. *Acta Ecologica Sinica* **40**, 44-51.

Igwilo, N. (2003). Presence of axillary bud and application of plant growth hormones on rooting and tuberization of yam (*Dioscorea sp*.) vine cuttings. *Global Journal of Agricultural Sciences* **2**, 128-130.

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 2191-2209.

Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H., and Meyerowitz, E. M. (2007). The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 3516-3529.

Iwahori, S., Lyons, J. M., and Smith, O. E. (1970). Sex expression in cucumber plants as affected by 2-chloroethylphosphonic acid, ethylene, and growth regulators. *Plant Physiology* **46**, 412-415.

Kabeya, J. M., Kabeya, C. U., Bekele, D. B., and kikuno, H. (2013). Vine cuttings technology in food yam (*Dioscorea rotundata*) production. *Asian Journal of Plant Science & Research* **3**, 107-111.

Kefi, S., Read, P. E., Pavlista, A., and Kachman, S. D. (1995). The effects of different concentrations of gibberellic acid (GA3) and kinetin on in vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *HortScience* **30**, 752C-752.

Kolachevskaya, O. O., Sergeeva, L. I., Floková, K., Getman, I. A., Lomin, S. N., Alekseeva, V. V., Rukavtsova, E. B., Buryanov, Y. I., and Romanov, G. A. (2017). Auxin synthesis gene tms1 driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones. *Plant Cell Reports* **36**, 419-435.

Lebot, V. (2009). "Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids," CABI, Wallingford, UK.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2021). Genome-Wide Association Studies for Sex Determination and Cross-Compatibility in Water Yam (*Dioscorea alata* L.). *Plants* **10**, 1412.

Mondo, J. M., Agre, P. A., Edemodu, A., Adebola, P., Asiedu, R., Akoroda, M. O., and Asfaw, A. (2020). Floral biology and pollination efficiency in yam (*Dioscorea spp*.). *Agriculture* **10**, 560.

Moorby, J., and Milthorpe, F. (1975). Potato, ln: Crop Physiology (Some case studies), edited by LT. EVANS. pp. 238. Cambridge University Press, 238p.

Mustafa, A., Ahmad, A., Tantray, A. H., and Parry, P. A. (2018). Ethnopharmacological potential and medicinal uses of miracle herb *Dioscorea spp*. *J. Ayurvedic Herb. Med* **4**, 79-85.

Obidiegwu, J. E., and Akpabio, E. M. (2017). The geography of yam cultivation in southern Nigeria: Exploring its social meanings and cultural functions. *Journal of Ethnic Foods* **4**, 28-35.

Pineda, M., Morante, N., Salazar, S., Cuásquer, J., Hyde, P. T., Setter, T. L., and Ceballos, H. (2020). Induction of earlier flowering in cassava through extended photoperiod. *Agronomy* **10**, 1273.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). Membrane structure and function. *Biology 9th Edition: Campbell*.

Sarkar, D., Pandey, S. K., and Sharma, S. (2006). Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (*Solanum tuberosum*) tuber formation in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **87**, 285-295.

Sugihara, Y., Kudoh, A., Oli, M. T., Takagi, H., Natsume, S., Shimizu, M., Abe, A., Asiedu, R., Asfaw, A., Adebola, P., and Terauchi, R. (2021). Population Genomics of Yams: Evolution and

Domestication of *Dioscorea* Species. pp. 1-28. Springer International Publishing, Cham.

Tamiru, M., Natsume, S., Takagi, H., White, B., Yaegashi, H., Shimizu, M., Yoshida, K., Uemura, A., Oikawa, K., and Abe, A. (2017). Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination. *BMC biology* **15**, 1-20.

Tostain, S., Agbangla, C., Scarcelli, N., Mariac, C., Daïnou, O., Berthaud, J., and Pham, J.-L. (2007). Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Genetic Resources* **5**, 71-81.

West, N. W., and Golenberg, E. M. (2018). Gender-specific expression of GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE is critical for unisexual organ initiation in dioecious *Spinacia oleracea*. *New Phytologist* **217**, 1322-1334.

Yolou, M., Anizehou, I., Dossou-Yovo, R., Akoegninnou, A., Zongo, J. D., and Zoundjihekpon, J. (2015a). Etat des lieux de la reproduction sexuée des ignames africaines *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* cultivées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **9**, 737-750.

Yolou, M., Zoundjihekpon, J., Assaba, E. I., Anizehou, I., and Akoegninnou, A. (2015b). La floraison des ignames africaines cultivées (*D. cayenensis–D. rotundata* et *D. dumetorum*) dans les champs des producteurs du Centre-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* **91**, 8480–8492.

Zhang, Y., Zhao, G., Li, Y., Mo, N., Zhang, J., and Liang, Y. (2017). Transcriptomic analysis implies that GA regulates sex expression via ethylene-dependent and ethylene-independent pathways in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in plant science* **8**, 10.

« L'Eternel est mon berger: je ne manque de rien.
Il me conduit dans les sentiers de la vie juste,
Et ma coupe déborde.
Que le bonheur et la grâce m'accompagnent
jusqu'à la fin de mes jours ». Ps : 23