



HAL
open science

Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production

Cécile Hastoy

► To cite this version:

Cécile Hastoy. Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0118 . tel-03092252

HAL Id: tel-03092252

<https://theses.hal.science/tel-03092252>

Submitted on 2 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE sous le dispositif de
Conventions Industrielles de Formation par la REcherche
PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé
SPECIALITE : Biologie Végétale

Par **Cécile Hastoy**

**Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de
Stevia rebaudiana (Bertoni) :
analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition
de production**

Sous la direction de MC Valérie Schurdi-Levraud et Pr Dominique Rolin

Soutenue publiquement le 20 juillet 2018

Membre du jury :

Pr. Michel HERNOULD

Dr. Bernadette JULIER

Dr. Christophe SALON

Dr. Lucia GUERIN-DUBRANA

Mr. Philippe BOUTIE

Professeur de l'Université de Bordeaux

Directeur de Recherche INRA

Directeur de Recherche INRA

Maître de Conférence de Bordeaux Sciences Agro

Président de la société Oviatis

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Invité

Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production

Résumé

La consommation excessive de sucres conduit à l'augmentation de désordres métaboliques, tels que l'obésité et le diabète. Les consommateurs souhaitent une alimentation plus saine à base de produits d'origine naturelle. *Stevia rebaudiana*, l'herbe sucrée du Paraguay, accumule dans ses feuilles des glycosides de stéviol (SGs) considérés comme des édulcorants naturels intenses, dont le marché est en pleine expansion au niveau mondial. Dans ce contexte, la société Oviatis implante une filière BIO de *Stevia rebaudiana* en Nouvelle-Aquitaine. Les objectifs de cette thèse CIFRE sont de caractériser la variabilité phénotypique d'une collection de cette espèce en vue de la mise en place future d'un programme de sélection. Les composantes du rendement, de biomasse foliaire, de quantité et qualité des SGs et de la réponse à *Septoria* sp. ont été finement décrites en condition de production pluriannuelle et multi-sites ou en conditions contrôlées. Ces travaux ont permis de 1) développer des outils de phénotypage métabolique, pathologique et au champ, 2) évaluer la variabilité phénotypique de cette collection de *Stevia rebaudiana* en condition de production et identifier les descripteurs de cette variabilité, 3) identifier les facteurs ontogéniques, abiotiques et culturels impliqués dans la variabilité de cette collection, 4) évaluer la variabilité de réponses face à la septoriose. Ces résultats permettent d'identifier les critères de sélection de cette espèce pour une production BIO en Nouvelle Aquitaine, ainsi que des génotypes d'intérêt. Ils constituent les bases de la mise en place d'un programme d'amélioration variétale.

Mots clés : Edulcorants naturels intenses – *Stevia rebaudiana* – Glycosides de stéviol – Biomasse – Septoriose

Characterisation of the phenotypic variability within *Stevia rebaudiana* (Bertoni) genetic resources: analysis of yield components and selection criteria in field condition

Abstract

Obesity and diabetes are consequences of metabolic disorders due to excessive sugar consumption. Consumers want a healthier diet with natural products. *Stevia rebaudiana*, the Paraguayan sweet herb, accumulates steviol glycosides (SGs) into its leaves. Considered as intense natural sweeteners, SGs represent a global market constantly increasing. In this context, Oviatis establishes a complete organic sector in the Nouvelle-Aquitaine region. The aims of this CIFRE thesis are to characterise the phenotypic variability within a collection of genetic resources, in order to implement a breeding program. Yield components, leaves biomass, SGs quality and quantity and responses against *Septoria* sp. were described in perennial and multi-site field conditions or in controlled conditions. This work allowed to: 1) develop tools for metabolic, pathology field-phenotyping, 2) evaluate the phenotypic variability of this *Stevia rebaudiana* collection in field conditions and identify variability descriptors, 3) identify ontogenic, abiotic and cultural factors implicated into phenotypic variability, and 4) evaluate response variability against septoria disease. These results led to the identification of genotypes of interest, as well as selection criteria for the organic production in Nouvelle-Aquitaine, which are the basis for the implementation of a breeding program.

Keywords: Natural intense sweeteners – *Stevia rebaudiana* – Steviol glycosides – Biomass – Septoria disease

**UMR 1132 Biologie du Fruit et Pathologie – INRA/Université de Bordeaux
71, av. Edouard Bourlaux – CS 20032 – 33882 Villenave d'Ornon Cedex – France**

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre du dispositif de Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) de l'Agence National de la Recherche et de la Technologie (ANRT) pour la société Oviatis (Agen, France) en partenariat avec l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (INRA, Villenave d'Ornon), où j'ai été accueillie dans l'équipe Virologie. Les expérimentations ont été réalisées en partenariat avec la station expérimentale INVENIO (Ste-Livrade, France). Les dosages métaboliques ont été réalisés au sein du laboratoire Molécules d'Intérêt Biologique (MIB, Villenave d'Ornon, France). L'aspect pathologie a été réalisé en collaboration avec l'UMR SAVE (Villenave d'Ornon, France).

Je tiens tout d'abord à adresser ma gratitude aux membres du jury. **Michel Hernould**, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury. **Bernadette Julier** et **Christophe Salon** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur. **Lucia Guérin-Dubrana** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes directeurs de thèse, **Valérie Schurdi-Levraud** et **Dominique Rolin**, pour m'avoir encadré pendant ces 4 ans de travail, pour la confiance que vous m'avez rapidement accordée, pour votre suivi et vos conseils constructifs. Merci pour vos encouragements, surtout dans les moments difficiles, et pour les relectures.

Philippe Boutié et **Pierre Jannot**, pour m'avoir fait découvrir ce monde passionnant de la Stévia, pour la confiance que vous m'avez accordée très rapidement. Merci pour le suivi très régulier à l'occasion des réunions partenaires et pour m'avoir considérée à part entière dans l'entreprise. Philippe, merci pour tes encouragements pendant ces 4 années, les coups de main sur le terrain, et pour toutes nos discussions. Je suis ravie que mes travaux de thèse participe au développement de la filière, et encore plus ravie et emballée de poursuivre ma carrière au sein d'Oviatis.

Sébastien Cavaignac et **Stephan Plas**, pour votre implication autant sur le terrain qu'au cours des réunions partenaires. Merci pour les discussions, les conseils et de m'avoir transmis votre expertise sur l'itinéraire culturel. **Eric Sclaunich** et **Renaud Galland** pour le suivi des parcelles. Merci **Eric** de m'avoir transmis tout ce que tu avais appris auparavant sur la Stévia. Je tiens également à exprimer ma gratitude à toutes les personnes d'INVENIO qui ont participé aux campagnes d'effeuillage durant ces 3 ans. Je tiens à remercier particulièrement **Pierre Gaillard** pour ce partenariat riche.

Je souhaite également remercier **Guy Maille** pour l'implication et la disponibilité dont vous avez fait preuve pour l'implantation de la parcelle à Blagon, qui fut avec émotion la dernière dans le cadre de cette thèse. Merci à votre équipe pour la préparation du terrain.

Un très grand merci à **Patrick Cosson**, le roi des marqueurs, pour l'aide que tu m'as apporté durant ces 4 années sur tous les fronts, et il y en avait beaucoup ! Merci de m'avoir transmis ton expertise technique sur les marqueurs, de m'avoir accompagné sur le terrain pour les plantations, les notations et les récoltes. Merci pour les discussions de hand, qui m'ont toujours rappelé de bons souvenirs, et toutes les parties de baby-foot !!

Je remercie tout particulièrement **Jonathan Gaudin** pour m'avoir transmis tes connaissances, pour la patience dont on a eu besoin pour tout développer, pour ta bonne humeur, ton optimisme et ton énergie débordante. **Dominique Blancard** pour vos précieux conseils et votre façon de booster les petits jeunes. Je tiens à remercier particulièrement **François Delmotte** pour notre discussion scientifique très constructive.

Coralie Chesseron, pour avoir pris soin de toutes les plantes dispersées sur le centre. Merci de m'avoir transmis ton expertise et tes précieux conseils sur la culture. **Justine Perrotte**, pour ton expertise en culture *in vitro* et pour la production de tous les plants qui m'ont permis d'implanter 2 parcelles. **Mathieu Mouravy**, pour avis pris soins de ces mêmes plants pour leur acclimatation.

Mes remerciements vont bien évidemment à l'ensemble de l'équipe de **Virologie**, pour l'accueil chaleureux dont vous avez tous fais preuve envers moi dès le départ. Je tiens à remercier particulièrement **Thierry Candresse** pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire. Merci pour votre bonne humeur, pour les fous rires, et même pour les journées ménage soldées par un barbeuc'. Merci de m'avoir laissé envahir (littéralement !) un labo. Un énorme merci à toutes les personnes qui sont venues effeuiller de la Stévia : **Valérie, Patrick, Bernadette, Xavier, Mélodie, Jos, Luc, Chantal, Armelle, la grande et la petite Amandine, Patrice** (une bonne façon de te souhaiter la bienvenue !), et j'espère sincèrement n'oublier personne... Je retiendrai évidemment **Jos** qui nous a emmené une mini-mascotte à Ste-Livrade ! Merci à toi également de nous avoir invités pour partager des repas. Merci aux supers musiciens **Luc et Timi** pour les soirées avec un petit concert privé. Merci **Armelle** pour ton rire communicatif qui a laissé s'exprimer le mien. Merci à **Laurence et Julie** pour les repas et pic niques. Merci à toi **David** pour m'avoir laissé manger le dernier macaron au chocolat. Je remercie particulièrement toutes les personnes qui ont apporté la bonne humeur dans le bureau « non-permanent » : **Iason, Elisa, Vincent, Justine, Leïla, Jules, Zoé, Yuxin, Shuo**. Un grand merci à **Bernadette** pour nos échanges et surtout ton soutien, tes encouragements, et ton aide pendant la rédaction. Sans oublier **Justine, Amandine et Valie** pour les petites pauses entre filles et vos encouragements. Merci à tous pour votre « folie » à l'occasion des séances photos, ce sont de supers souvenirs.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de l'**UMR BFP** avec qui j'ai pu partager des discussions scientifiques riches, qui m'ont transmise leur savoir technique et scientifique quand j'en ai eu besoin. **Patricia Ballias**, pour les essais en serre, l'utilisation de la plateforme, et plus récemment pour tes encouragements et ton soutien. **Pierre Waffo-Teguo**, pour votre expertise en chromatographie et toutes les discussions scientifique riches autour de ce domaine. **Catherine Cheniclet**, pour le temps que vous m'avez accordé et tous les précieux conseils d'utilisation d'ImageJ.

Les stagiaires que j'ai pu encadrer, **Anna Guillem, Nicolas Biron et Zoé Le Bihan**, pour votre implication sur un sujet neuf, votre bonne humeur et évidemment pour tous les résultats auxquels pour avez participé. Je voudrais tout particulièrement remercier te **Zoé Le Bihan**, pour ton aide qui m'a permis de finaliser mes essais de 3^{ème} année durant ton stage de fin d'étude. Egalement pour l'investissement et l'entrain dont tu fais preuve au quotidien pour le projet. Je suis ravie que tu te sois lancée dans l'aventure d'une thèse Stévia, ravie de voir où nous en sommes quand je repense au début du partenariat il y a 4 ans.

Anabelle Tournié, Amandine Nigro et Charlotte Fourcaud pour votre aide pendant les campagnes de récolte. Merci pour votre bonne humeur, votre patience, votre entrain, vos encouragements. **Amandine** je suis ravie de bientôt partager un bureau avec toi !

Ensuite, la liste des personnes qui ont fait parties de mon entourage personnel durant ces 4 années est longue, un immense merci à vous tous, vous avez tous apporter chacun à votre manière énormément de soutien...

Antoine, monsieur vigne. Merci pour les afterworks et toutes les discussions qu'on a eu pour évacuer le stress. A toi de jouer maintenant, tu vas tout déchirer !

Noé, pour les afterworks V&B, les soirées de longues discussions scientifiques (ou philosophiques !), sans oublier les parties de pétanque. Merci pour tes encouragements et tes mots rassurants et très touchants depuis les Etats-Unis. Ça sera un plaisir de boire une bière dans ton V&B quand tu reviendras !

Aurélien et Quentin, merci pour tous ces nombreux moments passés avec vous, pour le grain de folie que nous avons partagé. Merci à toi aussi **Manu** pour tes encouragements dans la dernière ligne droite.

Toutes les personnes avec qui je partage la danse, **Lucille, Kévin, Arnaud, Leïlani, Catherine, Cédric, Léo, Jade, Magalie, Mathieu**, ... et j'oublie certainement des personnes, je m'en excuse. Merci pour ces moments où nous nous retrouvons dans la bonne humeur ! Un merci tout particulier au KOD de Bordeaux (**Fred, Pablo Rachid, Wesley et Ahmed**) pour les trainings qui m'ont faite progresser très vite, et surtout permis de passer de très bons moments. Un très grand merci à **Damien**, Mr Câlin, qui m'a redonner de l'énergie et m'a permis de comprendre énormément de chose. Enfin, merci à toi **Fabien** pour ta présence, ton écoute et ton envie de discuter. On se comprend !

Martine, pour le soutien mutuel que nous nous sommes accordés depuis le centre de rééducation et la très belle amitié qui en a découlé. Drôle de circonstance pour se rencontrer, mais quelle rencontre. Merci pour tes mots rassurants, encourageants, et pour toutes les discussions riches que nous avons partagé.

Les loulous, **Xavier, Guillaume, Sophie, Anthony, Sylvain, Marie, Charlotte, Iason, Vincent**, un grand merci pour tous ces week-ends passés, pour toutes nos soirées depuis le master, pour vos encouragements. Merci pour votre folie ! On forme une très belle équipe !

Valie, un énorme merci pour tes encouragements, ton soutien, ton aide et tes relectures. Une vraie groupie !! Merci pour les bonnes doses de fous rires, pour les séances de tournage Kaamelot, pour m'avoir amené à manger, pour ta bonne humeur débordante, pour les moments d'émotion quand vous chantez tous ensemble. Un immense merci pour m'avoir rebooster.

Ma bridée, **Laura**, merci d'être toujours là, même quand tu es à l'autre bout de la planète. Merci pour tous les moments que l'on a passés ensemble depuis le master, pour les journées piscine, pour avoir autant eu envie de sortir autant que nous, pour ton soutien dans tous les moments difficiles, pour ton écoute, pour ta gentillesse. J'ai hâte de venir te voir en Nouvelle-Zélande.

Tracey, pour les pauses café/clope au labo, pour nos repas, nos soirées, nos discussions de tout ordre, nos délires. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été présente au moment le plus difficile arrivé pendant cette thèse, d'avoir trouvé les mots qui m'ont relancé et m'ont permis de me relever. Merci d'être toujours là.

Sabrina, pour nos moments de folie, pour la belle amitié que nous avons construite, pour le soutien que tu n'as pas hésité une seule seconde à m'apporter alors que nous nous connaissions à peine. Merci de m'avoir entraîné dans la kizomba, qui m'a enfin permis d'apprécier une activité presque autant que le hand. Pour tous ces moments de détente dont nous avons besoin. Nous avons parcouru un sacré chemin ensemble ! Merci pour tout.

Mon **Xav**, mon collègue de bureau et surtout un véritable ami. Même si je t'ai déjà mentionné, j'ai pas mal de choses à rajouter ! Tu dois certainement être la personne que j'ai le plus fréquenté, et qui a dû me supporter au travail et en dehors. Pas une mince affaire durant toutes ces années... Merci pour les pauses qui s'imposent, les fous rires, l'autodérision, tout ceci pimenté par notre grande classe et ton magnifique vocabulaire qui me fera toujours rire ! Merci pour les conseils, les relectures, pour ton écoute à n'importe quel moment. Je dirai que t'avoir à mes côtés est tout à fait génial. Mais bon si ça continue, il va falloir que ça cesse ?? Surtout pas ! Et évidemment un grand merci à toi et **Guillaume** pour les dimanches soirs qui ont été nombreux ! Merci pour votre soutien, pour les repas, et pour la place sur le canapé !

Un simple remerciement ne suffirait pas pour ma super coloc, **Sophie** (sans oublier, Mr Léon !). Il y a tellement à dire... Merci pour ces 3 ans de vie commune, pour ton écoute, ton soutien, tes mots justes, ta gentillesse, ta présence quotidienne, et aussi tes relectures. Tu as permis de faire de chez nous un endroit où je me sente bien, où je me ressource, et qui nous corresponde totalement !! Merci pour tous ces moments partagés, de sorties, d'afterwork, de week-ends, de concerts. Merci pour les dimanches tranquilles, pour les brunchs, qui ont été des moments où on se retrouvait. Merci à toi et **Jérémy** pour ce grain de folie partagé. J'ai un pincement au cœur en me disant que la colocation est finie, mais il est évident que je viendrai volontiers chez vous, et peut être même très souvent car vous allez me manquer au quotidien.

Ma meilleure amie, **Claire**, pour cette magnifique amitié que nous partageons depuis maintenant 14 ans. Avec toi, loin des yeux ne signifie pas loin du cœur. Merci pour ton soutien permanent, sans limite quel que soit le moment, ta franchise, ta gentillesse, ton écoute. Tu es tout simplement formidable. Merci d'être comme un membre de ma famille depuis toujours.

Yannick, pour tes attentions, tes conseils, ta simplicité, voir même ton franc-parler !... En résumé, pour ta présence quotidienne depuis ces nombreuses heures de danse soldées par un petit déjeuner au premier de l'an. Merci pour tous ces moments qui m'ont permis de m'évader et me reposer pendant cette longue période de rédaction. Merci pour la patience dont tu as fait preuve. Merci pour nos échanges riches. Et merci que l'on se soit retrouvé.

Mes parents, pour votre soutien, votre affection, pour avoir cru en moi. Vous m'avez toujours donné la chance de pouvoir faire ce que j'aime, même si cela impliquait que je parte de la maison dès le lycée et que je décide de faire de longues études. Je n'ai pas vraiment de mot pour exprimer ce que je ressens, mais une chose est sûre je suis terriblement chanceuse de vous avoir.

Je finirai ces remerciements par une personne qui a été des plus importantes dans ma vie, **mon beau-père, mon Jibou**. Je me rends compte chaque jour des bagages que tu m'as apporté pour me construire, évoluer et réussir. De toutes ces belles valeurs que tu m'as transmises. Ce manuscrit est l'aboutissement de mes études pour lesquelles tu as toujours bien plus cru en moi que moi-même. Je te serai toujours reconnaissante de t'être battu si longtemps pour me laisser la chance de te montrer et de te dire combien tu comptes pour moi. Ces quelques mots et ton nom dans mon manuscrit sont ma façon de témoigner que jamais je ne t'oublierai.

« J'avais plutôt le sentiment que la seule compétition valable était celle que l'on avait avec soi-même. Se surpasser plutôt que dépasser. »

Laurent Gounelle

Table des matières

RESUME.....	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	IX
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	XV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIX
TABLE DES ILLUSTRATIONS	XXI
PARTIE 1 – CONTEXTE ECONOMIQUE ET SCIENTIFIQUE	1
CHAPITRE 1 – CONTEXTE ECONOMIQUE	3
1 SUCRE, SAVEUR SUCREE ET SANTE HUMAINE	5
2 LE MARCHE MONDIAL DE LA STEVIA	6
3 LA CULTURE DE LA STEVIA AU NIVEAU MONDIAL	8
4 ETAT DES LIEUX EN EUROPE ET EN FRANCE.....	9
CHAPITRE 2 – CONTEXTE SCIENTIFIQUE	10
1 <i>STEVIA REBAUDIANA</i> , L'HERBE SUCREE DU PARAGUAY	11
1.1 <i>Historique</i>	11
1.2 <i>Description botanique</i>	13
1.3 <i>Stade de développement</i>	13
1.3.1 Croissance végétative	13
1.3.2 Reproduction.....	15
1.3.2.1 Stades de floraison	15
1.3.2.2 Auto-incompatibilité sporophytique	17
1.3.2.3 Pollinisation entomophile.....	18
1.3.2.4 Propagation de l'espèce.....	19
2 LE POUVOIR SUCRANT ACALORIQUE : LES GLYCOSIDES DE STEVIOL (SGS)	21
2.1 <i>Structure et variabilité des glycosides de stéviol</i>	21
2.2 <i>Voie de biosynthèse des SGS à l'échelle cellulaire</i>	21
2.2.1 Synthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes.....	23
2.2.2 Synthèse du stéviol, précurseur des SGS	23
2.2.3 Synthèse des glycosides de stéviol.....	25
2.2.4 Stockage des glycosides de stéviol	29
2.3 <i>Accumulation en SGS à l'échelle de la plante</i>	31
2.3.1 Accumulation dans les différents organes	31
2.3.2 Accumulation temporelle	33
2.3.3 Expression des gènes de la voie de synthèse des SGS	34
2.3.4 Fonctions des SGS pour la plante.....	35
2.4 <i>Propriétés des SGS pour la consommation humaine</i>	37

2.4.1	Edulcorants naturels intenses.....	37
2.4.2	Propriétés organoleptiques des SGs et perception du goût.....	37
2.4.3	Métabolisation des SGs par l'homme	40
2.4.4	Effets bénéfiques sur la santé humaine	41
3	AMELIORATION GENETIQUE DE LA STEVIA	43
3.1	<i>Caractérisation des ressources génétiques de Stevia rebaudiana</i>	45
3.1.1	La variabilité phénotypique décrite.....	45
3.2.1.1	Variabilité de la production de biomasse	45
3.2.1.2	Variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol	46
3.2.1.3	Effets des stress abiotiques	48
3.2.1.3	Effets des stress biotiques.....	51
3.1	<i>Amélioration génétique de Stevia rebaudiana</i>	55
3.1.1	Etats des lieux de la sélection et informations génomiques disponibles	55
3.2.1.1	Critères de sélection passés	55
3.2.1.1	Critères de sélection actuels et futurs.....	55
3.2.1.3	Apport des informations génomiques	57
3.2.2	Variétés développées.....	59
3.2.3	Stratégies d'amélioration.....	63
3.2.3.1	Schéma de sélection et d'amélioration.....	63
3.2.3.2	Génération de lignées pures.....	64
3.2.3.3	Augmentation de la ploïdie et mutagénèse.....	64
CHAPITRE 3 – CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....		65
PARTIE 2 – RESULTATS DES TRAVAUX DE THESE		69
CHAPITRE 1 – DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA METHODE D'EXTRACTION ET DE QUANTIFICATION DES GLYCOSIDES DE STEVIOL.....		71
1	INTRODUCTION	73
2	MATERIELS ET METHODES	75
2.1	<i>Réactifs et standards en glycoside de stéviol (SGs)</i>	75
2.2	<i>Conditions de séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)</i>	75
2.3	<i>Extraction des glycosides de stéviol (SGs)</i>	76
2.4	<i>Quantification des glycosides de stéviol (SGs)</i>	77
2.5	<i>Evaluation et validation des méthodes</i>	77
3	RESULTATS.....	81
3.1	<i>Validation d'une méthode HPLC pour la détection de 10 SGs</i>	81
3.1.1	Identification de la méthode HPLC.....	81
3.1.2	Fidélité de la détection des 10 SGs.....	85
3.2	<i>Validation de la quantification des 10 SGs</i>	87
3.2.1	Domaines de linéarité.....	87
3.2.2	Fidélité de la quantification.....	87
3.3	<i>Validation de la méthode d'extraction</i>	89

4	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	90
CHAPITRE 2 – CARACTERISATION DE LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE DE STEVIA		
REBAUDIANA EN CONDITION DE PRODUCTION..... 93		
1	INTRODUCTION	95
2	MATERIEL ET METHODES	99
2.1	<i>Matériel végétal</i>	99
2.2	<i>Méthodes</i>	99
2.2.1	Production du matériel végétal.....	99
2.2.2	Dispositifs expérimentaux.....	99
2.2.3	Conduite de la culture	101
2.2.4	Caractérisation de la variabilité phénotypique au stade bourgeons floraux.....	101
2.2.4.1	Dates de prélèvement	101
2.2.4.2	Caractérisation de la biomasse aérienne	102
2.2.4.3	Quantification des SGs.....	102
2.2.5	Détermination du taux de reprise en 2 ^{ème} année	104
2.2.6	Analyses statistiques.....	105
2.2.6.1	Analyse de variance.....	105
2.2.6.2	Corrélation de Spearman.....	106
2.2.6.3	Régression linéaire multiple.....	106
2.2.6.4	Analyse en composante principale et clustering	106
3	PERFORMANCES DE RESSOURCES GENETIQUES DURANT 2 ANNEES DE PRODUCTION	109
3.1	<i>Variabilité de la productivité et ses composantes</i>	109
3.2	<i>Contribution des composantes au rendement en SGs</i>	111
3.3	<i>Identification des descripteurs de la canopée en lien avec le rendement en biomasse foliaire</i>	113
3.4	<i>Caractérisation des profils en glycosides de stéviol</i>	117
3.5	<i>Pérennité de la culture suite à 3 mois d'implantation</i>	119
4	PERFORMANCE DE RESSOURCES GENETIQUES EN 2 ^{EME} ANNEE DE CROISSANCE.....	121
4.1	<i>Deciphering performances of fifteen genotypes and three seeds lots of Stevia rebaudiana in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation</i>	121
4.1.1	Introduction	122
4.1.2	Materials and methods	127
4.1.2.1	Genetic resources.....	127
4.1.2.2	Field trial.....	127
4.1.2.3	Evaluation of yield and its component	129
4.1.2.4	Steviol glycosides quantification	129
4.1.2.5	Statistical analysis	129
4.1.3	Results	133
4.1.3.1	Evaluation of global genetic resources performance through SGs yield, dry leaf yield and SGs content	133
4.1.3.2	Variables involved in <i>Stevia rebaudiana</i> aerial biomass variability	135
4.1.3.3	Evaluation of SGs profiles	139
4.1.4	Discussion and conclusion	140
4.1.5	References	144

4.2	<i>Résultats complémentaires</i>	153
5	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	154
5.1	<i>Variabilité de la productivité de Stevia rebaudiana</i>	155
5.2	<i>Caractérisation de structure de la canopée</i>	157
5.3	<i>Caractérisation de la teneur et composition en SGs</i>	158
5.4	<i>Reprise de la croissance</i>	160
CHAPITRE 3 – CARACTERISATION DES COMPOSANTES DU RENDEMENT AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE STEVIA REBAUDIANA EN 2EME ANNEE DE PRODUCTION.....		163
1	INTRODUCTION	165
2	MATERIELS ET METHODES	167
2.1	<i>Matériel végétal</i>	167
2.2	<i>Méthodes</i>	167
2.2.1	Dispositif expérimental et conditions de culture	167
2.2.2	Prélèvements au cours du développement	167
2.2.3	Caractérisation de la biomasse aérienne.....	169
2.2.4	Détermination de la teneur, proportion et du rendement en SGs.....	169
2.2.5	Analyses statistiques.....	170
2.2.5.1	Analyse de variance.....	170
2.2.5.2	Comparaison des pentes de régression linéaire	170
2.2.5.3	Corrélation de Spearman.....	170
2.2.5.4	Régression linéaire multiple.....	171
3	RESULTATS.....	173
3.1	<i>Cinétique du rendement et ses composantes</i>	173
3.2	<i>Caractérisation des composantes de la canopée</i>	175
3.3	<i>Identification des descripteurs expliquant la mise en place de la biomasse foliaire</i>	183
3.4	<i>Caractérisation des profils en SGs</i>	185
4	CONCLUSION	187
4.1	<i>Caractérisation du rendement en SGs au cours de la croissance</i>	187
4.2	<i>Croissance et traits phénotypiques expliquant la variabilité en biomasse foliaire</i>	189
4.3	<i>Evolution de la composition en SGs</i>	190
CHAPITRE 4 – CARACTERISATION DE SEPTORIA SP. ET EVALUATION DE LA REPONSE DE DIX GENOTYPES DE STEVIA REBAUDIANA VIS-A-VIS DU CHAMPIGNON EN CONDITIONS CONTROLEES.....		191
1	INTRODUCTION	192
2	CHARACTERISATION OF <i>SEPTORIA</i> SP. INFECTING <i>STEVIA REBAUDIANA</i> AND SCREENING OF <i>STEVIA REBAUDIANA</i> GENOTYPES FOR THEIR RESPONSE TO THE FUNGUS.....	193
2.1	<i>Introduction</i>	195
2.2	<i>Materials and methods</i>	199
2.2.1	Materials	199
2.2.1.1	<i>Stevia rebaudiana</i> genotypes	199
2.2.1.2	Fungus strains	199

2.2.2	Methods.....	199
2.2.2.1	Isolation of the <i>Septoria</i> sp.	199
2.2.2.2	Morphological characterization of <i>Septoria</i> sp. and validation of Koch's postulates	199
2.2.2.3	Genotypic characterisation through Multiple Loci Sequence Typing.....	199
2.2.2.4	Screening of <i>Stevia rebaudiana</i> response.....	201
2.2.2.5	Statistical analysis	203
2.3	Results.....	207
2.3.1	Characterization of <i>Septoria</i> sp. present in France on <i>Stevia rebaudiana</i>	207
2.3.2	Phylogenetic classification of <i>Septoria</i> strains through Multiple Loci Sequence Typing	207
2.3.3	Evaluation of <i>Stevia rebaudiana</i> response to <i>Septoria</i> in controlled conditions	207
2.3.4	Evaluation of <i>Stevia rebaudiana</i> response into the field under natural infection.....	209
2.4	Discussion and conclusion.....	211
2.5	Literature cited.....	215
2.6	Supplemental data.....	219
 PARTIE 3 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE		225
1	LA VARIABILITE GENOTYPIQUE DE L'ESPECE <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	229
1.1	Les ressources génétiques.....	229
1.2	Caractérisation de la diversité génotypique	230
2	INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	232
2.1	Le rendement en biomasse foliaire.....	232
2.2	Teneur en SGs	233
2.3	Impact sur l'itinéraire cultural	235
2.3.1	Choix du type de sol et de la durée d'implantation.....	235
2.3.2	La densité de plantation	236
2.3.3	Le stade de récolte	236
3	CRITERES DE SELECTION POUR L'AMELIORATION DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	236
3.1	Le rendement en biomasse foliaire définit la productivité de <i>Stevia rebaudiana</i>	236
3.2	La capacité de reprise de la croissance après l'hiver garantit la pérennité de la culture	238
3.3	La quantité et la proportion des SGs définissent la qualité gustative.....	239
3.3.1	La teneur en SGs	239
3.3.2	La composition en SGs	240
3.4	La sensibilité face à la septoriose	241
4	PERSPECTIVES EN VUE D'UNE AMELIORATION GENETIQUE	242
 BIBLIOGRAPHIE		247
 ANNEXES		268

Productions scientifiques

1 Productions écrites et animations scientifiques

1.1 Publications scientifiques

Hastoy C, Cosson P, Cavaignac S, Boutié P, Waffo-Teguo P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2018. Deciphering performances of fifteen genotypes and three seeds lots of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Publication soumise au journal Industrial Crops and products*

Hastoy C, Le Bihan Z, Gaudin J, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2018. Characterisation of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for their response to the fungus. *Publication soumise au journal Plant Disease*

Cosson P, Hastoy C, Errazzu LE, Boutié P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. Genetic Diversity and Population Structure in *Stevia rebaudiana* B. Cultivated and Landraces Assessed by Nuclear SSRs. *En préparation*

1.2 Productions scientifiques

- ❖ Poster et article dans le cadre du 8^{ème} symposium de l'EUSTAS (27-28 Janvier 2015) :

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V. 2015. Towards breeding for new *Stevia rebaudiana* cultivars adapted to organic production in the South West of France: first results on genetic and phenotypic evaluation. In: *Stevia: Growth in Knowledge and Taste, Proceedings of the 8th Stevia Symposium 2015* (p. 225-232). Presented at 8. Stevia Symposium 2015, Bonn, DEU (2015-01-27 - 2015-01-28). Euprint. Ed.

- ❖ Poster dans le cadre du 9^{ème} symposium de l'EUSTAS (15-16 Septembre 2016) :

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V. 2016. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes under field conditions in the South west of France for Organic Production Establishment.

- ❖ Article dans le cadre du 9^{ème} symposium de l'EUSTAS (15-16 Septembre 2016) :

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V. 2016. Organic Stevia production and development of Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide polymorphism (SNP) molecular markers as a tool for *Stevia rebaudiana*'s germplasm characterization and future breeding purposes. In: *From Field to Fork, Proceedings of the 9th Stevia Symposium 2016* (p. 127-136). Euprint Ed.

- ❖ Article dans le cadre du 10^{ème} symposium de l'EUSTAS (13-15 Septembre 2017) :

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V. 2017. *Stevia rebaudiana* organic production establishment: taking into account *Septoria* sp.. In: *Stevia, more than sweet science!, Proceedings of the 10th Stevia symposium 2017* (p. 25-34). Euprint, Ed.

1.3 Rapports d'activité

- ❖ Rapport d'activité annuel pour l'Agence Nationale Recherche Technologie (Décembre 2015 et 2016)

1.4 Animations scientifiques

- ❖ 18 présentations orales d'avancement des travaux dans le cadre des réunions entre les partenaires impliqués dans la thèse CIFRE (Oviatis, INRA, INVENIO)
- ❖ 2 présentations orales dans le cadre des réunions de l'équipe Virologie de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Bordeaux, France) : « First breeding contribution to an organic agriculture of *Stevia rebaudiana* » (22 septembre 2015) et « Phenotypic characterisation of *Stevia rebaudiana* : focus on biomass and sweeteners profiles » (6 décembre 2016)
- ❖ 2 présentations orales dans le cadre des animations scientifiques de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Bordeaux, France) : « Characterisation of *Stevia rebaudiana* genotypes as first step of breeding strategy » (14 décembre 2015) et « *Stevia rebaudiana* : Phenotypic characterisation in field conditions for breeding purposes » (23 janvier 2017)
- ❖ Présentation orale en anglais dans le cadre des Journées Jeunes Chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA : « *Stevia rebaudiana* : Evaluation of genetic resources for an organic production and first contribution to improvement » (Bordeaux, France, 20-21 avril 2017)
- ❖ Présentation orale en anglais dans le cadre du 10^{ème} symposium de l'EUSTAS : « *Stevia rebaudiana* organic production establishment : taking into account *Septoria* sp. » (Pise, Italie, 14-15 septembre 2017)
- ❖ Participation à la 8^{ème} convention internationale de la World Stevia Organization (Stevia Tasteful 2018 ; Berlin, Allemagne, 4-5 juin 2018)

1.5 Formations complémentaires

- ❖ Formation « Statistiques multidimensionnelles » de l'INRA (14h ; 2015)
- ❖ Formation « Perfectionner sa pratique de R : analyse de variance et analyse multivariée, régressions » de l'URFIST (12h ; 2016)
- ❖ Formation « Le modèle Linéaire » de l'INRA (17h ; 2017)

2 Activités transversales pour la société Oviatis

2.1 Productions écrites

- ❖ Rapport d'activité de Recherche et Développement pour le Crédit Impôt Recherche, pour l'année 2014, correspondant à mon stage de fin d'étude (août 2015)
- ❖ Rapport d'état d'avancement de la thèse CIFRE pour la Région Aquitaine (Décembre 2015, 2016 et 2017)

2.2 Animations scientifiques

- ❖ Participation au « Petit dej' investisseurs » pour la levée de fond de la société Oviatis par financement participatif (crowdfunding) : présentation de la Recherche & Développement effectuée pour l'implantation de la culture en Aquitaine (10 mars 2017). Cette levée de fond a fait l'objet d'un article dans le journal « La dépêche » :

<https://www.ladepeche.fr/article/2017/03/15/2536288-une-stevia-100-bio-et-locale.html>

- ❖ Interview pour l'hebdomadaire de Bordeaux TV (Web TV de Bordeaux et sa métropole) avec Philippe Boutié (Président d'Oviatis) pour la présentation de la société Oviatis et son partenariat avec l'INRA (13 juillet 2017)

<http://www.bordeaux.tv/bordeaux-hebdo-13072017-cecile-hastoy-inra-philippe-boutie-oviatis/>

- ❖ Présentation orale au Kiff Off Meeting de la structure Karma Produce, issue d'un partenariat entre Agricorp (Monaco) et Oviatis (Agen, France) pour l'implantation de la production de Stévia à Madagascar: « Mise en place d'un programme d'amélioration de *Stevia rebaudiana* pour l'implantation d'une filière BIO – Bilan de 4 ans de Recherche et Développement » (27 février 2018)

Liste des abréviations

DIVERS

ACN	Acétonitrile
BIC	Bayesian Information Criterion
GAs	Gibbérellines
(RP)HPLC	(Reversed Phase) High Performance Liquid Chromatography
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
MS	Matière sèche
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
NPK	Azote, phosphore et potassium
UV	Ultraviolet

GLYCOSIDES DE STEVIOL

DulA	Dulcoside A
RebA	Rebaudioside A
RebB	Rebaudioside B
RebC	Rebaudioside C
RebD	Rebaudioside D
RebF	Rebaudioside F
RebM	Rebaudioside M
Rub	Rubusoside
SGs	Glycosides de stéviol
ST	Stévioside
SV	Stéviol

ACIDES NUCLEIQUES ET MARQUEURS MOLECULAIRES

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
bp	Paire de base
EST	Expressed Sequence Tag
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat
Mb	Mégabase (1 million de bp)
nt	Nucléotide
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SSR	Simple Sequence Repeat

DESCRIPTEURS DE LA CANOPEE ET CROISSANCE

LAI	Leaf Area Index
LMR	Leaf Mass Ratio
RGR	Relative Growth Rate
SLA	Specific Leaf Area
SLM	Specific Leaf Mass
SSM	Specific Stem Mass

UNITES

°C	Degré Celsius
g	Gramme
ha	Hectare
L	Litre
m	Mètre
M	Molaire
T	Tonne (10 ³ kg)
V	Volt
w/w	weight/weight ; poids/poids

Facteur de multiplication

m	Milli- (10 ⁻³)
μ	Micro- (10 ⁻⁶)
n	Nano- (10 ⁻⁹)

Table des illustrations

Partie 1. Contexte économique et scientifique

Chapitre 1. Contexte économique de l'étude

Figure I.1.1. Carte mondiale de l'approbation réglementaire des édulcorants de <i>Stevia rebaudiana</i> pour la consommation (PureCircle Stevia Institute, 2018)	6
Figure 1.2. Illustration de <i>Stevia rebaudiana</i> en condition de production	7
Figure 1.3. Distribution mondiale de la culture de <i>Stevia rebaudiana</i> (Gantait <i>et al.</i> , 2018)	7

Chapitre 2. Contexte scientifique

Figure I.2.1. Morphologie de <i>Stevia rebaudiana</i> (Tiré de Carneiro, 2007)	12
Figure I.2.2. Illustration des stades de développement de <i>Stevia rebaudiana</i>	12
Figure I.2.3. Illustrations des stades de floraison de <i>Stevia rebaudiana</i>	14
Figure I.2.4. Types d'akènes chez <i>Stevia rebaudiana</i>	16
Figure I.2.5. Pollinisation entomophile chez <i>Stevia rebaudiana</i> par des bourdons	18
Figure I.2.6. Structure chimique du stéviol (SV), partie aglycone des glycosides de stéviol (SGs) (Perera <i>et al.</i> , 2017)	20
Figure I.2.7. Biosynthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes, par la voie plastidiale du méthylérithritol phosphate plastidiale (Tiré de Ceunen, 2012)	22
Figure I.2.8. Biosynthèse du Stéviol, précurseur des glycosides de stéviol (Tiré de Ceunen, 2012)	22
Figure I.2.9. Biosynthèse connue des glycosides de stéviol (Tiré de Ceunen, 2012)	24
Figure I.2.10. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol (Adaptée de Brandle and Telmer, 2007; Ceunen and Geuns, 2013a; G. Singh <i>et al.</i> , 2017)	26
Figure I.2.11. Représentation schématique spatiale de la teneur en glycosides de stéviol en conditions de jours longs (Ceunen & Geuns, 2013c)	30
Figure I.2.12. Représentation schématique des stades de développement chez <i>Stevia rebaudiana</i> et évolution de la teneur en glycosides de stéviol (Adapté de Ceunen & Geuns, 2013a)	32
Figure I.2.13. Seuils de détection de 9 SGs (μM) pour les saveurs amères et sucrées (Hellfritsch <i>et al.</i> , 2012)	39
Figure I.2.14. Absorption, digestion, métabolisation, et excrétion des glycosides de stéviol chez l'homme (Magnuson <i>et al.</i> , 2016)	40
Figure I.2.15. Variabilité de la morphologie aérienne de <i>Stevia rebaudiana</i> (Tateo <i>et al.</i> , 1998)	44
Figure I.2.16. Variabilité de teneur et composition en SGs dans une collection de 96 génotypes de la variété Criolla (Barbet-Massin <i>et al.</i> , 2016)	47
Figure I.2.17. Plants de <i>Stevia rebaudiana</i> atteint par <i>Sclerotium rolfsii</i> , responsable de maladie racinaire	52
Figure I.2.18. Plants de <i>Stevia rebaudiana</i> atteint par la septoriose	52
Figure I.2.19. Stratégie d'amélioration utilisée chez <i>Stevia rebaudiana</i>	62
Tableau I.2.1. Caractéristiques des 10 glycosides de stéviol majoritairement produits chez <i>Stevia rebaudiana</i> (Adapté de Ceunen, 2012 ; Barbet-Massin, 2015)	20
Tableau I.2.2. Liste exhaustive des édulcorants stricto-sensu connus dans le monde et leurs caractéristiques	36
Tableau I.2.3. Microorganismes affectant <i>Stevia rebaudiana</i> dans le monde, provoquant des maladies foliaires, racinaires et de la tige	50

Tableau I.2.4. Marqueurs moléculaires développés chez <i>Stevia rebaudiana</i>	58
Tableau I.2.5. Liste des dépôts de brevet pour des variétés de <i>Stevia rebaudiana</i> depuis 1998	60-61
Partie 2. Résultats des travaux de thèse	
Chapitre 1. Développement et validation de la méthode d'extraction et de quantification des glycosides de stéviol	
Figure II.1.1. Chromatogrammes comparatifs d'un mélange de 7 SGs standards à 125 ng/μL sur colonne NH ₂ et C ₁₈ de dimension 150 x 4,6 mm, 5μm	80
Figure II.1.2. Chromatogramme d'un mélange de 10 SGs standards à 50 ng/μL sur colonne Poroshell EC-C18	80
Figure II.1.3. Validation de la détection des 10 SGs par ajout de 100 ng/μL de composé pur à une matrice d'extraction végétale	82-83
Figure II.1.4. Reproductibilité de l'éluion des 10 SGs par la méthode développée durant l'utilisation d'une colonne Poroshell 120 EC-C18	85
Figure II.1.5. Représentation graphique des gammes étalons valides pour les 10 SGs quantifiés	86
Figure II.1.6. Carte de contrôle de la quantification des SGs dans l'échantillon de référence interne	88
Tableau II.1.1. Nom, formule, teneur par rapport à la masse sèche foliaire et masse molaire des 10 glycosides de stéviol (SGs) étudiés	75
Tableau II.1.2. Récapitulatif de la comparaison de 2 colonnes C18 pour la détection de 10 SGs	82
Tableau II.1.3. Paramètres de la quantification des 10 SGs suite à la régression linéaire entre la surface détectée et la concentration en SGs purs des gammes étalons	86
Tableau II.1.4. Répétabilité de l'injection et la quantification des 10 SGs	88
Tableau II.1.5. Répétabilité et reproductibilité de l'extraction des SGs	89
Chapitre 2. Caractérisation de la variabilité phénotypique de <i>Stevia rebaudiana</i> en condition de production	
Figure II.2.1. Données climatiques mensuelles durant le temps de l'expérimentation pour le site de Liposthey et de Sainte-Livrade	100
Figure II.2.2. Voile d'hivernage installé au mois de Décembre 2016 pour le passage de l'hiver (Ste-Livrade, 47)	100
Figure II.2.3. Illustration de la reprise de la croissance de <i>Stevia rebaudiana</i> en 2 ^{ème} année de production	104
Figure II.2.4. Evaluation de la productivité de ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux, dans 2 sites expérimentaux pendant 2 années de culture	108
Figure II.2.5. Corrélation entre les composantes du rendement de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de culture	112
Figure II.2.6. Caractérisation de 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux en 2 ^{ème} année de production dans 2 sites de production selon 4 descripteurs de la canopée	114
Figure II.2.7. Profils en SGs majoritaires d'une collection de 15 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> dans 2 sites durant 2 années de production	116
Figure II.2.8. Taux de reprise de la croissance (%) en 2 ^{ème} année de production pour 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> dans les sites de production de Ste-Livrade et Liposthey	118
Figure II.2.9. Taux de reprise de la croissance (%) en 2 ^{ème} année de production pour 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> dans les sites de production de Ste-Livrade et Liposthey dans le cas d'une implantation longue en 1 ^{ère} année	152

Tableau II.2.1. Ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> évaluées en condition de production	98
Tableau II.2.2. Variables utilisées pour la caractérisation de la biomasse aérienne de <i>Stevia rebaudiana</i> en conditions de production	102
Tableau II.2.3. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires mixtes du rendement en SGs et ses composantes pour 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de production	108
Tableau II.2.4. Décomposition de la variance du rendement en SGs chez <i>Stevia rebaudiana</i> en fonction du rendement en biomasse foliaire et de la teneur en SGs	112
Tableau II.2.5. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés des proportions en SGs doux et amers pour 15 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de production	116
Tableau II.2.6. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés des taux de reprise en 2 ^{ème} année pour 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux	118
Tableau II.2.7. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés du taux de reprise de croissance en 2 ^{ème} de production pour 18 ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> sur les 2 sites expérimentaux dans le cas d'une implantation longue en 1 ^{ère} année de production	152

Publication 1: Deciphering performances of fifteen genotypes and three seeds lots of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation

Table 1. Genetic resources of <i>Stevia rebaudiana</i> studied in field conditions in the South-west of France: provider, name of genetic resources, year of obtention, type of plant material used and origin before selection	126
Table 2. Organic status and elements composition at 30 cm depth of the sandy experimental field in 2017	127
Table 3. Quantitative variables used for the characterisation of <i>Stevia rebaudiana</i> phenotypic variability under field conditions	128
Figure 1. Yield component of <i>Stevia rebaudiana</i> genotype and seed lots (S) during harvesting at flower budding stage obtained in field conditions	132
Figure 2. Correlation between yield component during harvesting at flower budding stage	134
Figure 3. Main morphotypes of <i>Stevia rebaudiana</i> observed into genetic resources collection in field conditions	135
Figure 4. Classification of <i>Stevia rebaudiana</i> genetic resources according to morphotypes linked to foliar biomass production	136
Figure 5. Caracterisation of SGs profiles on 15 genotypes in field condtions	138

Chapitre 3. Caractérisation des composantes du rendement au cours du développement de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de production

Figure II.3.1. Evolution des composantes du rendement au cours du développement de 5 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> en 2 ^{ème} année de production	172
Figure II.3.2. Corrélations entre le rendement en SGs et ses composantes au cours de la croissance de 5 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	174

Figure II.3.3. Illustration de la variabilité morphologique de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> en 2 ^{ème} année de croissance en conditions de production à deux dates de prélèvement	175
Figure II.3.4. Evolution spatiale de la canopée au cours du développement de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	176
Figure II.3.5. Evolution du taux de croissance relatif (RGR, mg/g/jour) de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au cours du développement	176
Figure II.3.6. Evolution de la distribution de la biomasse au cours du développement de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	178
Figure II.3.7. Evolution de composantes de la croissance de au cours du développement de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	180
Figure II.3.8. Caractérisation de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au cours de la 2 ^{ème} année de croissance selon 6 descripteurs de la canopée	182
Figure II.3.9. Proportion en 5 SGs majeurs de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au cours de la 2 ^{ème} année de production	184
Tableau II.3.1. Résumé de la variabilité phénotypique des 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> observée en 1 ^{ère} année de croissance à Liposthey	167
Tableau II.3.2. Date de caractérisation des composantes du rendement en 2 ^{ème} année de croissance et stade ontogénique correspondant pour 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> sur la parcelle expérimentale de Liposthey	168
Tableau II.3.3. Détermination des 15 variables décrivant la biomasse aérienne au cours de la croissance de 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	168
Tableau II.3.4. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes du rendement en SGs et ses composantes pour 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au cours de la 2 ^{ème} année de croissance	172
Tableau II.3.5. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes des descripteurs de la canopée pour 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> au cours de la 2 ^{ème} année de production	174
Tableau II.3.6. Table de corrélation entre le rendement en biomasse foliaire et les descripteurs de la canopée	182
Tableau II.3.7. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes des proportions en 5 SGs	184
Tableau II.3.8. Coefficients de régression linéaire de la proportion en ST et RebA en fonction du temps pour 5 géotypes de <i>Stevia rebaudiana</i>	186

Chapitre 4. Caractérisation de *Septoria* sp. et évaluation de la réponse de dix géotypes de *Stevia rebaudiana* vis-à-vis du champignon en conditions contrôlées

Publication 2: Characterisation of *Septoria* sp. Infecting *Stevia rebaudiana* and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for their response to the fungus

Table 1. Genetic resources of <i>Stevia rebaudiana</i> studied for their response to <i>Septoria</i> leaf spot disease through controlled inoculation	198
Table 2. Isolated strains of <i>Septoria</i> genus in field conditions on <i>Stevia rebaudiana</i>	198
Table 3. Primers used in this study for the classification of <i>Septoria</i> species isolated on <i>Stevia rebaudiana</i> in field conditions as described by (Verkley et al., 2013)	200
Figure 1. Identification of <i>Septoria</i> leaf spot disease on <i>Stevia rebaudiana</i> in the South West of France	206

Figure 2. Phylogenetic classification of <i>Septoria</i> strains isolated on <i>Stevia rebaudiana</i> in France through Multiple Loci Sequence Typing	206
Figure 3. Evolution of <i>Septoria</i> leaf spot disease between 12 and 21 days after inoculation on 10 genotypes of <i>Stevia rebaudiana</i> after inoculation in controlled conditions	208
Figure 4. Evaluation of 10 <i>Stevia rebaudiana</i> genotypes response in controlled conditions to <i>Septoria</i> strain from Southwestern France	208
Figure 5. Evaluation of eight <i>Stevia rebaudiana</i> genotypes response against <i>Septoria</i> strain in the field at Liposthey (France) in September 2017 after natural infection	210
Table S1. P-value of ANOVA Type II analysis on linear mixed model for disease severity variables (Disease Proportion scores, Area Under the Disease Progress Curve, Proportion of Symptomatic Area) in controlled conditions experiment and field experiment	219
Table S2. Linear regression parameter of Disease Proportion score according to time after inoculation for 10 genotypes of <i>Stevia rebaudiana</i> (Figure 4). Result of multiple comparison on slope coefficient by HSD's Tuckey test are indicated by letter. Same letter shows no significant difference at P = 0.05 level	219
Figure S1. Validation of Koch's postulates	220
Figure S2. Pipeline of the evaluation of <i>Stevia rebaudiana</i> response against <i>Septoria</i> strain Sep-15-LIP in controlled conditions and automated inoculation	220
Figure S3. Phylogenetic classification of <i>Septoria</i> strains isolated on <i>Stevia rebaudiana</i> in France through Multiple Loci Sequence Typing	221-224

– Partie 1 –

Contexte économique et scientifique

– Chapitre 1 –
Contexte économique

1 Sucre, saveur sucrée et santé humaine

Il est largement admis que l'homme préfère la saveur sucrée dès le plus jeune âge et qu'elle reste la saveur la plus désirée comparée au salé ou à l'amertume (Carocho *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017). Ceci s'explique par les émotions positives qu'elle engendre, telles que le plaisir ou la satisfaction (Kim *et al.*, 2017). Cependant, la consommation excessive de sucre est connue pour participer à l'apparition de diabète ou à l'obésité. Dans les pays développés, la forte augmentation de ces désordres métaboliques est directement reliée à la consommation de sucre, et leur proportion est considérée comme épidémique (Carocho *et al.*, 2017).

Pour diminuer la quantité de sucre absorbé par l'organisme, les édulcorants ont été largement utilisés par les industries agro-alimentaires depuis leur découverte à partir des années 1800 en tant qu'additif alimentaire (Carocho *et al.*, 2017). Les édulcorants sont des molécules, naturelles ou synthétiques, à pouvoir sucrant qui apportent peu ou pas de calories lors de leur ingestion. De nos jours, leur usage et leur effet sur le métabolisme humain sont très controversés et débattus dans la littérature (Romo-Romo *et al.*, 2017). L'exemple le plus connu est celui de l'aspartame, édulcorant de synthèse dont des propriétés carcinogènes ont été démontrées (Soffritti *et al.*, 2006). Les résultats cliniques pour l'évaluation des effets des édulcorants naturels ou de synthèse sont hétérogènes, voir non comparables (Romo-Romo *et al.*, 2017) et nécessitent d'être évalués séparément en fonction de leur métabolisation (Magnuson *et al.*, 2016). De plus, les édulcorants synthétiques sont perçus par l'opinion publique comme des produits chimiques pouvant être nocifs, et les consommateurs cherchent à revenir vers des produits naturels, peu transformés (Wagner, 2012).

Dans ce contexte, les feuilles de *Stevia rebaudiana* (Bertoni), espèce originaire du Paraguay, sont apparues comme une nouvelle source d'édulcorant. *Stevia rebaudiana* accumule, en particulier dans ses feuilles, des glycosides de stéviol au goût sucré. Ces molécules présentent de nombreux avantages: pouvoir sucrant 300 fois supérieur au sucre, acalorique, non cariogène, utilisable en cuisson et d'origine naturelle (Wagner, 2012). De récentes études ont même démontré de nombreux effets thérapeutiques de la Stévia (Carrera-Lanestosa *et al.*, 2017; Mathur *et al.*, 2017). Bien qu'utilisé depuis des centaines d'années par les populations du Paraguay, l'acceptation de ces nouveaux édulcorants par les autorités sanitaires des pays hors Amérique du Sud a été longue depuis leur découverte, rendant leur utilisation à travers le monde relativement récente.



Figure I.1.2. Illustration de *Stevia rebaudiana* en condition de production en France. (A) Parcelle expérimentale de *Stevia rebaudiana* en France en 1^{ère} année de production (Liposthey, France). (B) Plant de *Stevia rebaudiana* au stade de récolte des feuilles en 1^{ère} année de croissance. (C) Plants en reprise de la croissance en 2^{ème} année de production. Crédit photo : C. Hastoy

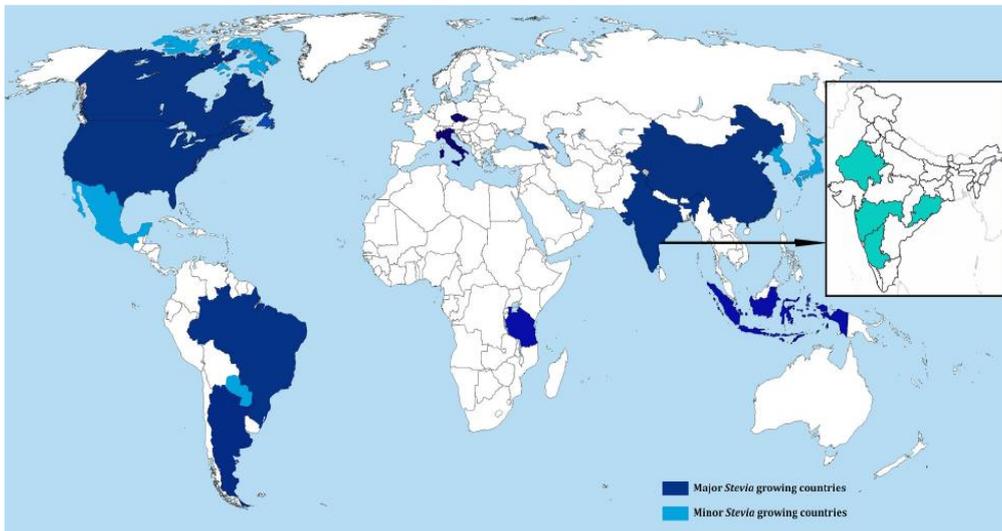


Figure I.1.3. Distribution mondiale de la culture de *Stevia rebaudiana* (Gantait et al., 2018). Les pays en bleu foncés sont considérés par l'auteur comme producteur majeur, alors que les pays en bleu clair sont considérés comme mineurs.

3 La culture de la Stévia au niveau mondial

Stevia rebaudiana est originaire des régions montagneuses au nord-est du Paraguay (Brandle & Rosa, 1992a). En habitat naturel, elle croît au bord de marais ou en prairie avec des nappes phréatiques peu profondes. Ces sols peuvent être sableux ou boueux, et infertiles. Le climat est considéré comme semi-humide, voir tropical, avec une large gamme de températures allant de -6°C à 43°C, et d'en moyenne de 23°C (Brandle & Rosa, 1992b).

La Stévia est cultivée pour ses feuilles (Figure I.1.2), contenant les édulcorants d'intérêt (Soejarto *et al.*, 1983). *Stevia rebaudiana* est une plante pérenne de jours-courts, avec une photopériode critique comprise entre 12h et 13h conduisant à sa floraison (Brandle *et al.*, 1998). L'accumulation maximale en édulcorants dans les feuilles est atteint avant la floraison (Ceunen & Geuns, 2013), définissant le stade récolte. Ces besoins photopériodiques rendent idéale la culture de la Stévia en conditions tempérées avec des jours longs en été (Ramesh *et al.*, 2006). Suivant les pays de production, la durée de la croissance végétative varie et amène à différentes stratégies de récolte, allant d'une récolte par an (Parris *et al.*, 2016), à plusieurs récoltes par an (Pal *et al.*, 2015) pour obtenir le meilleur rendement. Les rendements de production augmentent au fil des années de culture (Andolfi *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2015), rendant plus avantageuse la culture pérenne qu'annuelle. Après la récolte, les feuilles sont séchées et séparées des tiges (séchage et effeuillage) (Shantanu, 2018). Les édulcorants sont ensuite extraits, purifiés et cristallisés pour leur commercialisation.

Sa culture s'est étendue à l'ensemble des continents (Figure I.1.3), avec une production majoritaire en Asie et en Amérique (Ramesh *et al.*, 2006; Gantait *et al.*, 2018). La Chine est très nettement le premier pays producteur depuis les années 1980. En 2016, la Chine a produit 80% de la production mondiale de feuilles, correspondant à 50 000-60 000 tonnes de feuilles sèches par an (Sun, 2016). Pour chaque situation pédo-climatique, la culture de la Stévia à des fins de production industrielle nécessite l'identification d'un itinéraire cultural bien précis et adapté aux besoins de cette espèce.

4 Etat des lieux en Europe et en France

Après l'approbation par l'EFSA, l'Europe a eu le plus fort taux de croissance annuel (+149%) d'utilisation des édulcorants de la Stévia entre 2009 et 2014 (Angelini *et al.*, 2018). De la même manière, en 3 ans seulement ces édulcorants ont gagné 36% des parts de marché des édulcorants français (Lentscher, 2012). La Commission Européenne a très récemment revu le statut des feuilles de Stévia, qui ont été déclassées du statut « Novel food » et autorisées à la consommation en infusion (European Commission, 2017). L'augmentation des coûts de production en Chine et le manque d'informations sur la production et la qualité de la matière première amènent les industriels à diversifier leur source de feuilles (Angelini *et al.*, 2018). Le leader français de la production d'édulcorants purifiés, Stevia Natura (Clermont-Ferrand, France), importe des feuilles depuis le Paraguay (filiale SteviaCorp) et l'Inde (ACE AGRO Biosciences) issus d'une agriculture sans pesticides ni engrais chimiques (Stevia Natura, 2017).

Dans ce contexte, la Stévia est apparue comme une nouvelle culture potentielle pour les agriculteurs en Europe (Angelini *et al.*, 2018). Pour implanter et accroître la production de Stévia, un grand nombre d'expérimentations ont eu lieu, au Portugal (Lankes & Grosser, 2015), en Allemagne (Lankes & Zabala, 2011), au Danemark (Grevsen & Sorensen, 2016), en Italie (Andolfi *et al.*, 2006; Macchia *et al.*, 2007; Tavarini & Angelini, 2013; Karimi *et al.*, 2015), en Grèce (Zachokostas, 2015), en Suisse (Vouillamoz *et al.*, 2015) et en France (Barbet-Massin, 2015; Hastoy *et al.*, 2015, 2016). Toutes ces études ont montré que la culture de la Stévia est possible, et économiquement rentable (Ferrazzano *et al.*, 2016), mais nécessite l'identification d'un itinéraire cultural adapté à chaque condition (Angelini *et al.*, 2018) et de génotypes productifs adaptés.

Pour répondre à la demande des consommateurs cherchant des produits naturels pour une alimentation saine et équilibrée, le projet de filière BIO entièrement française, Aquitaine Stévia Innovation (ASI), est apparu en 2012 (Oviatis, 2015). La filière ASI est composée d'une association de producteurs aquitains (Sweetvia) et de la structure de transformation et de commercialisation Oviatis, créée en décembre 2013. Depuis, Oviatis a été identifié comme le pionnier de la Stévia BIO française (Rabiller, 2016). Pour développer la culture de la Stévia répondant aux exigences de l'agriculture biologique, Oviatis a établi des partenariats avec Invenio (Station d'Expérimentation Fruit et Légumes), pour l'identification d'un itinéraire cultural, et avec l'INRA pour la mise en place d'un programme de sélection et d'amélioration variétale de *Stevia rebaudiana*.

– Chapitre 2 –
Contexte scientifique

1 Stevia rebaudiana, l'herbe sucrée du Paraguay

1.1 Historique

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni est une plante herbacée vivace, faisant partie de la famille des Asteraceae, communément appelée « Stévia » ou « Ka-à He-é » au Paraguay, qui signifie l'herbe sucrée. Originaires de la Cordillère des Andes, au nord-est du Paraguay (Ceunen & Geuns, 2013c), la découverte de son pouvoir sucrant pour la communauté scientifique a été attribuée au botaniste italo-suisse Moisés Santiago Bertoni en 1899 (Kinghorn, 2002). Il fut le premier à décrire l'espèce, qu'il nomma d'abord *Eupatorium rebaudianum* Bertoni, en hommage au chimiste paraguayen Ovidio Rebaudi, qui réalisa par la suite les premières analyses chimiques des glucosides présents dans ses feuilles sur cette espèce (Yadav *et al.*, 2011). En 1904, Bertoni classe finalement l'espèce dans le genre *Stevia*, et la nomme définitivement *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bertoni, 1905). Elle est l'espèce la mieux connue du genre *Stevia* qui comporte 237 espèces de type herbacé, arbustif ou sous-arbustif, distribuées du Sud des Etats-Unis au Nord de la Patagonie en Argentine (Gutiérrez *et al.*, 2016). En 1931, deux chimistes français élucident la structure chimique de la principale molécule sucrante, le Stéviolside (ST), un glycoside de stéviol (SGs) présent dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* (Bridel & Lavieille, 1931).

Il n'a pas été identifié d'autres espèces du genre *Stevia* ayant un pouvoir sucrant comparable à *Stevia rebaudiana*, hormis *Stevia phlebophylla* A. Gray, mais cette dernière est considérée comme une espèce disparue (Soejarto *et al.*, 1982, 1983). Les SGs ont également été identifiées chez deux autres espèces (Ceunen & Geuns, 2013c) : *Rubus suavissimus* S. Lee (Rosaceae) (Tanaka *et al.*, 1981) et *Angelica keiskei* (Apiaceae) (Zhou *et al.*, 2012). Ces dernières ont été considérées comme moins intéressantes que la Stévia à cause de leur accumulation moindre en SGs et leur saveur.

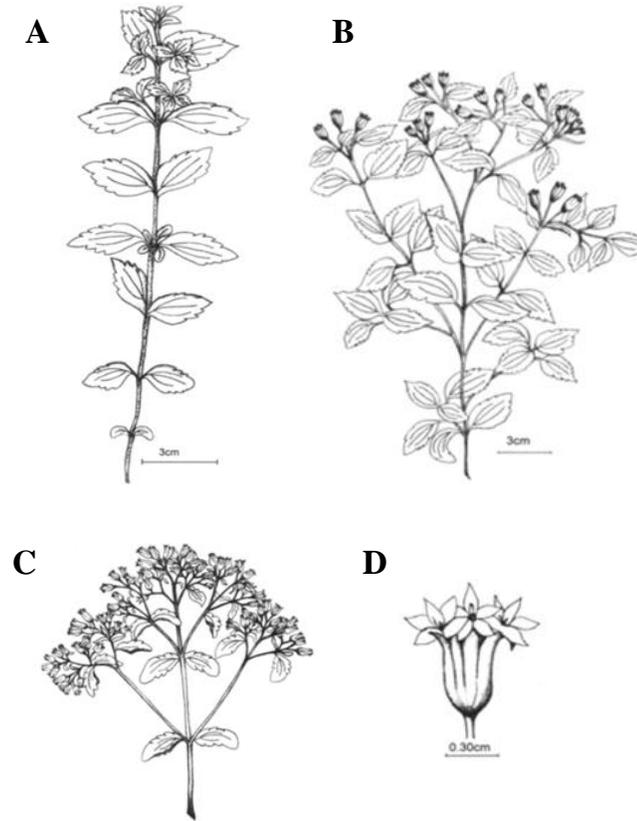


Figure I.2.1. Morphologie de *Stevia rebaudiana* (Tiré de Carneiro, 2007). (A) Tige principale caractéristique en croissance végétative. (B) Tige principale avec ramification des méristèmes axillaires, où les apex se sont différenciés en bourgeons floraux. (C) Capitules en corymbe. (D) Capitule contenant en moyenne 5 fleurs blanches.

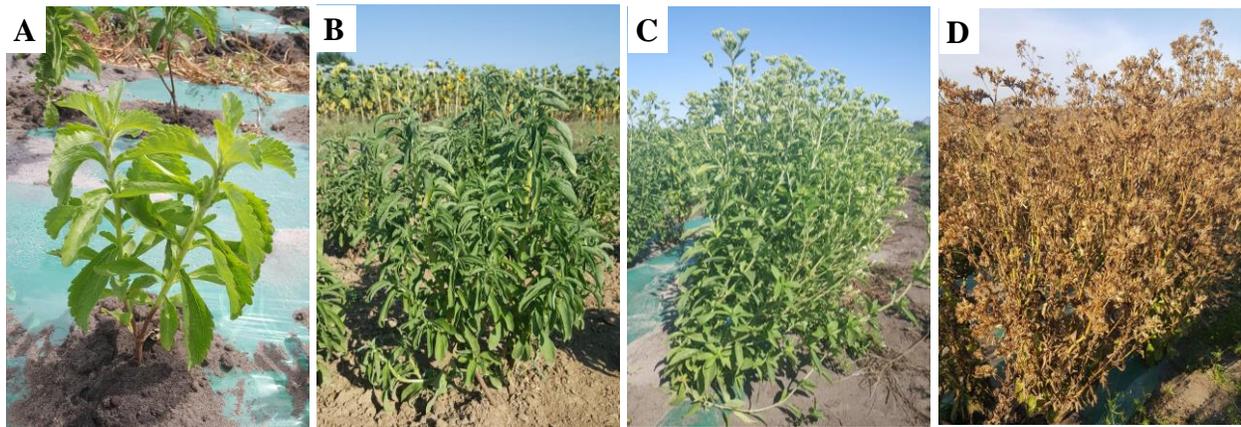


Figure I.2.2. Illustration des stades de développement de *Stevia rebaudiana*. (A) Stade végétatif précoce. (B) Stade végétatif tardif. (C) Stade bourgeons floraux. (D) Floraison. Photos prises sur les parcelles expérimentales de Ste-Livrade sur Lot (47) et Liposthey (40). Crédit photo : C. Hastoy

1.2 Description botanique

La Stévia est décrite comme une plante herbacée pérenne, ayant un système racinaire peu profond et étendu, des tiges minces, fragiles et peu ramifiées à l'état naturel, sur lesquelles croient de petites feuilles elliptiques (Yadav *et al.*, 2011; Ceunen & Geuns, 2013c). La plante peut atteindre une hauteur de 50 à 70 cm, voire 80 cm dans son milieu naturel, et 1,50 m en terre fertile (Wagner, 2012). Les feuilles sont petites, vertes, oblongues, et lancéolées (Figure I.2.1 A). Elles sont alternées, sub-sessiles, et opposées au niveau des nœuds. Les trichomes à leur surface peuvent être grands (4-5 μm) ou petits (2,5 μm).

Comme tous les genres qui composent la famille des Asteraceae, l'inflorescence de la Stévia est formée de capitules¹ en corymbe². Chaque capitule est enveloppée dans un involucre (ensemble de bractées³) et se compose de 2 à 6 fleurons à corolle actinomorphe⁴ (Figure I.2.1 B-D.). Les fleurs sont hermaphrodites, car elles renferment les organes mâles et femelles. Le stigmate est bilobé, bifurquant du milieu et le style est entouré par les anthères (Yadav *et al.*, 2011).

1.3 Stade de développement

Le développement de cette espèce a été précisément décrit en 4 phases de croissance végétative après germination et 5 phases reproductrices (Carneiro, 2007), puis simplifié en 4 grandes phases (Ceunen & Geuns, 2013a): croissance végétative précoce, croissance végétative tardive, formation des bourgeons floraux et floraison (Figure I.2.2).

1.3.1 Croissance végétative

La croissance végétative précoce débute par l'apparition des cotylédons et de l'hypocotyle. Elle est suivie par la croissance de l'axe principal, par la formation de nœuds successifs portant une paire de feuilles. La croissance végétative tardive correspond au développement de méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles, qui donneront des ramifications secondaires, voire tertiaires. La ramification peut être stimulée pendant la croissance végétative par la décapitation des méristèmes apicaux (Pal *et al.*, 2013).

¹ Fleurs sans pédoncules regroupées sur un réceptacle entouré de bractées ; ² Inflorescence dans le même plan ; ³ Pièce florale en forme de feuille ; ⁴ Symétrie radiale, en étoile

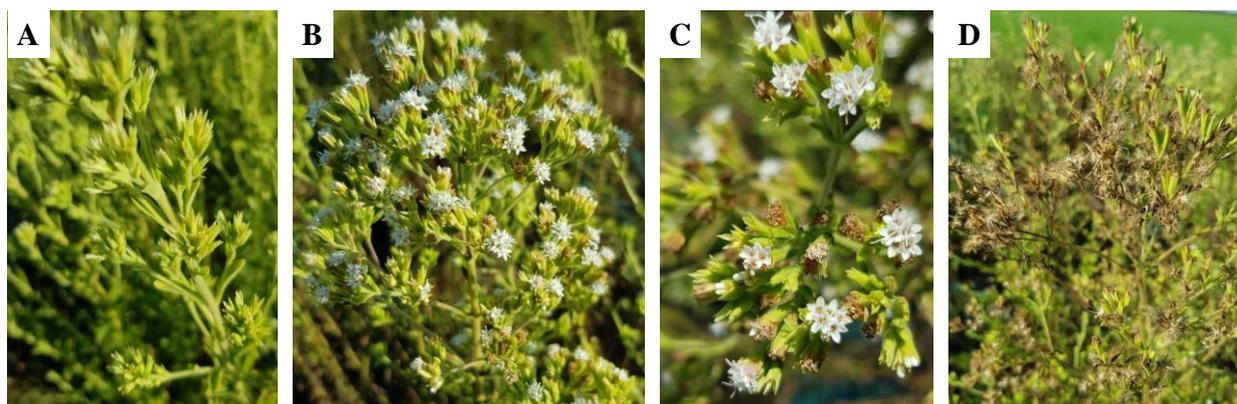


Figure I.2.3. Illustrations des stades de floraison de *Stevia rebaudiana*. (A) Bourgeons floraux : les apex sont différenciés en bourgeons floraux. (B) Floraison : anthèse, correspondant au stade de pollinisation. (C) Développement des graines : la croissance des graines est terminée lorsque les pétales sont bruns. (D) Dispersion des graines : maturation complète des graines, avec déploiement des aigrettes pour la dispersion. Photos prises sur une parcelle expérimentale à Liposthey en 2017 (Landes, France). Crédit photo : C. Hastoy

En conditions contrôlées de jours longs (photopériode de 16h), la phase végétative de croissance est allongée et dure 120 jours au lieu de 33 jours avec une photopériode de 8h (Ceunen & Geuns, 2013a). Ces conditions montrent une augmentation de la longueur des entrenœuds, de la surface et biomasse foliaire (4,4 fois supérieur), et une réduction de l'intervalle d'apparition des paires successifs de feuilles (Metivier & Viana, 1979; Ceunen & Geuns, 2013a).

La Stévia est une espèce pérenne. Dans le cas d'une production en Italie, la biomasse foliaire d'un génotype a augmenté à partir de la 3^{ème} année de production (de environ 70 à 120 g MS/plant), atteignant son maximum en 6^{ème} année (environ 150 g/plant), et diminuant à son minimum par la suite (Andolfi *et al.*, 2006). Les auteurs ont montré également que cette dynamique est dépendante du génotype puisque le second testé voit son rendement diminuer en 6^{ème} année. La Stévia apparaît donc comme économiquement rentable au moins sur 5 ans. Cependant, la pérennité de cette culture est dépendante de la reprise de la croissance après l'hiver. En France, un taux de survie de seulement 17% a été reporté dans une étude, démontrant la nécessité de sélectionner des génotypes adaptés au passage de l'hiver (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Les mécanismes de mise en réserve au niveau racinaire et de reprise après l'hiver n'ont pas encore été étudiés pour cette espèce.

1.3.2 Reproduction

1.3.2.1 Stades de floraison

La phase de reproduction de *Stevia rebaudiana* se compose de 5 stades et dure plus de 30 jours : formation des bourgeons floraux, anthèse, développement des graines, dispersion des graines, et sénescence de la plante (Carneiro, 2007; Raina *et al.*, 2013) (Figure I.2.3). Une fois les bourgeons floraux formés, la production de tiges est nettement favorisée au détriment des feuilles. Ceci se traduit par une diminution du LMR (Leaf Mass Ratio) tout au long de la croissance pour atteindre sa valeur la plus faible à la floraison (Barbet-Massin, 2015). Une étude approfondie des parties reproductives a permis d'établir la chronologie des événements pendant la floraison. La déhiscence des anthères commence lorsque les fleurs ne sont pas ouvertes. Le pollen est excrété dès que les fleurs s'ouvrent. La réceptivité du stigmate pour la germination du pollen coïncide avec l'ouverture complète des fleurs (Raina *et al.*, 2013). La période de floraison est fortement dépendante du génotype, amenant à définir des génotypes précoces et tardifs (Martini *et al.*, 2017).

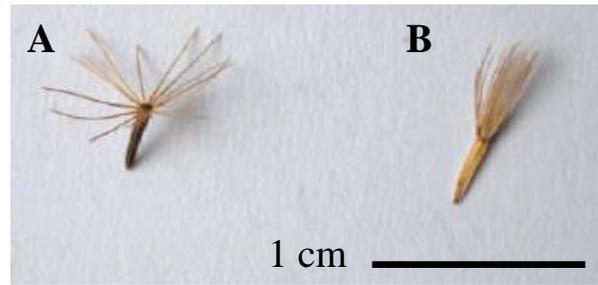


Figure I.2.4. Types d'akènes chez *Stevia rebaudiana*. (A) Akène noir fertile issu de fécondation. (B) Akène clair stérile. Crédit photo : Z. Le-Bihan

1.3.2.2 Auto-incompatibilité sporophytique

Son mode de reproduction est depuis longtemps considéré comme régi par des phénomènes d'auto-incompatibilité correspondant à de l'allogamie stricte (Yadav *et al.*, 2011; Raina *et al.*, 2013). Il existe deux systèmes d'auto-incompatibilité : gamétophytique lorsque le rejet est déterminé par le génotype du pollen haploïde, ou sporophytique quand l'incompatibilité est basée sur le génotype diploïde du parent mâle (Koseva *et al.*, 2017). Des mécanismes moléculaires interviennent dans la reconnaissance et le rejet de pollen « incompatible » lors de l'interaction pollen-pistil. Chez les Brassicaceae, la machinerie moléculaire SKR/SCR (S-LOCUS RECEPTOR KINASE/S-LOCUS CYSTEINE-RICH PROTEIN) conduit à l'auto-incompatibilité (Allen *et al.*, 2011). Chez les Asteraceae, l'auto-incompatibilité est sporophytique, mais les gènes du locus-S n'ont pas été clairement identifiés. Parmi les candidats chez *Senecio squalidus*, on retrouve des homologues de SKR (*SSRLK1*, *SSRLK2* et *SSRLK3*) (Tabah *et al.*, 2004), une peroxydase SSP (Stigma-specific Peroxidase) (McInnis *et al.*, 2005), ainsi que les gènes *MAP* et *Nod* impliqués dans la reconnaissance du pollen au niveau du pistil (Allen *et al.*, 2011). D'autres gènes spécifiques du pistil ont été identifiés par transcriptomique et pourraient jouer un rôle fondamental dans la reproduction, comme le gène *SF21* dont la fonction reste pourtant inconnue (Allen *et al.*, 2011). Chez le genre *Tolpis* (Asteraceae), la transition de l'allogamie vers l'autogamie serait la résultante d'une mutation de type INDEL dans 2 autres gènes, entraînant la production de protéines tronquées. Il s'agit des gènes *PMEI* (pectin methyltransferase inhibitor) et *IPPK* (inositol polyphosphate kinase) (Koseva *et al.*, 2017). Il a été récemment confirmé que l'auto-incompatibilité chez *Stevia rebaudiana* est sporophytique (Raina *et al.*, 2013) mais le manque de connaissance du déterminisme génétique de l'allogamie stricte peut être une contrainte dans le cadre de programme d'amélioration de cette espèce.

L'auto-incompatibilité chez la Stévia entraîne la production de deux types de graines surmontées d'aigrette : des akènes « noirs » et des akènes « clairs » (Figure I.2.4) (Goettemoeller & Ching, 1999). Les premiers sont plus lourds (0.300 mg contre 0.178 mg) (Goettemoeller & Ching, 1999), longs et larges (Yadav *et al.*, 2011; Raina *et al.*, 2013). Des tests de germination ont montré que les akènes clairs sont stériles (0% de germination), alors que les noirs montrent un pourcentage de germination supérieur à 85% (Raina *et al.*, 2013). Les akènes deviennent noirs lors d'un transfert de pollen, alors que les akènes clairs stériles résultent d'une absence de fécondation (Goettemoeller & Ching, 1999; Raina *et al.*, 2013).

1.3.2.3 Pollinisation entomophile

Sa reproduction est dépendante d'insectes pollinisateurs, on parle alors d'entomophilie (Yadav *et al.*, 2011). En Italie, les pollinisateurs les plus rencontrés sont les abeilles (Apidae et Halictidae), suivi par les bombyles (Syrphidae) (Benelli *et al.*, 2017; Martini *et al.*, 2017). L'abondance de ces insectes est dépendante du génotype de *Stevia rebaudiana* à travers les composés volatils émis par les corymbes (Benelli *et al.*, 2017) et le nombre d'inflorescences (Martini *et al.*, 2017). En effet, il a été montré que le limonène est le composé le plus présent chez les génotypes les plus attractifs, alors que l'émission de δ -élémane et bicyclogermacrène sont corrélés avec les plants les moins attractifs (Benelli *et al.*, 2017).

Le rendement de production de graines viables dépend principalement du génotype de *Stevia rebaudiana* à travers les groupes d'auto-incompatibilité, de la période de floraison et l'abondance d'insectes pollinisateurs, dépendant de la senteur de ses fleurs. Pour garantir une pollinisation optimale, des insectes pollinisateurs sont utilisés dans le cadre de croisements contrôlés (Figure I.2.5) (Goettemoeller & Ching, 1999)



Figure I.2.5. Pollinisation entomophile chez *Stevia rebaudiana* par des bourdons. Photo prise à l'INRA de Villenave d'Ornon dans le cadre de croisements contrôlés en cage insect-proof. Crédit photo : C. Hastoy

1.3.2.4 Propagation de l'espèce

La propagation de l'espèce par semis est la méthode la moins coûteuse pour de la production (Angelini *et al.*, 2018). Cependant, elle conduit à une hétérogénéité des plants à cause de son mode de reproduction auto-incompatible entraînant une forte hétérozygotie (Yadav *et al.*, 2011). La difficulté principale de ce mode de production provient du faible taux de germination décrit chez *Stevia rebaudiana*. Il peut varier de 9 à 83% suivant la qualité des graines et les conditions de germination (Macchia *et al.*, 2007).

Pour produire de nombreux plants de qualité pour de la production, cette méthode est la moins efficace (Khalil *et al.*, 2014) mais elle reste la moins couteuse.

La difficulté de propagation par semis et l'hétérogénéité des populations ont entraîné la propagation par multiplication végétative de l'espèce pour une culture à grande échelle. La multiplication par bouturage ou par culture *in vitro* a largement été étudiée (Pande & Gupta, 2013). La micropropagation *in vitro* de *Stevia rebaudiana* est possible grâce à l'ajout de régulateurs de croissance et entraîne une stabilité des profils génétiques (contrôlés par des marqueurs moléculaires ISSR ou RAPD) et en SGs (Lata *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017a). Pourtant, une étude a montré l'apparition de variations génétiques (10.4%), qualifiées de variations somaclonales (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016). D'une manière générale, la multiplication végétative est plus efficace (Khalil *et al.*, 2014), permet d'obtenir des plants uniformes, mais ce type de propagation reste coûteux.

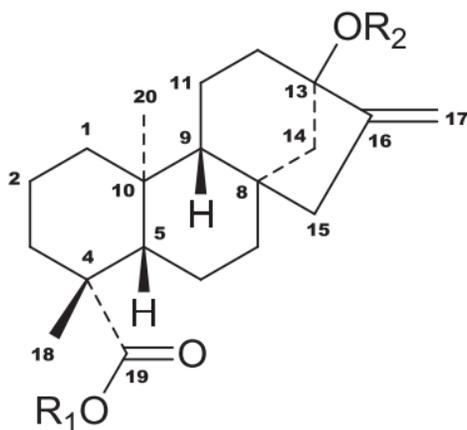


Figure I.2.6 Structure chimique du stéviol (SV), partie aglycone des glycosides de stéviol (SGs) (Perera *et al.*, 2017a)

Tableau I.2.1. Caractéristiques des 10 glycosides de stéviol majoritairement produits chez *Stevia rebaudiana* (Adapté de Ceunen, 2012 ; Barbet-Massin, 2015). R : formule semi-développée des chaînes R1 et R2 greffées sur le stéviol. Abréviations : Glc : glucose, Rha : rhamnose, Xyl : xylose ; Références : premier détection et caractérisation ; Pouvoir sucrant : valeur sucrante déterminée par rapport au saccharose dont le pouvoir sucrant est égal à 1.

Nom	R1	R2	Formule	Teneurs (% w/w)	Masse molaire (g/mol)	Références	Pouvoir sucrant
Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1)	$C_{38}H_{60}O_{18}$	5-10	804.87	Bridel and Lavieille, 1931	250-300
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{44}H_{70}O_{23}$	2-5	967.01	Kohda et al., 1976	250-400
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{44}H_{70}O_{22}$	1	951.01	Sakamoto et al., 1977	50-120
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1)	$C_{38}H_{80}O_{17}$	0.5	788.87	Kobayashi et al., 1977	50-120
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{38}H_{60}O_{18}$	0.2	804.47	Kohda et al., 1976	300-350
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{43}H_{68}O_{22}$	0.2	936.99	Starratt et al., 2002	
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{50}H_{80}O_{28}$	0.2	1129.15	Sakamoto et al., 1977	250-400
Steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2-1)	$C_{32}H_{50}O_{13}$	0.1	642.73	Kohda et al., 1976	100-125
Rubusoside	β -Glc	β -Glc	$C_{32}H_{50}O_{13}$		642.73	Ohta et al., 2010	
Rebaudioside M	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	$C_{56}H_{90}O_{33}$		1291.29	Ohta et al., 2010	200-350

2 Le pouvoir sucrant acalorique : les glycosides de stéviol (SGs)

2.1 Structure et variabilité des glycosides de stéviol

La saveur sucrée des feuilles de *Stevia rebaudiana* provient des glycosides de stéviol (SGs), qui sont des hétérosides appartenant à la famille des diterpènes (C₂₀) de type ent-kaurane. Actuellement, 4 structures aglycones ont été identifiées, sur lesquelles différents résidus osidiques sont greffés. La partie aglycone la plus représentée est le stéviol (SV) (Figure I.2.6). Son squelette permet la formation d'un grand nombre de SGs par une liaison ester en R1 et une liaison osidique en R2 (Ceunen & Geuns, 2013c). Ces SGs peuvent être classés en 10 groupes en fonction de leur caractéristique structurale, à travers le type de résidus osidiques greffés (glucose, fructose, xylose, rhamnose, arabinose) et le type de liaison entre les oses. Actuellement, 46 SGs ont été identifiés dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*, reflétant la grande diversité de cette famille de diterpènes (Annexe A1) (Ceunen & Geuns, 2013c; Ibrahim *et al.*, 2016a,b; Chaturvedula & Meneni, 2017; Mao *et al.*, 2017; Perera *et al.*, 2017a,b; Prakash *et al.*, 2017).

Les SGs ne sont pas produits de manière équivalente chez *Stevia rebaudiana*. On dénombre 10 SGs majoritaires (Tableau I.2.1). La teneur en SGs est exprimée en % par rapport à la matière sèche (% w/w). Les 2 SGs les plus accumulés sont le Stévioside (ST) et le Rebaudioside A (RebA) (> 2 % w/w). Les 8 autres SGs sont accumulés entre 0.1 et 1 % w/w (Ceunen & Geuns, 2013c).

2.2 Voie de biosynthèse des SGs à l'échelle cellulaire

Les SGs sont des diterpènes qui partagent la voie de biosynthèse des gibbérellines (GAs) (Brandle & Telmer, 2007). Le précurseur des diterpènes est le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP, C₂₀), formé par couplage successif d'isopentényl pyrophosphate (IPP, C₅) sur un diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP, C₅). Ces intermédiaires sont synthétisés par différentes voies : la voie mévalonate cytoplasmique (MVA), ou par la voie du méthylérythritol phosphate plastidiale (MEP). Chez *Stevia rebaudiana*, les mono- et diterpènes sont principalement synthétisés par la voie plastidiale du MEP, alors que les sesquiterpènes sont préférentiellement synthétisés par la voie cytosolique du MVA (Wölwer-Rieck *et al.*, 2014). Une fois le GGPP formé, la voie de biosynthèse commune aux SGs et GAs conduit à la formation de l'acide kaurénoïque. Ce précurseur commun est ensuite pris en charge par la voie spécifique de biosynthèse des SGs pour former leur précurseur, le stéviol (SV) sur lequel sont greffés des oses pour produire les SGs.

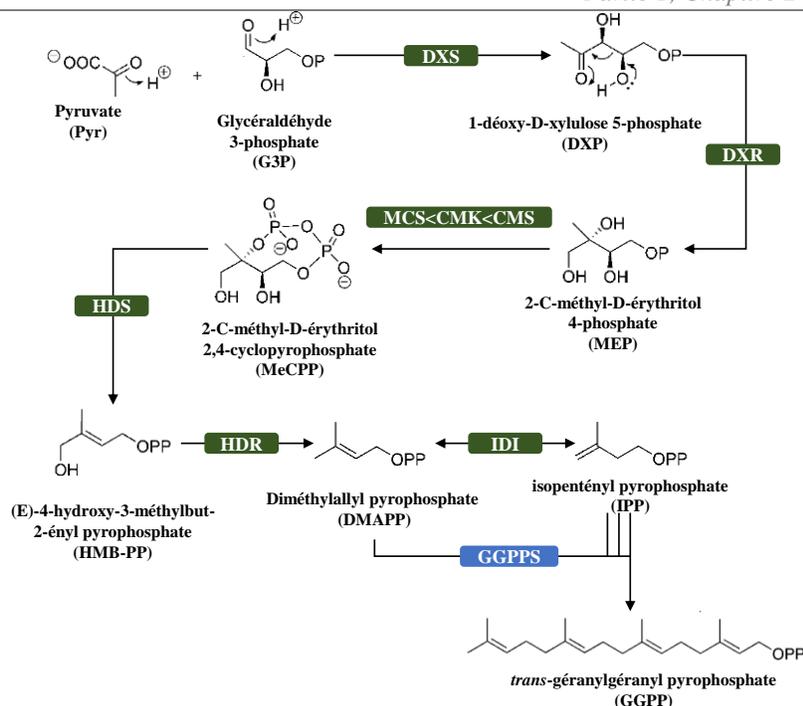


Figure I.2.7. Biosynthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes, par la voie plastidiale du méthylérythritol phosphate plastidiale (MEP) (Tirée de Ceunen, 2012). Abréviations des enzymes : DXS (1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase), DXR (1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase), CMS (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidilyltransférase), CMK (4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase), MCS (2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase), HDS (4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphateréductase), HDR ((E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphateréductase), IDI (isopentényl-diphosphate delta-isomérase), GGPPS (géranylgeranyl pyrophosphate synthase)

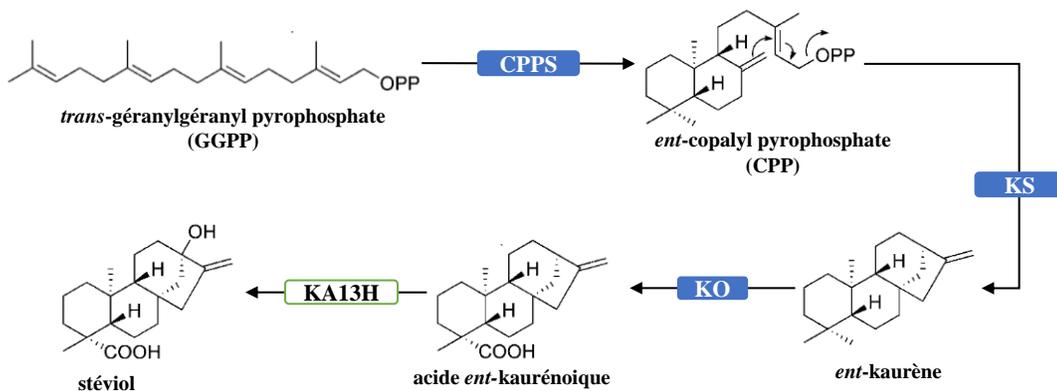


Figure I.2.8. Biosynthèse du Stéviol, précurseur des glycosides de stéviol (Tirée de Ceunen, 2012). Abréviations des enzymes : CPPS (ent-copalylpyrophosphate synthase), KS (ent-copalyl diphosphate synthase), KO (ent-kaurène oxidase) ; KA13H (acide ent-kaurénoïque 13-hydroxylase)

2.2.1 Synthèse du GGPP, précurseurs des diterpènes

Dans le plaste, la synthèse du GGPP débute par la conversion du Pyruvate (Pyr) et du Glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) en 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), réaction catalysée par la 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*DXS*) avec son coenzyme, la thiamine pyrophosphate (TPP) (Figure I.2.7). Ce déoxy-ose est ensuite réduit par la 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (*DXR*) en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP). Ensuite, le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclopyrophosphate (MeCPP) est formé, par les activités catalytiques de la 4-diphosphocytidil-2-C-méthyl-D-érythritol synthase (*CMS*), la 4-(cytidine 5' diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (*CMK*) et de la 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclopyrophosphate synthase (*MCS*) respectivement. Le MeCPP est réduit en (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl pyrophosphate (HMB-PP) par l'(E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase (*HDS*). Une seconde réduction, catalysée par l'(E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphatéréductase (*HDR*) conduit à la formation de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). L'isopentényl diphosphate isomérase (*IDI*) catalyse l'isomérisation réversible de l'IPP en DMAPP. Ensuite, la *trans*-géranylgéranyl pyrophosphate synthase (*GGPPS*) condense 3 molécules d'IPP sur 1 de DMAPP pour former le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes (Brandle & Telmer, 2007; Ceunen & Geuns, 2013c).

2.2.2 Synthèse du stéviol, précurseur des SGs

Dans le plaste, le GGPP subit une cyclisation pour former l'*ent*-copalyl pyrophosphate (CPP), réaction l'*ent*-copalyl pyrophosphate synthase (*ent-CPPS*). L'*ent*-kaurène synthase (*ent-KS*) catalyse la formation de l'*ent*-kaurène tétracyclique (Figure I.2.8). Après sa formation, l'*ent*-kaurène est transféré vers le cytosol où il est oxydé en acide *ent*-kaurénoïque par l'*ent*-kaurène oxydase (*ent-KO*), une CYP (cytochrome P450 monooxygénase) localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (Humphrey *et al.*, 2006; Ceunen & Geuns, 2013c). Cette molécule est le dernier intermédiaire commun à la synthèse des GAs et des SGs, dont les précurseurs sont obtenus par l'activité catalytique de CYPs située à la membrane du RE. L'acide *ent*-kaurénoïque oxydase (*KAO*) catalyse la formation de GA₁₂, précurseurs de toutes les gibbérélines, alors que l'acide *ent*-kaurénoïque 13-hydroxylase (*ent-KA13H*) forme le stéviol, précurseurs des SGs.

L'*ent-KA13H* est la première enzyme spécifique de la voie de biosynthèse du stéviol élément indispensable à la production d'édulcorants. (Brandle & Telmer, 2007; Ceunen & Geuns, 2013c).

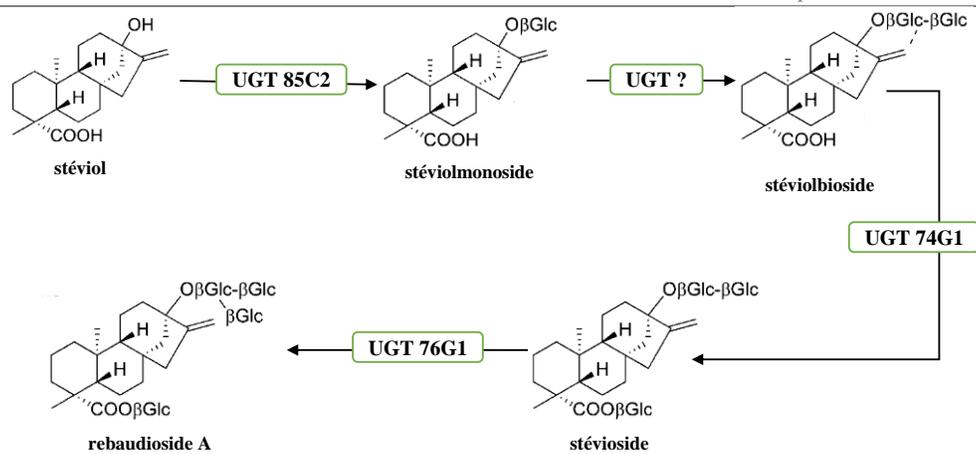


Figure I.2.9. Biosynthèse connue des glycosides de stéviol (Tirée de Ceunen, 2012). Abréviations des enzymes : UGT 85C2 (UDP-glycosyltransférase 85C2), UGT 74G1 (UDP-glycosyltransférase 74G1), UGT 76G1 (UDP-glycosyltransférase 76G1), UGT ? (UGT inconnue)

2.2.3 Synthèse des glycosides de stéviol

Après la formation du stéviol, des séries de glycosylations s'opèrent dans le cytoplasme pour former la large famille des SGs (Humphrey *et al.*, 2006). Ces réactions sont catalysées par des glycosyltransférases dépendantes de l'UDPG ou UDP-glucose (UGTs). Les UGTs appartiennent à la superfamille des glycosyltransférases (GTs) organisée en 14 groupes, et les UGTs impliqués dans la synthèse des SGs appartiennent à la famille 1. Les UGTs transfèrent un résidu osidique à partir d'un donneur activé (majoritairement l'UDP-glucose) sur une molécule receveuse, incluant les hormones, les métabolites secondaires, et les xénobiotiques (Li *et al.*, 2001; Wang & Hou, 2009). Les gènes codant les UGTs dans le règne végétal possèdent un motif spécifique, la PSPG (Plant Secondary Product Glycosyltransferase) box, très conservée dans leur séquence C-terminale, qui intervient dans la liaison du résidu UDP au sucre activé (Richman *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, ce motif a permis d'identifier la superfamille des glycosyltransférases, incluant 119 UGTs impliqués dans l'homéostasie des hormones de croissance, dans la détoxification de composés exogènes, et dans la synthèse et le stockage de métabolites secondaires (Wang & Hou, 2009).

Dans le mésophylle des feuilles de *Stevia rebaudiana*, la synthèse de l'UDP-glucose par une UDP-glucose pyrophosphorylase a été surtout localisée dans le cytoplasme, avec tout de même quelques activités dans l'appareil de Golgi (Ceunen & Geuns, 2013c). La caractérisation fonctionnelle de 12 UGTs de *Stevia rebaudiana* a conduit à l'identification de 3 UGTs impliquées dans la biosynthèse des SGs (Richman *et al.*, 2004) (Figure I.2.9).

La glycosylation du stéviol commence sur le groupement hydroxyle en C-13 (R2), réaction catalysée par l'**UGT85C2**, pour former le stéviolmonoside. Celui-ci est ensuite glycosylé sur le C-2' de son résidu glucose et donne le stéviolbioside. L'UGT responsable de cette glycosylation n'a pas encore été identifiée *in vivo*, mais il existe une UGT candidate : *UGT91D2* (Kishore *et al.*, 2011). L'**UGT74G1** catalyse la glycosylation sur le groupe carboxyle (R1), présent au niveau du C-19 de la partie aglycone, pour conduire au stévioside.

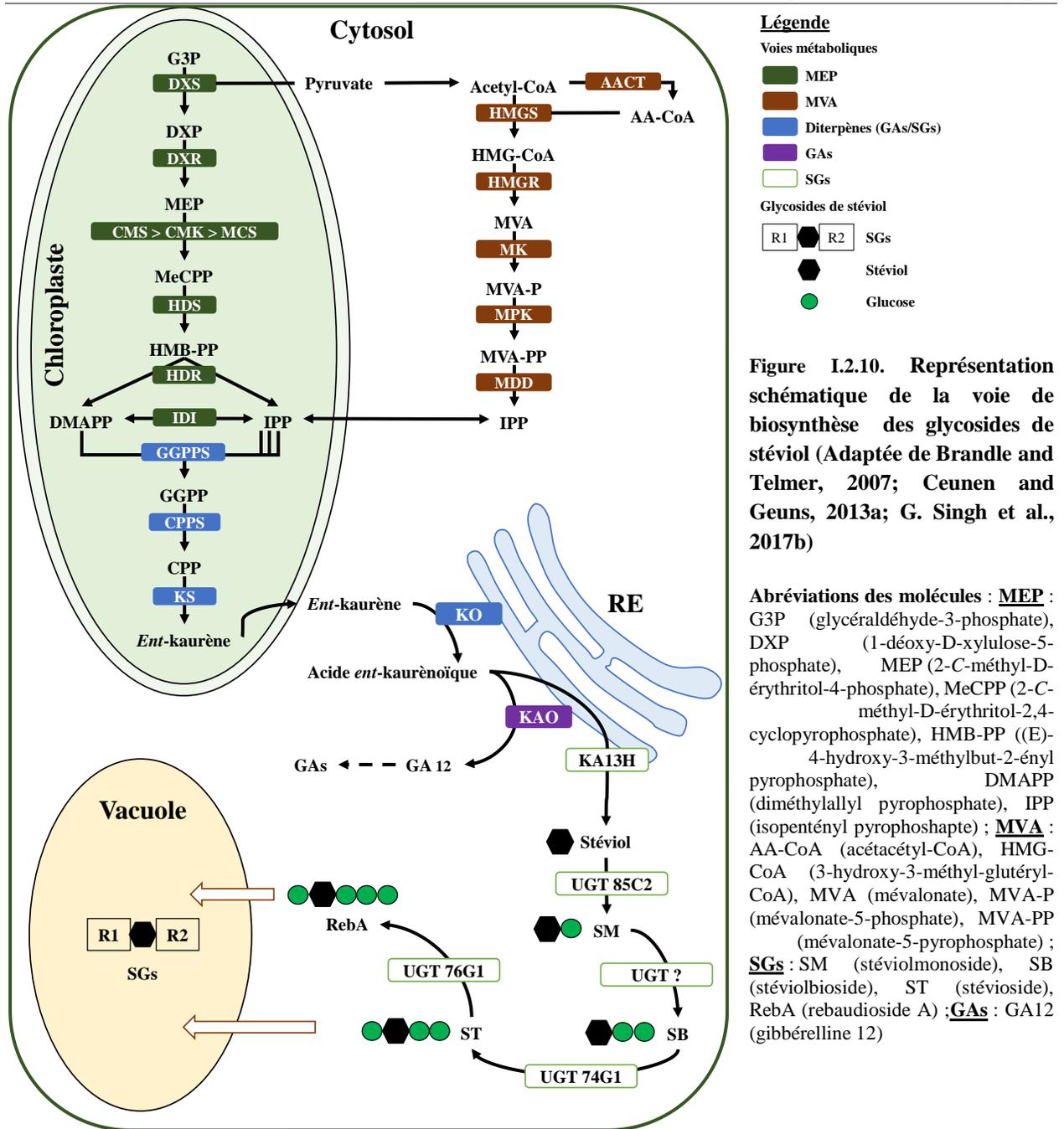


Figure I.2.10. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol (Adaptée de Brandle and Telmer, 2007; Ceunen and Geuns, 2013a; G. Singh et al., 2017b)

Abréviations des molécules : **MEP** : G3P (glycéraldéhyde-3-phosphate), DXP (1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate), MEP (2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate), MeCPP (2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclopyrophosphate), HMB-PP ((E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl pyrophosphate), DMAPP (diméthylallyl pyrophosphate), IPP (isopentényl pyrophosphate) ; **MVA** : AA-CoA (acétyl-CoA), HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthyl-glutéryl-CoA), MVA (mévalonate), MVA-P (mévalonate-5-phosphate), MVA-PP (mévalonate-5-pyrophosphate) ; **SGs** : SM (stéviolmonoside), SB (stéviolbioside), ST (stévioside), RebA (rebaudioside A) ; **GAs** : GA12 (gibbérelline 12)

Abréviations des enzymes : **MEP** (voie du méthylérythritol phosphate) : DXS (1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase), DXR (1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase), CMS (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase), CMK (4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase), MCS (2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase), HDS (4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthase), HDR ((E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphatéréductase), IDI (isopentényl-diphosphate delta-isomérase) ; **MVA** (voie du mévalonate) : AACT (acétyl Co-A acétyltransférase), HMGS (3-hydroxy-3-méthyl-glutéryl-CoA synthase), HMGR (3-hydroxy-3-méthyl-glutéryl-CoA réductase), MK (mévalonate kinase), MPK (phosphomévalonate kinase), MDD (diphosphomévalonate décarboxylase) ; **Voie communes aux GAs/SGs** : GGPPS (géranylgéranyl pyrophosphate synthase), CPPS (ent-copalylpyrophosphate synthase), KS (ent-copalyl diphosphate synthase), KO (ent-kaurène oxydase) ; **SGs** (Voie des glycosides de stéviol) KA13H (acide ent-kaurénoïque 13-hydroxylase), UGT 85C2 (UDP-glycosyltransférase 85C2), UGT 74G1 (UDP-glycosyltransférase 74G1), UGT 76G1 (UDP-glycosyltransférase 76G1), UGT ? (UGT inconnue) ; **GAs** (voie des gibbérellines) : KAO (acide ent-kaurénoïque oxydase).

Ensuite suit la glycosylation du C-13 glucose sur son C-3', catalysée par l'*UGT76G1*, pour former le rebaudioside A. Récemment, une UGTs supplémentaire a été caractérisée : l'*UGTSr* (Madhav *et al.*, 2013). Elle possède 98% d'homologie (au niveau de sa séquence nucléotidique) avec l'*UGT76G1* et possède une activité de glycosylation similaire à l'encontre du ST, pour former du RebA. Cependant, il a été montré que la perte de fonction de l'*UGT76G1* entraîne l'absence de synthèse de RebA (Yang *et al.*, 2014), ce qui signifie qu'il n'y a pas de complémentarité fonctionnelle *in vivo* par une autre UGTs pour cette réaction.

Le ST et le RebA sont les SGs les plus représentés dans les feuilles de Stévia, mais ces derniers ne sont pas les produits finaux de cette voie de biosynthèse. D'autres glycosylations s'opèrent puisque des SGs comme le rebaudioside IX portent jusqu'à 9 résidus osidiques (Prakash *et al.*, 2017), ce qui complexifie considérablement cette voie de biosynthèse, non élucidée après le RebA (Figure I.2.10). Une récente étude a permis d'identifier 118 transcrits chez *Stevia rebaudiana* présentant une homologie pour 45 UGTs connues (Singh *et al.*, 2017b). Les produits de ces gènes sont connus pour avoir un large spectre de substrats, mais certaines UGTs de *Stevia rebaudiana* n'ont pas d'activité catalytique à l'encontre des SGs (Richman *et al.*, 2004).

2.2.4 Stockage des glycosides de stéviol

Il est généralement pensé que les SGs sont stockés dans la vacuole (Brandle & Telmer, 2007; Ceunen & Geuns, 2013c). Cependant, le mécanisme de stockage des SGs n'est pas encore élucidé.

La vacuole des cellules végétales est depuis longtemps connue pour la séquestration de métabolites secondaires toxiques et de xénobiotiques (Brandle & Telmer, 2007). D'une manière générale, la translocation des composés à travers la membrane sélective de la vacuole requière des transporteurs intégrés à la membrane, dont l'activité est substrat spécifique (Ceunen & Geuns, 2013c). Ils exploitent l'énergie stockée dans les gradients électrochimiques, ou l'énergie directement fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs utilisant des gradients de protons ou d'ions appartiennent aux familles des MFS (Major Facilitator) et des MATE (Multi-drug and Toxic Compound Extraction), et ont déjà montré leur implication dans le stockage vacuolaire de métabolites endogènes (Brandle & Telmer, 2007; Ceunen & Geuns, 2013c). Une autre super-famille de transporteur a été identifiée dans des transports à travers la membrane vacuolaire : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), qui utilisent l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP (Brandle & Telmer, 2007) pour transférer la molécule d'intérêt.

Une seule étude chez *Stevia rebaudiana* s'est intéressée aux activités de transporteurs. Une augmentation des activités d'ATPase dans le tonoplaste de feuilles matures a été trouvée, avec simultanément une diminution de celle-ci dans le plasmalemme. Alors que dans des feuilles en sénescence, ces deux activités décroissent rapidement (Ceunen & Geuns, 2013a). Des gènes candidats codant pour des transporteurs MFS, MATE et ABC ont été identifiés dans une collection d'EST de *Stevia rebaudiana* (Brandle & Telmer, 2007), mais aucune étude n'a validé leur implication dans le transport et le stockage des SGs.

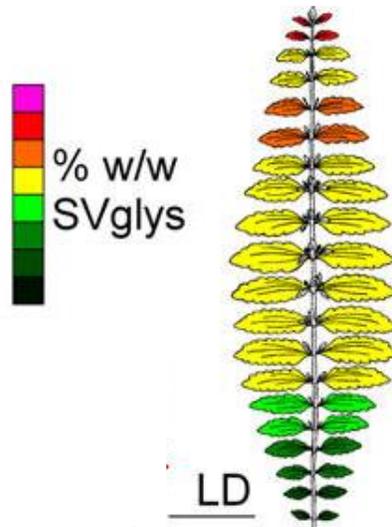


Figure I.2.11. Représentation schématique spatiale de la teneur en glycosides de stéviol en conditions de jours longs. Les teneurs exprimées en % w/w les plus faibles sont représentées en vert, et les plus fortes en rose. (LD, Long Day, figure tirée de Ceunen & Geuns, 2013c).

2.3 Accumulation en SGs à l'échelle de la plante

2.3.1 Accumulation dans les différents organes

Les SGs sont présents dans toutes les parties de la plante, mais sont accumulés de manière inégale en fonction de la nature du tissu, et de sa position spatiale. Leur teneur est exprimée en % par rapport à la matière sèche et varierait entre 0,1 et 10 % w/w à l'état naturel.

Les organes produisant le moins de SGs sont les racines, où leur teneur est comprise entre 0,1 et 0,25 % w/w (Ceunen & Geuns, 2013a). Des cultures de « hairy roots » de *Stevia rebaudiana* ne sont pas capables de produire des SGs en absence de lumière, prouvant que, sans activité photosynthétique, ces organes ont une incapacité biosynthétique (Yamazaki *et al.*, 1991). Ensuite dans les tiges, la plus forte teneur en SGs est trouvée vers l'apex (environ 1,5% w/w), et décroît graduellement jusqu'à 0,5% w/w à la base du plant (Ceunen & Geuns, 2013a). Dans les fleurs, la majorité des SGs sont accumulés dans l'involucre (5-7% w/w), avec une faible teneur dans les pétales (0,7% w/w), les pistils (0,6% w/w) et les akènes (0,2-1,5% w/w) (Ceunen and Geuns, 2013b).

Les organes produisant le plus de SGs sont les feuilles, où la teneur atteint 2 à 10 % w/w pour des ressources génétiques sauvages. En règle générale, les SGs seraient accumulés principalement dans les vacuoles des cellules du mesophylle de la feuille, mais ne sont pas présents dans les trichomes (Mu-zuan *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2015). L'accumulation foliaire en SGs varie en fonction de l'étage foliaire (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015) : leur teneur est plus forte dans les feuilles en croissance active, proches de l'apex, et celle-ci diminue progressivement jusqu'à la teneur la plus basse dans les feuilles en sénescence (Figure I.2.11). De la même manière, la teneur en SV (stéviol, précurseur des SGs) dans les feuilles est 1 000 fois inférieure à ses dérivés glycosylés et en moyenne 4 fois plus concentrée dans les feuilles jeunes comparée aux plus âgées (Ceunen & Geuns, 2013b).

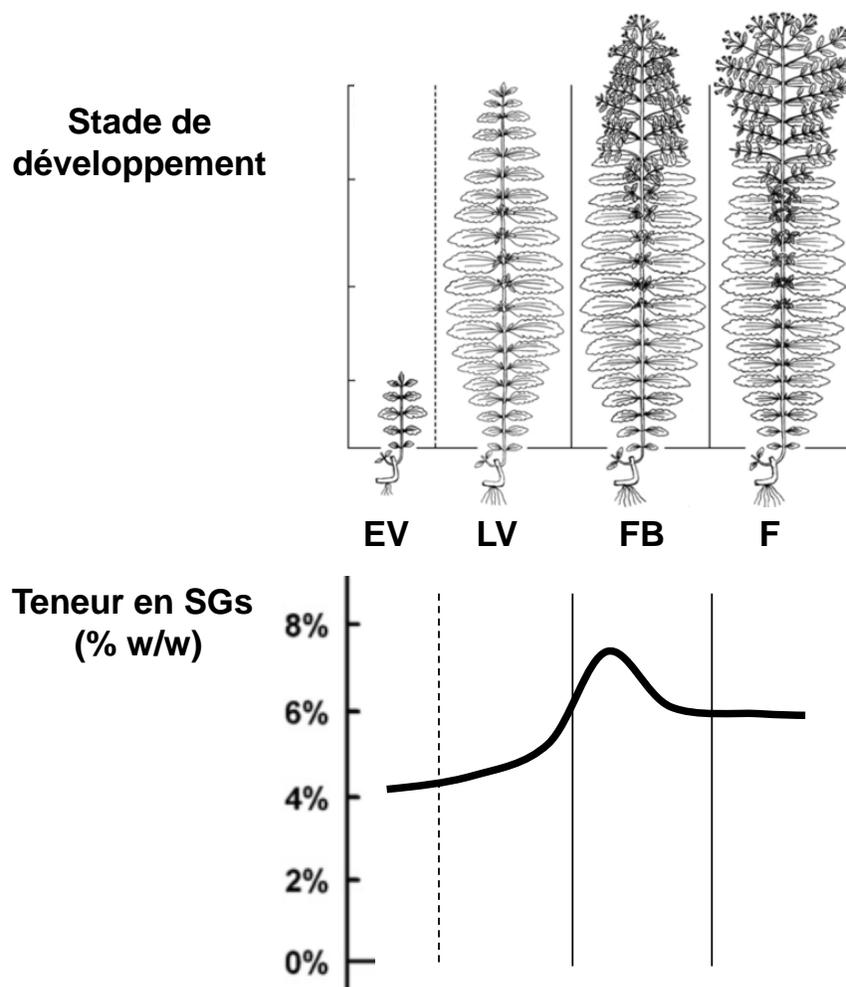


Figure I.2.12. Représentation schématique des stades de développement chez *Stevia rebaudiana* et évolution de la teneur en glycosides de stéviol dans les feuilles (Adapté de Ceunen & Geuns, 2013a). EV : stade végétatif précoce ; LV : stade végétatif tardif ; FB : stade bourgeons floraux ; F : floraison.

2.3.2 Accumulation temporelle

L'accumulation en SGs qui est tissu-spécifique varie aussi en fonction du stade phénologique de la plante. Dans les racines, la teneur en SGs diminue au cours du développement végétatif, allant de 0,14 à 0,05 % w/w. Ensuite, une augmentation de la teneur en SGs d'un facteur 7 (de 0,05 à 0,35% w/w) est observée entre la phase végétative tardive et le stade bourgeons floraux. Enfin, à l'ouverture des fleurs, la teneur atteint 0.25 % w/w (Ceunen & Geuns, 2013a). L'accumulation en SGs au cours du développement a été caractérisée uniquement pour les tiges principales, révélant la même évolution que dans les racines, avec des teneurs comprises entre 0.25 et 0.8 % w/w (Ceunen & Geuns, 2013a).

La variation de la teneur dans les feuilles est plus complexe. Elle est dépendante de l'âge de chaque feuille et du stade phénologique de la plante. A l'échelle de la feuille, la teneur en SGs augmente très rapidement puis reste relativement stable, entre l'initiation de celle-ci et son développement (Barbet-Massin, 2015). Cette observation est en adéquation avec une autre étude qui a montré que la teneur en SGs est la plus forte au 3^{ème} nœud, en partant de l'apex (Kumar *et al.*, 2012a). A l'échelle de la biomasse foliaire de la plante entière, les SGs sont accumulés graduellement pendant la phase végétative jusqu'à une teneur maximale atteinte à l'initiation de la floraison (Figure I.2.12) (Weilian *et al.*, 1987; Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Ces différentes études ont été réalisées sur des plants en 1^{ère} année de croissance. La Stévia étant une espèce pérenne, il n'existe pas encore d'informations sur la cinétique d'accumulation des SGs en fonction des différentes années de croissance.

L'évolution de la teneur en SGs dans les feuilles au cours des stades reproductifs est controversée dans la littérature. Pendant la floraison, une diminution de 20 à 50% des SGs a été reportée, alors que d'autres études ont observé une teneur constante (Ceunen & Geuns, 2013c). La comparaison de 3 génotypes en condition de production a montré une évolution différentielle de la teneur au cours de la floraison, en fonction du génotype, mais également en fonction de son interaction avec l'environnement, suggérant un mécanisme génotype-dépendant (Barbet-Massin, 2015). La teneur en SV (stéviol), précurseur des SGs, diminue à partir de l'ouverture des fleurs (3 à 4 fois moins comparé à la fin de la phase végétative de croissance) (Ceunen & Geuns, 2013b).

2.3.3 Expression des gènes de la voie de synthèse des SGS

Les variations de teneurs décrites précédemment sont en lien direct avec l'expression transcriptionnelle des gènes de la voie de biosynthèse des SGS. L'accumulation différentielle entre les organes s'explique par une expression supérieure des gènes dans les feuilles, comparée aux tiges et racines, que ce soit pour les gènes de la voie du MEP, que pour les gènes spécifiques à la synthèse des SGS sans corrélation stricte (Humphrey et al., 2006; Kumar et al., 2012b).

L'expression varie en fonction de l'âge de la feuille, dépendante de sa position, et du stade phénologique de la plante. L'expression transcriptionnelle de 15 gènes connus de la voie de biosynthèse des SGS suivie par RT-qPCR évolue spatialement de la même manière que la teneur en SGS (Mohamed *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012a), ce qui est illustré par l'expression des gènes de la voie des SGS la plus forte dans les feuilles de l'apex (1^{er} nœud), exceptée pour *DXR* et *KO*, et minimum dans les feuilles du 5^{ème} nœud (dernier nœud de l'étude) en phase végétative précoce (Kumar *et al.*, 2012a). Une corrélation positive entre l'expression de l'*UGT85C2* (catalysant la synthèse de steviolmonoside (SM) à partir du stéviol (SV)) et la teneur en SGS totaux (Mohamed *et al.*, 2011). A l'échelle de la plante entière, l'expression des gènes augmente et atteint un maximum dans les stades précoces de la croissance végétative, puis diminue et reste stable dans les stades plus avancés (Modi *et al.*, 2014). Le traitement de plants *in vitro* avec du SV induit une sous-expression de la majorité des gènes de la voie, suggérant une boucle d'autorégulation négative cohérente avec la variation transcriptionnelle au cours du développement végétatif (Modi *et al.*, 2013). Ensuite, l'expression des gènes spécifiques à la voie des SGS (*KAI3H* et les 3 UGTs) diminue fortement aux stades bourgeons floraux et floraison (Singh *et al.*, 2017b).

La diminution ou la stabilité de la teneur en SGS pourrait coïncider avec la sous-expression des gènes spécifiques à leur synthèse (*KAI3H* et les 3 UGTs) au stade bourgeons floraux puis à la floraison. Aux mêmes stades, les gènes spécifiques de la voie des GAs sont surexprimés, suggérant la réorientation du flux de carbone vers la synthèse de GAs, au détriment des SGS (Singh *et al.*, 2017b). Chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression hétérologue de *SrKA13H*, première enzyme de la voie des SGS, révèle l'accumulation de SV et une diminution de la synthèse des GAs actives, démontrant le détournement du flux de carbone (Guleria *et al.*, 2015). De plus, ces lignées transgéniques montrent un phénotype de nanisme, une diminution de la viabilité du pollen, du taux de germination du tube pollinique, et du rendement en graines. Ces observations sont cohérentes avec le rôle des GAs dans la croissance et le développement des plantes. En effet, ces hormones sont impliquées dans de nombreux mécanismes, tels que l'élongation cellulaire, la morphologie

des feuilles, la différenciation des méristèmes, le développement et la germination des graines (Yamaguchi, 2008).

L'accumulation des SGs chez *Stevia rebaudiana* est un mécanisme dynamique complexe, qui n'est actuellement pas entièrement compris. Elle est tissu-spécifique, varie en fonction de l'âge des tissus, et est dépendante de l'ontogénie.

2.3.4 Fonctions des SGs pour la plante

La fonction des SGs pour la plante est encore inconnue. Plusieurs hypothèses ont été proposées (pour revue : Ceunen and Geuns, 2013). En résumé, 5 fonctions sont discutées dans la littérature :

- le stéviol comme précurseur des gibbérélines
- les SGs comme un mécanisme de défense contre les herbivores
- les SGs comme des osmolytes
- les SGs comme une réserve d'énergie
- les SGs piègeurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Tableau I.2.2. Liste exhaustive des édulcorants *stricto-sensu* connus dans le monde et leurs caractéristiques (JECFA, 2004; Faus & Sisniega, 2005; European Food Safety Authority, 2011; Carocho *et al.*, 2017; FAO & OMS, 2017)

Numéro SIN	Nom de l'additif	Nature	Pouvoir sucrant	DJA (mg/kg)
420	Sorbitols	Polyol	0.6	
421	Mannitol	Polyol	0.6	
950	Acésulfame de potassium	Lactame sulfonique	150-200	15
951	Aspartame	Dipeptide (a.a)	200	40
952	Cyclamates	Acide cyclamique	30-80	11
953	Isomalt	Polyol, dérivés du saccharose	0.55	
954	Saccharines	Sulfonamide benzoïque	240-300	5
955	Sucralose	Polyol	400-800	15
956	Alitame	Dipeptide (a.a)	2000	1
957	Thaumatine	Protéine	2000	
958	Glycyrrhizine	Hétéroside	100	
959	Dihydrochalcone de néohesperidine	Hétéroside, dihydrochalcone	1500	5
960	Glycosides de stéviol	Hétéroside	200-400	4
961	Néotame	Dipeptide (a.a)	7000-13000	2
962	Ascésulfame-aspartame, sel de	Lactame sulfonique		
963	Tagadose, D-	Cétohexose	0.92	
964	Sirop de polyglycitol	Polyol		NS
965	Maltitols	Polyol	0.75	
966	Lactitol	Polyol	0.35	
967	Xylitol	Polyol	1	
969	Advantame	Dérivé de vanilline et aspartame	37000	5
968	Erythritol	Polyol	0.7	
	Monelline	Protéine	3000	
	Mabinline	Protéine	100-400	
	Pentadine	Protéine	500	
	Brazzéine	Protéine	500-2000	
	Curculine	Protéine	550	
	Miraculine	Protéine	0	
Nom de l'ingédient				
	Fructose	Monosaccharide	1.1-1.5	
	Saccharose	Diholoside	1	
	Dextrose	Monosaccharide	0.9	
	Glucose	Monosaccharide	0.75	
	Isomaltose	Diholoside	0.55	
	Maltose	Disaccharide	0.4	
	Galactose	Monosaccharide	0.3	
	Raffinose	Triholoside	0.2	

2.4 Propriétés des SGs pour la consommation humaine

2.4.1 Edulcorants naturels intenses

Le terme « édulcorant » est communément utilisé pour des substances apportant une saveur sucrée sans apporter de calories. Cependant, *stricto-sensu* un édulcorant est uniquement un produit, une molécule, ayant un goût sucré. Il faut donc distinguer les édulcorants nutritifs dits « de charge » ou « massiques » apportant des calories telles que les sucres, des édulcorants non-nutritifs, dits « basses calories ». Ils peuvent également être classés en fonction de leur provenance, c'est-à-dire s'ils sont artificiels (obtenus par synthèse chimique) ou naturels, identifiés dans les plantes ou leur fruit. Le pouvoir sucrant est la valeur sucrante de la molécule déterminée par rapport au saccharose dont le pouvoir sucrant est égal à 1. Celui-ci différencie les édulcorants à faible puissance (pouvoir sucrant < 10), des édulcorants intenses (pouvoir sucrant >10).

Dans le *Codex Alimentarius*, les édulcorants sont définis comme des additifs alimentaires qui confèrent un goût sucré. 22 édulcorants sont identifiés par le Système International des additifs alimentaires (SIN) regroupant les différentes caractéristiques précédemment citées (Tableau I.2.2). Les sucres mono- ou disaccharides sont exclus de cette classification, car ils sont qualifiés d'ingrédients alimentaires, qu'ils soient naturellement présents dans l'aliment ou ajoutés pendant la production. 8 oses sont communément utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, et possèdent des pouvoirs sucrants variables. Il existe également 6 protéines issues de fruits d'arbres tropicaux ayant un pouvoir sucrant (Faus & Sisniega, 2005), cependant elles ne sont pas référencées dans le *Codex Alimentarius*.

Les SGs sont des édulcorants non-nutritifs, intenses, et naturels. Ils sont consommés en tant qu'additifs alimentaires depuis les années 1970 au Japon, 1^{er} pays consommateur. Ils ont été acceptés aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) en 2009, et en Europe par la Joint Food and Agriculture Organization and the World Health Organization Expert Committee in Food Additives (JECFA) en 2011. Dans les aliments, leur présence est indiquée par le code E960.

2.4.2 Propriétés organoleptiques des SGs et perception du goût

Une saveur sucrée a été identifiée chez 18 espèces du genre *Stevia*, dont *S. phlebophylla* et *S. rebaudiana* qui ont montré la plus forte sensation de pouvoir sucrant (Soejarto *et al.*, 1982, 1983; Kinghorn *et al.*, 1984).

S. rebaudiana se différencie des 18 espèces par une intensité et une persistance du goût sucré nettement supérieure, probablement due à une concentration en SGs supérieure à 10% (w/w) dans ses feuilles (Soejarto *et al.*, 1982). Les SGs n'ont ensuite été détectés que dans 2 espèces du genre *Stevia* sur les 108 espèces testées : *S. rebaudiana* et *S. phlebophylla* (Kinghorn *et al.*, 1984).

Les saveurs attribuées aux SGs sont amères et sucrées (Soejarto *et al.*, 1982), le goût de réglisse et de métal (Espinoza *et al.*, 2014), et ils favorisent la perception de la saveur umami (Philippaert *et al.*, 2017). Actuellement, le problème des produits à base de Stévia est présence de saveurs ou goûts non désirés, trop insistants, comme l'amertume et la réglisse.

Chez l'homme, la perception des 5 saveurs fondamentales ou primaires (amer, sucré, umami, salé et acide) se fait par l'intermédiaire de récepteurs situés sur la langue. Un screening de 25 récepteurs humains pour l'amertume a permis d'identifier les 2 récepteurs, hTAS2R4 et hTAS2R14, stimulés par les SGs et conduisant à cette saveur. Les SGs interagissent également avec les sous-unités hTAS1R2/hTAS1R3 des récepteurs humains à la saveur sucrée (Hellfritsch *et al.*, 2012). Plus précisément, la création de modèles permet d'identifier l'interaction avec 11 acides aminés des sous-unités hTAS1R2/hTAS1R3, par la formation de liaison hydrogène avec le groupe hydroxyle des résidus glucose des SGs (Mayank & Jaitak, 2015). L'interaction avec ces récepteurs entraîne des flux de calcium dans les cellules (Hellfritsch *et al.*, 2012) par l'intermédiaire de canaux ioniques, tels que TRPM5 (Philippaert *et al.*, 2017).

La variabilité des SGs leur confère des propriétés gustatives propres à chacun. Ils se différencient par leur pouvoir sucrant, leur capacité à interagir avec les récepteurs aux saveurs présents sur la langue, et leur seuil de perception. Les caractéristiques structurales permettant aux SGs d'induire les saveurs amère et sucrée sont la longueur et la nature des chaînes glycones, la substitution de l'empreinte des sucres sous forme pyranose, et la double liaison en C16 (Hellfritsch *et al.*, 2012).

Une étude plus récente a montré que la présence de résidus osidiques en C-3" du RebA entraîne la restriction de l'interaction entre la molécule et le récepteur à l'amertume hTAS2R4, empêchant le déclenchement de la cascade de signalisation (Singla & Jaitak, 2016). La modification du groupe méthylène, présent sur la double liaison C16-C17, en cétone modifie la saveur des SGs (Upreti *et al.*, 2012). Cette double liaison et le groupe méthylène sont donc primordiaux pour la perception de la saveur sucrée. La présence de rhamnose (RebC et DulA) favorise la saveur amer (Espinoza *et al.*, 2014). Une seule étude a réalisé une analyse sensorielle de 9 SGs purs par un panel entraîné

(Hellfritsch *et al.*, 2012). Les auteurs ont déterminé les concentrations auxquelles chaque SGs déclenche la perception de la saveur sucrée et amère (Figure I.2.13). La saveur sucrée est perçue à faibles concentrations pour tous les SGs (entre 5.3 et 32.9 μM) alors que la gamme pour la saveur amère est plus importante (entre 23 et 194 μM). Plus le nombre de résidus glucose augmente (3 à 5 Glc), plus la saveur sucrée est détectée à de faibles concentrations et plus il faut de fortes concentrations pour percevoir l'amertume (RebD, RebA, ST, RebB). Le RebM (6 Glc) a également été qualifié de sucré, avec un très faible arrière-goût amer (Prakash *et al.*, 2014). La présence de résidus rhamnose (RebC et DulA) ou la présence uniquement de 2 résidus glucose (SB et Rub) abaisse considérablement le seuil de détection à l'amertume, rendant ces SGs moins désirables dans les extraits.

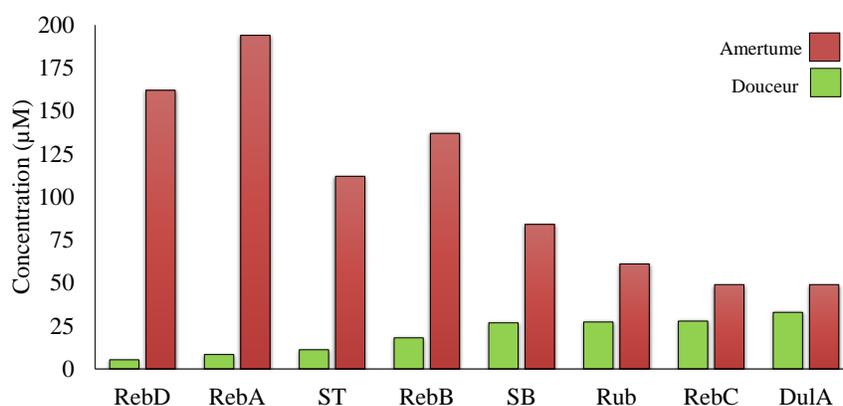


Figure I.2.13. Seuils de détection de 9 SGs (μM) pour les saveurs amères et sucrées (Hellfritsch *et al.*, 2012). Les SGs sont classés en fonction du seuil de détection croissant de la saveur sucrée douce

Les propriétés organoleptiques des extraits de Stévia sont dépendantes du pool de SGs présents, de leur teneur, et de leur proportion respective. Dans la suite de l'étude, nous ferons donc 3 groupes de SGs en fonction de leur propriétés organoleptiques : les amers (ST, RebC, DulA, Rub, SB), les sucrées (RebA, RebD, RebM, RebB) et ceux de saveurs non connues (RebF).

Actuellement, les saveurs des extraits de Stévia sont difficilement maîtrisables à cause de la diversité métabolique de cette famille de composés présents en mélange dans les feuilles. De plus, *Stevia rebaudiana* arbore une grande richesse métabolique pouvant impacter les saveurs des extraits (Wölwer-Rieck, 2012; Molina-Calle *et al.*, 2017). Par exemple, la stéviamine, un alcaloïde indolinizidique, est responsable d'amertume (Thompson *et al.*, 2009; Michalik *et al.*, 2010), et 2 sesquiterpènes, le spathuléanol et le carophyllène, sont décisifs pour l'arrière-goût apporté par les SGs (Cornara *et al.*, 2001 ; Tsanova *et al.*, 1991).

2.4.3 Métabolisation des SGs par l'homme

Les SGs se différencient des autres édulcorants non nutritifs par leur métabolisation chez l'homme (Magnuson *et al.*, 2016). Une étude pharmacocinétique a permis de mettre en évidence la métabolisation chez l'homme des 2 principaux SGs, le ST et le RebA (Wheeler *et al.*, 2008). Les auteurs ont réalisé des prélèvements de plasma sanguin, d'urine et de fèces chez 10 individus humains en bonne santé suite à une prise orale de ST et RebA. La première étape de la métabolisation est le clivage des liaisons osidiques par la flore bactérienne de l'intestin grêle et du gros intestin pour former le stéviol. Des études cliniques ont démontré que les SGs n'ont pas d'effet sur la glycémie chez l'homme (Carakostas *et al.*, 2008), et qu'ils possèdent une propriété acalorique. Il est donc supposé que les résidus osidiques produits par le clivage des SGs en stéviol sont utilisés par le microbiote du colon (Magnuson *et al.*, 2016). Le stéviol est absorbé et transporté vers le foie où il subit une glucuro-conjugaison pour former le stéviol glucuronide, par l'action de l'UDP-glucuronosyltransférase UGT2B7 (Chen *et al.*, 2017). Ce conjugué apparaît dans le plasma sanguin entre 8h et 12h après administration orale. Durant les 72h après administration orale, le stéviol glucuronide est excrété dans les urines, et correspond à une élimination de 59% et 62% de la dose ingérée en RebA et ST respectivement. Chez l'homme, le métabolite principal résultant de l'ingestion de SGs est le stéviol glucuronide (Geuns *et al.*, 2006), mais de faibles quantités de stéviol sont éliminées dans les fèces (Wheeler *et al.*, 2008). Des études *in vitro* ont montré que le RebA, RebB, RebC, RebD, RebE, RebF, RebM, DulA et SB sont totalement hydrolysés en stéviol par des matières fécales en 24h (Purkayastha *et al.*, 2014, 2015), indiquant la même métabolisation chez l'homme pour tous les SGs.

En résumé, ces études montrent que tous les SGs majoritaires sont dégradés en stéviol par la flore bactérienne du système digestif, pour être ensuite glucuronidés par le foie et enfin transportés pour son excrétion dans les urines (Figure I.2.14).

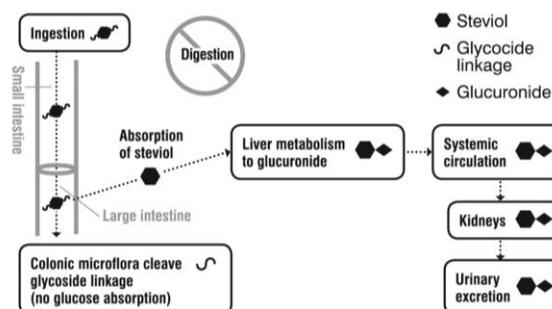


Figure I.2.14. Absorption, digestion, métabolisation, et excrétion des glycosides de stéviol chez l'homme (Magnuson *et al.*, 2016)

2.4.4 Effets bénéfiques sur la santé humaine

Actuellement, les effets des édulcorants non-nutritifs sur le métabolisme humain ne sont pas clairement démontrés (Romo-Romo *et al.*, 2017). Il n'existe pas de lien de cause à effet clairement établi entre leur consommation et les risques pour la santé humaine (Olivier *et al.*, 2015).

Depuis la découverte des SGs dans la communauté scientifique, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont évalué les effets des SGs sur la santé humaine, nécessaires pour leur approbation par les autorités sanitaires. Il a été prouvé que les SGs ne sont pas carcinogènes (Brusick, 2008), ni allergènes (Urban *et al.*, 2015). De plus, la consommation quotidienne de SGs diminue les risques d'apparition d'une hyperglycémie diabétique induite par un régime riche en matière grasse (Diabète de type II) chez les souris (Philippaert *et al.*, 2017). Des revues scientifiques font donc état de propriétés thérapeutiques des SGs et des extraits de Stévia (Carrera-Lanestosa *et al.*, 2017; Mathur *et al.*, 2017) : antioxydant, antihypertenseur, antidiabétique, anticancéreux. Les auteurs proposent même qu'ils soient considérés comme des traitements alternatifs aux syndromes métaboliques.

3 Amélioration génétique de la Stevia

La culture de *Stevia rebaudiana* en tant qu'espèce d'intérêt industriel est récente à travers le monde. Les premiers programmes d'amélioration en dehors du Paraguay ont vu le jour au Japon et en Corée à partir des années 1970. Des programmes se sont ensuite développés à partir des années 1980-1990 en Chine, Malaisie, Etats-Unis, Inde et plus récemment en France. L'amélioration variétale de cette espèce a principalement été réalisée par sélection massale, permettant d'améliorer des populations cultivées génération après génération, en se focalisant sur la production de biomasse et l'optimisation de la teneur et la composition en SGs. D'une manière générale, les traits sélectionnés sont peu nombreux et même la sélection du caractère biomasse foliaire est très peu documentée. Si de la diversité génotypique et phénotypique existe, alors l'amélioration de cette espèce relativement récente laisse supposer qu'un gain génétique important peut être atteint. Néanmoins, pour cela il est nécessaire d'avoir connaissance du phénotype et du génotype des ressources génétiques existantes. De plus, les traits à améliorer pour une production BIO peuvent être plus spécifiques.

L'amélioration variétale de *Stevia rebaudiana* doit faire face à plusieurs contraintes. Il n'existe pas de large collection de *Stevia rebaudiana* référencée et accessible. Les informations sur les ressources génétiques utilisées ou commercialisées dans le monde et leurs origines sont partielles, voir secrètes. Les échanges de graines sans traçabilité rendent également difficile l'identification du matériel végétal. De plus, les bases génétiques impliquées dans l'expression des caractères d'intérêt sont très peu documentées, tout comme les informations génomiques. Il n'existe pas non plus d'étude caractérisant la variabilité phénotypique d'un grand nombre de ressources génétiques. Le problème majeur limitant qui découle de ces contraintes est la faible caractérisation des ressources génétiques de cette espèce.

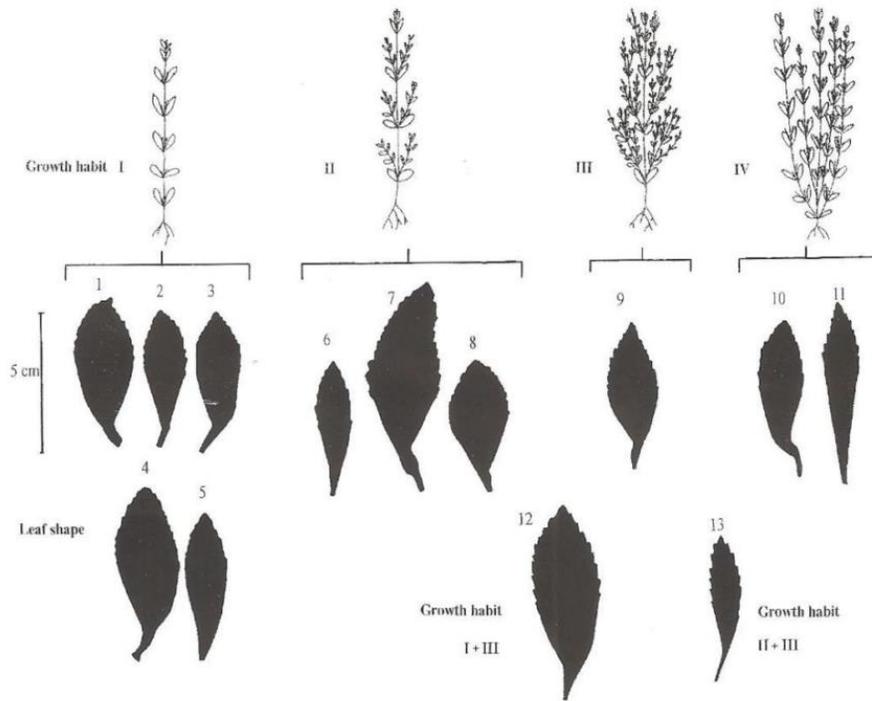


Figure I.2.15. Variabilité de la morphologie aérienne de *Stevia rebaudiana* (Tateo et al., 1998)

3.1 Caractérisation des ressources génétiques de *Stevia rebaudiana*

A cause du fort intérêt économique de la Stévia, les programmes de sélection dans le monde restent relativement secrets sur leurs ressources génétiques et leurs origines. La variabilité phénotypique décrite dans la littérature n'est caractérisée que sur un nombre réduit de génotypes dans chaque étude. En majorité, les publications scientifiques indiquent seulement qu'elles sont issues de sélection locale, et l'échange de matériel végétal est très réduit. Ajouté à cela, l'absence d'informations génomiques et de traçabilité rendent complexe l'appréciation de la variabilité phénotypique existante dans le monde.

3.1.1 La variabilité phénotypique décrite

3.1.1.1 Variabilité de la production de biomasse

Stevia rebaudiana étant une espèce pérenne, elle peut être cultivée pendant plusieurs années consécutives, ou en système de production annuelle, en fonction de son adéquation avec les conditions environnementales. La rentabilité de cette culture est donc fortement dépendante du rendement en biomasse foliaire et nécessite la sélection de génotypes performants et l'identification d'un itinéraire cultural adapté. Dans une étude sur 3 génotypes Criolla, la production de biomasse foliaire est le caractère le plus important pour l'obtention d'un rendement en SGs amélioré (Barbet-Massin, 2015).

La biomasse foliaire est un caractère très variable chez *Stevia rebaudiana* en termes d'architecture, de morphologie foliaire et de rendement en fonction du génotype. Une collection de 10 génotypes cultivés en Malaisie révèle la variabilité de la hauteur du plant, du nombre et de la circonférence des tiges, du nombre et de la taille des feuilles (Abdullateef & Osman, 2011). Cette variabilité se traduit par différents types d'architecture pouvant être classée en 4 à 6 groupes (Figure I.2.15) d'après les observations morphologiques de 13 génotypes provenant du Paraguay (Tateo *et al.*, 1998). Ces architectures ont été ensuite simplifiées sous les termes de port droit pour des axes principaux dominants, et buissonnants pour des ports se ramifiant (Barbet-Massin, 2015).

Des corrélations entre caractères phénotypiques liés à la biomasse aérienne ont été répertoriées dans la littérature. Elles peuvent constituer un outils d'aide à la sélection, mais ces corrélations impliquent peu de variables descriptives de la canopée (Yadav *et al.*, 2011). Une première étude a corrélé positivement le nombre de feuilles et de tiges à la biomasse foliaire, sans

implication de la taille des plants (Buana, 1958), alors que plus tard le nombre de feuilles, la taille des plants (Buana & Goenadi, 1985), et le nombre de tiges (Chalapathi *et al.*, 1998) ont montré une corrélation positive avec la production de biomasse. En dehors de ces corrélations phénotypiques, le lien entre structure de la canopée et rendement n'a pas été démontré chez *Stevia rebaudiana*.

Les rendements sont extrêmement variables, pouvant aller de 1,5 T/ha en Suisse à 7 T/ha aux Etats-Unis, avec des densités de plantation quasi équivalentes de 99 000 et 100 000 plants par hectare respectivement (Vouillamoz *et al.*, 2015; Parris *et al.*, 2016). Les rendements sont dépendants des génotypes et de leur interaction avec l'environnement (Barbet-Massin, 2015; Parris *et al.*, 2016). Il est donc nécessaire d'identifier et de sélectionner des génotypes adaptés pour chaque aire de production. De plus, la pérennité de cette culture est dépendante de la reprise de la croissance après l'hiver. En France, un taux de survie de seulement 17% a été reporté dans une étude, démontrant la nécessité de sélectionner des génotypes adaptés au passage de l'hiver (Barbet-Massin *et al.*, 2016), comme la variété SW 107 qui a une forte capacité de survie aux Etats-Unis (Shock & Parris, 2017a).

Malgré l'absence de connaissance sur le déterminisme génétique du rendement en biomasse foliaire, une étude a montré que ce caractère est fortement héritable dans 13 populations demi-frères ($h^2 = 75.5$) (Brandle & Rosa, 1992a). Ce résultat est particulièrement encourageant pour l'amélioration variétale de *Stevia rebaudiana*.

3.1.1.2 Variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol

Associée à une forte production de biomasse foliaire, une forte teneur en SGs est souhaitée pour obtenir les rendements les plus productifs. Cependant, en fonction des caractéristiques structurales en lien avec les propriétés organoleptiques, les profils en SGs doivent également être sélectionnés (2.4.2 Propriétés organoleptiques des SGs et perception du goût).

La teneur en SGs est un caractère très variable chez *Stevia rebaudiana*. En Bulgarie, la teneur en SGs totaux varie entre 8 et 22 % w/w pour 26 génotypes d'une collection locale, avec des teneurs en ST allant de 4 à 9 % w/w et en RebA de 3 à 14 % w/w (Denev *et al.*, 2017). Au sein d'une collection de 96 génotypes évalués en France, la teneur en SGs varie de 4.57 à 12.29 % w/w (Barbet-Massin *et al.*, 2016). 25 génotypes d'origine géographique diverse (Brésil, Paraguay et Italie) ont été évalués en Italie et montrent des teneurs en SGs allant de 9.44 à 27.38 % w/w (Montoro *et al.*, 2013). La gamme de variabilité de cette composante est très importante et dépend

du génotype, de son interaction avec l'environnement et de l'âge de la culture (Figure I.2.16) (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Parris *et al.*, 2016). Il a été démontré que la teneur en ST est fortement héritable (Brandle & Rosa, 1992b). Cependant, le déterminisme génétique de la teneur en SGs totaux n'est pas encore élucidé. La caractérisation de l'expression des 3 UGTs dans les feuilles par RT-qPCR a montré une corrélation positive entre l'expression de l'UGT85C2 et la teneur en SGs totaux dans les feuilles jeunes (Mohamed *et al.*, 2011). Les auteurs suggèrent que cette enzyme est l'étape clé pour l'accumulation en SGs.

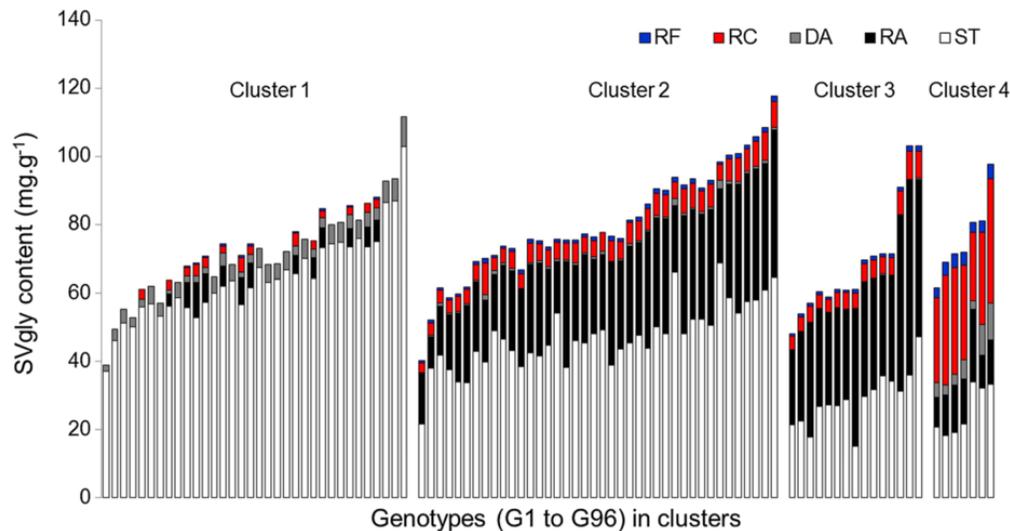


Figure I.2.16. Variabilité de teneur et composition en SGs dans une collection de 96 génotypes de la variété Criolla (Barbet-Massin *et al.*, 2016). ST : Stévioside ; RA : Rebaudioside A ; RC : Rebaudioside C ; RF : Rebaudioside F.

La composition en SGs, c'est-à-dire la proportion respective de chaque SGs par rapport aux SGs totaux, est relativement stable en fonction du génotype et de l'année de production (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Cette observation est également confirmée sur des cultures *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, comparée à la plante entière (Bondarev *et al.*, 2001). Dans ces études, seule la teneur en SGs rapportée à la masse sèche foliaire varie. Une large variabilité de profils en SGs est décrite dans la littérature, comme dans l'étude de 96 génotypes de la variété Criolla (Barbet-Massin *et al.*, 2016). La composition en 5 SGs amène les auteurs à classer cette diversité en 4 clusters (Figure I.2.16) et révèle la grande variabilité de profils au sein d'une même population. Ainsi, les gammes de variabilité sont importantes allant de génotypes n'accumulant pas de RebA (Barbet-Massin *et al.*, 2016) à des génotypes dont le profil est composé à 75% de RebA (Lankes & Grosser, 2015), ou jusqu'à 89% pour des variétés améliorées (Alvarez Britos, 2012a,b). La ségrégation des teneurs en SGs dans des 13 populations demi-frères montre que la présence/absence de RebA et de RebC

est un caractère monogénique, et que leur proportion respective est un caractère multigénique (Brandle, 1999). Une mutation perte de fonction dans le gène codant pour l'UGT76G1 entraîne l'absence de synthèse de RebA (Yang *et al.*, 2014), mais le déterminisme génétique de la proportion en SGs n'a pas encore été élucidé. L'analyse du transcriptome de 3 génotypes de *Stevia rebaudiana*, dont les profils en SGs sont opposés en termes d'accumulation en RebA, révèle des différentiels d'expression des gènes spécifiques de la voie de biosynthèse des SGs (Chen *et al.*, 2014). Le génotype accumulant la plus forte teneur en RebA, et par conséquent la plus forte proportion, montre une expression transcriptionnelle nettement supérieure des gènes KA13H, UGT85C2 et UGT76G1. Ce résultat suggère que l'accumulation en RebA serait dépendante de la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans sa synthèse.

3.1.1.3 Effets des stress abiotiques

Comme toute culture, la Stévia est soumise aux fluctuations de l'environnement, pouvant impacter sa productivité. De nombreuses études traitent également de l'incidence des pratiques culturales chez *Stevia rebaudiana* en Europe (pour revue : Angelini *et al.*, 2018). Ici, nous résumerons les paramètres impactant le plus la productivité.

Comme indiqué précédemment, la Stévia est une plante de jours courts dans son habitat naturel, les régions semi-humides voir subtropicales du Paraguay (Yadav *et al.*, 2011). En conditions contrôlées de jours longs, la biomasse foliaire est 4,4 fois supérieure et la teneur en SGs 3,4 fois supérieure comparées aux conditions de jours courts (Ceunen & Geuns, 2013a). L'accumulation spatiale des SGs (en fonction de l'âge de la feuille) n'est pas influencée par la photopériode : la teneur reste significativement supérieure dans les feuilles jeunes comparées aux feuilles âgées (Mohamed *et al.*, 2011).

La densité de plantation impacte la croissance et le rendement en biomasse foliaire. Une étude a comparé des densités de plantation allant de 37 000 à 110 000 plants/ha (Kumar *et al.*, 2014). Le nombre de tiges et de feuilles, ainsi que le rendement en biomasse foliaire par plant évolue négativement avec la densité, révélant une croissance moins optimale. Mais ramené à l'hectare, le rendement en biomasse foliaire augmente d'environ 40 %. La teneur en SGs n'est pas influencée par ce paramètre.

La Stévia requiert une irrigation adaptée. Elle est particulièrement sensible à la saturation en eau des sols mais également à la sécheresse (Pordel *et al.*, 2015). Ces 2 phénomènes ont un impact négatif sur les composantes du rendement. Une irrigation restituant 100% de l'évapotranspiration

permet d'obtenir les meilleurs rendements en biomasse foliaire (Lavini *et al.*, 2008). La teneur en SGs diminue par une période de sécheresse (Hajihashemi & Geuns, 2016)

L'apport de nutriments est un facteur important de la culture. Le déficit en macronutriments (N, P, S, Mg et Ca) et en micronutriment (uniquement Cu) conduisent à une diminution de la teneur en SGs totaux (Kafle *et al.*, 2017). Une faible teneur en azote dans les feuilles (≈ 1 % w/w) est corrélée avec une diminution de la biomasse foliaire et une augmentation de la teneur en SGs, contrairement à de fortes teneurs en azote ($> 2,5$ % w/w) qui augmentent la production de biomasse foliaire et diminuent la teneur en SGs, conduisant à un effet négatif sur le rendement en SGs en conditions contrôlées (Barbet-Massin *et al.*, 2015). Il est donc nécessaire d'identifier les apports azotés pour optimiser la production de biomasse foliaire, tout en conservant une accumulation en SGs optimale.

Tableau I.2.3. Microorganismes affectant *Stevia rebaudiana* dans le monde, provoquant des maladies foliaires, racinaires et de la tige

Maladie	Agent causal	Type	Localisation	Références
Alternariose (tâche foliaire)	<i>Alternaria alternata</i>	Champignon (Ascomycète)	Inde	(Maiti <i>et al.</i> , 2007)
Tâche foliaire	<i>Alternaria steviae</i>	Champignon (Ascomycète)	Japon Egypte	(Ishiba <i>et al.</i> , 1982b) (Hilal & Baiuomy, 2000)
Tâche foliaire	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Bactérie	Floride	(Strayer <i>et al.</i> , 2012)
Septoriose (tâche foliaire)	<i>Septoria steviae</i>	Champignon (Ascomycète)	Japon Canada Caroline du Nord Inde	(Ishiba <i>et al.</i> , 1982a) (Reeleder, 1999) (Lovering & Reeleder, 1996) (Bhandari & Harsh, 2006)
Moisissure grise	<i>Botrytis cinerea</i>	Champignon (Ascomycète)	Italie Egypte	(Garibaldi <i>et al.</i> , 2009) (Hilal & Baiuomy, 2000)
Virus de la maladie bronzée de la tomate	<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>	Virus	Amérique du Nord Grèce	(Koehler <i>et al.</i> , 2016) (Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2007)
Mosaïque du concombre	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	Virus	Espagne	(Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2016)
Pourriture racinaire	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Champignon (Basidiomycète)	Caroline du Nord Grèce Inde Italie Egypte	(Koehler & Shew, 2014a) (Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2016) (Kamalakaran <i>et al.</i> , 2007) (Carrieri <i>et al.</i> , 2016) (Hilal & Baiuomy, 2000)
Pourriture de la tige	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Champignon (Ascomycète)	Caroline du Nord Canada	(Koehler & Shew, 2014b) (Chang <i>et al.</i> , 1997)
Flétrissement (verticilliose)	<i>Verticillium dahliae</i>	Champignon (Ascomycète)	Amérique du Nord	(Farrar <i>et al.</i> , 2000)
Flétrissement	<i>Fusarium oxysporum</i>	Champignon (Ascomycète)	Egypte	(Hilal & Baiuomy, 2000)
Pourriture racinaire	<i>Fusarium semitectum, F. solani</i>	Champignon (Ascomycète)	Egypte	(Hilal & Baiuomy, 2000)
Pourriture racinaire	<i>Rhizoctonia solani</i>	Champignon (Basidiomycète)	Egypte	(Hilal & Baiuomy, 2000)
Pourriture racinaire	<i>Pythium myriotylum, P. irregulare, P. aphanidermatum</i>	Oomycète	Caroline du Nord	(Koehler <i>et al.</i> , 2017)
Pourriture charbonneuse	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Champignon (Ascomycète)	Caroline du Nord Egypte	(Koehler & Shew, 2018) (Hilal & Baiuomy, 2000)
Non déterminée	<i>Phytoplasma (groupe 16SrXXIV)</i>	Mollicute	Inde	(Samad <i>et al.</i> , 2011)

3.1.1.4 Effets des stress biotiques

Les stress biotiques sont causés par des organismes vivants (parasites animaux, champignons, bactéries, et plantes adventices), conduisant à une interaction défavorable pour la plante. On parle alors de maladies infectieuses, parasitaires. Il a été estimé sur 10 grandes cultures que ces stress sont responsables de 32% de perte de rendement avec une protection de culture, et pourraient conduire à 67% de pertes potentielles sans protection phytosanitaire ou mécanique (Oerke & Dehne, 2004). Dans cette étude, les pertes de rendement ont été causées à 10,1% par les parasites animaux, 9,9% par les champignons et bactéries, 9,4% par les plantes adventices et 2,7% par les virus. La lutte chimique reste actuellement le principal moyen de protection des cultures contre ces stress biotiques, et elle n'est donc utilisable qu'en agriculture conventionnelle.

Stevia rebaudiana est sensible à la présence de plantes adventices, en particulier lors de son implantation (Angelini *et al.*, 2018). Cette compétition provoque une réduction de la biomasse aérienne et de la formation des ramifications, un retard de floraison, et rend la récolte plus difficile (Harrington *et al.*, 2011). Les principales méthodes de désherbage utilisées, hors lutte chimique, sont la lutte mécanique et manuelle, et la couverture du sol par du plastique noir (Basuki, 1990). Des méthodes alternatives complémentaires peuvent être envisagées dans le cas d'un itinéraire cultural biologique : utilisation des phénomènes d'allopathie, utilisation de culture de couverture, gestion des nutriments, agencement de la plantation, lutte biologique et physique (Angelini *et al.*, 2018).

Différents microorganismes responsables de maladies racinaires ou foliaires ont déjà été identifiés à travers le monde, et peuvent entraîner une perte de rendement direct chez *Stevia rebaudiana* (Tableau I.2.3). Parmi ces infections, 2 pathogènes fongiques sont fréquemment décrits : *Septoria steviae* et *Sclerotium rolfsii*, responsable de maladies foliaire et racinaire respectivement.

Sclerotium rolfsii est responsable de la pourriture racinaire chez *Stevia rebaudiana*. Le mycélium de ce champignon (filament blanc) apparaît au niveau du collet et se développe vers les racines, entraînant leur décomposition (Figure I.2.17) (Kamalakaran *et al.*, 2007). Cette maladie provoque un jaunissement, une fanaison des feuilles, et entraîne un flétrissement du plant entier. Ces symptômes entraînent 65% de perte de rendement en biomasse foliaire sèche chez *Stevia rebaudiana* (Chavan, 2017).



Figure I.2.17. Plants de *Stevia rebaudiana* atteint par *Sclerotium rolfsii*, responsable de maladie racinaire. (A) Fanaison et flétrissement des feuilles. (B) Mycélium blanc et sclérotés au niveau du collet. Crédit photo : C. Hastoy



Figure I.2.18. Plants de *Stevia rebaudiana* atteint par la septoriose. (A) Nécroses foliaires sur la partie basses des plants. (B) Spots nécrotiques entourés de halos chlorotiques. Crédit photo : C. Hastoy

L'utilisation de fongicides, tel que l'héxaconazole à 0,1% ou les QoI (Quinone outside inhibitors), se révèle efficace contre ce pathogène chez la Stévia (Chavan, 2017; Koehler & Shew, 2017). Des approches de biocontrôle améliorent également la résistance contre l'invasion par *Sclerotium rolfsii* en Inde (Angayarkanni, 2013). En effet, l'auteur a identifié des souches bactériennes de la rhizosphère (*Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*) ayant un effet antagoniste à ce pathogène. Des sources de résistance contre celui-ci ont été identifiées chez le pois (Shirsole *et al.*, 2018), mais pas encore chez *Stevia rebaudiana*. Ce pathogène a été décrit sur tomate dans le Sud-Ouest, et peut donc représenter un risque pour l'implantation de la Stévia, pour lequel il existe peu de moyens de lutte (Blancard, 2014).

Le genre *Septoria* est responsable de l'apparition de spots marron, nécrotiques sur les feuilles, entourées de halo chlorotique. Ces symptômes apparaissent tout d'abord sur la partie basse de la plante et se propagent ensuite vers le haut (Figure I.2.18). Ils conduisent à la nécrose foliaire puis à la défoliation du plant, impliquant une perte directe du rendement de production en SGs pouvant atteindre 50% (Ishiba *et al.*, 1982a; Lovering & Reeleder, 1996; Reeleder, 1999; Bhandari & Harsh, 2006). La septoriose survit pendant l'hiver grâce aux débris de culture infectés (Reeleder, 1999), et est disséminée par contact ou par les éclaboussures. Cette maladie est donc fortement persistante au fil des années. Il serait possible de minimiser l'impact de la septoriose par les pratiques culturales, en réduisant la durée d'humidité au niveau du plant par la circulation de l'air dans la canopée et en adaptant le régime d'irrigation (Angelini *et al.*, 2018). Cependant, l'efficacité de ces pratiques n'a pas encore été démontrée chez *Stevia rebaudiana*. Une étude a montré l'existence de résistance quantitative à la septoriose au sein d'un germplasm de Stévia au Canada (Reeleder, 1999), révélant la possibilité de sélectionner selon ce critère et d'apporter un gain génétique à l'espèce. L'identification de sources de résistance est le meilleur moyen de lutte contre ce pathogène (Yadav *et al.*, 2011), avec la sélection éventuelle de structure de la canopée ne favorisant pas le développement de la maladie, comme chez le blé (Scott *et al.*, 1985). Des espèces du genre *Septoria* sont présentes en France, telles que *Septoria cucurbitaceum*, *Septoria lycopersici*, et *Septoria lactucae* (Blancard, 2018). Il est donc primordial d'évaluer leur incidence potentielle sur *Stevia rebaudiana*.

3.2 Amélioration génétique de *Stevia rebaudiana*

3.2.1 Etats des lieux de la sélection et informations génomiques disponibles

3.2.1.1 Critères de sélection passés

Les programmes de sélection et d'amélioration se sont tout d'abord intéressés à augmenter la teneur totale en SGs dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*. En 3 décennies, la sélection essentiellement massale de *Stevia rebaudiana* a permis de doubler cette teneur en passant de 5-10 % w/w de SGs à jusqu'à 20 %w/w (Yao *et al.*, 1999). Ainsi des variétés améliorées pour ce caractère sont apparus dès 1978 en Corée (Lee *et al.*, 1978), et le dépôt de brevet de variétés a débuté dès 1984 au Japon (Morita, 1984 ; Yadav *et al.*, 2011). Ce caractère majeur continue de faire l'objet de sélection.

Cette teneur totale n'est cependant pas suffisante. Les programmes de sélection se sont rapidement tournés vers l'amélioration de la composition en SGs à cause de l'amertume apportée par le ST. L'objectif des sélectionneurs a donc été d'augmenter la teneur en RebA et le ratio RebA/ST. En 1982, une première variété (Suweon 11) exprimant un ratio RebA/ST de 0,96 et une teneur en SGs de 22,4 % w/w a été sélectionnée à partir de ressources génétiques dont le ratio n'était que de 0,36 (Lee *et al.*, 1982). En 1987 Morita développa également une variété clonale dont le ratio RebA/ST atteint 9,1 mais dont la teneur en SGs n'est que de 10,2 % w/w (Yadav *et al.*, 2011). Des variétés de la population Morita ont été également développées et montrent des ratios RebA/ST $\geq 2,56$ (Morita & Bu, 1998) ou ≥ 4 (Morita *et al.*, 2007). La variété synthétique AC Black Bird permet d'obtenir un fort ratio de 9,1 (Brandle, 2001).

3.2.1.2 Critères de sélection actuels et futurs

La teneur en SGs a continué d'être optimisée ces dernières années. Certaines variétés développées affichent ainsi des teneurs allant jusqu'à 28 % w/w (Wang, 2016; Wang *et al.*, 2018). Les progrès sur l'identification des SGs accumulés minoritairement et la caractérisation de leur propriété gustative ont amené les sélectionneurs à développer des variétés accumulant de forte teneur en RebD (0,5-3,25 % w/w) et en RebM (0,5-1,15% w/w) (Brower *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017a,b,c; Markosyan *et al.*, 2017; Michigan States University, 2018). Une attention particulière est maintenant portée à la sélection pour ces composés mineurs. Ainsi la composition en SGs n'est plus uniquement définie par le ratio RebA/ST, mais par la proportion respective de chaque SGs par rapport au SGs totaux.

La teneur et la composition en SGs sont les critères premiers de sélection mentionnés par les sélectionneurs. Récemment, de nouveaux caractères sont mentionnés dans les développements variétaux. Ainsi, des variétés développées seraient résistantes à la sécheresse (Garnighian, 2012; Casaccia *et al.*, 2016), adaptées aux sols argileux (Garnighian, 2012) ou à des sols faiblement fertiles (Casaccia *et al.*, 2016). La résistance à des maladies foliaires a été un critère de sélection au Japon (Septoriose et Alternariose), en Malaisie (Morita *et al.*, 2007; Alvarez Britos, 2012b,a), et aux Etats-Unis avec la variété T60 résistance à *Fusarium* spp et *Sclerotinia* spp (Garnighian, 2012). Ces sélections correspondent aux programmes d'amélioration au Paraguay (Casaccia *et al.*, 2016), aux Etats-Unis (Parris *et al.*, 2016), et en Malaisie (Alvarez Britos, 2012b,a), mais certains de ces programmes n'indiquent pas si ces caractères ont fait l'objet de leur schéma de sélection.

En Europe, et en général dans l'hémisphère Nord, la capacité de survie à l'hiver est un critère primordial pour garantir la pérennité de la culture (Barbet-Massin *et al.*, 2016), mais ce caractère n'a pas encore été clairement travaillé en sélection. Un seul génotype (Gawi) a été clairement identifié comme adapté au climat tempéré (Lankes & Zabala, 2011). Pour l'implantation d'une production pérenne BIO, ce trait est primordial à sélectionner.

Dans le cas d'une production BIO en Europe, il est prioritaire de sélectionner les profils en SGs, l'adaptation au climat tempéré qui se traduit par la productivité de biomasse foliaire et la capacité de survie pendant l'hiver, ainsi que la résistance aux maladies foliaires.

3.2.1.3 Apport des informations génomiques

Stevia rebaudiana est une espèce diploïde ($2n=22$) et son génome est estimé à $1C = 1\ 330$ Mbp soit environ 10 fois celui d'*Arabidopsis thaliana* (Frederico *et al.*, 1996; de Oliveira *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2014). Malgré le très fort intérêt économique représenté par la Stévia, et le développement des techniques de séquençage, les informations en libre accès sur le génome sont relativement pauvres.

Les premières informations génomiques sont apparues en 2002, avec le séquençage d'une librairie d'ADNc (5 548 Expressed Sequence Tag) réalisé pour comprendre et élucider la voie de biosynthèse des SGs (Brandle *et al.*, 2002). Ainsi jusqu'en 2014, aucune donnée de séquençage n'a été ajoutée aux bases de données publiques. C'est le projet de séquençage des génomes des *Asteraceae* (http://compgenomics.ucdavis.edu/compositae_database.php; Compositae Genome Project) aux Etats-Unis qui a fourni à la communauté scientifique une plus large banque d'ESTs de *Stevia rebaudiana* (Hodgins *et al.*, 2014). Très récemment, PureCircle Stevia Institute et KeyGene ont annoncé le séquençage de *Stevia rebaudiana* (PureCircle, 2017) mais aucun génome exploitable n'est pour le moment accessible dans les bases de données publiques. L'obtention de ce type de référence est un grand pas en avant car il permet de mieux comprendre l'organisation d'un génome, sa complexité et facilite les recherches de marqueurs génétiques.

Peu de marqueurs moléculaires pour la caractérisation de la diversité génétique sont disponibles chez *Stevia rebaudiana* et leur développement est relativement récent (Tableau I.2.4). On dénombre des marqueurs aléatoires de type ISSR (Heikal *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2016) et RAPD (Yao *et al.*, 1999; Chester *et al.*, 2013; Abdelsalam *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016). Ces marqueurs sont simples à développer, mais ciblent aléatoirement les régions du génome et sont peu reproductibles (Singh & Singh, 2015). La banque de 5 548 ESTs en libre accès a permis de démarrer l'identification de centaines de marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) (Bhandawat *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015). Ces derniers sont spécifiques, polymorphes, révèlent un grand nombre d'allèles (Singh & Singh, 2015) et sont donc plus informatifs pour la caractérisation de la diversité génétique (Gong *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2014). Ils ont été largement développés chez d'autres espèces pour l'identification de variétés, la caractérisation de germplasm, la cartographie génétique et la sélection assistée par marqueurs (Singh & Singh, 2015). Une seule étude répertorie un set de 44 510 marqueurs SNPs et 10 070 SSRs, identifiés par le séquençage du transcriptome de 3 génotypes (Chen *et al.*, 2014). Grâce à l'obtention d'un génome de référence, PureCircle a identifié 7 824 613 marqueurs SNPs, mais ils ne sont pas en libre accès (Markosyan *et al.*, 2017).

Ces marqueurs sont les plus abondants dans le génome, et par conséquent les plus résolutifs, malgré leur degré de polymorphisme moins élevé par rapport aux SSRs (Singh & Singh, 2015).

Dans les programmes d'amélioration, les informations génomiques et les outils de génotypage permettent de réduire les coûts et le temps de sélection par Sélection Assistée par Marqueurs (SAM). Cette approche réside sur l'identification de corrélations statistiques entre phénotype d'intérêt et régions du génome. Ces corrélations sont établies grâce aux cartes génétiques, développées à partir de marqueurs moléculaires, et l'analyse d'un grand nombre de ressources génétiques révélant un maximum de variabilité phénotypique. Des marqueurs RAPD ont été utilisés pour créer la seule carte génétique publiée chez *Stevia rebaudiana*. Les auteurs obtiennent 21 groupes de liaison avec 183 marqueurs RAPD, distants entre eux d'en moyenne 7,6 cM (Yao *et al.*, 1999). Cette carte génétique n'est pas suffisamment résolutive pour de la détection de Quantitative Trait Loci (QTL) chez *Stevia rebaudiana*. Actuellement, seulement deux cas de corrélation entre marqueurs et phénotype ont été établis, et font l'objet de brevets. 2 RAPD ont été utilisés pour sélectionner des ratio RebA/ST ≥ 3 (Hosono *et al.*, 2001) et 8 SNPs pour identifier de forte teneur en RebD et en RebM (Markosyan *et al.*, 2017).

Tableau I.2.4. Marqueurs moléculaires développés chez *Stevia rebaudiana*. RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA ; ISSR : Inter-Simple Sequence Repeat ; SSR : Simple Sequence Repeat ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Marqueurs	Testés / Identifiés	Développés / Utilisés	Références
RAPD	700	183	Yao <i>et al.</i> , 1999
	20	20	Chester <i>et al.</i> , 2013
	8	8	Abdelsalam <i>et al.</i> , 2016
	27	22	Sharma <i>et al.</i> , 2016
ISSR	-	7	Heikal <i>et al.</i> , 2008
	26	23	Sharma <i>et al.</i> , 2016
SSR	107	52	Bhandawat <i>et al.</i> , 2014
	10 070	-	Chen <i>et al.</i> , 2014
	168	18	Kaur <i>et al.</i> , 2015
SNP	44 510	-	Chen <i>et al.</i> , 2014
	7 824 613	48	Markosyan <i>et al.</i> , 2017

3.2.2 Variétés développées

Il existe plusieurs types de variétés chez *Stevia rebaudiana*. On trouve principalement des variétés populations provenant de système d'allofécondation ouverts, des variétés clonales et des variétés synthétiques. Actuellement, il n'existe pas de variétés inscrites dans les catalogues officiels internationaux ou européens. La plupart des variétés développées ne sont pas protégées. Les autres sont protégées par un brevet international ou national (Tableau I.2.5).

Les variétés les plus accessibles et présentes sur le marché à travers le monde chez *Stevia rebaudiana* sont Criolla, Morita, Eirété et Katupyry (Casaccia *et al.*, 2016). La variété Criolla est la plus connue et la plus cultivée au Paraguay. Elle est propagée par semis et résulte de sélection par les producteurs Paraguayens. L'inconvénient de cette variété est l'arrière-goût amer, causé par le ST qui représente en moyenne 64 % des SGs totaux. Les programmes de sélection paraguayens ont ensuite développé deux variétés clonales, Eirété et Katupyry, inscrites aux RNCP (Registro Nacional de Cultivares Protegidos, Paraguay). Eirété est particulièrement adaptée à de forte de fortes densités de plantation, permettant d'obtenir des rendements en biomasse foliaire annuels 3 à 5 fois supérieur par rapport à Criolla. Sa teneur en SGs est également supérieur (22 % w/w), ainsi que sa composition en RebA (52 % des SGs totaux). Katupyry est une variété tolérante à la sécheresse et adaptée à des sols pauvres, et sa composition en RebA est équivalente à Eirete (53% des SGs totaux) (Casaccia *et al.*, 2016). Les variétés Morita (clonale ou population) ont été développées par le programme de sélection Japonais pour de forte proportion en RebA (Morita & Bu, 1998; Morita *et al.*, 2007).

Des variétés portant ces dénominations sont maintenant vendues sous forme de graines (Stevia Store, 2018), sans garantie qu'elles soient restées similaires à celles d'origines. Il semblerait que les sélectionneurs paraguayens aient continué d'améliorer certaines de ces variétés amenant à des dénominations supplémentaires. Les variétés Morita II et III présentent actuellement de forte proportion de RebA (60 et 75 % respectivement), et Morita III consomme 20% d'eau en moins (Stevia Store, 2018).

En Europe, nous avons accès à la collection de l'EUSTAS (European Stevia Association) qui référence officiellement 6 génotypes (C, D, E, F, Gawi, K) (Lankes & Grosser, 2015). Gawi est particulièrement intéressant car sélectionné pour son adaptation au climat tempéré (Lankes & Zabala, 2011), ainsi que C pour sa forte teneur en RebA (Lankes & Grosser, 2015). Ces génotypes peuvent servir de références entre études Européennes.

Tableau I.2.5. Liste des dépôts de brevet pour des variétés de *Stevia rebaudiana* depuis 1998

Cessionnaire	Pays	Brevet	Variété	Caractéristiques	Propagation	Inventeurs
Royal-Sweet International Technologies Ltd. Part.	Canada	USPP10564P	RSIT 94-751	Fort teneur en RebA (11,6 % w/w ; 65 % / SGs totaux)	Multiplication végétative	(Marsolais <i>et al.</i> , 1998)
	Canada	USPP10562P	RSIT 94-1306	Fort teneur en ST (17,25 % w/w ; 93% /SGs totaux)	Multiplication végétative	(Sys <i>et al.</i> , 1998)
	Canada	USPP10563	RSIT 95-166-13	Fort teneur en RebC (14 % w/w ; 90% /SGs totaux)	Multiplication végétative	(Brandle <i>et al.</i> , 1998)
Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd	Japon	US6031157A	ATCC Accession No PTA-444 (SF-6)	Fort ratio RebA/ST (≥ 2,56)	Reproduction sexuée	(Morita & Bu, 1998)
Ministry of Agriculture and Agri-Food Canada	Canada	US6255557B1	Synthetic cultivar AC Blackbird	Fort teneur en SGs (≥ 14 % w/w) Fort ratio RebA/ST (≥ 9,1)	Reproduction sexuée	(Brandle, 2001)
Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd	Japon	EP 1 856 967 A1	Morita variety No.FERM BP - 10353	Fort ratio RebA/ST ≥ 4 Résistance contre <i>Septoria</i> spp et <i>Alternaria</i> spp	Reproduction sexuée	(Morita <i>et al.</i> , 2007)
	Japon	WO 2009/093610	F1ST No. FERM BP-10870	Faible teneur en RebA (< 1 % w/w)	Reproduction sexuée	(Morita <i>et al.</i> , 2009)
PureCircle Sdn Bhd	Malaisie	USPP23164P3	AKHL1	Floraison tardive 3 coupes = 4,5 T/ha feuilles sèches Fort teneur en RebA (11,5 % w/w ; 89% /SGs totaux) Résistance aux maladies foliaires	Multiplication végétative	(Alvarez Britos, 2012b)
	Malaisie	US 2012/ 0090063 P1	AKHL4	Floraison précoce 3 coupes = 4,5 T/ha feuilles sèches Fort teneur en RebA (11,5 % w/w ; 89% /SGs totaux) Résistance aux maladies foliaires	Multiplication végétative	(Alvarez Britos, 2012a)
Sweet Green Field Holdings LLC	USA	US PP22, 593 P3	T60	Fort teneur en RebA (≥ 12 % w/w ; ≥ 82 % /SGs totaux) Résistance à la sécheresse, sols argileux Résistance contre <i>Fusarium</i> ssp, <i>Sclerotinia</i> spp	Multiplication végétative	(Garnighan, 2012)
Cargill Inc	USA	EP2966990A1	ATCC Accession SC0419 x SC0435 Tent 1 SC0422 x SC0312 Tent 2	Fort teneur en RebD (0,5-3 % w/w) RebA ≥ 4 % w/w et ≤ 15 % w/w RebM+RebE+RebN ≥ 0,5 %w/w	Multiplication végétative / reproduction sexuée	(Brower <i>et al.</i> , 2014)

Tableau I.2.5. Liste des dépôts de brevet pour des variétés de *Stevia rebaudiana* depuis 1998 (Suite)

Cessionnaire	Pays	Brevet	Variété	Caractéristiques	Propagation	Inventeur
GLG Life Tech Corporation	Canada	US20160338396A1	-	Fort teneur en RebA (7-20% w/w) Fort teneur en SGs totaux (15-28% w/w)	Multiplication végétative / reproduction sexuée	(Wang, 2016)
	Malaisie	US20170283819A1		Fort teneur en RebD (0,6-3,3% w/w) Fort teneur en RebM (0,5-1,15 % w/w)	Multiplication végétative // reproduction sexuée	(Markosyan <i>et al.</i> , 2017)
USA Inc	Chine	US 9668450 B2	817096 CGMCC.No. 9703	Fort teneur en RebD (3,25 % w/w)	Multiplication végétative // reproduction sexuée	(Li <i>et al.</i> , 2017a)
	Chine	US 9675015 B2	807086 CGMCC.No. 9702	Fort teneur en RebD (1,55 % w/w), RebM (1,0 % w/w) 2,7 T/ha de feuilles sèches	Multiplication végétative // reproduction sexuée	(Li <i>et al.</i> , 2017c)
	Chine	US 9668451B2	814011 CGMCC.No. 9701	Fort teneur en RebA (8,45 % w/w), RebD (1,11 % w/w), RebM (1,12 % w/w) 1,5 T/ha de feuilles sèches	Multiplication végétative // reproduction sexuée	(Li <i>et al.</i> , 2017b)
S&W Seed Company	USA	US PP27,937 P3	SW 107	Fort vigueur Rendement en biomasse foliaire de 2 T/ha Fort teneur en SGs totaux (16,9 % w/w) Fort teneur en RebA (62 %/SGs totaux) Excellent survie à l'hiver	Multiplication végétative	(Shock & Parris, 2017a)
	USA	US 2017/0142885 P1 SW 129		Fort vigueur Rendement en biomasse foliaire de 2,3 T/ha Fort teneur en SGs totaux (17,5 % w/w) Fort teneur en RebA (77 %/SGs totaux) Floraison tardive	Multiplication végétative	(Shock & Parris, 2017b)
GLG Life Tech Corporation	USA	US 2017/0290225 P1 SW 227		Fort vigueur Rendement en biomasse foliaire de 5,5 T/ha Fort teneur en RebA (10,7 % w/w ; 80,4 % / SGs totaux)	Multiplication végétative	(Shock & Parris, 2017c)
	Canada	US20170290285A1	-	Fort teneur en RebC (3-8% w/w) Teneurs en SGs totaux (10-13% w/w)	Multiplication végétative / reproduction sexuée	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
PureCircle USA Inc	Canada	US20180042280A1	-	Fort teneur en RebA (6-20% w/w) Fort teneur en SGs totaux (15-28% w/w)	Multiplication végétative / reproduction sexuée	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
	Malaisie	US20180070553A1	314018 CGMCC No. 11712 I6139002 CGMCC.No. 11697	Identification de génotypes auto-compatibles et obtention d'une descendance	Multiplication végétative / reproduction sexuée	(Markosyan & Jing, 2018)

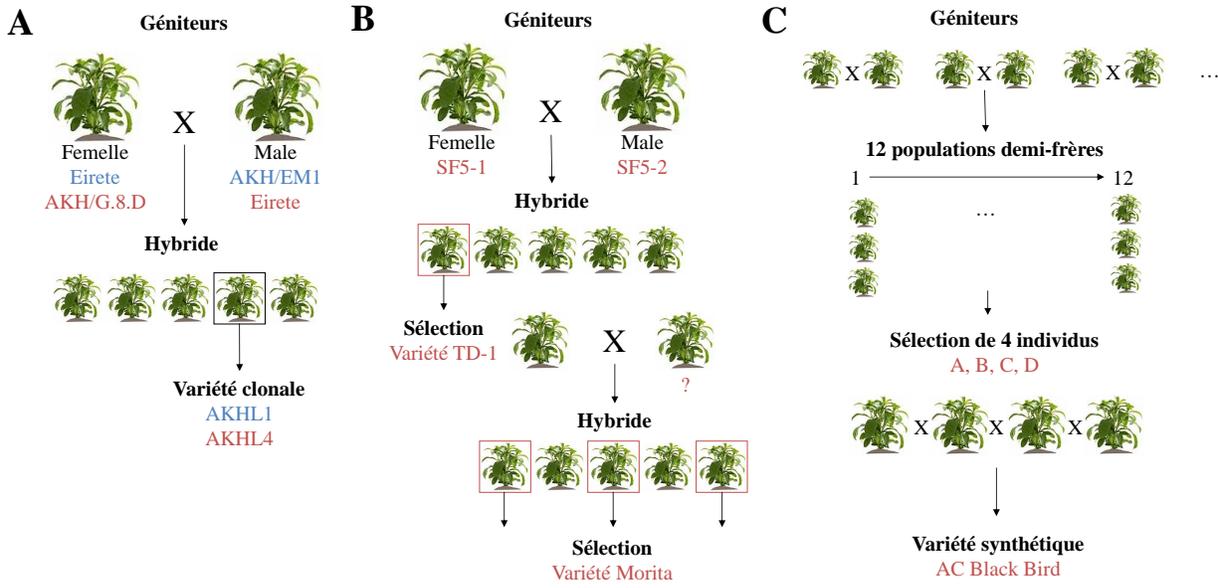


Figure I.2.19. Stratégie d'amélioration utilisée chez *Stevia rebaudiana*. (A) Sélection clonales pour l'obtention des variétés AKHL1 et AKHL4 (Alvarez Britos, 2012b,a). (B) Variété Morita développée au Japon par sélection récurrente assistée par marqueur RAPD (Morita *et al.*, 2007). (C) Création de la variété synthétique AC Black Bird (Brandle, 2001).

3.2.3 Stratégies d'amélioration

Différentes stratégies d'amélioration sont répertoriées dans le monde et ont permis de développer les variétés précédemment décrites. A l'instar des origines des ressources génétiques, les stratégies d'amélioration des variétés non protégées par des brevets ne sont pas décrites. La première stratégie utilisée est la sélection massale, conduisant à l'amélioration génération après génération de la teneur en SGs par exemple et au développement de la variété Criolla au Paraguay (Casaccia *et al.*, 2016). Tous les programmes d'amélioration appliquent cette stratégie en premier lieu pour évaluer leurs ressources génétiques et identifier des individus adaptés à leurs conditions, pouvant servir de parents dans des stratégies d'amélioration. Les stratégies d'amélioration présentées dans les brevets sont principalement basées sur l'évaluation phénotypique, ce n'est que très récemment que ces programmes ont utilisé la SAM. Les stratégies se différencient par le nombre et le type de croisement réalisé, et la génération des lignées parentales.

3.2.3.1 Schéma de sélection et d'amélioration

L'auto-incompatibilité de *Stevia rebaudiana* ne permet pas de générer des lignées pures par autofécondation, contrairement aux espèces autogames, et a pour conséquence une forte hétérozygotie. La stratégie la plus simple est donc la sélection clonale (Figure I.2.19 A), correspondant à la sélection d'individus remarquables au sein de la population hybride en 1^{ère} génération, telles que les variétés clonales AKHL1 et ALHL4 (Alvarez Britos, 2012b,a). Ces individus remarquables peuvent être ensuite utilisés comme géniteurs pour la génération de variétés population, méthode utilisée en Chine qui n'indique pas le gain apporté quantitativement (Haiyan *et al.*, 2008, 2012, Ping *et al.*, 2015a,b).

La sélection récurrente consiste à sélectionner les individus intéressants dans chaque génération qui servent alors de géniteurs en mélange pour la génération suivante. C'est la valeur générale de la population qui est améliorée au fil des générations (Figure I.2.19 B). Cette sélection a été utilisée pour développer la variété population Morita au Japon (Morita *et al.*, 2007). Cette stratégie a également servi pour l'identification des 4 géniteurs pour la l'obtention de la variété synthétique AC Black Bird (Brandle, 2001) (Figure I.2.19 C). Les variétés clonales RSIT 94-1306 et RSIT 94-751 sont issues de ce même schéma de sélection à partir de populations demi-frères issus de 13 génotypes parentaux (Brandle & Rosa, 1992a). Les variétés clonales SW 107 et SW 129 sont issues du même schéma de sélection (Shock & Parris, 2017a,b). Enfin, la stratégie de rétrocroisement consiste à sélectionner les individus intéressants au sein d'une génération, qui sont

ensuite interfécondés avec un des 2 géniteurs du premier croisement. Cette stratégie a été utilisée récemment pour générer plusieurs variétés population (Li *et al.*, 2017a; Markosyan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017, 2018)

Très peu de stratégie d'amélioration ont eu recours à la sélection assistée par marqueurs (SAM). Des marqueurs RAPD ont permis de sélectionner les individus dans chaque génération pour la création de variété Morita (Morita *et al.*, 2007). 8 SNPs sont utilisés pour identifier les individus dont les teneurs en RebD et RebM sont supérieurs (Markosyan *et al.*, 2017).

3.2.3.2 Génération de lignées pures

L'haplodiploïdisation par culture *in vitro* d'anthère a été utilisé aux Etats-Unis pour la création de la variété clonale T60 à partir d'individus de la variété Criolla (Garnighian, 2012). Il n'est recensé que dans un seul brevet des génotypes de Stévia supportant l'autofécondation (Markosyan & Jing, 2018). Ces avancés récentes permettent d'obtenir des individus homozygotes, appelés lignées pures, utilisables pour générer des F1 hybrides, particulièrement intéressantes pour la vigueur d'hétérosis démontrée chez d'autres espèces (Townsend *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2013).

3.2.3.3 Augmentation de la ploïdie et mutagénèse

L'augmentation de la ploïdie est une des stratégies utilisée pour l'amélioration des composantes du rendement chez *Stevia rebaudiana* (Yadav *et al.*, 2011). En Chine, la méthode d'obtention de plants tétraploïdes par traitement à la colchicine de méristèmes axillaires fait l'objet d'un premier brevet (Xiang & Hong, 2012). Un second brevet chinois induit des individus tétraploïde par traitement à la colchicine de graines en germination en vue d'une propagation végétative (Zhang *et al.*, 2018). Ce doublement de la ploïdie induit des stomates plus larges et une teneur en chlorophylle supérieure, suggérant une activité photosynthétique et une capacité de transpiration supérieure aux plants diploïdes. Cette stratégie améliore la croissance, la production de biomasse foliaire, à travers l'augmentation de la surface foliaire, et la teneur en ST et RebA (Zhang *et al.*, 2018). En Chine, il a été montré que l'obtention de plants de Stévia triploïdes est possible par croisement d'individus tétraploïdes et diploïdes (Ping *et al.*, 2015c). Cette méthode rend possible la propagation d'hybrides triploïdes.

La mutagénèse aléatoire par irradiation gamma a été utilisée pour générer des mutants de *Stevia rebaudiana* accumulant plus de RebD et RebM (Brower *et al.*, 2014). Les mutants identifiés ont été utilisés pour des croisements biparentaux et les inventeurs ont réalisé une deuxième série de mutagénèse aléatoire.

– Chapitre 3 –

Contexte et objectifs de la thèse

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans une stratégie de développement d'une filière de production et de transformation BIO de *Stevia rebaudiana* dans le Sud-Ouest de la France. Cette production est naissante en Europe et les besoins de connaissances sont nombreux. Il est en particulier indispensable de pouvoir fournir aux agriculteurs des génotypes productifs adaptés aux conditions de production du Sud-Ouest. Pour cela, il est indispensable de :

- (1) Identifier des ressources génétiques adaptées aux conditions pédoclimatiques du bassin de production
- (2) Optimiser les itinéraires culturaux (date de semis, date de coupe, technique de protection pour l'hiver, exigences d'une filière BIO, etc...)
- (3) Identifier les facteurs environnementaux majeurs susceptibles d'affecter la production. Ces facteurs peuvent être d'ordre abiotique (température optimale, sensibilité au gel, besoin en eau, sensibilité à l'excès d'eau, quantité et qualité de la lumière, etc.) ou biotique
- (4) Mettre en place un programme d'amélioration répondant aux cahiers des charges

Les travaux de cette thèse se sont concentrés sur la caractérisation de ressources génétiques afin d'envisager la mise en place d'un programme d'amélioration. Ceci nécessite l'exploration de la variabilité phénotypique et génotypique de cette espèce. Comme nous l'avons précédemment vu, la caractérisation et la traçabilité des ressources génétiques ne sont pas disponibles chez *Stevia rebaudiana*. Les outils de génotypage sont peu décrits. La variabilité phénotypique n'est décrite que sur un nombre réduit de ressources génétiques. Les traits phénotypiques qui ont été les plus décrits sont la teneur et la composition en SGs. Cependant, la composante de biomasse foliaire et la pérennité de la culture sont peu caractérisées, surtout en climat tempéré. Le déterminisme de ces caractères d'intérêt ainsi que les facteurs abiotiques et biotiques influençant la productivité de *Stevia rebaudiana* est également peu documentée en climat tempéré.

Dans ce contexte, caractériser la variabilité génotypique et phénotypique de *Stevia rebaudiana* est primordial en vue de la mise d'un programme de sélection et d'amélioration. Au cours de cette thèse, j'ai pu participer au développement d'outils de génotypage, mais mes travaux se sont concentrés sur la caractérisation phénotypique de cette espèce. Les objectifs sont :

- (1) Le développement d'une méthode de quantification robuste des SGs
- (2) L'évaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques en condition pluriannuelle de production et identifier les descripteurs de cette variabilité
- (3) La caractérisation de la mise en place des composantes du rendement au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana*
- (4) L'identification de *Septoria* sp. affectant la Stévia et l'évaluation de la réponse face à *Septoria* sp

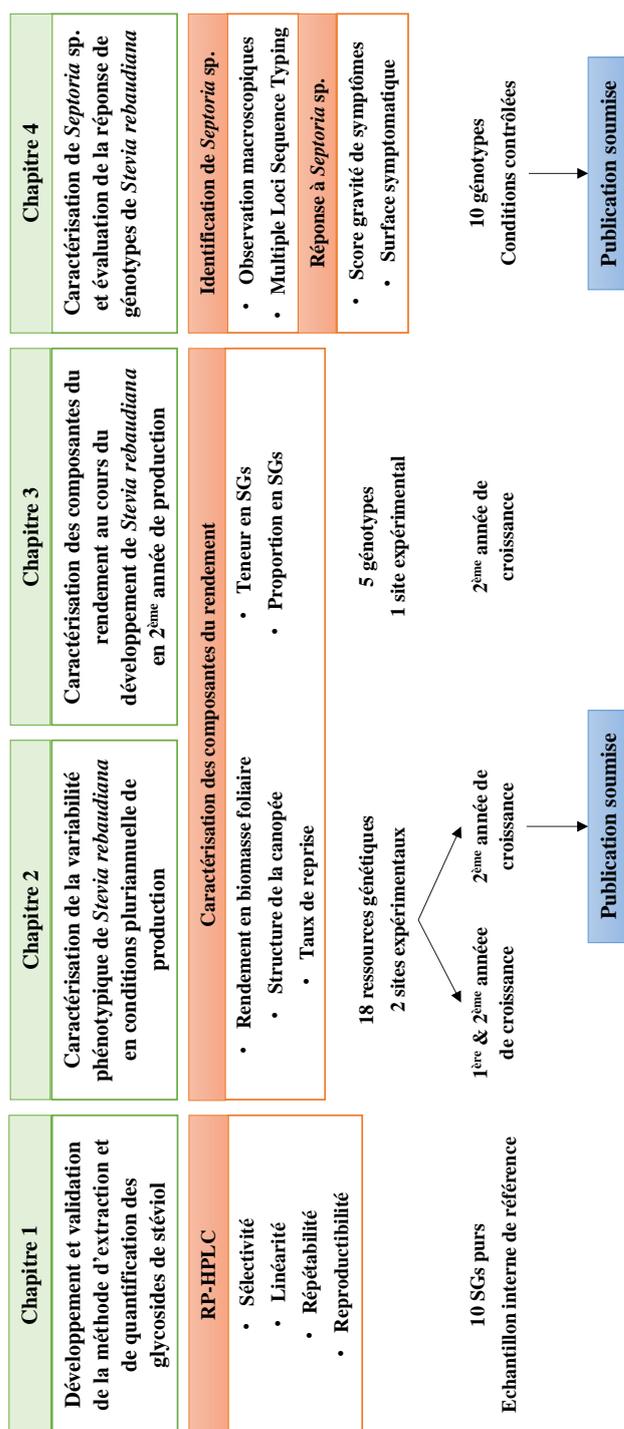
Pour répondre à ces objectifs, nous avons tout d'abord collecté des ressources génétiques à travers le monde et mis en conservation une partie de ces ressources génétiques en culture *in vitro* (Fraise concept', Douville) et sous forme de boutures (INRA, Villenave d'Ornon). Nous avons validé une méthode de quantification de 10 SGs par HPLC en phase inverse en partenariat avec le laboratoire MIB (Molécules d'Intérêt Biologique, INRA, Villenave d'Ornon) faisant l'objet du Chapitre 1 (Partie 2). En partenariat avec la station d'expérimentation INVENIO, nous avons implanté 1 parcelle expérimentale en 2015 et 2 parcelles en 2016 d'une collection de *Stevia rebaudiana*. Cependant, les aléas climatiques ont conduit à la perte de la parcelle implantée en 2015, correspondant à ma 1^{ère} année de thèse. Nous avons évalué finement les composantes du rendement, à travers la caractérisation de la canopée et l'analyse métabolique des feuilles, réalisés en 2^{ème} et 3^{ème} année de thèse sur les 2 parcelles implantées en 2016. La totalité de la collection (18 ressources génétiques) a été phénotypée au stade bourgeons floraux durant 2 années et uniquement en 2^{ème} année, sur 2 sites de production, faisant l'objet du Chapitre 2 (Partie 2). La mise en place des composantes du rendement a été caractérisée au cours du développement végétatif pour 5 ressources génétiques en 2^{ème} année de production sur 1 site expérimental, faisant l'objet du Chapitre 3 (Partie 2). En partenariat avec l'UMR SAVE (INRA, Villenave d'Ornon), nous avons mis en place une surveillance des parcelles expérimentales pour l'identification des pathogènes affectant la Stévia. Cette surveillance nous a permis d'identifier 3 genres fongiques provoquant des maladies foliaires ou racinaires (*Septoria*, *Alternaria* et *Sclerotium*). La prédominance de la Septoriose nous a conduit à concentrer nos études sur cet agent pathogène. Nous avons caractérisé les souches isolées au cours des 3 années de thèse par des observations macroscopiques et moléculaires, par Multiple Loci Sequence Typing. Nous avons développé

un test en test d'inoculation de la Septoriose en conditions contrôlées qui nous a permis d'évaluer la réponse de 10 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* face à cet agent pathogène. Les notations de gravité de symptômes sur les parcelles expérimentales nous ont permis d'obtenir une évaluation de la réponse des ressources génétiques en condition d'infection naturelle. Ces résultats font l'objet du Chapitre 4 (Partie 2).

Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production

OBJECTIFS

- > Développement d'une méthode de quantification robuste des SGs
- > Evaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques en condition pluriannuelle de production et identifier les descripteurs de cette variabilité
- > Caractérisation de la mise en place des composantes du rendement au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana*
- > Identification de *Septoria* sp. affectant la Stévia et l'évaluation de la réponse face à *Septoria* sp



– Partie 2 –

Résultats des travaux de thèse

– Chapitre 1 –

**Développement et validation de la méthode
d'extraction et de quantification des
glycosides de stéviol**

1 Introduction

Actuellement, 46 Glycosides de Stéviol (SGs) ont été identifiés dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* (Annexe A1). Le ST et le RebA sont les SGs les plus accumulés (entre 2-10 % par rapport à la masse sèche foliaire) (Ceunen & Geuns, 2013c). La caractérisation des propriétés organoleptiques des SGs purs ou en mélange a montré l'importance du ratio entre RebA et ST ainsi que des SGs minoritairement accumulés (Hellfritsch *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 2014). Parmi les SGs minoritaires, le RebD et le RebM sont particulièrement intéressants pour leur saveur sucrée sans amertume (Prakash *et al.*, 2012, 2014). Il existe une grande variabilité de composition en SGs chez *Stevia rebaudiana* en fonction du génotype (Montoro *et al.*, 2013; Barbet-Massin *et al.*, 2016), conduisant à la nécessité de développer une méthode analytique robuste pour la détermination des profils en SGs.

Plusieurs revues font le bilan des méthodes d'extraction ainsi que d'analyse qualitative ou quantitative des SGs en laboratoire depuis leur découverte (Wölwer-Rieck, 2012; Ceunen & Geuns, 2013c). La méthode de référence pour l'analyse de la teneur et la composition de 9 SGs est l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en phase inverse pour la séparation des SGs suivi d'une détection UV (Ultra-Violet) (JECFA, 2010). Malgré le protocole de référence du JECFA, cette méthode analytique a été énormément optimisée par l'utilisation de différents instruments, colonnes, phases mobiles, et systèmes de détection (Ceunen & Geuns, 2013; Zimmermann, 2018).

Les SGs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles sont composées d'une partie hydrophobe (le stéviol) et d'une partie hydrophile (les résidus osidiques). Il existe majoritairement 2 types de colonnes utilisées pour la séparation des SGs, C₁₈ et NH₂. Le caractère polaire de la phase greffée NH₂ entraîne l'élution des SGs dans l'ordre de polarité croissante, correspondant à l'HPLC en phase normale. Le caractère hydrophobe de la phase greffée C₁₈ entraîne une élution des SGs dans l'ordre de polarité décroissant des SGs, on parle alors d'HPLC en phase inverse. Majoritairement, les laboratoires utilisent l'HPLC en phase inverse avec des colonnes C₁₈ (250 x 4,6 mm ; 5 µm), comme référencé par le JECFA (Mohamed *et al.*, 2011; Pieri *et al.*, 2011; Ceunen, 2012; Serfaty *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2013; Aranda-gonzález *et al.*, 2014; Bililign *et al.*, 2014; Barbet-Massin, 2015). Quelques études développent des méthodes HPLC avec des colonnes et des tailles de particules plus petites (150 x 2,1 mm ; 1,8 µm ; (Espinoza *et al.*, 2014)). D'autres études utilisent l'HPLC en phase normale avec des colonnes NH₂ de dimension 250 x 4,6 mm ; 5 µm (Hearn & Subedi, 2009; Kafle, 2011; Tavarini & Angelini, 2013; Wölwer-Rieck *et al.*, 2014), ou 150 x 4,6 mm ; 5 µm (Agilent,

2011). Les méthodes sur colonne NH₂ permettent de détecter et quantifier uniquement le ST, RebA et RebC (Hearn & Subedi, 2009; Kafle, 2011; Tavarini & Angelini, 2013).

Quel que soit le type de colonne, la phase mobile majoritairement utilisée est composée d'eau et d'acétonitrile (ACN) dont les proportions sont adaptées au type de colonne. L'ACN est un solvant organique polaire. Du tampon phosphate est parfois ajouté pour les colonnes C₁₈ (JECFA, 2010; Pieri *et al.*, 2011; Ceunen, 2012; Zeng *et al.*, 2013; Bililign *et al.*, 2014; Karimi *et al.*, 2015) ou de l'acide acétique pour les colonnes NH₂ (Hearn & Subedi, 2009; Kafle, 2011; Tavarini & Angelini, 2013) pour ajuster le pH. Deux types de phases mobiles sont utilisés, correspondant au mode isocratique (stabilité de la composition de la phase mobile) ou au mode gradient, où les proportions d'eau et d'ACN varient au cours de l'analyse.

De nombreux protocoles d'extraction ont été développés pour l'analyse des SGs à partir des feuilles de Stévia. Ces méthodes débutent par une extraction à base d'alcool ou d'eau et se poursuivent par des étapes de purification, comme par exemple avec des agents d'élimination des pigments avec des phases lipophiles, des procédures de fractionnement ou des extractions sur phase solide (Ceunen & Geuns, 2013c). Pour des extractions analytiques, l'eau est le solvant majoritairement utilisé et l'incubation est faite en bain marie entre 50°C et 95°C (Mohamed *et al.*, 2011; Ceunen, 2012; Barbet-Massin, 2015). Les purifications sont rares dans la littérature (Zeng *et al.*, 2013), principalement pour éviter les pertes en SGs (Ceunen, 2012). Les extraits sont ensuite centrifugés et filtrés avant l'injection en système HPLC.

L'objectif de ce chapitre est donc de présenter la méthode développée en début de thèse et qui repose sur une méthode simple d'extraction aqueuse et d'analyse par HPLC permettant de détecter et quantifier de façon robuste les 10 SGs majoritairement accumulés dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*. Pour cela, différentes méthodes d'extraction et de séparation ont été testées afin de valider la fiabilité de l'identification des SGs par leur temps de rétention, et de valider la répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'extraction et de quantification.

2 Matériels et méthodes

2.1 Réactifs et standards en glycoside de stéviol (SGs)

L'acétonitrile Chromasolv gradient-grade 99% (ACN) provient de Sigma-Aldrich (France). Les standards en glycosides de stéviols (SGs) proviennent de la société Chromadex (USA) et comportent le ST, RebA, RebB, RebC, RebD, RebM, DulA, Rub et SB (Tableau II.1.1). Ces 10 SGs ont été dissous à 1 000 ng/μL avec de l'eau ultra-pure. L'échantillon de référence sous forme de poudre de feuilles sèches provient de la société Oviatis (France).

Tableau II.1.1. Nom, formule, teneur par rapport à la masse sèche foliaire et masse molaire des 10 glycosides de stéviol (SGs) étudiés

Nom	R1	R2	% w/w	Masse molaire
Stevioside	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1)	5-10	804.87
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)	2-5	967.01
Rebaudioside C	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1) β-Glc(3-1)	1	951.01
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2-1)	0.5	788.87
Rebaudioside B	H	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)	0.2	804.47
Rebaudioside F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2-1) β-Glc(3-1)	0.2	936.99
Rebaudioside D	β-Glc-β-Glc(2-1)	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)	0.2	1129.15
Steviolbioside	H	β-Glc-β-Glc(2-1)	0.1	642.73
Rubusoside	β-Glc	β-Glc		642.73
Rebaudioside M	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)	β-Glc-β-Glc(2-1) β-Glc(3-1)		1291.29

2.2 Conditions de séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses ont été réalisées sur un système HPLC Agilent LC 1100 au sein des laboratoires MIB (Molécules d'Intérêts Biologiques) de l'unité de recherche Œnologie (EA4577 ; Villenave d'Ornon, France), sous l'encadrement du Pr. Waffo-Teguo. Ce système est composé d'un dégazeur (Degasser G1322A), d'une pompe quaternaire (QuatPump G1322A), d'un injecteur automatique (ALS G1322A), d'un compartiment de colonne (COLCOM G1322A), et d'un détecteur UV à barrette de diode (DAD G1322B).

A partir de l'étude comparative de la littérature, 2 types de phases ont été comparés pour leur facteur de séparation des 10 SGs majoritairement accumulés chez *Stevia rebaudiana* (RebA-B-C-D, RebF, RebM, DulA, Rub, ST, SB). Une première colonne de type NH₂ (Zorbax Carbohydrates, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent, France) a été testée ainsi que des colonnes C18 de type phase inverse (150 x 4,6 mm, 5µm, Phenomenex et Poroshell 120 EC (250 x 4,6 mm, 4 µm, Agilent). Ces colonnes diffèrent par leur phase greffée (NH₂ et C₁₈), leur longueur (150 et 250 mm) et la taille des particules (4 et 5 µm). En amont de chaque colonne, des pré-colonnes de protection adaptées ont été installées.

Pour simplifier la présentation des résultats dans ce chapitre, seule la meilleure phase mobile pour chaque colonne est présentée. Pour ces trois méthodes (NH₂ Zorbax Carbohydrates, C18 Phenomenex et C18 Poroshell), 5µL de solutions filtrées sont injectées, la température du compartiment de la colonne est de 40°C, et les SGs sont détectés à 202 nm. La phase mobile pour la colonne NH₂ correspond à de l'ACN/eau ultra-pure (75 :25) en mode isocratique à un débit de 1 mL/min (Agilent, 2011). Pour la colonne C18 (150 x 4,6 mm, 5µm), la phase mobile est appliquée à 1 mL/min et correspond au gradient : 0 min, 28% B ; 15 min, 32% B ; 20 min, 28% B. Enfin, pour la colonne C18 (250 x 4,6 mm, 4 µm) la phase mobile est appliquée à un débit de 1,5 mL/min en mode gradient : 0 – 1,5 min, 20% B ; 1,5 – 11,5 min, 20 – 50,7% B ; 11,6 – 14,6 min, 100% B ; 14,7 – 26 min, 20% B.

Les chromatogrammes sont analysés par le logiciel Agilent Chemstation © version B.04.03 (2012), obtenu par Luc Arnaud, Responsable commercial – Zone sud (Agilent Technologies, France).

2.3 Extraction des glycosides de stéviol (SGs)

La méthode d'extraction a été développée au sein de la Plateforme Métabolome de l'équipe Métabolisme de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Villenave d'Ornon, France). 20 mg de poudre de feuilles sèches sont extraits dans 2 mL d'eau ultra-pure pendant 2 h au bain-marie à 80°C. Les extraits aqueux sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 12 000 rpm à 4°C. 1 mL de surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue Luer-slip en plastique (Fisher Bioblock Scientific, France), pour être filtré avec un econofiltre Captiva (Agilent Technologies, France) dont la membrane est en nylon et les pores de 0,45 µm. Le filtrat est déposé en vial en verre de 2 mL (32 mm de hauteur, 12 mm de diamètre ; Fisher Bioblock Scientific, France) pour être analysé par RP-HPLC.

2.4 Quantification des glycosides de stéviol (SGs)

Une fois la méthode d'analyse sélectionnée, les standards de SGs ont été utilisés pour déterminer la corrélation entre la surface détectée et la concentration en SGs dans la solution aqueuse injectée, permettant une quantification automatisée. Des gammes étalons comprises entre 5 et 1 000 ng/ μ L (11 concentrations différentes) pour chaque SGs ont été réalisées. Les solutions sont filtrées (0,45 μ m) et injectées à 3 répétitions (3 jours différents). Pour chaque SGs, la régression linéaire est de la forme de l'équation (1), permettant de déterminer la concentration en SGs présents dans les extraits (2), puis la teneur par rapport à la masse sèche (3) :

$$(1) \textit{Area} = a C + b$$

$$(2) C = \frac{\textit{Area} - b}{a}$$

$$(3) \textit{Teneur} = \frac{C \times D \times V}{m_{MS}} \times 100$$

Area : surface du pic détecté (mAU) ; *a* : pente de la régression linéaire ; *b* : ordonné à l'origine de la régression linéaire ; *C* : concentration en SGs dans la solution injectée convertit en mg/mL ; *D* : facteur de dilution ; *V* : volume d'extraction (mL) ; *m_{MS}* : masse sèche extraite (mg) ; *Teneur* : teneur en SGs par rapport à la masse sèche exprimée en % w/w.

2.5 Evaluation et validation des méthodes

Les 3 méthodes d'analyse ont été comparées par leur capacité à séparer les 10 SGs, et plus précisément par le facteur de séparation (α) et le facteur de rétention (*k*) de chaque SGs :

$$\alpha = k_2/k_1$$

α : sélectivité ; *k₂* : temps de rétention d'un second pic ; *k₁* : temps de rétention d'un premier pic

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

k : facteur de rétention ; *t_R* (min): temps de rétention ; *t₀* : temps de rétention pour un pic non retenu

Le domaine de linéarité des gammes étalons a été déterminé par analyse statistique avec le logiciel R (R Core Team, 2015). Les points de gamme ne respectant pas la linéarité ont été identifiés par la fonction *outlierTest* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011) appliquée sur le modèle linéaire : $lm(\textit{Area} \sim C_{SGs})$. Les paramètres de la corrélation (pente, ordonnée à l'origine et écart-type) ainsi que les coefficients de corrélation ont été déterminés par la matrice de la fonction *DROITEREG* avec le logiciel Microsoft Excel. La limite de détection correspond à la concentration minimale à partir de laquelle un signal est détecté. La limite de quantification haute correspond à la concentration maximale pour laquelle la corrélation linéaire est respectée. La limite de quantification basse est déterminée par l'équation suivante :

$$LOQ = \frac{b + 10 \sigma_b}{a}$$

LOQ : limite de quantification (ng/μL) ; *a* : pente de la régression linéaire ; *b* : ordonné à l'origine de la régression linéaire ; σ_b : écart-type de l'ordonné à l'origine.

Pour confirmer l'identification des SGs dans des extraits végétaux par leur temps de rétention, un échantillon de feuilles sèches a été extrait (par la méthode décrite en paragraphe 2.3) dans lequel ont été ajoutés les standards purs. Dans chaque aliquote de l'extrait (900 μL), 100 μL de SGs pur à 1 000 ng/μL ont été ajoutés. L'analyse comparative des chromatogrammes permet d'identifier les pics dont la surface est augmentée par l'ajout des standards et de valider l'identification des 10 SGs.

Selon le vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie (Joint Committee For Guides In Metrology, 2012), la fidélité de mesure est l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même objet dans des conditions spécifiées. Deux types de conditions de fidélité sont évalués dans cette étude. La répétabilité de mesure correspond aux conditions de mesure qui comprennent la même procédure, les mêmes opérateurs pour des mesures répétées pendant une courte période de temps. Dans cette étude, elle correspond aux mesures répétées sur une même journée. La reproductibilité correspond à ces mêmes conditions de mesure mais sur une période de temps étendue, ou par un autre opérateur. La reproductibilité correspond dans cette à des mesures répétées à des jours différents. La fidélité est exprimée numériquement par l'écart-type (1) ou le coefficient de variation (2) :

$$(1) \sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$(2) CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

σ : écart-type ; *n* : effectif des mesures ; \bar{x} : moyenne des mesures ; x_i : résultat d'une mesure ; *CV* : coefficient de variation (%)

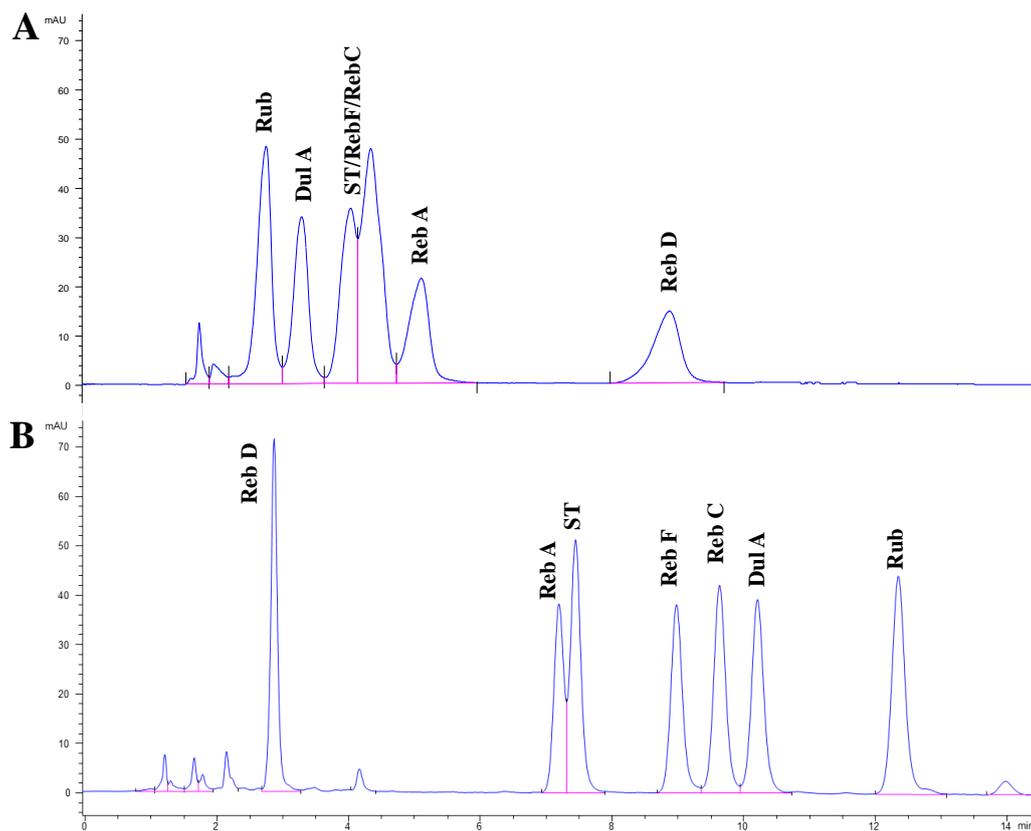


Figure II.1.1. Chromatogrammes comparatifs d'un mélange de 7 SGs standards à 125 ng/μL sur colonne NH₂ et C₁₈ de dimension 150 x 4,6 mm, 5μm. (A) Elution des SGs identifiés en mode isocratique sur colonne NH₂. (B) Elution des SGs identifiés en mode gradient sur colonne C₁₈.

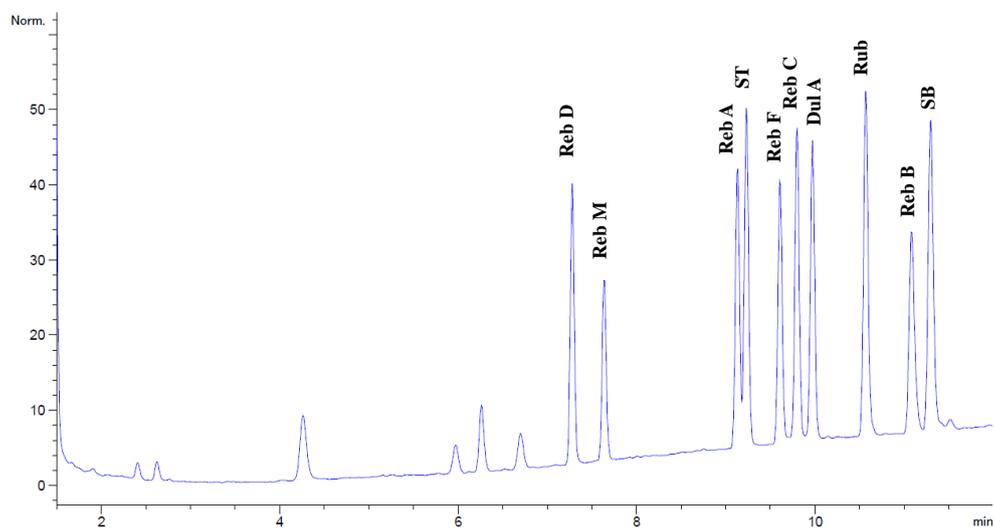


Figure II.1.2. Chromatogramme d'un mélange de 10 SGs standards à 50 ng/μL sur colonne Poroshell EC-C₁₈

3 Résultats

3.1 Validation d'une méthode HPLC pour la détection de 10 SGs

3.1.1 Identification de la méthode HPLC

En fonction des propriétés des phases greffées étudiées (NH₂ et C₁₈), l'ordre d'éluion des SGs est opposé (Figure II.1.1), sachant que ces 2 colonnes ont les mêmes dimensions et taille de particule (150 x 4,6 mm, 5 µm). Le caractère polaire de la phase greffée NH₂ entraîne une éluion des SGs dans l'ordre de polarité croissante. Au contraire, le caractère hydrophobe de la phase greffée C₁₈ entraîne une éluion des SGs dans l'ordre de polarité décroissant. L'interprétation des chromatogrammes révèlent une meilleure séparation des SGs sur colonne C₁₈ que NH₂, où le ST, RebF et RebC ne sont pas séparés. De plus, le facteur de rétention (k) du Rub sur NH₂ est de 0,579 alors que celui du RebD sur C₁₈ est de 1,377. Ce résultat indique une meilleure rétention des SGs sur une phase hydrophobe. La colonne C₁₈ Poroshell EC 120 (250 x 4,6 mm, 4µm) a été testée pour améliorer la rétention des 10 SGs (Figure II.1.2). Elle diffère de la précédente colonne C₁₈ par une longueur plus grande (250 mm), une taille de particules plus petite (4 µm), et par le débit de phase mobile supérieur appliqué (1,5 mL/min). Les facteurs de rétention du RebD jusqu'au ST sont supérieurs avec cette seconde colonne (Tableau II.1.2). En revanche, à partir du RebF les facteurs de rétention sont supérieurs avec la première méthode utilisant une C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5µm). La sélectivité entre RebA et ST est équivalente entre les 2 méthodes (1,04 et 1,01). Ensuite les sélectivités entre ST et RebF jusqu'entre DulA et Rub sont légèrement inférieures avec la méthode sur C₁₈ (250 x 4,6 mm, 4µm). Le ST et RebA sont les SGs accumulés majoritairement chez *Stevia rebaudiana*, ils représentent donc les SGs prioritaires pour le développement d'une méthode analytique. Les résultats obtenus ont amené à sélectionner la méthode d'analyse en phase inverse avec une colonne C₁₈ Poroshell EC 120 (250 x 4,6 mm, 4µm) permettant une meilleure séparation des premiers SGs élués (RebD et RebM), ainsi que pour le ST et RebA.

Tableau II.1.2. Récapitulatif de la comparaison de 2 colonnes C18 pour la détection de 10 SGs. t_R : temps de rétention du composé (min) ; k : facteur de rétention entre le SGs et le pic non retenu ; α : sélectivité entre 2 SGs successifs

	C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m)			C18 (250 x 4,6 mm, 4 μ m)		
	t_R (min)	k	α	t_R (min)	k	α
Pic non retenu	1.204			1.413		
RebD	2.862	1.377		7.346	4.199	-
RebM	ND	ND	ND	7.698	4.448	1.05
RebA	7.191	4.973	-	9.181	5.498	1.19
ST	7.443	5.182	1.04	9.283	5.570	1.01
RebF	8.98	6.458	1.21	9.652	5.831	1.04
RebC	9.636	7.003	1.07	9.839	5.963	1.02
DulA	10.214	7.483	1.06	10.013	6.086	1.02
Rub	12.344	9.252	1.21	10.669	6.551	1.07
RebB	ND	ND	ND	11.032	6.808	1.03
SB	ND	ND	ND	11.243	6.957	1.02

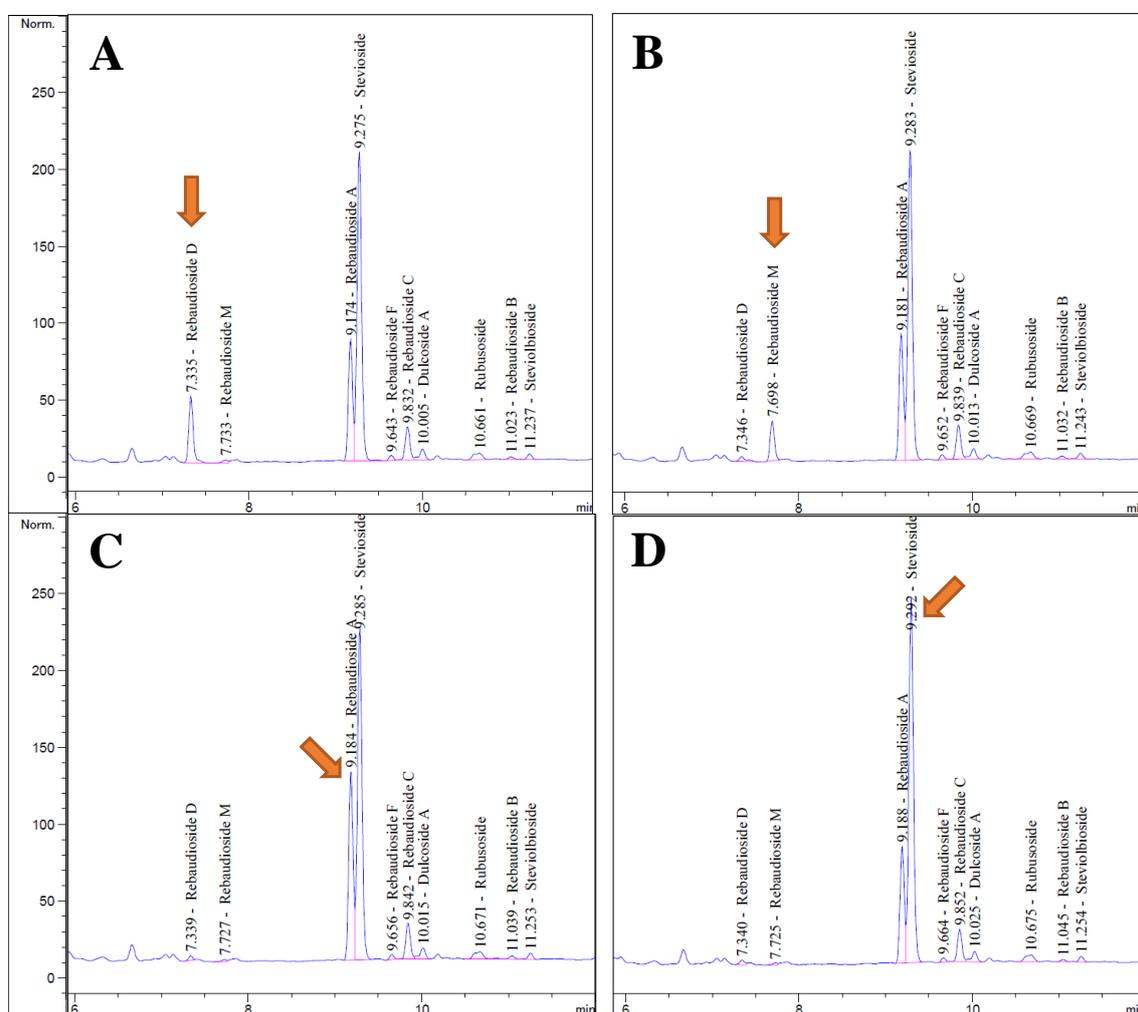


Figure II.1.3. Validation de la détection des 10 SGs par ajout de 100 ng/μL de composé pur à une matrice d'extraction végétale. Les flèches orange représentent le pic dont la surface est augmentée comparé au chromatogramme de l'extrait végétal sans ajout de SGs pur. (A) Ajout de Rebaudioside D. (B) Ajout de Rebaudioside M. (C) Ajout de Rebaudioside A. (D) Ajout de Stéviolside.

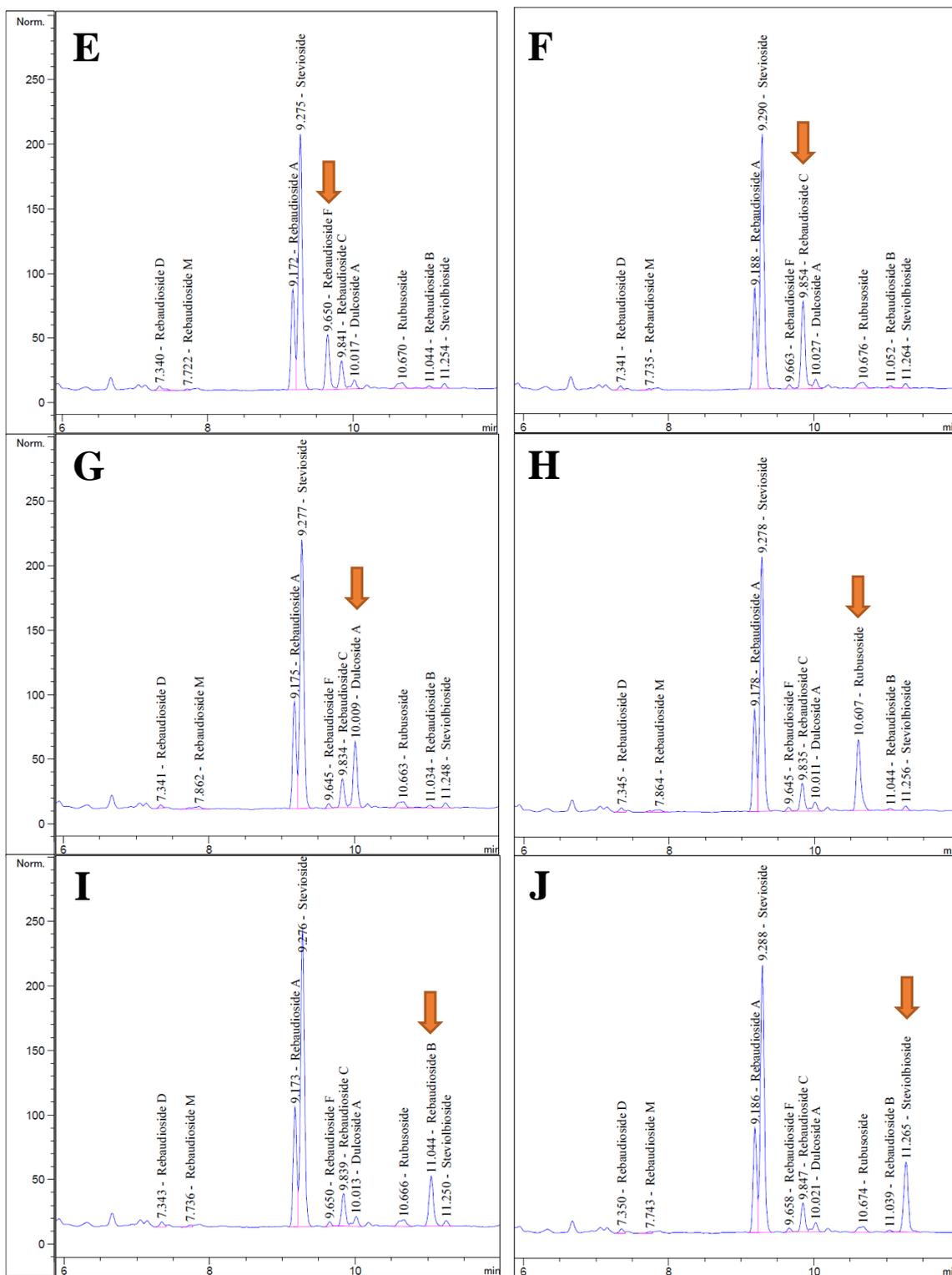


Figure II.1.3. Suite. (E) Ajout de Rebaudioside F. (F) Ajout de Rebaudioside C. (G) Ajout de Dulcoside A. (H) Ajout de Rubusoside. (I) Ajout de Rebaudioside B. (J) Ajout de Stéviolbioside.

3.1.2 Fidélité de la détection des 10 SGs

L'identification des SGs est déterminée en fonction des temps de rétention obtenus à partir d'un mélange de standards. Ensuite, les temps de rétention des 10 SGs sont contrôlés à partir d'un extrait de feuilles sèches et ajout des composés standards (Figure II.1.3). Ainsi, les pics dont la surface est augmentée par l'ajout de standard correspondent aux pics identifiés par les temps de rétention. Les temps de rétention des 10 SGs sont donc identiques entre un mélange de standards et un extrait végétal.

Tout au long des campagnes de dosage, le mélange des 10 standards a été injecté en début et fin de chaque série pour contrôler l'élution des SGs. Ainsi, nous pouvons évaluer la reproductibilité des temps de rétention en fonction de l'âge d'une colonne Poroshell 120 EC-C18 (Figure II.1.4). L'évolution du temps de rétention en fonction du nombre d'injection est fortement stable, conduisant à des coefficients de variation de 0,15 à 0,19%. Nous observons une faible variation des temps de rétention du RebB et du SB au cours des 200 premières injections. Cette variation conduit à un coefficient de variation de 0,52%. Malgré cette variation pour ces 2 SGs, nous pouvons conclure que l'élution des 10 SGs est fortement reproductible par la méthode HPLC développée dans cette étude.

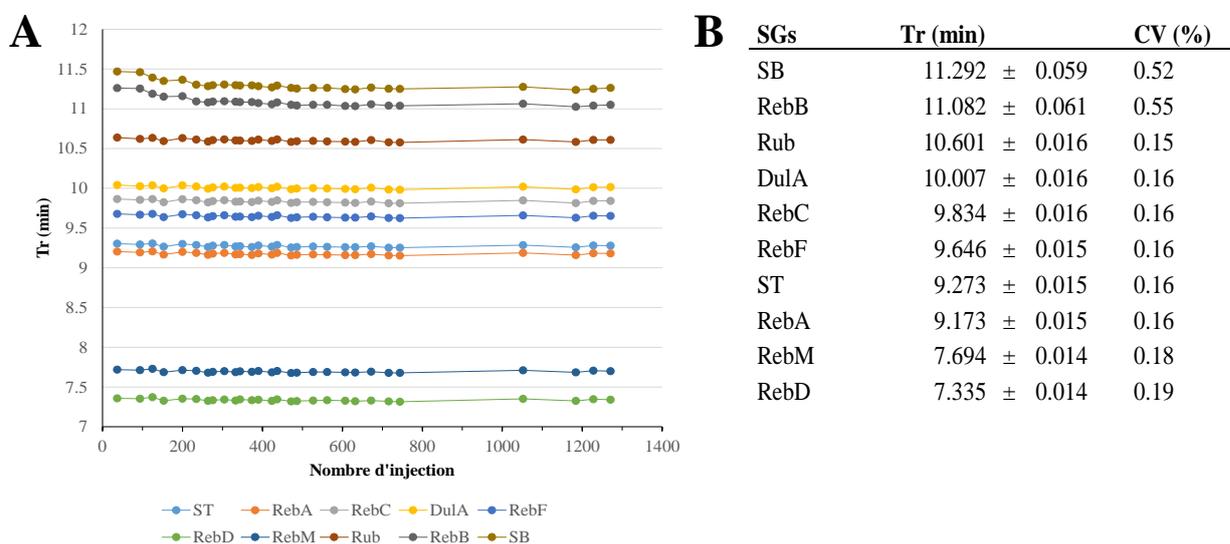


Figure II.1.4. Reproductibilité de l'élution des 10 SGs par la méthode développée durant l'utilisation d'une colonne Poroshell 120 EC-C18. (A) Temps de rétention en fonction du nombre d'injection. (B) Temps de rétention moyen ± écart-type, et coefficient de variation associé pour les 10 SGs

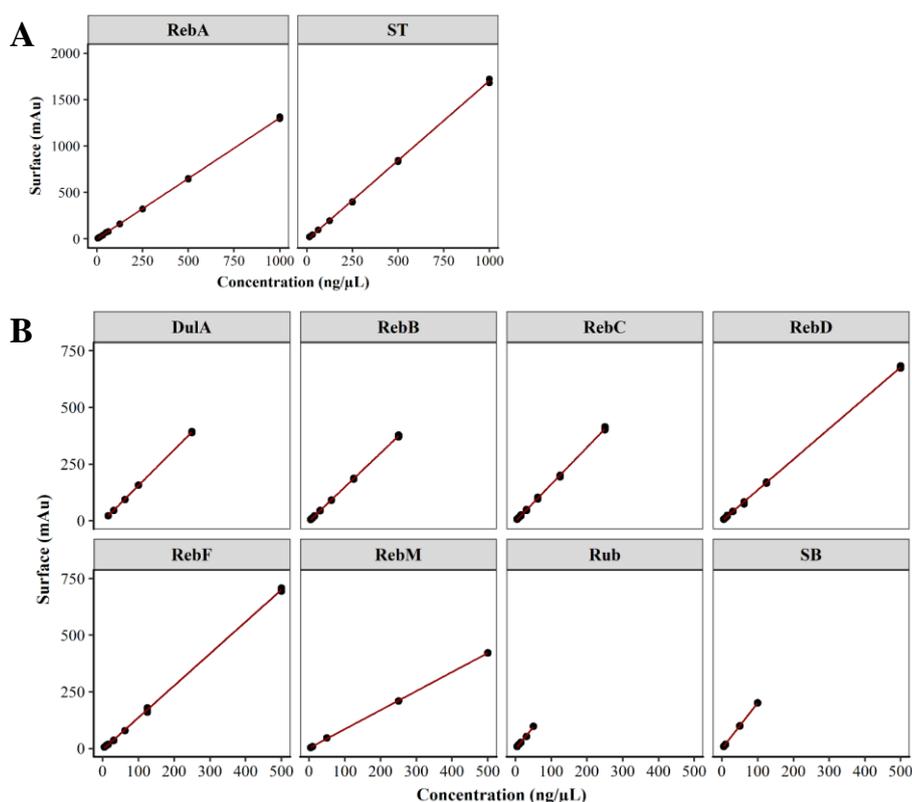


Figure II.1.5. Représentation graphique des gammes étalons valides pour les 10 SGs quantifiés. Les nuages de points représentent la surface des pics détectés en fonction de la concentration en SGs purs.

Tableau II.1.3. Paramètres de la quantification des 10 SGs suite à la régression linéaire entre la surface détectée et la concentration en SGs purs des gammes étalons. SGs : glycoside de stéviol ; Niveau : nombre de concentrations préparées pour la gamme étalon valide ; a : pente du modèle ; b : ordonnée à l'origine du modèle ; R² : coefficient de corrélation de la régression linéaire ; LOD : limite de détection en ng/μL ; LOQ_{min} : limite de quantification basse en ng/μL, déterminée par les paramètres du modèle ; LOQ_{max} : limite de quantification haute (ng/μL) ; Teneur_{min} : teneur en SGs par rapport à la matière sèche équivalente à la LOQ_{min} ; Teneur_{max} : teneur en SGs par rapport à la matière sèche équivalente à la LOQ_{max}

SGs	Niveau	a	b	R ²	LOD (ng/μL)	LOQ _{min} (ng/μL)	LOQ _{max} (ng/μL)	Teneur _{min} (% w/w)	Teneur _{max} (% w/w)
RebD	7	1.36	-0.70	0.9998	5.0	5.7	500	0.06	10.0
RebM	6	0.84	0.96	1.0000	5.0	7.5	500	0.07	5.0
RebA	10	1.30	-1.59	0.9999	5.0	6.1	1000	0.06	10.0
ST	7	1.72	-15.17	0.9996	5.0	11.7	1000	0.12	10.0
RebF	7	1.41	-5.59	0.9995	5.0	6.4	500	0.06	5.0
RebC	7	1.63	-2.78	0.9994	5.0	5	250	0.05	2.5
DulA	5	1.58	-3.47	0.9998	5.0	5	250	0.05	2.5
Rub	5	1.95	-2.84	0.9921	5.0	5.4	50	0.05	0.5
RebB	7	1.50	-2.36	0.9999	5.0	5	250	0.05	2.5
SB	4	2.01	-1.47	0.9998	5.0	5	100	0.05	1.0

3.2 Validation de la quantification des 10 SGs

3.2.1 Domaines de linéarité

Les résultats bruts des gammes étalons entre 5 ng/μL et 1 000 ng/μL pour les 10 SGs sont présentés en Annexe. L'analyse statistique de validation des modèles linéaires a permis de supprimer les points de gamme ne respectant pas la proportionnalité significative entre la surface détectée et la concentration en SGs.

Les 10 SGs sont détectés à partir de la concentration la plus basse testée dans cette étude (5ng/μL), correspondant donc à la limite de détection de la méthode (Tableau II.1.3). Pour les 10 SGs, des gammes étalons avec différents domaines de linéarité sont obtenues (Figure II.1.5), permettant d'identifier les limites de quantification basses (LOQ_{min}) et hautes (LOQ_{max}). Le ST et le RebA montre les plus grandes gammes de linéarité (Figure II.1.5A), permettant une quantification juste de ces 2 composés pour des teneurs par rapport à la masse sèche de 0,12 – 0,06 % w/w respectivement à 10 % w/w. Pour les 8 SGs restants, les LOQ_{max} sont comprises entre 50 et 500 ng/μL, équivalent à des teneurs dans la masse sèche foliaire de 0,5 à 5 %/w, et les LOQ_{min} sont comprises entre 5 et 7,5 ng/μL, équivalent à 0,05 et 0,075 % w/w (Figure II.1.5B).

En fonction des différents domaines de linéarité, les paramètres des régressions linéaires sont déduits et permettront de déterminer la concentration en SGs à partir de la surface des pics détectés (Tableau II.1.3). Les coefficients de corrélation (R²) permettent de valider les modèles linéaires. Dans cette étude, ils varient entre 0,9921 et 1, correspondant à une très forte corrélation entre la surface du pic détectée et la concentration en SGs. Les paramètres des modèles linéaires permettront donc une quantification fiable des 10 SGs

3.2.2 Fidélité de la quantification

La répétabilité de la quantification a été testée par un triplicata d'injection d'un mélange de 10 standards à 50 ng/μL (Tableau II.1.4). La concentration en SGs totaux montre un coefficient de variation de 2,05%, ce qui signifie que l'injection et la quantification des standards sont répétables. Les écart-types varient de 0,59 ng/μL (RebD) à 1,25 ng/μL (RebA), représentant de très faibles variations de la quantification de chaque SGs. Les faibles concentrations du Rub, RebB et SB (<50 ng/μL) peuvent être expliquées par une erreur de préparation du mélange de standards.

Tableau II.I.4. Répétabilité de l'injection et la quantification des 10 SGs. Les moyennes des concentrations \pm écart type ont été déterminées à partir des résultats de 3 injections (injection 1, 2 et 3) du même mélange de standards par le même opérateur, le même jour, et déterminent le coefficient de variation (CV).

SGs	Concentration (ng/ μ L)			Moyenne	CV (%)
	Injection 1	Injection 2	Injection 3		
ST	54.85	55.61	56.83	55.76 \pm 1.00	1.80
RebA	51.18	52.34	53.69	52.40 \pm 1.25	2.39
RebC	49.56	50.22	51.22	50.33 \pm 0.84	1.67
DulA	47.72	47.76	49.15	48.21 \pm 0.81	1.68
RebF	50.40	50.72	52.16	51.09 \pm 0.94	1.83
RebD	50.66	51.12	51.83	51.21 \pm 0.59	1.15
RebM	52.10	53.82	54.97	53.63 \pm 1.44	2.69
Rub	44.31	45.86	46.75	45.64 \pm 1.24	2.71
RebB	35.16	35.73	36.91	35.93 \pm 0.89	2.48
SB	33.48	34.77	35.44	34.56 \pm 1.00	2.89
SGs totaux	469.41	477.95	488.95	478.77 \pm 9.79	2.05

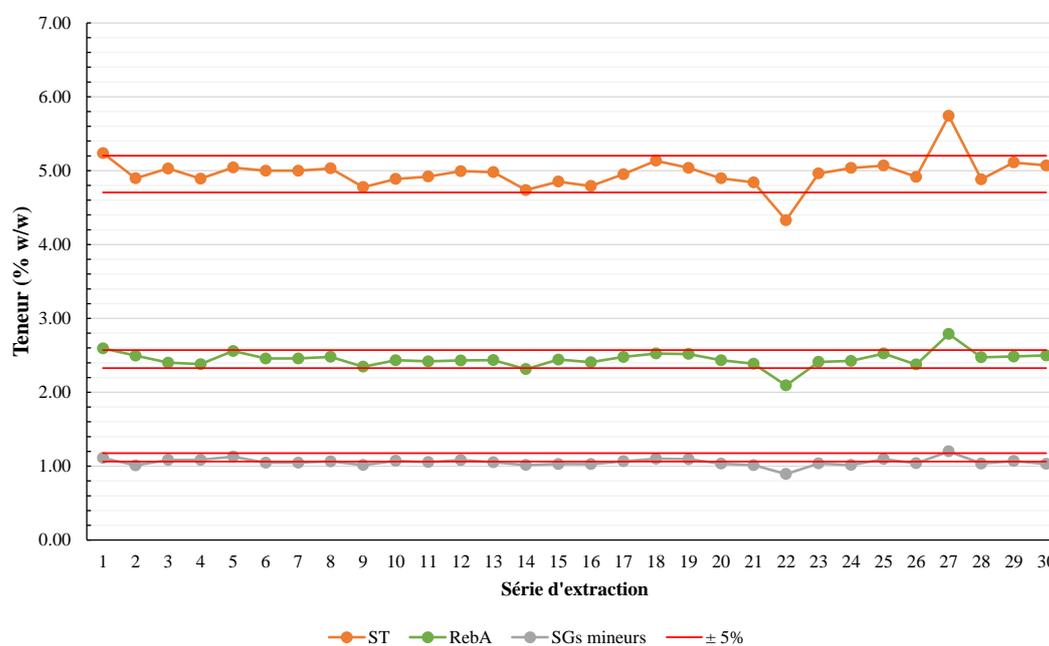


Figure II.1.6. Carte de contrôle de la quantification des SGs dans l'échantillon de référence interne. Les résultats ont été obtenus pour une campagne de dosage des SGs sur une durée de 2 mois, équivalent à \approx 1 300 injections sur la colonne Poroshell 120 EC-C18.

3.3 Validation de la méthode d'extraction

La répétabilité de la méthode d'extraction a été évaluée par un triplicata d'extraction du même échantillon (Tableau II.1.5). La teneur en SGs totaux montre un coefficient de variation de 5%, ce qui signifie que la méthode d'extraction des SGs est répétable. Les écart-types varient de 0,005 (RebD et SB) à 0,27 % w/w (ST), représentant de très faibles variations de teneur pour chaque SGs, malgré que les coefficients de variation évoluent de 3,3% (RebA) à 19% (RebB).

Cet échantillon a servi de référence pour la validation des séries de dosage de cette étude (Figure II.1.6). Sur 30 dosages successifs, seulement 2 dosages sont hors limites établies à 5% de variation. Ainsi, la reproductibilité de la méthode est déduite sur les 28 dosages valides (Tableau II.1.5). La teneur en SGs totaux montre un coefficient de variation de 2,1%, permettant de conclure que la méthode d'extraction des SGs est reproductible sur 93% de la campagne de 30 séries d'extraction. Les écart-types spécifiques à chaque SGs varient de 0,006 (RebD et SB) à 0,112 % (ST), conduisant à des coefficients de variations compris entre 2,3 % (ST) et 15,7% (RebB).

Ces deux essais valident la répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'extraction et d'analyse par HPLC en phase inverse pour la quantification de 10 SGs.

Tableau II.1.5. Répétabilité et reproductibilité de l'extraction des SGs. (A) Répétabilité de l'extraction des SGs, où les moyennes des teneurs \pm écart type ont été déterminées à partir des résultats de 3 dosages (extraction A, B, C) du même échantillon par le même opérateur le même jour, et déterminent le coefficient de variation (CV). (B) Reproductibilité de l'extraction des SGs, où les moyennes des teneurs \pm écart type ont été déterminées à partir des résultats de 28 dosages du même échantillon, dont 21 ont été réalisés par un premier opérateur et 7 par un second, sur une période de 2 mois.

A	Extraction			Teneur (% w/w)	CV (%)	B	Teneur SGs (%/w)	CV (%)	
	SGs	A	B						C
	RebD	0.066	0.076	0.073	0.072 \pm 0.005	6.8	RebD	0.071 \pm 0.009	12.3
	RebM	ND	ND	ND			RebM	ND	
	RebA	2.399	2.561	2.509	2.490 \pm 0.083	3.3	RebA	2.450 \pm 0.062	2.5
	ST	4.705	5.199	5.139	5.076 \pm 0.270	5.4	ST	4.963 \pm 0.112	2.3
	RebF	0.124	0.144	0.134	0.134 \pm 0.010	7.3	RebF	0.129 \pm 0.004	3.2
	RebC	0.506	0.578	0.566	0.550 \pm 0.039	7.0	RebC	0.541 \pm 0.014	2.7
	DulA	0.148	0.177	0.170	0.165 \pm 0.015	9.0	DulA	0.167 \pm 0.006	3.8
	Rub	ND	ND	ND			Rub	ND	
	RebB	0.059	0.056	0.079	0.065 \pm 0.012	19.0	RebB	0.066 \pm 0.010	15.7
	SB	0.083	0.094	0.090	0.089 \pm 0.005	5.8	SB	0.087 \pm 0.006	6.6
	SGs totaux	8.092	8.885	8.760	8.579 \pm 0.426	5.0	SGs totaux	8.492 \pm 0.177	2.1

4 Conclusion et discussion

La caractérisation de la variabilité phénotypique de *Stevia rebaudiana* nécessite l'adaptation d'une méthode de quantification fiable des SGs. Nous avons retenu l'HPLC en phase inverse avec une résine de type C18, puis déterminer les caractéristiques de la colonne et le gradient de la phase mobile permettant une rétention optimale des 10 principaux SGs accumulés dans les feuilles de *Stevia rebaudiana*. Ainsi, les dosages de la suite de l'étude utilise la colonne Proshell EC 120 C₁₈ (250 x 4,6 mm, 4 µm, Agilent) avec une pré-colonne de protection. La phase mobile est appliquée à un débit de 1,5 mL/min en mode gradient : 0 – 1,5 min, 20% B ; 1,5 – 11,5 min, 20 – 50,7% B ; 11,6 – 14,6 min, 100% B ; 14,7 – 26 min, 20% B. L'identification et la quantification des SGs à 202 nm à l'aide d'un détecteur UV-DAD sont fortement reproductibles. Les domaines de quantification spécifiques pour chaque SGs sont suffisants pour leur quantification par rapport à leur teneur respective répertoriée dans la littérature (Ceunen & Geuns, 2013c). La méthode développée est donc suffisamment fidèle et précise pour la quantification de 10 SGs.

La comparaison d'HPLC en phase normale avec une résine de type NH2 et inverse avec une résine de type C18 révèle que les interactions hydrophobes mis en jeu en phase inverse améliorent la rétention des SGs. En effet, les méthodes en phase normale ne détectent que 3 SGs (ST, RebA, RebC) (Hearn & Subedi, 2009; Kafle, 2011; Tavarini & Angelini, 2013), alors que les colonnes C₁₈ sont généralement considérées comme plus reproductibles dans le temps (Chaturvedula & Prakash, 2011), aspect confirmé par la reproductibilité de l'élution avec la méthode retenue. Les différences de notre méthode par rapport aux méthodes en phase inverse sont la taille des particules de la colonne (4 µm) et le débit de phase mobile à 1,5 mL/min. Ces deux paramètres combinés à un gradient adapté de la phase mobile permettent d'améliorer la rétention des SGs et conduisent à une meilleure sélectivité.

La méthode développée permet la détection et quantification de 10 SGs (ST, RebA, RebB, RebC, RebD, RebM, DulA, Rub et SB). Nous identifions le RebM en plus comparé aux études s'intéressant à 9 SGs (JECFA, 2010; Bililign *et al.*, 2014; Parris *et al.*, 2017). La méthode détectant le plus de SGs (26 au total) utilise l'HPLC en phase inverse avec une résine de type C₁₈ couplée à un détecteur CAD (Charged Aerosol Detector) (Chaturvedula & Prakash, 2011). L'identification des SGs par HPLC-UV nécessite des molécules pures pour identifier leur temps de rétention. Ainsi, pour identifier de nouveaux SGs, il faudra se procurer de nouveaux standards ou purifier les pics non identifiés dans les extraits puis déterminer leur structure.

Le système de détection est le paramètre le plus déterminant pour la quantification des SGs. Avec notre système comportant un détecteur UV-DAD, les limites de quantification des SGs

sont comprises entre 5 et 11,7 mg/L, et sont inférieures aux LOQ de 17,21-26,69 mg/L établit dans une étude avec un système HPLC similaire (Aranda-gonzález *et al.*, 2014). Notre méthode apparait donc comme plus sensible, et permet la quantification des SGs mineur (RebD, RebM, RebC, RebF, DulA, Rub, RebB, SB). Le couplage de l'HPLC avec un détecteur CAD a permis d'abaisser la LOQ à 0,5 mg/L pour détecter 26 SGs (Chaturvedula & Prakash, 2011). La spectrométrie de masse (MS) est la méthode de détection la plus sensible pour les SGs (Wölwer-Rieck, 2012). Ainsi, un système LC-ESI/MS/MS permet d'abaisser la quantification de 6 SGs entre 2,1 et 7,8 µg/L (Montoro *et al.*, 2013). Notre limite de détection pourrait donc être abaissée par l'utilisation d'un détecteur plus sensible que l'UV-DAD.

Le principal inconvénient des méthodes HPLC en phase inverse sont les durées des cycles. Malgré que les 10 SGs soient élués en 12 min dans notre méthode, le temps d'analyse par échantillon est de 26 min, car il faut inclure une phase de lavage et une phase de rééquilibrage de la colonne. Dans la littérature, peu de méthodes HPLC en phase inverse similaire atteignent des durées inférieurs à 25 min (Aranda-gonzález *et al.*, 2014). La majorité des études indiquent des cycles de 30 min (JECFA, 2010; Zeng *et al.*, 2013), et certaines atteignent jusqu'à 50 min (Bililign *et al.*, 2014). Une réduction significative à 11 min a été obtenu en utilisant un système UHPLC (Ultra-high performance liquid chromatography) avec une colonne C₁₈ de dimension 150 x 2,1 mm et une taille de particule de 1,6 µm. Une telle méthode permet une séparation satisfaisante de 9 SGs (Zimmermann, 2018). Cette méthode révèle une meilleure sélectivité entre ST et RebA ($\alpha=2$) comparée à la méthode de cette étude ($\alpha=1$) mais le facteur de rétention du RebD est inférieur ($k=1,24$ comparée à $k=4,20$ dans notre étude). Le transfert de la méthode HPLC vers UHPLC est possible et permet de réduire considérablement le temps d'analyse (Nováková *et al.*, 2011). Cette optimisation permettrait d'analyser un plus grand nombre d'échantillons sur un temps réduit, surtout dans le cadre d'un programme d'amélioration nécessitant d'analyser des populations en ségrégation.

Une méthode de détection très rapide existe, c'est le NIRS (Near Infra Red Spectroscopy) (Hearn & Subedi, 2009; Midmore *et al.*, 2012; Munz *et al.*, 2018). La spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse qui consiste à soumettre un échantillon à un rayonnement infrarouge. Les molécules organiques soumises à ce rayonnement absorbent ces radiations en modifiant leurs énergies de vibration. Pour quantifier cette méthode nécessite une calibration entre les spectres IR et une méthode de référence telle que l'HPLC couplée à un détecteur UV-DAD. Les modèles développés permettent de déterminer la teneur en ST et RebA par rapport à la matière sèche (Munz *et al.*, 2018). Cependant, les coefficients de corrélation linéaire obtenus entre la quantification par HPLC et spectre IR ($r^2 = 0,82$ pour le

ST et $r^2 = 0,72$ pour le RebA) peuvent conduire à des erreurs de quantification. Hearn & Subedi (2009) recommande une calibration des spectres avec les teneurs en ST, RebA et RebC cumulées pour une calibration du NIRS plus robuste. L'absence de différences significatives entre les valeurs prédites par le modèle et les valeurs analysés par HPLC font du NIRS un outil puissant pour l'analyse rapide des SGs dans un extrait bien calibré (Wölwer-Rieck, 2012). Cependant, *Stevia rebaudiana* montre une grande variabilité de composition en SGs (Montoro *et al.*, 2013; Barbet-Massin *et al.*, 2016), il est donc nécessaire d'utiliser la méthode HPLC développée comme méthode de référence pour la calibration du NIRS. Il existe des appareils NIRS portables dans le commerce (ASC Inc., 2013). L'intérêt serait de développer un modèle de prédiction utilisable sur les feuilles, et ainsi réaliser les mesures directement au champ pour réaliser des cinétiques d'accumulation des SGs, par exemple. Cependant, le modèle développé par Midmore *et al.* (2012) n'a pas montré de bonne corrélation entre la teneur en SGs prédite sur matière fraîche et la teneur déterminée par HPLC.

– **Chapitre 2** –

**Caractérisation de la variabilité phénotypique
de *Stevia rebaudiana* en condition de
production**

1 Introduction

Les objectifs de ce chapitre sont (1) d'évaluer la variabilité phénotypique de *Stevia rebaudiana* à travers l'évaluation de la productivité, (2) de décomposer les traits impliqués dans le rendement en SGs en termes de quantité et de qualité, et (3) d'identifier les caractères d'intérêt pour la mise en place d'un programme d'amélioration pour une filière BIO en Aquitaine.

La productivité de cette culture est définie par le rendement en SGs. Celui-ci est le produit du rendement en biomasse foliaire par la teneur en SGs. Ces deux composantes sont décrites comme dépendante du génotype et de son interaction avec l'environnement (Barbet-Massin, 2015). Elles atteignent leur maximum au stade bourgeons floraux (Bondarev *et al.*, 2004; Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Une grande variabilité phénotypique est décrite pour ces 2 caractères pouvant permettre d'apporter un gain à l'espèce (Yadav *et al.*, 2011). Cependant, peu de ressources génétiques sont caractérisées dans les études et sont souvent issues de collections internes rendant difficile les comparaisons entre différents environnements et l'identification de génotypes adaptés à des conditions spécifiques.

La durée d'implantation correspond à la période entre la plantation et la coupe de la partie aérienne en 1^{ère} année de croissance. Les études, qui comparent cette condition, s'intéressent principalement à la date de plantation, qu'elles définissent comme précoces ou tardives en fonction des saisons (Taleie *et al.*, 2012; Angelini *et al.*, 2018). L'impact positif d'une plantation précoce, correspondant au début du printemps dans l'hémisphère nord, est clairement démontré pour le rendement en SGs (Taleie *et al.*, 2012; Serfaty *et al.*, 2013; Benhmimou *et al.*, 2017).

La biomasse foliaire est le caractère à sélectionner pour garantir un rendement en SGs (Barbet-Massin, 2015). Il existe une grande variabilité d'architecture et de morphologie foliaire chez *Stevia rebaudiana* (Tateo *et al.*, 1998). Dans la plupart des études, les auteurs décrivent les ressources génétiques uniquement comme des ports droits ou buissonnants, sans lien avec le rendement en biomasse. Une première étude a corrélé positivement le nombre de feuilles et de tiges à la biomasse foliaire, sans implication de la taille des plants (Buana, 1958), alors que, plus tard, le nombre de feuilles, la taille des plants (Buana & Goenadi, 1985) et le nombre de tiges (Chalapathi *et al.*, 1998) ont montré une corrélation positive avec la production de biomasse. Ces travaux ont été réalisés sur un nombre réduit de variables descriptives comparées à la variabilité de cette espèce, et semblent montrer une différence suivant les ressources utilisées. Nous nous intéresserons donc à caractériser finement la

canopée de *Stevia rebaudiana* pour révéler la variabilité de l'espèce et potentiellement identifier des traits morphologiques impliqués dans le rendement en biomasse foliaire. De plus, une seule étude a caractérisé la dynamique de ce rendement sur plusieurs années et a montré une augmentation jusqu'à 5-6ans (Andolfi *et al.*, 2006). Cependant, cette étude n'a été faite que sur 2 géotypes.

De la même manière, la teneur en SGs est géotype-dépendant et il est admis qu'elle augmente dès la deuxième année de production (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Cependant, la teneur en SGs n'est pas forcément signe de qualité. La saveur des extraits de *Stevia rebaudiana* est principalement dépendante du ratio RebA/ST qui est souhaité le plus élevé possible (Ceunen & Geuns, 2013b). L'amélioration des connaissances sensorielles des SGs a permis de révéler l'implication des SGs accumulés minoritairement (Hellfritsch *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2014). Ces études définissent les SGs souhaités pour leur saveur douce et sucrée, avec un faible arrière-goût amer (RebA, RebD, RebM, RebE), au contraire des SGs définis comme amer (ST, RebC, DulA, Rub, SB). Une caractérisation fine des profils en SGs est nécessaire pour de la sélection, à travers la détermination de leur teneur et de leur proportion respective par rapport aux SGs totaux. De plus, il a été montré que la composition en SGs serait uniquement dépendante du géotype (Barbet-Massin *et al.*, 2016).

En système pluriannuel, le taux de reprise est un caractère primordial pour garantir la rentabilité de la culture. *Stevia rebaudiana* est décrite comme sensible au froid pendant le passage de l'hiver (Angelini *et al.*, 2018). En France, un taux de survie de 17% seulement a été observé sans protection de la parcelle (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Les auteurs concluent que la capacité de survie face à l'hiver est un caractère primordial à sélectionner pour cultiver *Stevia rebaudiana* en milieu tempéré en système pluriannuel (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Des systèmes de protection de cultures pendant l'hiver ont montré leur efficacité pour augmenter le taux de reprise de *Stevia rebaudiana* au Japon (Meng Qingfu Meng Aihua, 1998). De plus, une étude montre un différentiel de ce caractère en fonction de la période d'implantation de la culture (Serfaty *et al.*, 2013). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude qui caractérise l'impact du géotype de *Stevia rebaudiana* sur le taux de reprise.

Dans ce contexte, nous avons rassemblé et évalué en conditions de production une collection de 18 ressources génétiques (15 géotypes et 3 lots de semences) dans 2 environnements au cours de 2 années de production. Au cours de la première année, une série de plants a été récoltée au stade bourgeons floraux pour évaluer la productivité des ressources génétiques au bout de 3 mois d'implantation, correspondant à une implantation courte. Ces mêmes plants ont été récoltés en 2^{ème} année, permettant d'évaluer la productivité sur 2

saisons. Une autre série de plants a subi une implantation prolongée en 1^{ère} année (5 mois) car taillés seulement pour le passage de l'hiver. Ces plants ont été phénotypés uniquement en 2^{ème} année de croissance. Pour optimiser le taux de survie après l'hiver, nous avons installé un voile d'hivernage sur les 2 sites expérimentaux. La capacité d'adaptation face à l'hiver a été évaluée grâce aux taux de reprise en 2^{ème} année. Durant ces 2 années, le phénotypage a été réalisé à la récolte, c'est-à-dire au stade bourgeons floraux, et consistait à déterminer le rendement en SGs à travers le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs. La biomasse foliaire a été décrite à l'aide de descripteurs de la canopée, et les teneurs de 10 SGs ont permis de caractériser la composition en SGs.

Tableau II.2.1. Ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* évaluées en condition de production. Ce tableau indique le fournisseur, le nom des ressources génétiques, l'année d'obtention, le type de matériel végétal utilisé et l'origine avant la sélection.

Fournisseur	Pays	Nom	Obtention	Type de matériel	Origine avant sélection
EUSTAS gene bank	Allemagne	C	2016	Boutures <i>in vitro</i>	Colombie
		Gawi	2016	Boutures <i>in vitro</i>	Inconnue
		D	2016	Boutures <i>in vitro</i>	Paraguay
OVIATIS collection	France	E161718	2011	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		E8	2011	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		Eirete	2015	Boutures <i>in vitro</i>	Paraguay
		EspLac1	2013	Boutures <i>in vitro</i>	Espagne
		EspLac2	2013	Boutures <i>in vitro</i>	Espagne
		FP	2011	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		GF	2014	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		S6030-1	2015	Boutures <i>in vitro</i>	Israël
		Lac4	2013	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		Larrère	2013	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
		Septo4	2014	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine
Septo5	2014	Boutures <i>in vitro</i>	Argentine		
Genesis seeds	Israël	Candy	2016	Lots de semences	Inconnue
Richter Herbs	Canada	SowNatural	2016	Lots de semences	Inconnue
Hem Zaden	Pays-Bas	SweetStar	2016	Lots de semences	Inconnue

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel végétal

L'objectif de cette étude a été de rassembler un nombre important de génotypes de *Stevia rebaudiana*. A ce jour, il n'existe pas de germplasm de cette espèce. La collection utilisée lors de cette étude est composée de 15 génotypes et 3 lots de semences provenant de différentes origines géographiques et commerciales (Tableau II.2.1). 3 génotypes proviennent de la collection de l'EUSTAS (Hortilab, Telge, Allemagne). Ces génotypes ont été évalués en condition de production en Europe, représentant des contrôles d'expérimentation (Lankes and Grosser, 2015). Les 3 lots de semences proviennent de différents fournisseurs (Genesis seeds, Israël ; Richter Herbs, Canada ; Hem Zaden, Pays-Bas). 12 génotypes proviennent de la collection d'Oviatis (Lacaussade, France), et ont été sélectionnés auparavant au sein de ressources génétiques de fournisseurs en Argentine, Paraguay, Espagne et Canada, puis mis en conservation au laboratoire de culture *in vitro* 'Fraise Concept' (Douville, France).

2.2 Méthodes

2.2.1 Production du matériel végétal

Les génotypes de l'EUSTAS et d'Oviatis sont issus de multiplications végétatives en culture *in vitro* et ont été produits en serre semi-contrôlées de la station d'expérimentation Invenio (Douville, France) avec une température d'aération de 22°C, une température de chauffage à 18°C, et de l'ombrage lorsque l'intensité lumineuse excédait 500 W/m² pendant 7 semaines au total. L'acclimatation et le semis ont été réalisés sur une période de 10 jours en condition d'hygrométrie saturante, suivie par 2 semaines d'aération progressive. Les plants *in vitro* ont été repiqués en mini-motte Jiffy®7 (42 mm de diamètre, Jiffy, France). Le semis des 3 lots de semences a été réalisé sur du substrat Jiffy GOM8 (Jiffy, France). 3 semaines après germination, les plantules ont été repiquées en mini-motte Jiffy®7. Chaque semaine, une sub-irrigation adaptée a été réalisée pour maintenir les mini-mottes humides. Un écimage a été effectué lorsque les plantules ont atteint 7-8 cm pour promouvoir la ramification. Les plantules de 7 semaines ont ensuite été transférées à Liposthey et Ste-Livrade pour implantation.

2.2.2 Dispositifs expérimentaux

La collection de ressources génétiques a été implantée sur une parcelle de la station d'expérimentation Invenio à Ste-Livrade le 6 juin 2016, et sur une parcelle de producteur à Liposthey le 24 juin 2016.

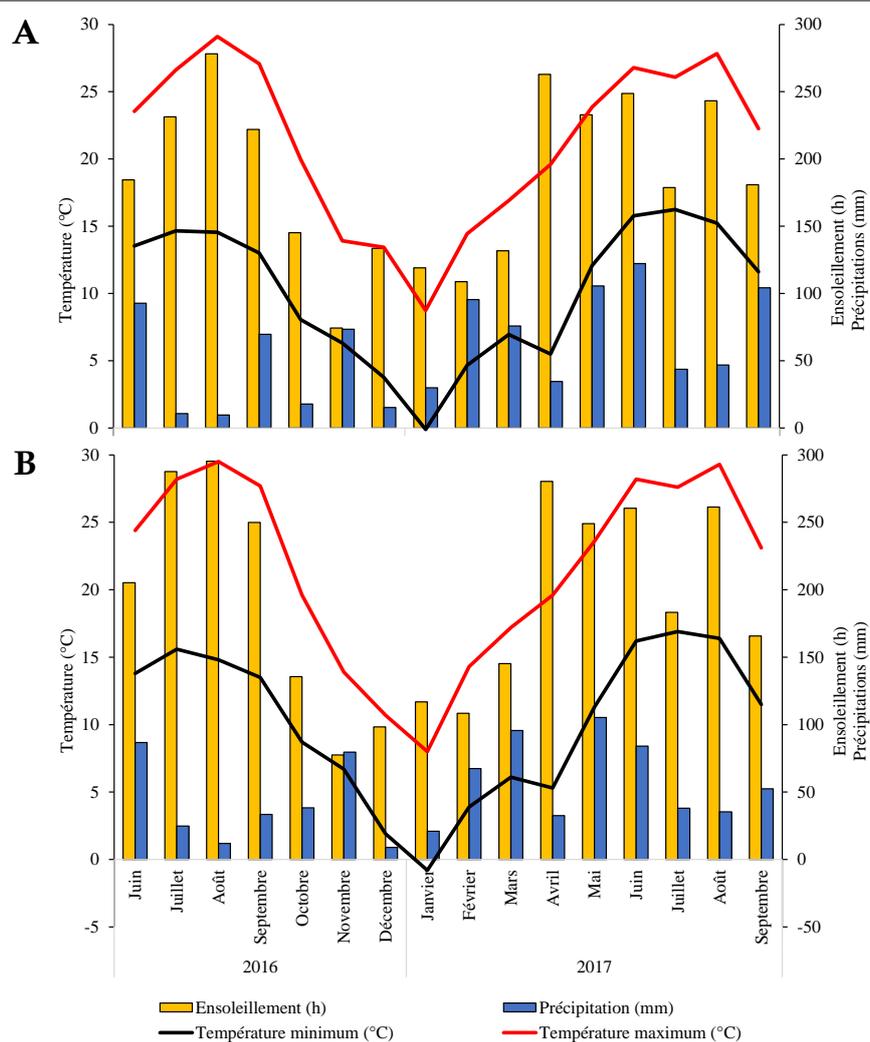


Figure II.2.1. Données climatiques mensuelles durant le temps de l'expérimentation pour le site de Liposthey (A) et de Sainte-Livrade (B). Les températures indiquées correspondent aux moyennes mensuelles. L'ensoleillement et les précipitations sont le cumul mensuel.



Figure II.2.2. Voile d'hivernage installé au mois de Décembre 2016 pour le passage de l'hiver (Ste-Livrade, 47). Crédit photo : S. Cavaignac (Invenio)

Les dispositifs expérimentaux sont arrangés en 4 blocs randomisés avec une densité de plantation de 37 500 plants/ha. Chaque bloc randomisé contient 20 ou 21 réplicas biologiques par géotypes ou individus par lot de semences, à Ste-Livrade et Liposthey respectivement. La répartition de chaque ressource génétique au sein du dispositif est la même sur les 2 sites.

Les 2 sites expérimentaux diffèrent par le type de sol, le système d'irrigation et le dispositif d'implantation. A Liposthey, le sol est sablonneux, noir et est constitué de 85-90% de sable grossier et de 5-10% de sable fin. Sa densité est de 1,3 T/m³. Un système de goutte-à-goutte enterré a été utilisé et l'implantation a été réalisée sur paillage plastique. A Ste-Livrade, le sol est de texture argilo-calcaire. L'irrigation a été faite par aspersion avec un système de sprinklers et l'implantation a été réalisée sur buttés, sans protection par paillage.

2.2.3 Conduite de la culture

Les données climatiques sur les 2 années de production sont représentées en Figures 2.2. Pendant les 2 années de culture, le désherbage aux pieds des plants a été réalisé par action mécanique (manuelle ou avec bineuse). Des traitements fongicides (0,5 L/ha de Score, Syngenta, France) ont été réalisés uniquement lorsque des symptômes foliaires sont apparus. A Liposthey, une irrigation d'1h à 1 L/h par goutteur a été programmée en été, et a été réduite à 30 min par jour en automne. A Ste-Livrade, l'irrigation a été adaptée tout au long de la culture pour maintenir le sol humide sans provoquer une rétention d'eau au niveau du système racinaire. Cependant, 2 blocs du dispositif expérimental ont été perdus dans les mois suivant l'implantation en 2016, à cause de l'hétérogénéité de l'irrigation par sprinklers. Des voiles d'hivernage (P30) ont été installés sur les 2 parcelles pour protéger les parties racinaires pendant le passage de l'hiver (Figure II.2.3).

2.2.4 Caractérisation de la variabilité phénotypique au stade bourgeons floraux

2.2.4.1 Dates de prélèvement

En 1^{ère} année de production, la caractérisation phénotypique a été effectuée 3 mois après implantation à Liposthey et 3,5 mois après implantation à Ste Livrade (les 21 et 28 septembre 2016) sur un effectif de 20 plants par ressources génétiques. Le reste des plants ont été taillés en Décembre 2016 pour le passage de l'hiver, conduisant à des implantations de 5 mois à Liposthey et 5,5 mois à Ste-Livrade pour des effectifs de 64 et 20 plants respectivement. En 2^{ème} année de production, le voile d'hivernage a été retiré en mars 2017 sur les 2 sites de production. La récolte plante entière a été effectuée sur les 2 séries de plants présents sur les 2 sites de production. La caractérisation phénotypique a été effectuée au

minimum sur 8 plants et au maximum sur 20 plants par ressource génétique. Autrement dit, les ressources génétiques ont été évaluées sur les 2 années de production pour une implantation courte (3 mois) et uniquement en 2^{ème} année de production pour une implantation longue (5 mois).

2.2.4.2 Caractérisation de la biomasse aérienne

La caractérisation morphologique des ressources génétiques a été réalisée grâce à plusieurs mesures : nombre de tiges principales, hauteur du plant et diamètres du plant (nord-sud et est-ouest). Les plants ont été taillés à la main, à environ 10 cm du sol, pour être effeuillés le jour même. En 1^{ère} année, les biomasses des 5 plants récoltés par bloc par ressource génétiques ont été poolées. En 2^{ème} année, les biomasses n'ont pas été mélangées et les mesures ont été réalisées plant par plant. Les feuilles et les tiges ont été séchées séparément en étuve pendant 48h à 50°C. Le rendement à l'hectare a été calculé par le produit des masses sèches et de la densité de plantation. Ces variables quantitatives sont utilisées pour déterminer les 12 descripteurs de la canopée (Tableau II.2.2).

Tableau II.2.2. Variables utilisées pour la caractérisation de la biomasse aérienne de *Stevia rebaudiana* en conditions de production. MS : masse sèche

Catégorie	Variables	Unité	Description / formule
Mesurée	Rendement foliaire	kg/ha	$MS_{feuille} \times Densité_{plantation}$
	Rendement tige	kg/ha	$MS_{tige} \times Densité_{plantation}$
	h	m	Hauteur du plant
	ϕ_{NS}	m	Diamètre Nord-Sud du plant
	ϕ_{EO}	m	Diamètre Est-Ouest du plant
	Nombre de tige principale	nb/ha	$nb_{tige} \times Densité$
Calculée	Surface de la canopée	m ² /ha	$\frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \pi \times Densité_{plantation}$
	Volume de la canopée	m ³ /ha	$\frac{4}{3} \pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \frac{h}{2} \times Densité_{plantation}$
	Densité de tige	nb/m ²	$nb_{tige} / Surface_{canopée}$
	Leaf Mass Ratio	%	$(MS_{feuille} / MS_{feuille+tige}) \times 100$
	Specific Leaf Mass	g/m ²	$MS_{feuille} / Surface_{canopée}$
	Specific Stem Mass	g/m ²	$MS_{tige} / Surface_{canopée}$

2.2.4.3 Quantification des SGs

La biomasse sèche foliaire est homogénéisée, puis transférée en fiole à scintiller pour être broyée finement (GenoGrinder®). 3 billes de 5 mm de diamètre sont utilisées, et le

broyage de chaque échantillon est réalisé 2 fois 30 secondes à 1 750 rpm. La poudre obtenue est ensuite utilisée pour déterminer la teneur en SGs présente dans les feuilles sèches.

La validation de la méthode décrite pour la quantification des différents SGs est décrite dans le Chapitre 1 (Partie 2). 20 mg de MS finement broyées sont extraits dans 2 mL d'eau ultra-pure pendant 2 h au bain-marie à 80°C. Les extraits aqueux sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 12 000 rpm à 4°C. 1 mL de chaque surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue Luer-slip en plastique (Fisher Bioblock Scientific, France), pour être filtré avec un econofiltre Captiva (Agilent Technologies, France) dont la membrane est en nylon et les pores de 0,45 µm. Le filtrat est déposé en vial en verre de 2 mL (32 mm de hauteur, 12 mm de diamètre ; Fisher Bioblock Scientific, France) pour être analysé par RP-HPLC.

Le dosage des SGs est réalisé avec une chaîne Agilent 1100 à un débit de 1.5 mL/min, à 40°C, et la longueur d'onde du signal mesuré est à 202 nm. 5 µL de surnageant filtré est injecté sur une colonne Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 250 mm, 4 µm ; Agilent Technologies) précédé d'une colonne de garde Poroshell 120 UHPLC EC-C18 (4,6 mm, 4 µm ; Agilent Technologies). Les solvants de la phase mobile sont l'eau ultra-pure (A) et l'acétonitrile Chromasolv gradient grade 99% (B ; Sigma-Aldrich, France), et sont utilisés en mode gradient. La phase mobile commence par une phase initiale en mode isocratique (0 – 1,5 min, 20% B), poursuivie par un gradient linéaire (1,5 – 11,5 min, 20 – 50,7% B). Un lavage avec le solvant organique est appliqué (11,6 – 14,6 min, 100% B), suivi de la phase d'équilibrage de la colonne (14,7 – 26 min, 20% B). Les chromatogrammes sont analysés par le logiciel Agilent Chemstation © version B.04.03 (2012), obtenu par Luc Arnaud, Responsable commercial – Zone sud (Agilent Technologies, France). Les 10 SGs sont élués entre 7 et 11,5 min et sont identifiés par leur temps de rétention spécifique (T_R) déterminés avec des standards de SGs purs (LGC Standard). Les concentrations en 10 SGs dans la MS foliaire ont été déterminées grâce aux équations linéaires obtenues par gamme d'étalonnage (Partie 2, Chapitre 1).

La teneur de chaque SGs est exprimée en % w/w. La somme des teneurs des 10 SGs constitue la teneur en SGs totaux dans cette étude. La somme des teneurs de 8 SGs (ST et RebA exclu) constitue la teneur en SGs mineurs. La teneur de chaque SGs est rapportée à la teneur en SGs totaux, pour obtenir leur proportion respective et constituer le profil de l'échantillon.

Le rendement en glycoside de stéviol, exprimé en kg/ha, est le produit du rendement en biomasse sèche foliaire et de la teneur en SGs. Les rendements présentés dans l'intégralité du chapitre sont déterminés pour une reprise complète des plants (100 %) et nous permet

d'évaluer le potentiel de nos ressources génétiques, hors absence totale de reprise. Le caractère phénotypique de reprise après l'hiver est traité séparément.

2.2.5 Détermination du taux de reprise en 2^{ème} année

La pérennité de la culture de *Stevia rebaudiana* est évaluée par le taux de reprise de la croissance en 2^{ème} année de production. Les notations binaires (présence/absence de croissance, Figure II.2.3) ont débuté fin avril 2017 à Liposthey et fin mai 2017 à Ste-Livrade, et ont été réalisées une fois par mois jusqu'à la récolte de 2^{ème} année en septembre 2017. Ce dénombrement a été effectué sur la totalité des plants implantés en 2016, correspondant à 84 plants/ressource génétique à Liposthey et 40 plants/ressource génétique à Ste-Livrade. L'effectif à 3 mois d'implantation est de 20 plants/ressource génétique sur les 2 sites. L'effectif à 5 mois d'implantation est de 64 plants/ressource génétique à Liposthey et de 20 plants/ressource génétique à Ste-Livrade. Les taux de reprise ont été déterminés en fonction de la durée d'implantation en 1^{ère} année de production (3 et 5 mois) pour chaque site de production par l'équation suivante :

$$\text{Taux (\%)} = \frac{\text{Effectif}_{\text{repris}}}{\text{Effectif}_{\text{implanté}}} \times 100$$

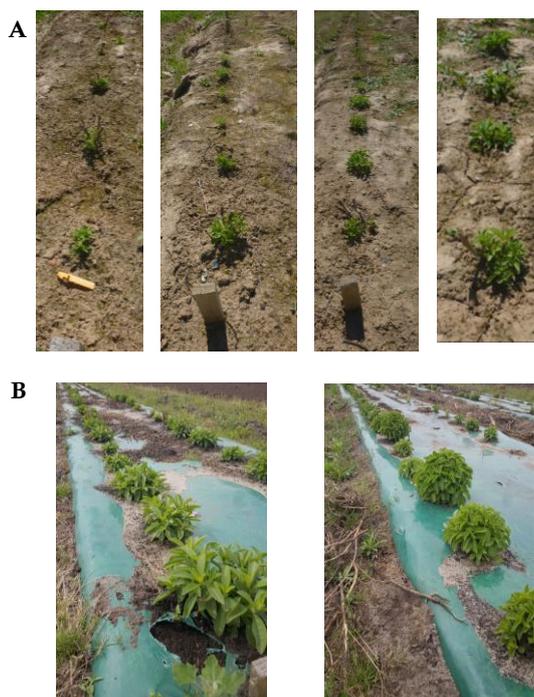


Figure II.2.3. Illustration de la reprise de la croissance de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de production. (A) Site de Ste-Livrade le 12 avril 2017. Crédit photo : S. Cavaignac (Invenio). (B) Site de Liposthey le 25 avril 2017. Crédit photo : C. Hastoy

2.2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R version 3.4.3 (R Core Team, 2015). Les représentations graphiques sont obtenues avec les packages « ggplot2 » (Wickham, 2009), « cowplot » (Wilke, 2017), « gridExtra » (Auguie, 2017) et « extrafont » (Chang, 2014).

2.2.6.1 Analyse de variance

L'analyse de variance de type II des variables quantitatives a été réalisée par la fonction *Anova* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011) sur le modèle linéaire mixte (1), établi par la fonction *lmer* du package « lme4 » (Bates *et al.*, 2015). Ce modèle a été utilisé pour estimer les moyennes marginales et les erreurs standards avec la fonction *emmeans* du package « emmeans » (Russell, 2018). Le modèle (2) a été utilisé pour la comparaison multiple des ressources génétiques par site et par année de production par le test HSD de Tukey avec la fonction *cld* du package « emmeans » (Russell, 2018).

$$(1) \text{ lmer } (y \sim A * B * C + (1|D:B))$$

$$(2) \text{ lmer } (y \sim A + (1|D))$$

Où, y est la variable mesurée, A est le facteur fixe génotype, B est le facteur fixe site de production, C le facteur fixe année de production, et D est le facteur aléatoire bloc randomisé. Les interactions du bloc avec les autres facteurs sont considérées comme facteurs aléatoires.

L'analyse de variance de type II des proportions en SGs (% par rapport aux SGs totaux) a été réalisée par la fonction *Anova* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011) sur le modèle linéaire généralisé :

$$(1) \text{ glm } (y \sim A * B * C + D/C)$$

$$(2) \text{ glm } (y \sim A * D)$$

Où, y est la proportion, A est le facteur génotype, B est le facteur année, C le facteur site de production, D est le facteur bloc randomisé. L'interaction du bloc avec les autres facteurs ne peut être testé à cause du nombre de répliques en 1^{ère} année de production ($n=1/\text{bloc}/\text{RG}$). Le second modèle (2) a été utilisé pour tester l'effet des facteurs intra-site, et réaliser la comparaison multiple des ressources génétiques par le test HSD de Tuckey avec la fonction *HSD.test* du package « agricolae » (ref).

L'analyse de variance de type II de la reprise en 2^{ème} année a été réalisée par la fonction *Anova* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011) sur 2 modèles linéaires généralisés :

$$(3) \text{ glm } (y \sim A * B * C)$$

$$(4) \text{ glm } (y \sim A * B)$$

Où, y est la notation binaire de la reprise, A est le facteur génotype, B est le facteur bloc randomisé hiérarchisé au site et C le facteur site de production. Le premier modèle (1) a été utilisé pour révéler l'effet des facteurs de l'expérimentation. Le second modèle (2) a été utilisé pour tester l'effet des facteurs intra-site, et réaliser la comparaison multiple des ressources génétiques par le test HSD de Tuckey avec la fonction *HSD.test* du package « agricolae » (ref).

2.2.6.2 Corrélation de Spearman

La corrélation entre deux variables numériques a été évaluée par le niveau de significativité de l'association de ces variables par la méthode de Spearman à l'aide de la fonction *cor.test*, et le calcul du coefficient de Spearman (r) par la fonction *cor*. Ces deux fonctions proviennent du package « stats » (R Core Team, 2015).

2.2.6.3 Régression linéaire multiple

Une matrice de corrélation a été construite pour sélectionner uniquement les variables indépendantes pour la régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire, correspondant à des coefficients de corrélation de Pearson $< 0,8$. Le meilleur modèle a été obtenu par la procédure de sélection exhaustive de prédicteurs en fonction du Bayesian Information Criterion (BIC) par les fonctions *regsubsets* et *plot* du package « leaps » (Lumley and Miller, 2017). La détermination du Variance Inflation Factor (VIF) a permis de vérifier l'absence de quasi-colinéarité entre les prédicteurs sélectionnés par la fonction *vif* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011). La représentation graphique sous forme de Heatmap a été obtenue par la fonction *heatmap* du package « stats » sur la matrice des moyennes des prédicteurs (R Core Team, 2015).

2.2.6.4 Analyse en composante principale et clustering

La composition en SGs, correspondant aux proportions respectives de chaque SGs par rapport au SGs totaux, a été décrite par Analyse en Composante Principale (ACP) à l'aide de la fonction *PCA* du package « FactoMineR » (Le et al., 2008). Les données manquantes ont été au préalable imputées par la fonction *imputePCA* du package « missMDA » (Husson and Josse, 2016). Le Clustering Hiérarchique sur Composante Principale (HCPC) a été réalisé sur les résultats de l'ACP par la fonction *HCPC*.

Tableau II.2.3. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires mixtes du rendement en SGs et ses composantes pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de production

Facteurs	Rendement en SGs (kg/ha)		Rendement biomasse foliaire sèche (kg/ha)		Teneur en SGs (% w/w)	
	Pr (>Chi ²)	<i>p</i> < 0.001	Pr (>Chi ²)	<i>p</i> < 0.001	Pr (>Chi ²)	<i>p</i> < 0.001
Génotype	5.72E-12	<i>p</i> < 0.001	8.14E-08	<i>p</i> < 0.001	2.20E-16	<i>p</i> < 0.001
Site	0.33	NS	0.9	NS	4.99E-04	<i>p</i> < 0.001
Année	5.60E-04	<i>p</i> < 0.001	0.57	NS	2.20E-16	<i>p</i> < 0.001
Génotype : Site	1.63E-07	<i>p</i> < 0.001	0.0039	<i>p</i> < 0.01	2.07E-08	<i>p</i> < 0.001
Génotype : Année	0.036	<i>p</i> < 0.05	0.11	NS	2.20E-16	<i>p</i> < 0.001
Site : Année	0.12	NS	0.14	NS	0.075	NS
Génotype : Site : Année	0.38	NS	0.93	NS	4.12E-11	<i>p</i> < 0.001

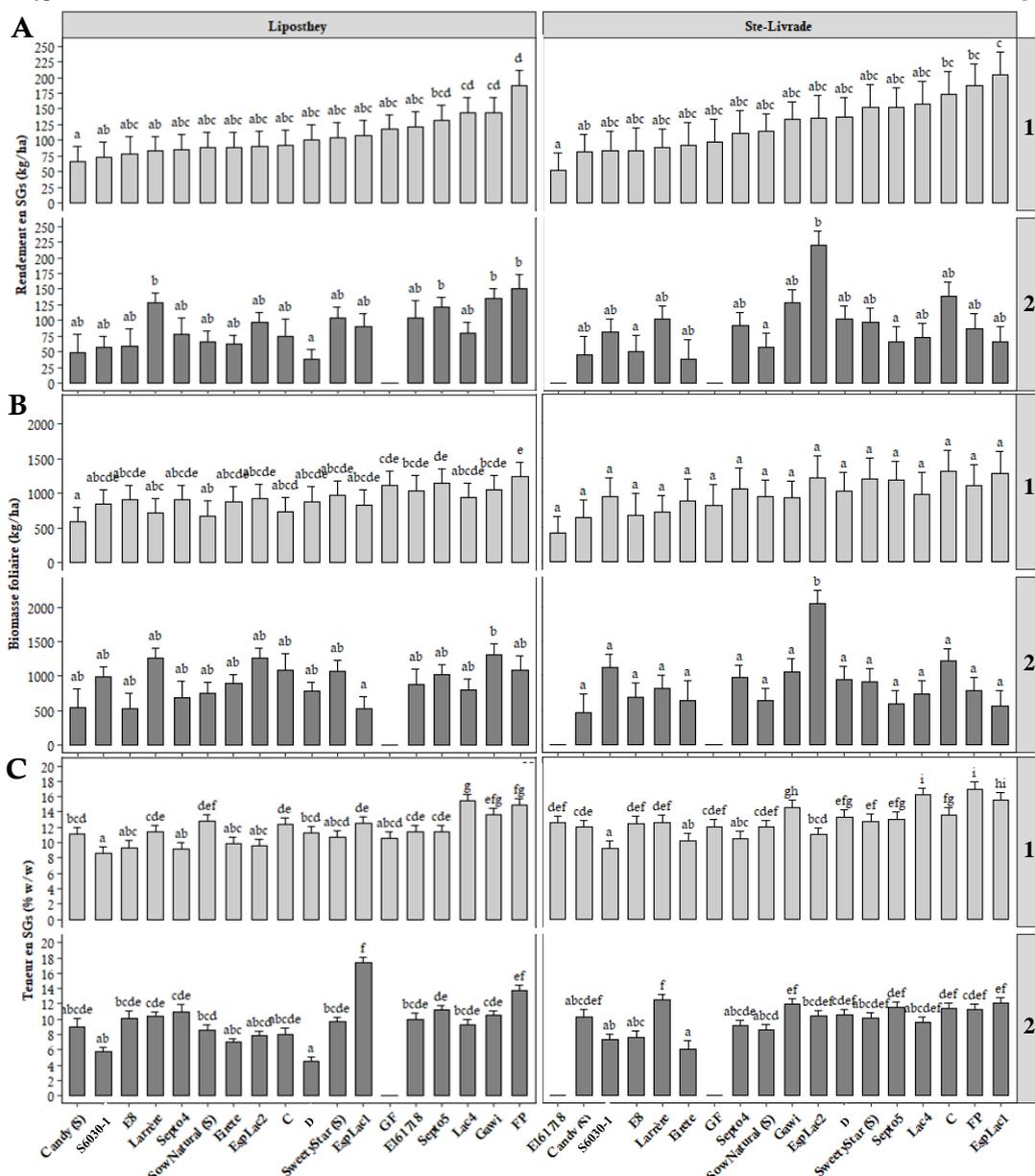


Figure II.4. Evaluation de la productivité de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux, dans 2 sites expérimentaux pendant 2 années de culture. (A) Rendement en SGs exprimé en kg/ha ; (B) Rendement en biomasse foliaire sèche exprimé en kg/ha ; (C) Teneur en SGs totaux exprimée % w/w. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes marginales estimées ± erreur standard, déterminées à partir de 20 plants par ressource génétique en première année de production (1), et, entre 3 et 12 plants en deuxième année de production (2). Les ressources génétiques sont classées dans l'ordre croissant des rendements SGs en 1^{ère} année de production sur chaque site. Le résultat de la comparaison multiple par le test HSD de Tukey des ressources génétiques par année et par site de production est indiqué sous forme de lettres. Les résultats montrant les mêmes lettres dans chaque condition ne sont pas significativement différents à *p* = 0,05.

3 Performances de ressources génétiques durant 2 années de production

3.1 Variabilité de la productivité et ses composantes

Le rendement en SGs est significativement différent en fonction du génotype, l'année de production, l'interaction entre le génotype et le site, puis l'interaction entre le génotype et l'année (Tableau II.2.3). Le rendement en biomasse foliaire est dépendant uniquement du génotype et de son interaction avec le site. Enfin, la teneur en SGs est influencée par tous les facteurs et leur interaction, hormis l'interaction entre le site et l'année de production. Dans nos conditions, la variabilité phénotypique des composantes du rendement de *Stevia rebaudiana* est fortement dépendante du génotype. Ce résultat révèle qu'il existe suffisamment de variabilité au sein de la collection pour identifier des différences significatives. Les interactions avec le site et l'année de production indiquent que les génotypes n'évoluent pas de la même manière suivant les conditions pédoclimatiques, induisant un classement différentiel de la productivité en fonction des conditions (Figure II.2.4).

En 1^{ère} année de production, les ressources génétiques ont atteint des rendements en SGs entre 65 et 187 kg/ha à Liposthey, et entre 52 et 205 kg/ha à Ste-Livrade (Figure II.2.4 A). En 2^{ème} année de production, ce rendement diminue allant de 38 à 150 kg/ha à Liposthey alors qu'à Ste-Livrade la gamme de rendement en SGs est plus large, entre 37 et 220 kg/ha. Certains génotypes n'ont pas repris de croissance la deuxième année (GF dans les 2 sites, et E161718 à Ste-Livrade). La comparaison multiple des ressources génétiques dans chaque condition permet d'identifier les réponses extrêmes, dépendantes de l'interaction du génotype avec le site et l'année de production (Tableau II.2.3). Le classement, en fonction de la productivité en 1^{ère} année, n'est pas maintenu en 2^{ème} année (Figure II.2.4). A Liposthey, Candy (S) et S6030-1 (< 72 kg/ha) sont des producteurs limités de SGs comparés à Lac4, Gawi et FP (> 144 kg/ha) en 1^{ère} année, alors qu'en 2^{ème} année le génotype D (38 kg/ha) est significativement différent de Larrère, Septo5, Gawi et FP (> 121 kg/ha). A Ste-Livrade, le génotype E161718 (52 kg/ha) comparé à C, FP et EspLac1 (> 173 kg/ha) est un génotype limité en production de SGs, alors qu'en 2^{ème} année, ce sont les ressources génétiques E8, SowNatural (S) et Septo5 (< 66 kg/ha) les moins intéressantes comparées à EspLac2 (220 kg/ha). L'effet année sur le rendement en SGs ($p < 0,001$) montre une diminution générale des rendements de production en 2^{ème} année, cependant, celui-ci n'est pas significatif pour toutes les ressources génétiques. EspLac2 est le seul génotype montrant une nette augmentation du rendement en 2^{ème} année (de 135 à 220 kg/ha à Ste-Livrade). Ensuite, quel que soit le site, les

ressources génétiques Eirete FP, Lac4, D et SowNatural (S) voient leur rendement diminuer de manière significative en 2^{ème} année, auxquels s'ajoutent E8 et EspLac1 à Ste-Livrade. L'effet du site de production révèle que C, EspLac2 et D sont plus productifs à Ste-Livrade qu'à Liposthey, quel que soit l'année de production. Enfin, les ressources génétiques les plus stables sont Candy(S), Gawi, S6030-1, Larrère, Septo4, Septo5 et SweetyStar (S) pour lesquels nous ne révélons ni d'effet site, ni d'effet année.

Le rendement en biomasse foliaire (Figure II.2.4 B) obtenu en 1^{ère} année de production varie entre 593 et 1 242 kg/ha à Liposthey et entre 412 et 1 300 kg/ha à Ste-Livrade. En 2^{ème} année, ce rendement reste stable entre 528 et 1 315 kg/ha à Liposthey alors que celui-ci passe de 469 à 2 046 kg/ha à Ste-Livrade. L'absence d'effet année significatif ($p>0,05$) indique une stabilité générale de la production de biomasse foliaire en 2^{ème} année (Tableau II.2.3), quel que soit le site, mais l'interaction significative du génotype avec le site ($p>0,01$) indique des comportements spécifiques au génotype et au site de production. A Liposthey, Candy et SowNatural (S) (< 675 kg/ha) sont des producteurs mineurs comparés à GF, Septo5, Gawi et FP (> 1 107 kg/ha) en 1^{ère} année, puis en 2^{ème} année Gawi (1 315 kg/ha) maintient une bonne production alors que EspLac1 (525 kg/ha) perd son rendement de production foliaire. A Ste-Livrade, l'absence de différences significatives en 1^{ère} année de production indique que la variabilité intra- est supérieure à la variabilité inter-ressources génétiques. En 2^{ème} année, toutes les ressources génétiques (< 1 211 kg/ha) sont significativement différentes de EspLac2 (2 046 kg/ha). Ce dernier est le seul génotype à montrer une augmentation significative de son rendement entre les 2 années de production (de 1 214 à 2 046 kg/ha). Le génotype EspLac1 est le seul génotype à montré une diminution significative de son rendement en biomasse foliaire en 2^{ème} année sur les 2 sites.

Les teneurs en SGs (Figure II.2.4 C) obtenues en 1^{ère} année varient de 8,58 à 15,47 % w/w à Liposthey et de 9,22 à 16,9 % w/w à Ste Livrade. En 2^{ème} année, elles varient entre 4,51 et 17 % w/w à Liposthey et entre 6,12 et 12,44 % w/w. L'effet année révèle une diminution générale des teneurs en SGs sur les 2 sites, excepté pour EspLac1 à Liposthey dont la teneur augmente de 12,54 à 17,37 % w/w. La faible variabilité intra-ressources génétiques dans chaque condition révèle de nombreuses différences significatives et explique la significativité de tous les facteurs et leurs interactions.

A Liposthey en 1^{ère} année, S6030-1, Septo4, E8, EspLac2 et Eirete présentent les teneurs les plus faibles inférieures à 9,85 % w/w et vont maintenir de faibles teneurs en 2^{ème} année (<8,63 % w/w). Alors qu'en 1^{ère} année, les génotypes C, EspLac1, SowNatural (S), Gawi, FP et Lac4 ont des teneurs comprises entre 12,45 et 15,47 % w/w. Seuls les génotypes FP et EspLac1

vont maintenir ou augmenter leur teneur en deuxième année (13,69 et 17,37 % w/w respectivement).

Pour St-Livrade en 1^{ère} année, on retrouve les mêmes génotypes (S6030-1, Eirété, Septo4, EspLac2) ainsi que Candy (S) avec des faibles teneurs en SGs (11,92 % w/w). En 2^{ème} année, seuls les génotypes (Eirété, S6030-1 et E8) maintiennent de faible teneur inférieure à 7,54 % w/w alors que les génotypes C, Septo5, Gawi, EspLac1 et Larrère présentent les meilleures teneurs allant de 11,38 et 12,44 % w/w.

Cette évaluation de la productivité sur 2 années et 2 sites de production permet d'identifier les ressources génétiques les mieux adaptées dans ces conditions culturales. A Liposthey, les génotypes Gawi et FP sont les plus productifs sur les 2 années. A Ste-Livrade, les génotypes C, FP et EspLac1 sont les plus productifs en 1^{ère} année, mais sont intermédiaires en 2^{ème} année où EspLac2 est le plus productif, suite à une forte augmentation de son rendement en biomasse foliaire. Le génotype GF n'a pas pu être évalué en 2^{ème} année suite à une absence de reprise après l'hiver, et semble donc non adapté à une implantation courte dans les 2 sites, tout comme E161718 à Ste-Livrade.

3.2 Contribution des composantes au rendement en SGs

Le rendement en SGs dépend du rendement en biomasse foliaire et de la teneur en SGs. Pour comprendre la mise en place de celui-ci chez *Stevia rebaudiana*, nous avons évalué les liens et les contributions des composantes du rendement.

Pour cela, nous avons évalué les corrélations entre le rendement en SGs, le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs (Figure II.2.5). L'analyse statistique de la totalité des récoltes révèle des corrélations significatives entre rendement en SGs et en biomasse foliaire (Figure II.2.5 A), et entre rendement et teneur en SGs (Figure II.2.5 B). De plus, les coefficients de corrélation de Pearson montrent une forte corrélation entre rendement en SGs et en biomasse foliaire (0,87), suggérant que le rendement en biomasse foliaire détermine le rendement en SGs, quel que soit le génotype étudié. La faible corrélation entre rendement et teneur en SGs (0,52) révèle seulement une tendance entre ces 2 caractères. L'absence de corrélation significative entre rendement en biomasse foliaire et teneur en SGs suggère l'indépendance de ces 2 caractères au sein de la collection (Figure II.2.5 C). Pour évaluer la contribution des composantes au rendement en SGs, nous avons évalué leur part de variance respective dans la variabilité du rendement (Tableau II.2.4). Ainsi, nous confirmons la contribution nettement supérieure du rendement en biomasse foliaire (75%) par rapport à la teneur en SGs (20%) dans la mise en place du rendement en SGs.

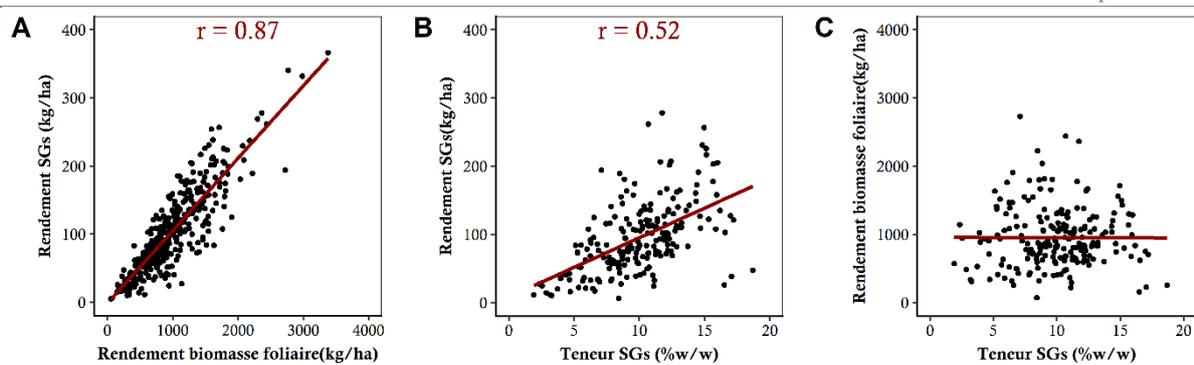


Figure II.2.5. Corrélation entre les composantes du rendement de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de culture.

Le coefficient de corrélation de Pearson (pour $p < 0.05$) est indiqué en haut de chaque graphique. Les droites rouges représentent la corrélation linéaire entre les variables. Les nuages de point correspondent à 450 mesures.

Tableau II.2.4. Décomposition de la variance du rendement en SGs chez *Stevia rebaudiana* en fonction du rendement en biomasse foliaire et de la teneur en SGs.

Source de la variance	SCE	Part de la variance (%)	Pr ($>Chi^2$)
Biomasse foliaire	989277	75	$p < 0.001$
Teneur en SGs	265961	20	$p < 0.001$
Résidus du modèle	60478	5	

3.3 Identification des descripteurs de la canopée en lien avec le rendement en biomasse foliaire

Le rendement en biomasse foliaire est le caractère déterminant dans nos conditions de culture. *Stevia rebaudiana* arborant une grande variabilité d'architecture, il est donc nécessaire d'identifier les traits morphologiques expliquant la variabilité du rendement en biomasse foliaire sèche. En raison des différences d'échantillonnage entre les 2 années de culture, nous nous concentrons uniquement sur les résultats obtenus en 2^{ème} année de production (mesures plante à plante).

L'absence de forte corrélation significative ($r > 0.8$) entre rendement en biomasse foliaire et descripteurs de la canopée ne permet pas d'identifier un caractère unique à sélectionner. Cela suggère soit l'absence de lien direct entre descripteur de la canopée et rendement en biomasse, soit l'implication de plusieurs traits dans la mise en place de celle-ci. Pour répondre à ces hypothèses, nous avons réalisé une régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire en fonction des descripteurs de la canopée mesurés (Tableau II.2.2). A partir des 10 variables, le meilleur modèle linéaire obtenu par sélection exhaustive de régresseurs en fonction du BIC est composé de 4 variables et obtient un coefficient R^2 de 0,79 :

$$y \sim 32,93 a + 31,11 b + 30,55 c + 1,63 d - 3\ 148$$

Où y est le rendement en biomasse foliaire sèche (kg/ha), a est le diamètre Nord-Sud (cm), b est le diamètre Est-Ouest (cm), c est le Leaf Mass Ratio (%) et d est le Specific Stem Mass (g/m²). Ces 4 descripteurs de la canopée constituent les variables permettant de décrire de manière significative la variabilité du rendement en biomasse foliaire dans nos conditions culturales.

Les ressources génétiques évaluées sur les 2 sites de production se classent en 2 grands groupes en fonction de ces 4 descripteurs de la canopée (Figure II.2.6). Les principaux critères différenciant ces 2 classes sont les diamètres NS et EO. Le premier groupe présente des diamètres de canopée importants comparé au second groupe. Le SSM n'est pas en lien avec les diamètres, car nous pouvons observer une gamme importante de variabilité dans les 2 groupes. Enfin, le LMR évolue à l'inverse du SSM. En terme d'architecture, le premier groupe correspond à des plants se développant sur d'importantes largeurs au contraire du second groupe. Le SSM révèle la densité de biomasse de tige et le LMR révèle la part de la biomasse foliaire par rapport à la biomasse aérienne.

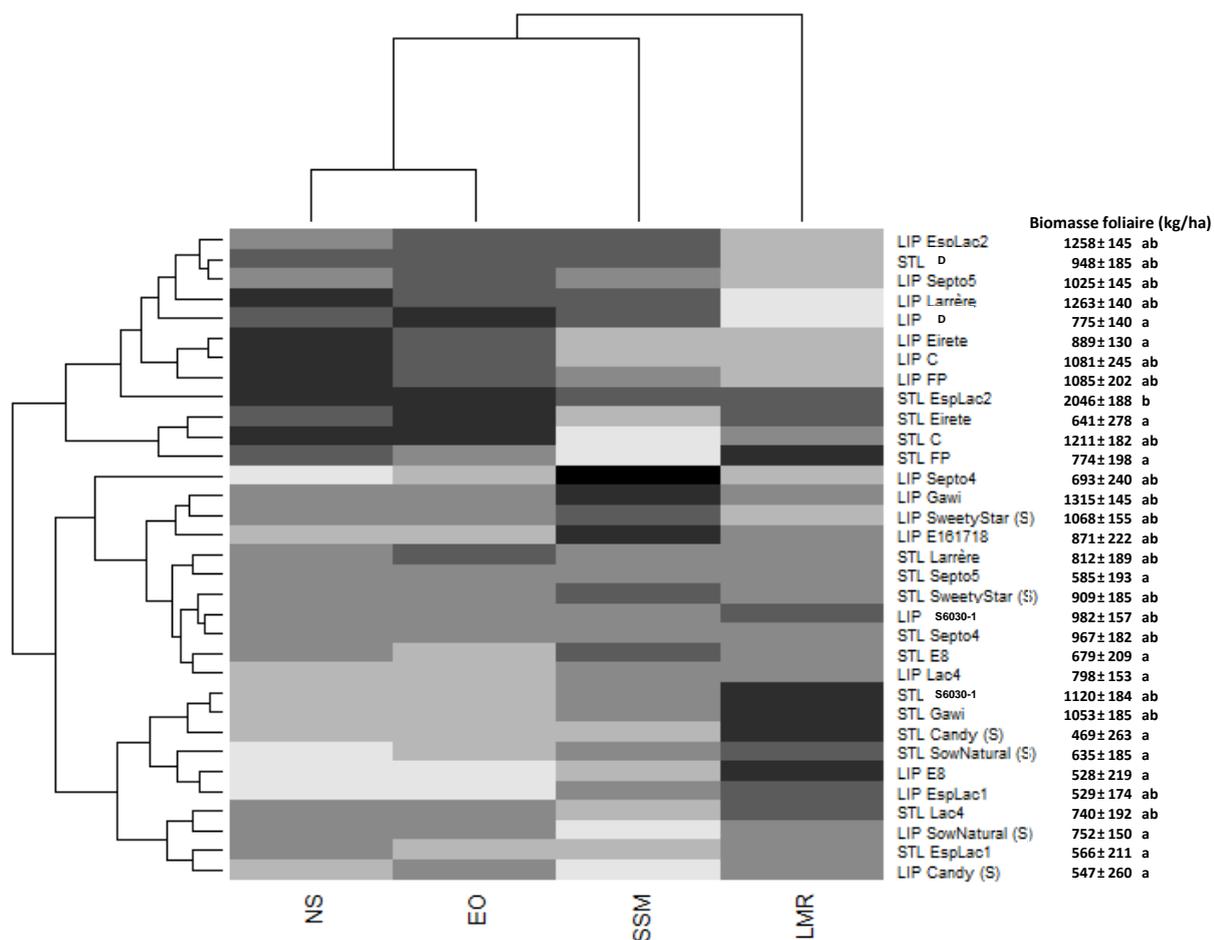


Figure II.2.6. Caractérisation de 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux en 2^{ème} année de production dans 2 sites de production selon 4 descripteurs de la canopée. La représentation sous forme de heatmap est obtenue sur les moyennes marginales estimées pour chaque ressource génétique dans 2 sites de production (LIP : Liposthey ; STL : Ste-Livrade). Les rendements en biomasse foliaire (kg/ha) correspondant sont indiqués à droite avec le résultat de la comparaison multiple de la 2^{ème} année de production par le test HSD de Tukey.

Cette analyse révèle une plasticité phénotypique importante des ressources génétiques en fonction du site de production. En effet, les géotypes Septo5 et Larrère développent une canopée plus large à Liposthey qu'à Ste-Livrade, et se classent dans les 2 groupes.

Ensuite, dans chacun des 2 groupes, les ressources génétiques révèlent des variations de distributions de la biomasse (SSM et LMR), comme par exemple le géotype FP qui montre un fort LMR à Ste-Livrade comparé à Liposthey, ou le géotype Gawi dont le SSM est plus important à Liposthey comparé à Ste-Livrade.

Le rendement en biomasse foliaire du groupe 1 varie de 774 à 2 046 kg/ha (STL FP et STL EspLac2 respectivement) et est en moyenne de 1 083 kg/ha. Le rendement du groupe 2 est compris entre 469 et 1 315 kg/ha (STL Candy et LIP Gawi respectivement) et est en moyenne de 791 kg/ha. Ces résultats suggèrent que les ressources génétiques dont la largeur de la canopée est plus importante obtiennent en moyenne un rendement en biomasse foliaire plus important.

Tableau II.2.5. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés des proportions en SGs doux et amers pour 15 génotypes de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux pendant 2 années de production.

Facteurs	SGs doux (%)		SGs amers (%)	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Génotype	2.00E-16	$p < 0.001$	2.00E-16	$p < 0.001$
Année	0.2732	NS	0.4488	NS
Site	2.00E-16	$p < 0.001$	2.00E-16	$p < 0.001$
Génotype : Année	0.2512	NS	0.4568	NS
Génotype : Site	7.18E-03	$p < 0.01$	3.24E-04	$p < 0.001$
Site : Year	0.09512	NS	0.1303	NS
Génotype : Site : Année	0.2553	NS	0.2374	NS

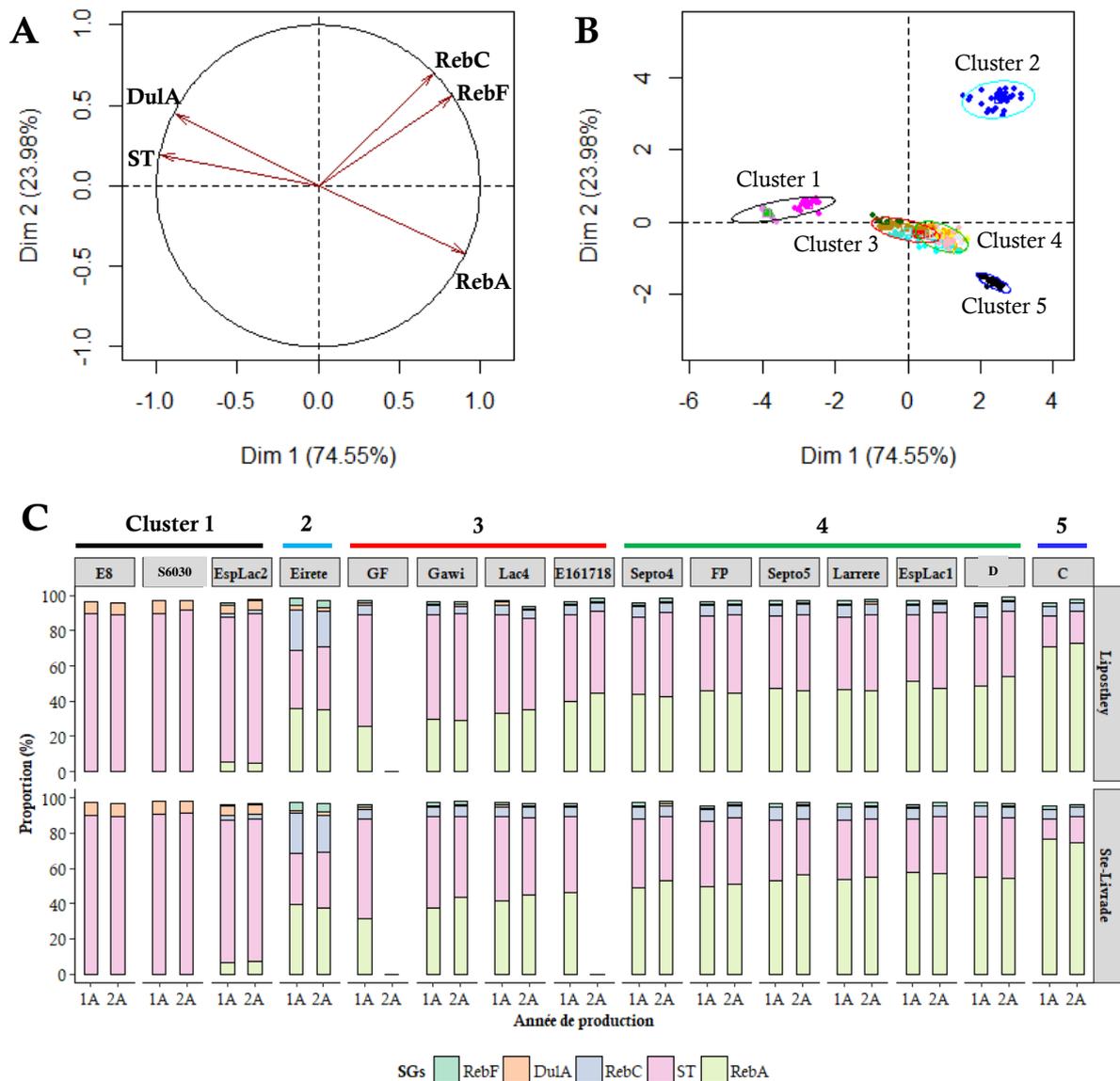


Figure II.2.7. Profils en SGs majoritaires d'une collection de 15 génotypes de *Stevia rebaudiana* dans 2 sites durant 2 années de production. (A) Graphique des variables suite à une Analyse en Composante Principale (ACP) des proportions en ST, RebA, RebC, DulA et RebF (% par rapport au SGs totaux). (B) Graphique des individus de l'ACP des proportions des 5 SGs, où chaque couleur représente un génotype. Les ellipses représentent le résultat du Clustering Hiérarchique sur Composante Principale et permet d'identifier les profils ressemblants. (C) Les histogrammes représentent la proportion de 5 SGs majeurs par rapport aux 10 SGs totaux, exprimés en %, en fonction du génotype (axe horizontal), du site de production (axe vertical) et de l'année de production (axe des abscisses). Les génotypes sont classés en fonction de leur proportion moyenne en SGs désiré (RebA).

3.4 Caractérisation des profils en glycosides de stéviol

Les profils en SGs sont révélés par la teneur relative de chaque SGs constituant le pool des 10 SGs quantifiables, qui signifie ayant une teneur > 0,05 % w/w. Les profils peuvent être établis en fonction de la saveur des SGs : doux (RebA, RebD, RebM, RebE) et amère (ST, RebC, DulA, Rub, SB). L'analyse de variance révèle que les proportions en groupe de SGs dépendent du génotype, du site et de leur interaction ($p < 0,001$; Tableau II.2.5). L'absence d'effet année et d'interaction avec les autres facteurs ($p > 0,05$) indique une stabilité des profils en SGs pour toute la collection de RG pour un même site. Toutes ressources génétiques confondues, la proportion de SGs doux est significativement supérieure à St Livrade comparée à Liposthey, et inversement pour les SGs amères (Figure II.2.7).

Les 5 SGs majoritairement accumulés par *Stevia rebaudiana* sont ST, RebA, RebC, DulA et RebF et permettent d'expliquer 98,8% de la variabilité biochimique de la collection étudiée durant ces 2 années (Figure II.2.7 A). Parmi ces 5 SGs, le RebA, est le plus recherché pour son absence d'amertume, alors que DulA et ST participent activement à l'amertume. RebA et ST sont les 2 SGs majoritaires et leurs proportions permettent d'expliquer plus de 80 % de la teneur en SGs quel que soit le génotype (sauf pour Eirete qui présente une teneur en RebC supérieure à 20%). Les proportions en RebC et RebF sont plus minoritaires, et semblent indépendantes des teneurs relatives des 3 précédents SGs (Figure II.2.7 A). L'analyse en composante principale et le clustering hiérarchique sur composante principale nous permet de mettre en évidence les profils globaux des 15 ressources génétiques étudiées (Figure II.2.7 B-C).

Les génotypes se classent en 6 clusters et se répartissent principalement sur l'axe des variables ST et RebA (Figure II.2.7 B-C). Le cluster 1 est composé de 3 génotypes, qui n'accumulent pas de RebA (E8 et S6030-1) et EspLac2 qui accumule une proportion infime (5,1% à Liposthey et 6,7% à Ste-Livrade). Le cluster 2 représenté par Eirete a la particularité d'accumuler une forte proportion de RebC (21,8% à Liposthey et 22% à Ste-Livrade), comparé à l'ensemble de la collection qui atteint en moyenne seulement 4%. Les 3 derniers clusters se caractérisent par leur proportion croissante en RebA. Celle-ci varie en moyenne de 26 à 42,3% à Liposthey et de 31,2% à 46,5% à Ste-Livrade au sein du cluster 3 (GF et E161718 respectivement). Le cluster 4 varie de 43% à 51,6% à Liposthey et de 50,8% à 54,5% à Ste-Livrade (Septo4 et D respectivement), puis atteint 72% à Liposthey et 75,9% à Ste-Livrade pour le génotype C (cluster 5). Le SGs le plus recherché étant le RebA, les clusters 4 et 5 représentent les profils les plus intéressants au sein de la collection.

Tableau II.2.6. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés des taux de reprise en 2^{ème} année pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* au stade bourgeons floraux, sur 2 sites expérimentaux dans le cas d'une implantation courte en 1^{ère} année de production (A). Table d'ANOVA pour le site de Ste-Livrade (B) et Liposthey (C)

A	Taux de reprise (%)	
	Probabilité	Significativité
Génotype	2.20E-16	$p < 0.001$
Site	1.50E-04	$p < 0.001$
Génotype:Site	2.20E-16	$p < 0.001$
Bloc:Site	7.29E-06	$p < 0.001$
Génotype:Site:Bloc	2.85E-07	$p < 0.001$

B Ste-Livrade	Taux de reprise (%)		C Liposthey	Taux de reprise (%)	
	Probabilité	Significativité		Probabilité	Significativité
Génotype	2.20E-16	$p < 0.001$	Génotype	2.20E-16	$p < 0.001$
Bloc	2.49E-07	$p < 0.001$	Bloc	1.27E-01	NS
Génotype:Bloc	6.42E-10	$p < 0.001$	Génotype:Bloc	8.24E-02	NS

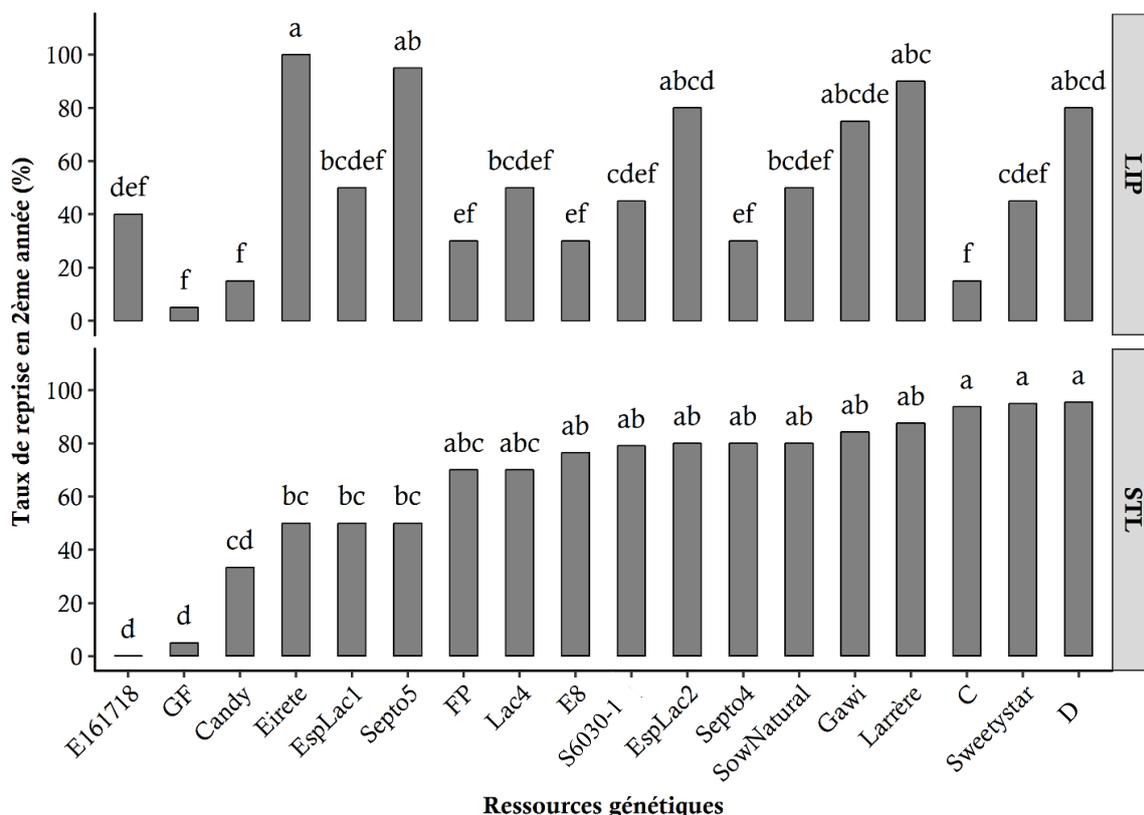


Figure II.2.8. Taux de reprise de la croissance (%) en 2^{ème} année de production pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* dans les sites de production de Ste-Livrade et Liposthey. Les résultats présentent la reprise déterminée le 11 juillet à LIP et le 20 juillet 2017 à STL sur les plants récoltés en 1^{ère} année, soit n=20 plants par ressource génétique. Les ressources génétiques sont classées en fonction du taux de reprise croissant à STL, site de production ayant un taux de reprise moyen supérieur (63%) comparé à LIP (51%). Le résultat du test HSD de Tuckey est indiqué en haut des histogrammes. Les ressources génétiques ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$.

3.5 Pérennité de la culture suite à 3 mois d'implantation

La pérennité de la culture est évaluée par le taux de reprise de la croissance en 2^{ème} année de production. Cette évaluation témoigne de l'adaptation des ressources génétiques aux conditions culturales, suite à une implantation courte en 1^{ère} année de croissance (3 mois). La reprise de la croissance a débuté fin mars 2017 à Liposthey et mi-avril 2017 à Ste-Livrade. La figure II.2.8 présente les taux de reprise en 2^{ème} année des 18 ressources génétiques au mois de juillet 2017 sur les 2 sites, date à partir de laquelle la reprise est restée stable. Le % de reprise est significativement différent en fonction du génotype, du site de production, du bloc et de leur interaction (Tableau II.2.6 A). Toutes ressources génétiques confondues, le taux de reprise est significativement supérieur à Ste-Livrade par rapport à Liposthey à $p=0,05$ (63% et 51% respectivement). La forte interaction entre le génotype et le site de production indique un différentiel d'adaptation en fonction des conditions pédoclimatiques.

Nous observons un fort effet génotype du bloc, ainsi qu'une interaction entre ces 2 facteurs à Ste-Livrade ($p<0,001$; Tableau II.2.6 B), contrairement à Liposthey où la reprise n'est influencée que par le génotype ($p<0,001$; Tableau II.2.6 C). Elle varie entre 0% (E161718) et 95% (D) à Ste-Livrade et entre 5% (GF) et 100% (Eirete) à Liposthey (Figure II.2.8). La comparaison multiple des ressources génétiques nous permet d'identifier les comportements extrêmes pour chaque site. A Ste-Livrade, les ressources génétiques ayant une reprise $\geq 94\%$ (C, SweetyStar et D) sont significativement différentes des ressources génétiques dont la reprise est $\leq 50\%$ (Septo5, EspLac1, Eirete, Candy, GF, E161718). Les ressources génétiques montrant une adaptation intermédiaire ont un taux de reprise compris entre 70% et 88% (Lac4 et Larrère respectivement). A Liposthey, Eirete et Septo5 (reprise $\geq 95\%$) sont significativement différents de S6030-1, SweetyStar, E161718, FP, E8, Septo4, Candy, C et GF (reprise $\leq 45\%$). Dans ce cas, la reprise intermédiaire est comprise entre 50% et 90% (SowNatural et Larrère respectivement).

En fonction des comparaisons multiples, nous pouvons ainsi identifier les ressources génétiques ayant des comportements opposés entre les 2 sites (C, Eirete, E8, FP, S6030-1, Septo4, Septo5, SweetyStar). Ces ressources génétiques sont donc à sélectionner en fonction du site de production. Des ressources génétiques ayant un taux de reprise similaire, compris entre 50% et 90%, sont classées comme intermédiaires (EspLac2, Gawi, Lac4, Larrère, SowNatural). E161718, Candy, GF ont une reprise défavorable dans les 2 sites (entre 0 et 40%). Enfin, EspLac1 et D révèlent des taux reprise équivalents entre les 2 sites, mais la variabilité de la collection dans chaque site indique un classement dans des groupes différents.

4 Performance de ressources génétiques en 2^{ème} année de croissance

Les résultats de cette partie font l'objet d'une publication scientifique soumise au journal *Industrial Crops and Products* et de résultats complémentaires. Ils présentent la caractérisation phénotypique de 18 ressources génétiques en 2^{ème} année de production à Liposthey, suite à une implantation longue en 1^{ère} année (5 mois).

4.1 Deciphering performances of fifteen genotypes and three seeds lots of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation

Cécile Hastoy^{a,b}, Patrick Cosson^a, Sébastien Cavaignac^c, Philippe Boutié^b, Pierre Waffo-Tegu^d, Dominique Rolin^a, Valérie Schurdi-Levraud^{a,*}

^a *INRA Université de Bordeaux, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, 1332, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France*

^b *Oviatis SA, Le Bourg, 47150 Lacaussade, France*

^c *INVENIO, Domaine de Lalande, 47110 Sainte Livrade sur Lot, France*

^d *INRA Université de Bordeaux, UR Œnologie, MIB, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France*

* Corresponding author at : INRA Université De Bordeaux, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, 1332, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France. *E-mail address* : valerie.schurdi-levraud@inra.fr

Keywords

Stevia rebaudiana ; phenotypic diversity ; aerial biomass; steviol glycosides

4.1.1 Introduction

For many years, the consumption of excessive sugar is known to promote metabolic disorders as obesity and diabetes. In industrialised and developing countries, it can be considered as an epidemic (Carocho et al., 2017). In order to reduce the sugar intake and keep sweet taste, strong artificial sweeteners have been used for years by food industry. Nowadays, the use of these artificial sweeteners is controverted even if the link between health risks and their consumption is not clearly established (Olivier et al., 2015).

For centuries, Paraguayan Indians are using *Stevia rebaudiana* leaves as a natural acaloric source of sweetening (Soejarto et al., 1982). The active sweet compounds of this species are the glycosylated diterpenes Steviol Glycosides (SGs; Bridel and Lavieille, 1931). *Stevia rebaudiana* is the only species in *Stevia* genus which exhibits intense and persistent sweet taste (Soejarto et al., 1982), because of high content of SGs in leaves. These molecules are 250-300 times sweeter than sucrose (Ceunen and Geuns, 2013a) being considered as a natural alternative to controverted synthetic sweeteners.

SGs have been approved in Japan since 1970 as a sweetener for food industry. In 2009 and 2011, they have been classified into a food additive category (FAO and OMS, 2017) in the United States, and in Europe (WSO, 2018) respectively. Recently, leaves have been authorised to consumption in Europe for tea, herbal or fruit infusion (EC, 2017). The global market is constantly increasing, leading to a strong need of *Stevia rebaudiana* leaves for direct use or SGs' extraction. In 2016, 80% of world stevia leaves production was coming from China with 50,000-60,000 tons of dry leaves per year (Sun, 2016) harvested on around 80,000 ha. Other significant producing countries are located in Asia (Indonesia, India, Japan, Korea) and in America (Mexico, USA, and Canada)(Gantait et al., 2018). Recent regulatory approval and market opening explain the few area of production in Europe. Nevertheless, in order to assess *Stevia rebaudiana* production in Europe, lots of experimental studies on *Stevia* producing have been recently carried out as in Portugal (Lankes and Grosser, 2015), Germany (Lankes and Zabala, 2011; Munz et al., 2018), Denmark (Grevsen and Sorensen, 2016), Italy (Andolfi et al., 2006; Karimi et al., 2015; Macchia et al., 2007; Tavarini and Angelini, 2013), Greece (Zachokostas, 2015), Sweden (Vouillamoz et al., 2015) and France (Barbet-Massin, 2015; Hastoy et al., 2016, 2015). All these experiment have shown that *Stevia* production, as a perennial crop, is possible and economically viable in Europe (Ferrazzano et al., 2016). But the identification of productive genetic resources adapted to european environmental conditions is clearly needed.

Productivity of *Stevia rebaudiana* is evaluated through SGs yield and composition. SGs yield expressed in kg/ha is depending on two main components: biomass production of dry leaves and their specific SGs content according to their taste.

Stevia rebaudiana dry leaf yield depends on genotype, year of production and cultural management leading to a large range from 710 to 7420 kg/ha in western countries (Parris et al., 2016; Taleie et al., 2012). As for many plants, plant biomass yield is determined by the efficiency of solar energy capture and the conversion of the captured solar energy into vegetative tissues (Demura and Ye, 2010). *Stevia rebaudiana* is highly sensitive to photoperiod. It is an obligate short-day species, with a critical day length around 12-13h leading to early flowering (Angelini et al., 2018). The role of critical day length on its cultivation and SGs accumulation has been widely described (Ceunen and Geuns, 2013b; Metivier and Viana, 1979; Yoneda et al., 2017). Long-day conditions (14h-16h) is required for vegetative growth prolongation and increasing leaf yield (Ceunen and Geuns, 2013b; Metivier and Viana, 1979). Similar to the influence of photoperiod, temperature regime also plays a crucial role in SGs content. The plant can bear a wide range of temperatures from 0–2° C to 35°C (Sumida, 1980). But the expression of thirteen out of fifteen genes involved in SGs biosynthesis is optimized at 25°C whereas it is decreased under 15°C or above 35°C (Yang et al., 2015).

Soil quality also impacts biomass production. It is preferable to implement it on lightly textured and well-drained soil because *Stevia rebaudiana* is sensitive to waterlogging (Angelini et al., 2018; Print et al., 2015). And at the same time, *Stevia rebaudiana* is sensitive to water deficit (Benhmimou et al., 2017). In USA, water irrigation is carried out to increase dry leaf yield from 4.12 T/ha without irrigation to 5.2 with drip irrigation (Parris et al., 2017). Acid to neutral soils (pH 6.5-7.5) should be preferred for *Stevia* cultivation (Angelini et al., 2018), because alkali conditions decrease growth and leaf yield (Kafle et al., 2017). Nitrogen (Claire Barbet-Massin et al., 2015; Rodrigues et al., 2017) or nitrogen-phosphorus-potassium (Aladakatti et al., 2012; Pal et al., 2015) contributes positively to dry leaf yield.

The date of the implementation of the culture and the plant density also affect the leaf biomass production. Early planting is recommended for better dry leaf yield-(Angelini et al., 2018; Angelini and Tavarini, 2014; Munz et al., 2018; Serfaty et al., 2013; Taleie et al., 2012). A higher plant density of 40,000 compared to 100,000 plants/ha reached a better dry leaf yield, 1.03 and 1.99 T/ha, respectively (Taleie et al., 2012). A comparative study of three genotypes showed that leaf yield is enhanced over year until 5-6 years of production in Italy and in France (Andolfi et al., 2006; Barbet-Massin et al., 2016), which makes *Stevia* production possible as a perennial crop in Europe.

Thus, optimum production conditions and their effects on dry leaf yield have been largely documented but variability of *Stevia rebaudiana* canopy structure is poorly described by quantitative traits. In *Stevia rebaudiana*, previous work on phenotypic diversity has described several plant architectures with a large variability (Tateo et al., 1998). This has been simplified, in more recent studies, in two main architectures either straight port or bushy structure (Barbet-Massin, 2015; Munz et al., 2018). But, very few biomass descriptors have been described and used in *Stevia*. Only Leaf-Stem Mass Ratio is generally used. It has been demonstrated to vary between 37% and 58% and can affect the biomass production (Tateo et al., 1998).

Total SGs content highly depends on photoperiod, ontogeny, genotype and its interaction with the environment. A study carried out in Southwest France has shown that the phenotypic variability of 96 “Criola” related genotypes during the first year of production led to a large range of SGs content from 4.6 to 12.3 % w/w (Barbet-Massin et al., 2016), while a study with 24 Brazilian and Paraguayan genotypes has shown a larger range of SGs content from 9.4 to 27.3 % w/w (Montoro et al., 2013). During vegetative growth, SGs content increases (Barbet-Massin, 2015; Ceunen and Geuns, 2013b). Long-day photoperiod improves SGs accumulation by 30% compared to short-day conditions (Ceunen and Geuns, 2013b). For the second year of production, SGs content could be enhanced from 12% to 152% according to the genotype (Barbet-Massin et al., 2016). Moreover, SGs content also depends on genotype-location interaction, illustrated by different contents observed on two sites (12.6 and 10.5 %w/w) for one genotype (Barbet-Massin et al., 2016).

Each SGs has different taste characteristics according to its monosaccharide type, number and attachment position on its steviol aglycon part (Ekman and Hall, 2016; Upreti et al., 2012). It has been demonstrated that RebA participates in sweet taste, whereas ST, RebC and Dula elicit a bitter aftertaste (Espinoza et al., 2014; Hellfritsch et al., 2012). While consumers asking for less bitterness and liquorice taste, SGs composition needs to be improved in RebA (Fry, 2016). A couple studies have shown that SGs profiles remains stable among various environments and years of production, indicating a high genotypic determinism (Barbet-Massin et al., 2016).

In *Stevia rebaudiana* few improved cultivars are available. Angelini et al. (2018) have recently inventoried 90 cultivars of *Stevia rebaudiana*. Most of them are sold as heterogeneous seeds population often produced through open pollination and improved through massal selection. The mostly known and largely cultivated genotypes are named “Criola”, “Eirete” or “Morita”. All these cultivars and seed populations have been improved

in and for environmental conditions highly different from the European's. Only "Gawi" genotype from EUSTAS collection was selected in Germany for its adaptation to temperate climates (Zabala, 2011). In Europe, only few genotypes from different origins have been evaluated in terms of productivity. Seven genotypes of EUSTAS collection were evaluated in Alentejo, Portugal (Lankes and Grosser, 2015) and four of them were used in a Danish study (Grevsen and Sorensen, 2016). Ninety-six genotypes were evaluated in South-West of France (Barbet-Massin et al., 2016) but they were all randomly chosen from a population of "Criola" seeds. Therefore, there is an urgent need to evaluate in European conditions the performances of a large diversity of genotypes.

The aim of the present study is to explore the performances of fifteen genotypes and three seeds lots gathered from different origins under the agro-pedo-climacteric conditions of South Western France. It has been chosen to evaluate the performances in a second year of production to avoid the crop establishment period. These performances are deciphered in terms of (1) biomass components and the evaluation of ten descriptors, (2) quantification and composition of SGs through the identification and quantification of ten majors and minors SGs.

List of abbreviations

SGs: steviol glycosides; **ST**: stevioside; **RebA**: rebaudioside A; **RebC**: rebaudioside C; **DulA**: dulcoside A; **RebF**: rebaudioside F; **Rub**: rubusoside; **RebD**: rebaudioside D; **RebM**: rebaudioside M; **RebB**: rebaudioside B; **SB**: steviolbioside; **ACN**: acetonitril; **LSMR**: Leaf-Stem Mass Ratio; **SLM**: Specific Leaf Mass; **SSM**: Specific Stem Mass; **S**: Seed lot.

Table 1. Genetic resources of *Stevia rebaudiana* studied in field conditions in the South-west of France: provider, name of genetic resources, year of obtention, type of plant material used and origin before selection.

Provider	Country	Name	Obtention	Plant material	Origin before selection
EUSTAS gene bank	Germany	C	2016	In vitro cuttings	Colombia
		Gawi	2016	In vitro cuttings	Unknown
		D	2016	In vitro cuttings	Paraguay
SteviaStore	Paraguay	Eirete	2015	In vitro cuttings	Paraguay
OVIATIS collection	France	E161718	2011	In vitro cuttings	Argentina
		E8	2011	In vitro cuttings	Argentina
		EspLac1	2013	In vitro cuttings	Spain
		EspLac2	2013	In vitro cuttings	Spain
		FP	2011	In vitro cuttings	Argentina
		GF	2014	In vitro cuttings	Argentina
		S6030-1	2015	In vitro cuttings	Israel
		Lac4	2013	In vitro cuttings	Argentina
		Larrère	2013	In vitro cuttings	Argentina
		Septo4	2014	In vitro cuttings	Argentina
		Septo5	2014	In vitro cuttings	Argentina
Genesis seeds	Israel	Candy	2016	Seeds	Unknown
Richter Herbs	Canada	SowNatural	2016	Seeds	Unknown
Hem Zaden	Netherlands	SweetStar	2016	Seeds	Unknown

4.1.2 Materials and methods

4.1.2.1 Genetic resources

Fifteen genotypes and three seeds lots of different origins were collected for the trial (Table 1). The genotypes were gathered from different providers trying to collect diversity as large as possible. Three genotypes were provided by EUSTAS gene bank (Hortilab, Telgte, Germany). These genotypes have already been evaluated in field conditions in Europe and are used as control (Lankes and Grosser, 2015). Twelve genotypes are issued from OVIATIS collection (Lacaussade, France) and were previously selected within diversity from commercial providers in Argentina, Paraguay, Spain, and Canada. Three seeds lots were obtained from different commercial providers (Genesis seeds, Israel; Richter Herbs, Canada; Hem Zaden, Netherlands).

4.1.2.2 Field trial

Genotypes from EUSTAS gene bank and OVIATIS collection are issued from *in vitro* cuttings and produced as clones under partially regulated greenhouse conditions with aeration temperature of 22°C, heating temperature of 18°C and shading when light intensity is overhead 500 W/m² during 7 weeks. Acclimatisation and sowing started by 10 days under saturated hygrometry level, followed by 2 weeks of gradual aeration. *In vitro* cuttings were transplanted in Jiffy®7 pellet (42 mm diameter, Jiffy, France). The four seeds lots were sown on Jiffy GOM8 substrate (Jiffy, France) and were transplanted on Jiffy®7 pellet (42 mm diameter, Jiffy, France) 3 weeks after seed germination. Sub-irrigation was weekly adapted in order to maintain pellet moistened. Ramification was promoted by decapitation when plantlets were 7-8 cm.

Table 2. Organic status and elements composition at 30 cm depth of the sandy experimental field in 2017

Organic status	(%)	Elements (g/kg)		Oligo-elements (mg/kg)	
Organic matter	2.3	P ₂ O ₅	0.091	EDTA Cu	3.11
Total nitrogen	0.053	K ₂ O	0.042	EDTA Mg	< 3.99
C/N ratio	25.6	MgO	0.076	EDTA Fe	88.81
				EDTA Zn	4.35

Stevia field trial began with trial implementation. All the genetic resources were planted in a private farm at Liposthey (44°17'56.9"N 0°53'14.7"W), South West, France. In this area, soil type is black sandy soil (85-90% coarse sand and 5-10% fine mud) at 1.3 T/m³ of density. Soil characteristics was determined at 30 cm depth in 2017 (Table 2). All 7 week-old plantlets

were transplanted to the field at the end of June 2016. The field trial was arranged in 4 randomised blocks with density of 37,500 plants/ha onto plastic mulching with drop by drop irrigation underground. Irrigation occurred 1h per day at 1L/h per drip during summer, and was reduced at 30 min per day in autumn. Each genotype was repeated 21 times by clone. For seeds lots, 21 different individuals were planted in each block. After 5.5 months of growth, all plants were cut after flowering stage in December 2016. A veil for wintering (30 g/m²) was installed for crop protection over winter until March 2017. Plant growth started in the middle of March 2017 and regrowth rate reached 93%. During both growing year, weeds were removed by hand at plants bottom as possible and Score fungicide (Syngenta, France) was applied at 0.5L/ha only when leave disease appeared. Genotypes and seed lots performance was studied during the second year of production. Plant harvest was conducted at flower budding stage on 21th September 2017.

Table 3. Quantitative variables used for the characterisation of *Stevia rebaudiana* phenotypic variability under field conditions.

Category	Variables	Unit	Description / Formula
Yield component	$Dry\ yield_{leaf}$	kg/ha	$Dry\ weight_{leaf} \times Density$
	$Dry\ yield_{stem}$	kg/ha	$Dry\ weight_{stem} \times Density$
	$SGs\ yield_i$	kg/ha	$Dry\ yield_{leaf} \times SGs\ content_i$
	$SGs\ Content_i$	% w/w _{DW leaf}	$i : ST, RebA, RebC, DulA, RebF, Rub, RebD, RebM, RebB, SB$
	$SGs\ Content_{total}$	% w/w _{DW leaf}	$\sum 10\ SGs$
	$SGs\ proportion_i$	%	$SGs\ content_i / SGs\ content_{total}$
Canopy descriptors	h	m	Height
	\emptyset_{NS}	m	North-south diameter
	\emptyset_{EO}	m	Est-west diameter
	Number of stem	nb/ha	$nb_{stem} \times Density$
	Canopy area	m ² /ha	$\frac{\emptyset_{NS}}{2} \times \frac{\emptyset_{EO}}{2} \times \pi \times Density$
	Canopy volume	m ³ /ha	$\frac{4}{3} \pi \times \frac{\emptyset_{NS}}{2} \times \frac{\emptyset_{EO}}{2} \times \frac{h}{2} \times Density$
	Stem density	stem/m ²	$Number\ of\ stem / Canopy\ area$
	Leaf Mass Ratio	-	$Dry\ yield_{leaf} / Dry\ yield_{stem}$
	Specific Leaf Mass	g/m ²	$Dry\ yield_{leaf} / Canopy\ area$
	Specific Stem Mass	g/m ²	$Dry\ yield_{stem} / Canopy\ area$

4.1.2.3 Evaluation of yield and its component

Plant yield was carry out on 3 plants randomly selected per genotype and per block at flower budding stage at 21th September. Number of main stems and plant height and diameters were used to calculate the canopy descriptors listed in Table 3. After measurement, whole plants were cut by hand around 10 cm above the ground, and aerial biomass harvested. Fresh leaves and stems were separated by hand before drying at 40°C during 60 h. Dry material was weighed for each plant to obtain dry weight variables used in the calculation of leaf and stem yield (Table 2).

4.1.2.4 Steviol glycosides quantification

Twenty mg of dried and grounded leaf samples were extracted with 2 mL of ultra-pure water at 80°C during 2 h. Extracts were centrifuged (10 min, 14700g), and supernatant were filtered (0.45 µm) before analysis. 5 µL of the supernatant were injected into a C18 column (250 x 4.6 mm, 4 µm; Poroshell 120 EC-C18, Agilent, Germany) with a guard column on a Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) system (Agilent LC1100, USA). SGs were eluted by a gradient phase of acetonitrile (HPLC grade, Sigma-Aldrich, France): (t₀: 20% ACN; 1.5 – 11.5 min : 20 – 50.7% ACN; 11.6 – 14.6 min: 100% ACN; 14.7 – 26 min: 20% ACN, 26 min : stop), and with a flow rate of 1.5 mL/min. Ten SGs were detected at 202 nm (RebD, RebM, ST, RebA, RebC, RebF, DulA, Rub, RebB, SB) and previously identified by purified SGs standard (Chromadex, United States). For each SGs, a standard range between 5 and 1 000 ng/µL of purified standard was used to quantify each amount. Results were expressed as content per unit leaf dry weight (% w/w) for each SGs and total SGs, and as proportion (%) of each SGs content compared to total SGs content.

4.1.2.5 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software R version 3.4.3 (R Core Team, 2015). Complete data frame was cleaned by deleting outliers according to Bonferroni tests on Studentised residuals of linear model, from the package “car” (Fox and Weisberg, 2011). Mixed linear model from package “lme4” (Bates et al., 2015) were used to study continue quantitative variables:

$$y = A + (1|B) + (1|A:B)$$

With y: continue quantitative variables, A: genetic resources as fixed effect, B: randomised block as random effect, A:B: block interaction with genetic resources as random effect. The package “car” was used for Type II analysis of variance on mixed model (Fox and Weisberg, 2011). Marginal means and standard error were calculated on mixed model and significant differences between genotypes and seed lots were determined on marginal means by Tukey’s Honestly Significant Difference (HSD) test with the package “emmeans” (Russell, 2018).

Multiple regression analysis was used to identify canopy descriptors explaining dry leaf yield variability. A total of 6 variables were measured for biomass characterisation (leaf and stem yield, plant height and diameters, number of stem), enabling to evaluate 6 canopy descriptors such as canopy area and volume, stem density (Clifton-Brown and Lewandowski, 2002), Leaf Mass Ratio (Barbet-Massin, 2015), Specific Leaf and Stem Mass (Valladares and Guzman, 2006) (Table 3). Correlation matrix was constructed in order to select only independent variables (when Pearson correlation coefficient was $r < 0.8$) for multiple linear regression. Then, best linear model regression was obtained by exhaustive selection of independent predictors according to Bayesian Information Criterion, from the package “leaps” (Lumley and Miller, 2017). Heatmap on discriminant canopy descriptors was constructed by clustering using complete linkage method into “stats” package (R Core Team, 2015) in order to reveal *Stevia rebaudiana* architecture.

SGs compositions within the genotype collection were analysed using Principal Component Analysis (PCA) using the package “FactoMineR” (Le et al., 2008), and “missMDA” (Husson and Josse, 2016) to compute missing values. Hierarchical Clustering on Principal Component (HCPC) was applied on PCA results in order to classify genotype according to their SGs profile.

For data representation, package “ggplot2” (Wickham, 2009), “cowplot” (Wilke, 2017) and “extrafont” (Chang, 2014) were used.

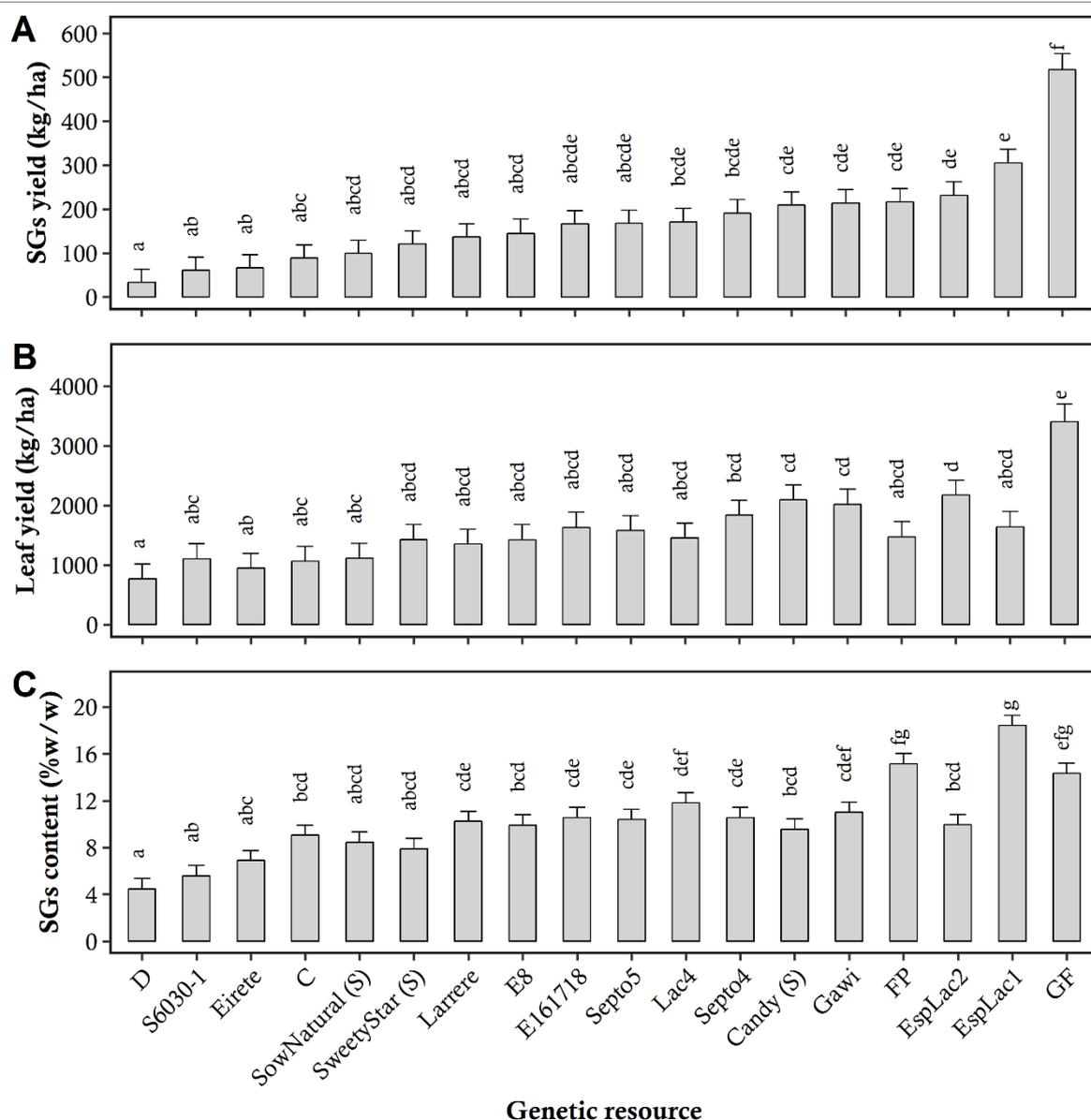


Figure 1. Yield component of *Stevia rebaudiana* genotype and seed lots (S) during harvesting at flower budding stage obtained in field conditions: SGs yield expressed in kg/ha (A), dry leaf yield expressed in kg/ha (B) and SGs content expressed in % w/w of leaf dry weight (C). Barplot represents Least-Squares Means of 4 randomized blocks, corresponding to a total 12 plants per genetic resource, with standard deviation. Results of multiple comparison by Tuckey's Honestly Significant Difference are indicated by letters, and same letter shows no significant difference at $p = 0.05$ level.

4.1.3 Results

4.1.3.1 Evaluation of global genetic resources performance through SGs yield, dry leaf yield and SGs content

For each genotype and seed lot (S), SGs yield expressed in kg/ha (Fig. 1A) was calculated from dry leaf yield and SGs content (Table 2; Fig. 1B-C). A significant and strong genotype effect ($p < 0.001$; Supp. data 1) was found for SGs yield (Fig. 1A). Depending on the genotype, SGs yield ranged from 33 kg/ha for “D” genotype to 517 kg/ha for “GF” genotype, corresponding to a 15-fold variability. Multiple comparison analysis between all genotypes and seed lots revealed that SGs yield for the worst group “D”, “S6030-1”, “Eirete” ranged from 33 to 67 kg/ha and were significantly different from the group including “EspLac1”, “EspLac2”, “FP”, “Gawi” and “Candy” (S), whose SGs yield ranged from 305 to 209 kg/ha. Finally, the best producer “GF” (517 kg/ha) was significantly different from the rest of genetic resources. These results revealed a large SGs yield variability among the studied genotype and seed lots.

In order to decipher the SGs yield, genotypes were also compared according to their dry leaf yield expressed in kg/ha (Fig. 1B). Dry leaf yield showed a 4-fold change variability among the studied genotype and seed lots. It ranges from 770 to 3402 kg of dry leaf/ha. Among the studied genetic resources, only “GF” exhibited a significant difference compared to the others. In our field conditions, this genotype is the best leaf biomass producer with 3402 kg of dry leaf/ha. The other genotypes exhibit a continuum from weak leaf biomass production 770 kg of dry leaf/ha for “D” to 2 173 and 2 019 kg of dry leaf/ha for “EspLac2” and “Candy” (S) respectively. Except for “FP” and “EspLac1”, genotypes are distributed by increasing dry leaf yield (Fig.1B), similarly as SGs yield (Fig 1A).

Among the studied genetic resources, total SGs content varied between 4.5 and 18.4 % w/w (Fig. 1C), corresponding to a large variability in *Stevia rebaudiana*. This variability is tightly linked to the genotype ($p < 0.001$). For this trait, “EspLac1” presents the significant higher SGs content (18.4 % w/w) and is significantly different from the rest of the genetic resources, excepting “FP” and “GF” which amount of SGs are 15.1 and 14.33 % w/w respectively. Six genotypes, “Lac4”, “Gawi”, “E161718”, “Septo4”, “Septo5”, “Larrere” present intermediate SGs content ranged between 11.8 and 10.2 % w/w. Three genotypes, “D”, “S6030-1” and “Eirete” present the worst SGs content with less than 7 % w/w (Fig 1C).

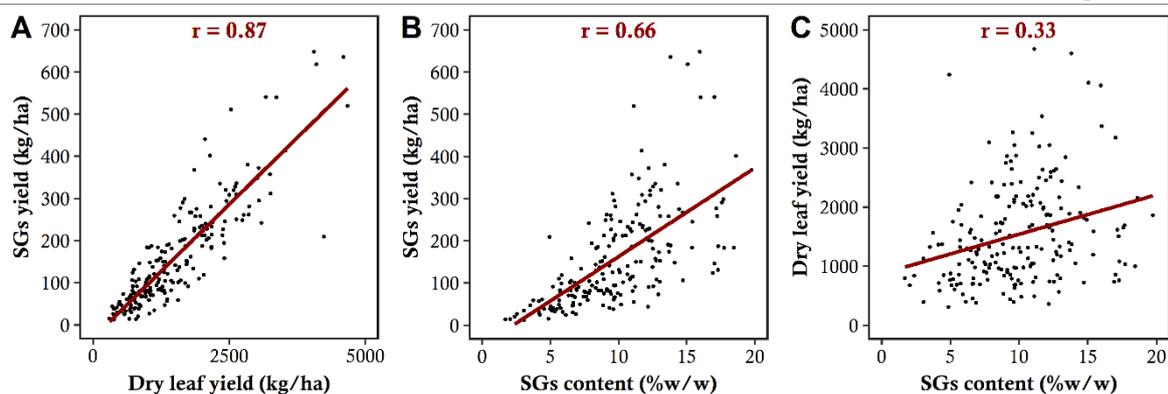


Figure 2. Correlation between yield component during harvesting at flower budding stage : SGs and dry leaf yield (A), SGs yield and SGs content (B), dry leaf yield and SGs content (B). Each point correspond to 1 harvested plant, and plots represent all genetic resources (12 plants per genetic resource). Significant Pearson correlation coefficient at $p = 0.05$ level is indicated on the bottom (r). Red line represents resulting linear correlation.

For SGs' content, it is interesting to notice that genotype classification obtained with SGs' yield is partly maintained. “D”, “S6030-1” and “Ereite” appear to be low performance genotypes. “GF” which is the best genotype for SGs yield is also one of the best in terms of SGs content. In order to understand which traits make the most effective contribution to SGs yield, we assessed the correlation between these 3 traits and the variance proportion of dry leaf yield and SGs content explaining SGs yield variability. A significant positive correlation of 0.87 ($p < 0.001$) was found between SGs yield and dry leaf yield (Fig. 2A), whereas a lower Spearman's correlation coefficient of 0.66 ($p < 0.001$) was found between SGs yield and SGs content (Fig. 2B). Moreover, lowest correlation was observed between dry leaf yield and total SGs content ($r = 0.33$), suggesting a lesser dependance between these yield components. (Fig. 2C). Variance analysis on linear regression of SGs yield revealed that 68% of the variance was explained by leaf dry yield, 24% by SGs content and 8 % by their interaction (Supp. Data 2). Both analysis confirmed the higher contribution of dry leaf yield, compared to SGs content, for SGs yield in our field growth conditions.

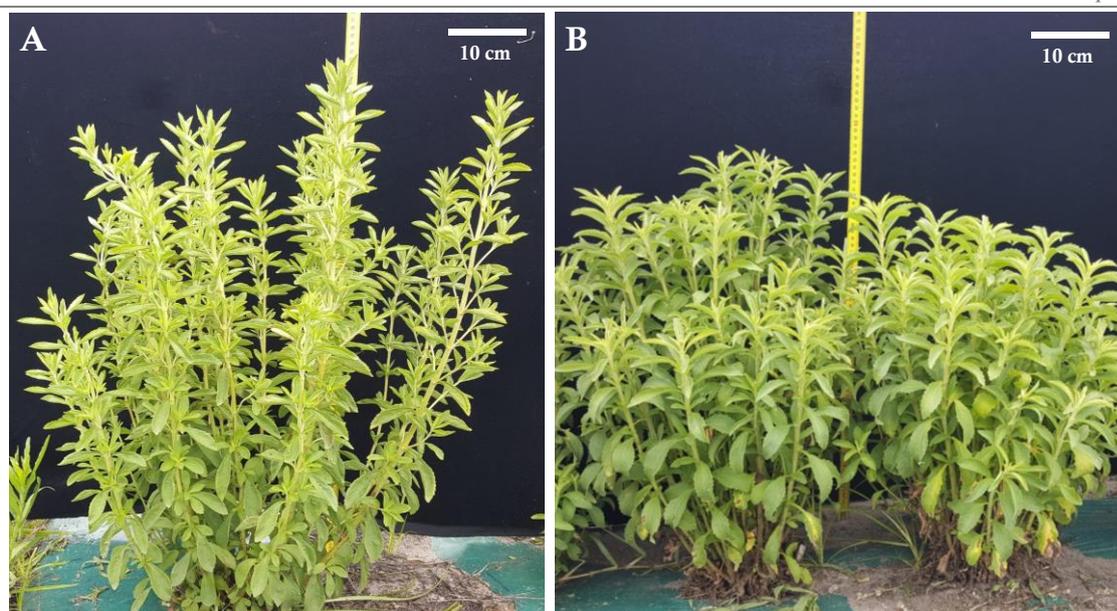


Figure 3. Main morphotypes of *Stevia rebaudiana* observed into genetic resources collection in field conditions. (A) Genotype C, from EUSTAS collection, exhibited bushy habit with many secondary ramifications and small leaves. (B) Genotype Gawi, from EUSTAS collection, exhibited main port architecture, corresponding to principal stems with larger leaves. Photo credit: C. Hastoy, July, Liposthey (France).

4.1.3.2 Variables involved in *Stevia rebaudiana* aerial biomass variability

In our field growth conditions, two main architectures were observed : bushy plants with small leaves on many lateral branches and main port plants with larger leaves (Fig. 3). However, this qualitative character is not sufficient to reveal aerial biomass variability among *Stevia rebaudiana*. These two different architectures suggest that the contribution of the leaf biomass to the total SGs yield can be different according to the genotype. Thus, to understand what contributes to aerial biomass, 10 quantitative canopy descriptors were determined to assess morphotype (Table 2). All 10 canopy descriptors significantly contributed to dry leaf yield variability at $p < 0.05$ level (Supp. Data 3). Best linear model obtained by exhaustive selection had a high adjusted $R^2 = 0.8578$ and was composed of 6 regressors involved in dry leaf yield variability :

$$y = 4.848 \times 10^{-4} \alpha - 5.389 \beta + 7.448 \times 10^{-2} \gamma + 7.068 \times 10^2 \delta + 3.374 \varepsilon + 8.839 \theta - 2.076 \times 10^3$$

Where y is dry leaf yield expressed in kg/ha, α is the number of principal stems/ha, β is stem density expressed in number of stem/m² of canopy area, γ is canopy area expressed in m²/ha, δ is Leaf Mass Ratio, ε is Specific Leaf Mass expressed in g/m², θ is Specific Stem Mass expressed in g/m². Among the ten descriptors, these six regressors constituted quantitative variables describing dry leaf yield variability.

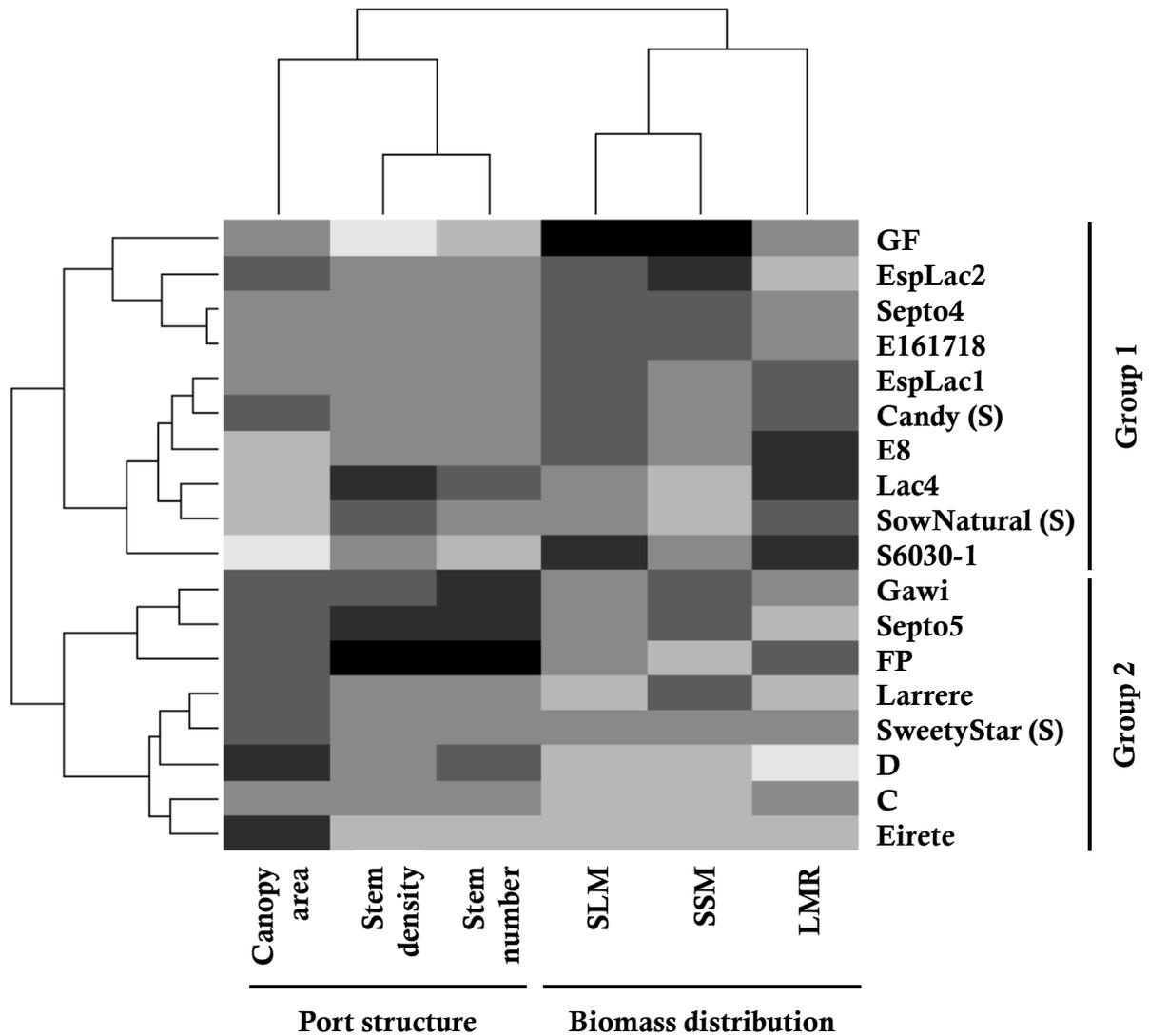


Figure 4. Classification of *Stevia rebaudiana* genetic resources according to morphotypes linked to foliar biomass production. Heatmap were constructed from centered matrix calculated on marginal means of independent canopy descriptors. For each variable (column) grey gradient represents result for genetic resources (row) from lower (light grey) to higher (black) value.

Complete linkage method on these regressors, previously identified, allowed to classify genetic resources into 2 main clusters depending on 2 groups of quantitative traits (Fig. 4). SLM, SSM and LSMR describe biomass partitioning, and, on the other hand, canopy area, density and number of stems reveal port architecture. Genetic resources such as “GF”, “EspLac2”, “Septo4”, “E161718”, “EspLac1”, “Candy” (S), “E8”, “Lac4”, “SowNatural” (S) and “S6030-1” corresponding to Group1 exhibited condensed foliar biomass on a small ground area, through condensed stem biomass or high LSMR. These genotype show the highest result for biomass distribution variables and the lowest values for port structure variables. On the opposite, “Gawi”, “Septo5”, “FP”, “Larrere”, “SweetyStar” (S), “D”, “C” and “Eirete” (Group 2) corresponded to airy biomass on a large ground area and obtained the lowest values for biomass partitioning descriptors and the highest results for port structure variables. Quantitative canopy descriptors allowed to distinguish genetic resources according two main aerial architecture.

“GF” and “EspLac2” obtained best dry leaf yield in our field conditions (Fig.1B), and were clasified into group 1, characterised by low canopy area and condensed biomass. On the opposite, worst foliar biomass producer “D”, “Eirete” and “C” were classified in group 2, corresponding to larger canopy area and airy biomass. This result suggest that condensed biomass is preferable to access better dry leaf yield. However, “S6030-1” was classified in condensed biomass group (group 1), while it had worst dry leaf yield (Fig. 1B). This result suggested that to low canopy area was not preferable as morphological trait.

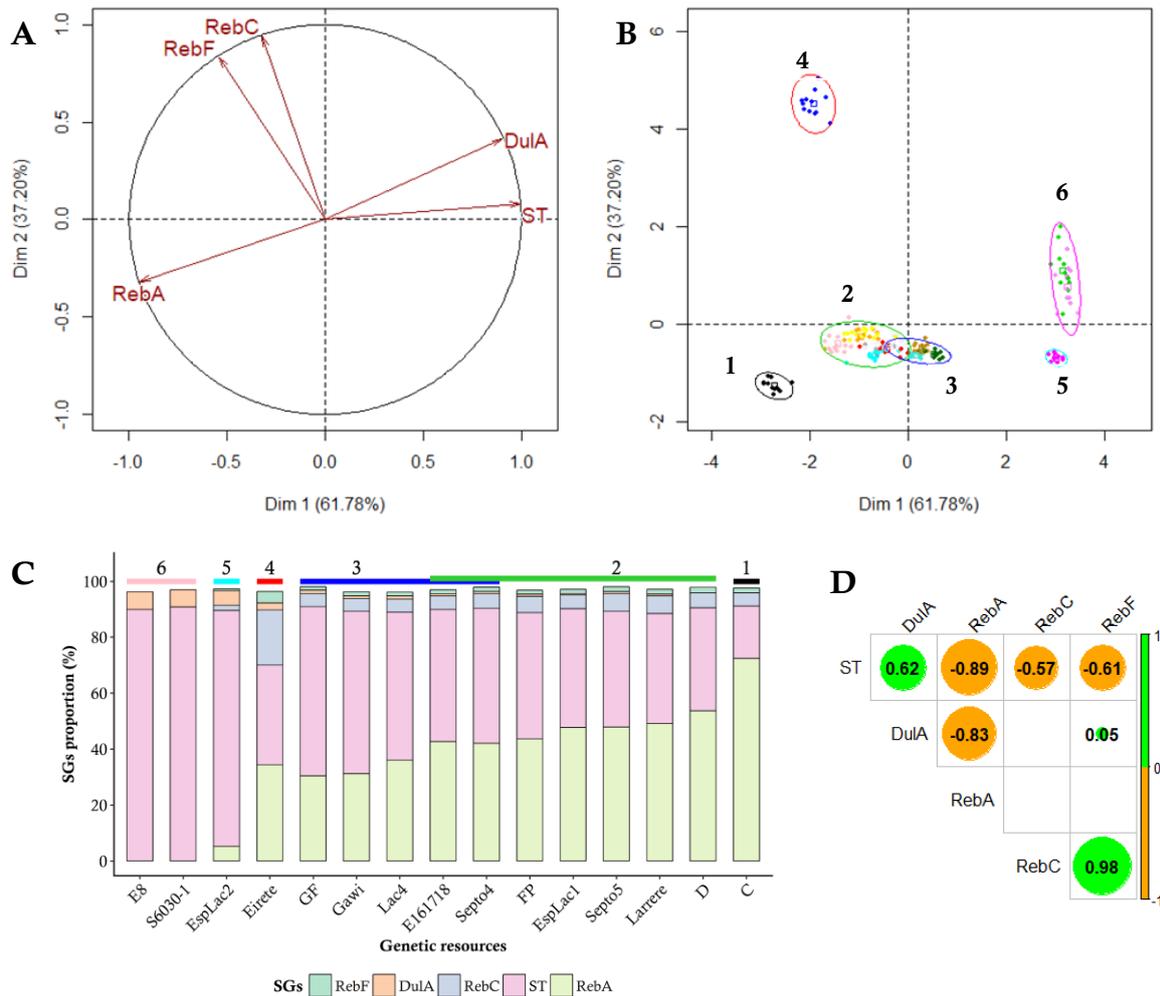


Figure 5. Characterisation of SGs profiles on 15 genotypes in field conditions. (A) Principal Component Analysis (PCA) variables factor map of 5 majors SGs proportion (DulA : dulcoside A; RebA : rebaudioside A; RebC : rebaudioside C; RebF : rebaudioside F; ST : stevioside). The 5 SGs proportion are expressed in percentage of total SGs content. The two major principal components explains 98.98 % of the variance. (B) PCA individual factor map from 15 genotypes according to the variable factor map. Each color represents 1 genotype. Ellipses reveal 6 clusters obtained by Hierarchical Clustering on Principal Component. (C) SGs proportion for 15 studied genotypes according to the HCPC results, indicating by horizontal bar with same color than ellipse. (D) Pearson correlation matrix of 5 majors SGs proportion. Positive correlation are represented in green and negative correlation are in orange. Circle size is proportional to Pearson coefficient, indicated inside. No significant correlation are represented by empty cell inside the matrix ($p > 0.05$).

4.1.3.3 Evaluation of SGs profiles

SGs composition needed to be characterised in order to evaluate economic potential of the genotype according to SGs quality linked to sweet taste (RebA, RebD, RebM, RebB) versus bitter taste (ST, RebC, DulA, Rub, SB). Principal Component Analysis has been used to characterise SGs composition on raw data, corresponding to 12 plants per genotype (Fig. 5). Among the 10 detected SGs, the proportion of the 5 SGs mostly produced (ST, RebA, RebC, RebF and DulA) were enough to explain 98.98% of the phenotypic variability. SGs composition lead to identify important significant correlation between major SGs (Fig. 5D). ST and DulA proportion are positively correlated ($r = 0.62$; $p < 0.05$) and highly negatively correlated to RebA proportion ($r = -0.87$ and $r = -0.83$ respectively; $p < 0.05$) while RebF and RebC proportion are positively correlated ($r = 0.98$; $p < 0.05$), and negatively correlated to ST proportion ($r = -0.61$ and $r = -0.57$ respectively; $p < 0.05$).

A significant genotype effect was confirmed for SGs profile, corresponding to the proportion of each SGs (Table 2; $p < 0.001$). Hierarchical Clustering on Principal Component allowed to identify 6 clusters of genotype (Fig. 5B-C). Genotypes are mainly separated along the first axis (Fig. 5 B) which corresponds to the ST/RebA separation.

C genotype appears to be the best in terms of sweet taste SGs with 72% of RebA and RebA/ST ratio of 3.9. The other genotypes are discriminated from RebA/ST ratio (Fig. 5B) ranging from 1.47 to 0.87 for cluster 2, 0.97 to 0.5 for cluster 3. Only Eirete (cluster 4) accumulates 20% of RebC. EspLac2 (cluster 5) shows a large content of ST (84%). Genotype from cluster 6 (E8 and S6030-1) did not accumulate RebA, nor RebF and RebC. In our field growth conditions and among the 15 genotypes, cluster 1 and 2 genotypes show the better economic potentiality, thanks to their higher proportion of RebA.

Interestingly, those 5 SGs proportion exhibited non significant correlation with yield component (dry leaf yield and total SGs content), or significant correlation but with a low correlation coefficient ($r < 0.5$; Supp.data 4). These results revealed the independence of yield components and SGs profil in *Stevia rebaudiana*.

4.1.4 Discussion and conclusion

For farmers, *Stevia rebaudiana* main productivity trait is SGs yield. Thus, improved cultivars with enhanced SGs yield and adapted to various environment have to be proposed to farmers. SGs yield trait encompasses dry leaf yield, SGs content and SGs composition which have to be evaluated in large genotypes set. In our study, SGs yield was evaluated in a set of 15 different genotypes and 3 seeds lots in south western France in a second year after planting. These genotypes have been gathered from different providers, trying to get diversified origins.

In our collection, SGs yield showed a high variability. It ranges from 33 kg/ha to 517 kg/ha. In France, 3 genotypes selected from “Criola” seeds population were evaluated on 3 sites. They revealed SGs’ yield between 55 to 292 kg/ha (C Barbet-Massin et al., 2015). In western United-States, SGs yield varied between 260 kg/ha and 890 kg/ha for 6 improved genotypes from S&W company cultivated in 4 locations (Parris et al., 2016). Taken together, these results show the role of breeding improvement. “Candy” seed lot from Israël is shared in our study and in Parris’ study. SGs yield reached 209 kg/ha for this cultivar in our study, which is lower than SGs yields, between 248 kg/ha and 581 kg/ha, obtained in the four locations in USA (Parris et al., 2016). This underlines the importance to evaluate the genotypes in different environments. “C” and “Gawi” genotypes from EUSTAS collection were evaluated in several places in Europe. Thus they can be used as benchmarks for SGs productivity according to different sites. In our conditions, “C” and “Gawi” genotypes from EUSTAS collection reached 90 and 214 kg/ha respectively. These genotypes experimented in Alentejo, Portugal, exhibited high performances with 990 kg/ha and 1,150 kg/ha respectively (Lankes and Grosser, 2015). Experimented in Danemark, they also show high performances with 376 and 468 kg SGs/ha (Grevsen and Sorensen, 2016). It is interesting to notice that under Danish’s conditions (Grevsen and Sorensen, 2016), “C” genotype obtained higher dry leaf yield compared to “Gawi”, 4.5 and 3.9 T/ha respectively. Whereas in our field conditions, these two genotypes showed very different dry leaf yields, as in Portugal’s conditions (Lankes and Grosser, 2015), with 1.9 and 1 T/ha for “Gawi” and “C”, respectively. These results clearly illustrate the need to evaluate genotypes according to the site.

We demonstrated the major role of dry leaf yield in SGs yield. Comparison of *Stevia rebaudiana* dry leaf yield per hectare and its relationship with plant productivity is skewed because of plant density, ranging from 37,500 plants/ha in the present study to 100,000 plants/ha (Vouillamoz et al., 2015). Expressing biomass productivity in g of dry leaf per plant, our collection ranged between genotype “D” producing 20 g/plant to “GF” producing

91 g/plant. This plant productivity was then similar as was observed for “SW107” genotype with 75 g/plant in USA (Parris et al., 2016) or for “F” genotype with 83 g/plant in Denmark.

Our results reveal a large morphological variability that can be clustered in two main architectures. A first group of genotypes exhibits condensed foliar biomass on a small ground area, with a condensed stem biomass or high LSMR. A second group shows airy biomass on a large ground area. The plant architecture of the first group seems to be the best architecture for greater dry leaf yield, compared to airy biomass on a large ground area. Similar plant architectures were compared in Germany (Munz et al., 2018). The authors showed the plants with broad leaves on upright shape corresponding to a higher Leaf Area Index (LAI; ratio between leaf area to ground canopy area) led to larger leaf dry yield, compared to the plants with narrow leaves with horizontally oriented shoots. However, the authors concluded that fraction of intercepted photosynthetically active radiation was lower for condensed biomass architecture and higher LAI was linked to higher Specific Leaf Area (SLA; ratio of leaf area to leaf dry weight), corresponding to thinner leaves (Munz et al., 2018). These observations suggest that increased yield may be attributed to higher leaf photosynthesis response to irradiance at elevated LAI, as in improved maize hybrids (Dwyerl et al., 1991). This result could be explain by the positive relationship between SLA and photosynthetic rate demonstrated on 17 herbaceous species (Dubey et al., 2017).

In our study, we could select six canopy descriptors, the number of principal stems/ha, the stem density expressed in number of stem/m² of canopy area, the canopy area expressed in m²/ha, the Leaf Mass Ratio, the Specific Leaf Mass expressed in g/m², and the Specific Stem Mass expressed in g/m² allowing us to describe aerial biomass variability. The identification of these canopy descriptors explaining aerial biomass variability provide useful tools for breeding program. They have been used in other species produced for their leaves biomass as in tobacco (Maleki et al., 2011) or in miscanthus (Clifton-Brown and Lewandowski, 2002).

Besides leaf dry yield, SGs content and composition are also important components of SGs yield. Among our studied genotypes, SGs content varied between 4.5 and 18.4 % w/w. This is similar to what was obtained for genotypes from “Criola” seeds studied in France over two years of production (Barbet-Massin et al., 2016). But high performance genotypes have also been described as the 23 genotypes from Brazil and Paraguay cultivated in Italy. They can accumulate 27 % SGs w/w (Montoro et al., 2013). These differences can be partly attributed to genotype effect. But it has also been described that SGs content is highly influenced by the pedoclimatic conditions, the age of plant stand and its phase of development (Barbet-Massin et al., 2016; Tavarini and Angelini, 2013).

As demonstrated in previous studies (Barbet-Massin et al., 2016), five majors SGs, ST, RebA, RebC, DulA and RebF, were enough to explain 98% of SGs variability into our collection. Highest proportion of RebA, with lowest ST, RebC and DulA proportion are desirable trait (Espinoza et al., 2014; Hellfritsch et al., 2012). In our study, we observed one particularly interesting genotype, “C” from EUSTAS collection, which accumulates 72% RebA among total SGs. Four other genotypes, Larrere, Septo5, EspLac1 and FP, appeared to be very interesting for SGs profile improvement as their RebA/ST ratio is above 1.

We demonstrated that RebA proportion is negatively correlated to DulA and ST proportion which is positive for breeding purpose. However, ST and RebC are negatively correlated. RebC elicitates bitter human receptors at lower concentration than ST (Hellfritsch et al., 2012). It is involved in the maintenance of bitter aftertaste. Therefore, selection clearly need to minimise RebC proportion in SGs profiles.

Nevertheless, comparison of “C” genotype composition over sites and years, demonstrates that SGs profiles are stable. In a first year of production “C” genotype reached 71% of RebA among total SGs in a field experiment in France (Hastoy et al., 2016) and around 75 % in Portugal (Lankes and Grosser, 2015). In a second year of production, “C” showed 72 % of RebA in France and around 69 % in Danish conditions (Grevsen and Sorensen, 2016). These few differences on RebA proportion suggest that SGs profiles are highly determined by genotype and very few influenced by environmental conditions.

Results obtained in western France field conditions with a large set of 15 different genotypes and 3 seeds lots confirmed that *Stevia rebaudiana* production is possible in France. Seeds lots led to intermediate dry leaf yield and SGs content, resulting on intermediate SGs yield (99-209 kg/ha). 15 genotypes revealed the high phenotypic variability of *Stevia rebaudiana*, in term of productivity through SGs yield (33-517 kg/ha), dry leaf yield (0.77-3.4 T/ha) and SGs content (4.47-18.41 %w/w). This study confirmed that dry leaf yield is one of the main trait contributing to SGs yield. Our diversity revealed higher dry leaf yield per plant (until 91 g/plant) than other country but our field design have the weakest plant density in *Stevia rebaudiana* studies (37,500 plants/ha), leading to an intermediate yield per hectare. Among dry leaf yield variability, 6 canopy descriptors were needed to reveal two main canopy structures, which could be described as condensed and airy biomass. Supplemental canopy descriptors such as Leaf Area Index and Specific Leaf Area could be characterised in further study to understand the link between light interception and photosynthetic activity with dry leaf yield. 15 genotypes also revealed the high variability of SGs composition through the proportion of 5 SGs among total SGs, leading to a classification into 6 groups

where the sweetest SGs (RebA) varied between 0-72%. SGs composition is determined by genotype and are poorly influenced by environment. In our conditions, two genotypes, “EspLac1” and “FP” are particularly interesting for their SGs composition and content, but exhibit intermediate leaf dry yield, whereas the best dry leaf producer “GF” do not have interesting SGs composition. These genotypes could represent interesting genitors for breeding improvement of *Stevia rebaudiana* for production in Southwestern of France.

For the future, understanding the relationship between canopy structure, plant density, light interception and photosynthetic activity could improve knowledge on leaf yield building pattern in *Stevia rebaudiana* for breeding purpose.

Acknowledgment

C. Hastoy was supported by funding from ANRT and Oviatis SA, France. Nouvelle-Aquitaine region supported the work through Cifre support. Authors thank Justine Peirotte (Fraise Concept’, Douville, France) and INVENIO’s team (Douville, Sainte-Livrade and Ychoux experimental sites, France) for plant production and cultural management, Pierre Jannot for support (Rouages, Agen, France) and all lab members for harvest help.

4.1.5 References

- Aladakatti, Y.R., Palled, Y.B., Chetti, M.B., Halikatti, S.I., Alagundagi, S.C., Patil, P.L., 2012. Effect of nitrogen , phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Karnataka J. Agric. Sci.* 25, 25–29.
- Andolfi, L., Macchia, M., Ceccarini, L., 2006. Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia Rebaudiana* in Central Italy 257–262.
- Angelini, L.G., Martini, A., Passera, B., Tavarini, S., 2018. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges. Springer, Cham, pp. 35–85. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_8
- Angelini, L.G., Tavarini, S., 2014. Crop Productivity, Steviol Glycoside Yield, Nutrient Concentration and Uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean Field Conditions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 45, 2577–2592.
- Barbet-Massin, C., 2015. Sélectionner et cultiver *Stevia rebaudiana* Bertoni en milieu tempéré : exploration de la variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol.
- Barbet-Massin, C., Giuliano, S., Alletto, L., Dayde, J., Berger, M., 2015. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133067>
- Barbet-Massin, C., Giuliano, S., Alletto, L., Dayde, J., Berger, M., 2015. Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition. *Genet Resour Crop Evol.*
- Barbet-Massin, C., Giuliano, S., Alletto, L., Daydé, J., Berger, M., 2016. Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition. *Genet. Resour. Crop Evol.* 685–694. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0276-9>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *J. Stat. Softw.* 1, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Benhmimou, A., Ibriz, M., Faïz, C. Al, Khiraoui, A., Amchra, F.Z., Lage, M., 2017. Productivity of new sweet plant in Morocco (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under water stress. *J. Med. Plant Stud.* 5, 126–131.

- Brandle, J., 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb , *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 79, 85–92.
- Brandle J.E., R.N., 1992. Heritability for yield, leaf/stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72, 1263–1266.
- Bridel, M., Lavieille, R., 1931. Le principe a saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana*, Bertoni). *Académie des Sci. Paris Comptes Rendus* 192, 1123–1125.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem. Toxicol.* 107, 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>
- Ceunen, S., Geuns, J.M.C., 2013a. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *J. Nat. Prod.* 76, 1201–1228. <https://doi.org/10.1021/np400203b>
- Ceunen, S., Geuns, J.M.C., 2013b. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Sci.* 198, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.003>
- Chang, W., 2014. extrafont: Tools for using fonts [WWW Document]. R Packag. version 0.17.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., 2002. Screening miscanthus genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in southern germany. *Eur. J. Agron.* 16, 97–110. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(01\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(01)00120-4)
- Demura, T., Ye, Z.-H., 2010. Regulation of plant biomass production. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.03.002>
- Dubey, P., Raghubanshi, A.S., Dwivedi, A.K., 2017. Relationship among specific leaf area , leaf nitrogen , leaf phosphorus and photosynthetic rate in herbaceous species of tropical dry deciduous in Vindhyan highlands 1531–1536. <https://doi.org/10.21746/aps.2017.02.001>
- Dwyerl, L.M., Tollenaar, M., Stewartl, D.W., 1991. Changes in plant density dependence of leaf photosynthesis of maize (*Zea mays* L.) hybrids , 1959 to 1988. *Can. J. Plant Sci.* 71, 1–11.
- EC, 2017. *Stevia rebaudiana* [WWW Document]. Eur. Com.
- Ekman, S., Hall, G., 2016. Flavour characterisation of *Stevia* products in water solution. *Proc.*

9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. 19–32.

Espinoza, M.I., Vincken, J., Sanders, M., Castro, C., Stieger, M., Agosin, E., 2014. Identification, Quantification, and Sensory Characterization of Steviol Glycosides from Differently Processed *Stevia rebaudiana* Commercial Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11797–11804.

FAO, O. des N.U. pour l'alimentation et l'agriculture, OMS, O. mondiale de la S., 2017. Noms de catégorie et système international de numérotation des additifs alimentaires, Codex Alimentarius.

Ferrazzano, G.F., Cantile, T., Alcidi, B., Coda, M., Ingenito, A., Zarrelli, A., Di Fabio, G., Pollio, A., 2016. Is *stevia rebaudiana* bertonii a non cariogenic sweetener? A review. *Molecules* 21, 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules21010038>

Fox, J., Weisberg, S., 2011. *An R Companion to Applied Regression*, Second. ed. Sage publication, Thousand Oaks (CA).

Fry, J.C., 2016. *Stevia Innovation: Improved Leaf Extracts From Advanced Understanding of Taste*. Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. 33–40.

Gantait, S., Das, A., Banerjee, J., 2018. Geographical Distribution, Botanical Description and Self-Incompatibility Mechanism of Genus *Stevia*. *SUGAR TECH* 20, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0563-1>

Grevsen, K., Sorensen, J.N., 2016. 2nd year cultivation results of the Danish “Green Stevia” project—a natural sweetener for organic food products. *From F. to Fork*, Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. 115–126.

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Cavaignac, S., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2016. Organic stevia production and Development of Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Molecular Markers as a Tool for *Stevia rebaudiana*'s Germplasm Characterization and Future Breeding Purposes. *From F. to Fork*, Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. 127–136.

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-levraud, V., 2015. Towards Breeding of new *Stevia rebaudiana* Cultivars adapted to Organic Production in the South West of France : First Results on Genetic and Phenotypic

Evaluation. Proc. 8th Stevia Symp. 2015, EUSTAS, Univ. Bonn, Ger. 225–232.

Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Staehler, F., Meyerhof, W., Hofmann, T., 2012. Human Psychometric and Taste Receptor Responses to Steviol Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6782–6793. <https://doi.org/10.1021/jf301297n>

Husson, F., Josse, J., 2016. missMDA: A Package for Handling Missing Values with Multivariate Data Analysis. *J. Stat. Softw.* 70, 1–31.

Kafle, G.G., Midmore, D.J., Gautam, R., 2017. Effect of nutrient omission and pH on the biomass and concentration and content of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) under hydroponic conditions. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.*

Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L., Angelini, L.G., 2015. The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 183, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.001>

Lankes, C., Grosser, P., 2015. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. Proc. 8th Stevia Symp. 2015, EUSTAS, Bonn, Ger. Geuns J.M.C., Ceunen S., Eds 167–176.

Lankes, C., Zabala, U., 2011. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. Proc. 5th Stevia Symp. 2011, EUSTAS, Belgium, Jan M.C. Geuns Ed. 75–87.

Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: A Package for Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18.

Lumley, T., Miller, A., 2017. leaps: Regression Subset Selection [WWW Document]. R Packag. version 3.0.

Macchia, M., Andolfi, L., Ceccarini, L., Angelini, L.G., 2007. Effects of Temperature, Light and Pre-Chilling on Seed Germination of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni Accessions. *Ital. J. Agron.* 1, 55–62.

Maleki, H.H., Karimzadeh, G., Darvishzadeh, R., Sarrafi, A., 2011. Correlation and sequential path analysis of some agronomic traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to improve dry leaf yield. *Aust. J. Crop Sci.* 5.

Metivier, J., Viana, A.M., 1979. The Effect of Long and Short Day Length upon the Growth of Whole Plants and the Level of Soluble Proteins, Sugars, and Stevioside in Leaves of

Stevia rebaudiana Bert. J. Exp. Bot. 30, 1211–1222.

- Montoro, P., Molfetta, I., Maldini, M., Ceccarini, L., Piacente, S., Pizza, C., Macchia, M., 2013. Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC–ESI–MS/MS. *Food Chem.* 141, 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.041>
- Munz, S., Praeger, A., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Hoenninger, S., 2018. Leaf area index, light interception, growth and steviol glycoside formation of *Stevia rebaudiana* Bertoni under field conditions in southwestern Germany. *Ind. Crops Prod.* 111, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.021>
- Olivier, B., Serge, A.H., Catherine, A., Jacques, B., Murielle, B., Marie-Chantal, C.-L., Sybil, C., Jean-Philippe, G., Sabine, H., Esther, K., Perrine, N., Fabienne, R., Gérard, S., Irène, M., 2015. Review of the nutritional benefits and risks related to intense sweeteners. *Arch. Public Heal.* 73, 41. <https://doi.org/10.1186/s13690-015-0092-x>
- Pal, P.K., Kumar, R., Guleria, V., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., Gill, B.S., Singh, D., Chand, G., Singh, B., Singh, R.D., Ahuja, P.S., 2015. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biol.* 15, 1–16.
- Parris, C.A., Shock, C.C., Qian, M., 2017. Soil Water Tension Irrigation Criteria Affects *Stevia rebaudiana* Leaf Yield and Leaf Steviol Glycoside Composition. *HORTSCIENCE* 52, 154–161. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11352-16>
- Parris, C.A., Shock, C.C., Qian, M., 2016. Dry Leaf and Steviol Glycoside Productivity of *Stevia rebaudiana* in the Western United States. *HORTSCIENCE* 51, 1220–1227. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11149-16>
- Print, I., Pordel, R., Esfahani, M., Kafi, M., Nezami, A., 2015. Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni root system to waterlogging and terminal drought stress Department of Agronomy Faculty of Agriculture , Ferdowsi university of Mashhad , Mashhad , Iran. *J. Biodivers. Environ. Sci.* 6, 238–247.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing [WWW Document]. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Rodrigues, M.A., Afonso, S., Ferreira, I.Q., Arrobas, M., 2017. Response of stevia to nitrogen fertilization and harvesting regime in northeastern Portugal. *Arch. Agron. SOIL Sci.* 63, 626–637. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1230272>

- Russell, L., 2018. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means [WWW Document]. R Packag. version 1.1.
- Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitch, D., Saranga, Y., Dudai, N., 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Ind. Crops Prod.* 50, 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.063>
- Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R., 1982. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J. Nat. Prod.* 45, 590–599.
- Sumida, T., 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a possible new crop for sweetening resource in Japan. *J. Cent. Agric. Exp. Stn.* 1–71.
- Sun, J., 2016. Development of *Stevia* and Steviol Glycosides Industry in China. *Proc. 9th Stevia Symp. 2016*, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. 145–150.
- Taleie, N., Hamidoghli, Y., Rabiei, B., Hamidoghli, S., 2012. Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Intl J Agri Crop Sci* 4, 298–302.
- Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., Lubian, E., Martello, S., Cornara, L., 1998. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. *Ital. J. Food Sci.* 10, 261–267.
- Tavarini, S., Angelini, L.G., 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: The effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2121–2129. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6016>
- Turgut, K., Ucar, E., Tucuntu, B., Ozyigit, Y., 2015. *Stevia rebaudiana* Bertoni could be an alternative crop in the mediterranean region of Turkey. *Proc. 8th Stevia Symp. 2015*, EUSTAS, Ger. 27-28th January 2015, Jan M.C. Geuns Ed. 43–52.
- Upreti, M., Dubois, G., Prakash, I., 2012. Synthetic study on the relationship between structure and sweet taste properties of steviol glycosides. *Molecules* 17, 4186–4196. <https://doi.org/10.3390/molecules17044186>
- Valladares, F., Guzman, B., 2006. Canopy structure and spatial heterogeneity of understory light in an abandoned Holm oak woodland. *Ann. For. Sci.* 63, 749–761.

<https://doi.org/10.1051/forest>

- Vouillamoz, J., Wolfram-Schilling, E., Carron, C., Baroffio, C., 2015. Agronomic and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. Proc. 8th Stevia Symp. 2015, EUSTAS, Bonn, Ger. Geuns J.M.C., Ceunen S., Eds 53–56.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2 : Elegant Graphics for Data Anamysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilke, C.O., 2017. *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for “ggplot2.”* R Packag. cowplot version 0.9.2.
- WSO, 2018. Regulatory Approval [WWW Document]. World Stevia Organ.
- Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., Wang, Z., 2015. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiol. Biochem.* PPB 86, 174—180. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.004>
- Yoneda, Y., Shimizu, H., Nakashima, H., Miyasaka, J., Ohdoi, K., 2017. Effects of light intensity and photoperiod on improving steviol glycosides content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni while conserving light energy consumption. *J. Appl. Res. Med. Aromat. PLANTS* 7, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.001>
- Zabala, U.M., 2011. Optimierung von Wachstum und Ertrag (Süßstoffbildung) bei *Stevia rebaudiana* Bertoni unter mitteleuropäischen Standortbedingungen. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Zachokostas, P., 2015. Effects of Chemical Weed Management on the Quantitative and Qualitative Characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni, under Mediterranean Conditions (Karditsa, Thessaly, Greece). Proc. 8th Stevia Symp. 2015, EUSTAS, Ger. 27-28th January 2015, Jan M.C. Geuns Ed. 5–12.
- Zaman, M.M., Chowdhury, M.A.H., Chowdhury, T., 2015. Growth parameters and leaf biomass yield of stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. *J. Bangladesh Agril. Univ* 13, 31–37.
- Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B., Wu, W., 2013. Effects of Salt Stress on the Growth, Physiological Responses, and Glycoside Contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5720–5726.

Supplemental data

Supplemental data 1. Probability values of ANOVA type II table on linear mixed model for SGs yield and its component

Variables	Genetic resources
SGs yield	$p < 0.001$
Dry leaf yield	$p < 0.001$
SGs content	$p < 0.001$

Supplemental data 2. Variance analysis for linear regression of SGs yield by leaf dry yield and SGs content

Explicative variables	P-value	Variance proportion (%)
Dry leaf yield	$p < 0.001$	68
SGs content	$p < 0.001$	24
Dry leaf yield : SGs content	$p < 0.001$	8

Supplemental data 3. Result of ANOVA type II on linear model for dry leaf yield regression

Explicative variables	P-value
h	$p < 0.001$
\emptyset_{NS}	$p < 0.001$
\emptyset_{EO}	$p < 0.001$
Number of stem	$p < 0.01$
Canopy area	$p < 0.01$
Canopy volume	$p < 0.001$
Stem density	$p < 0.01$
Leaf Mass Ratio	$p < 0.001$
Specific Leaf Mass	$p < 0.001$
Specific Stem Mass	$p < 0.001$

Supplemental data 4. Pearson correlation matrix of SGs yield, leaf dry yield, SGs content and the 5 majors SGs proportion. Positive correlation are represented in green and negative correlation are in orange. Circle size is proportional to Pearson coefficient, indicated inside. No significant correlation are represented by empty cell inside the matrix ($p > 0.05$).

	SGs content	SGs yield	ST	RebA	RebC	DuLA	RebF
Dry leaf yield	0.16	0.88	0.48	-0.38	-0.34		-0.36
SGs content		0.55			-0.44	-0.23	-0.5
SGs yield				-0.24	-0.38	0.05	-0.44

Tableau II.2.7. Table d'ANOVA de type II sur modèles linéaires généralisés du taux de reprise de croissance en 2^{ème} de production pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* sur les 2 sites expérimentaux dans le cas d'une implantation longue en 1^{ère} année de production (A). Table d'ANOVA pour le site de Ste-Livrade (B) et Liposthey (C)

A			B Ste-Livrade			C Liposthey		
	Taux de reprise (%)		Taux de reprise (%)		Taux de reprise (%)		Taux de reprise (%)	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Génotype	2.20E-16	$p < 0.001$	Génotype	2.20E-16	$p < 0.001$	Génotype	1.68E-10	$p < 0.001$
Site	2.20E-16	$p < 0.001$	Bloc	0.159	NS	Bloc	3.48E-03	$p < 0.01$
Génotype:Site	2.20E-16	$p < 0.001$	Génotype:Bloc	8.66E-05	$p < 0.001$	Génotype:Bloc	0.0827	NS
Bloc:Site	1.10E-02	$p < 0.05$						
Génotype:Site:Bloc	8.23E-08	$p < 0.001$						

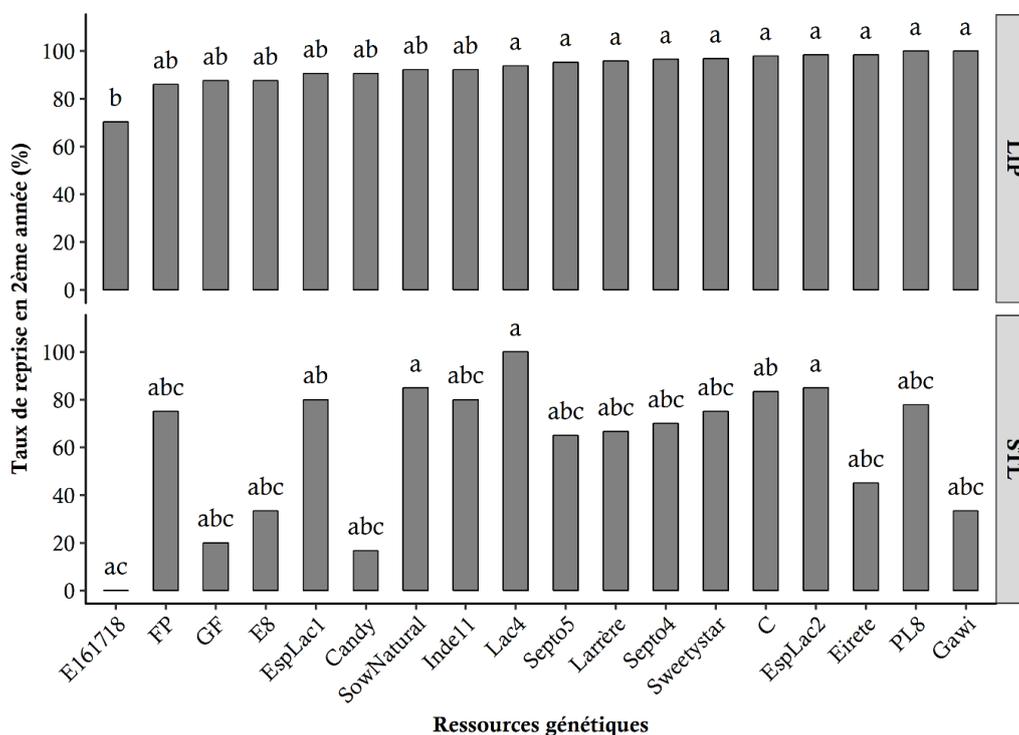


Figure II.2.9. Taux de reprise de la croissance (%) en 2^{ème} année de production pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* dans les sites de production de Ste-Livrade et Liposthey dans le cas d'une implantation longue en 1^{ère} année. Les résultats présentent la reprise déterminée le 11 juillet à Liposthey et le 20 juillet 2017 à Ste-Livrade sur les plants implantés 5 mois en 1^{ère} année de production, soit n=64 plants par ressource génétique à Liposthey et n=20 plants à Ste-Livrade. Les ressources génétiques sont classées en fonction du taux de reprise croissant à Liposthey, site de production ayant un taux de reprise moyen supérieur (93%) comparé à Liposthey (58%). Le résultat du test HSD de Tuckey est indiqué en haut des histogrammes. Les ressources génétiques ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$.

4.2 Résultats complémentaires

La figure II.2.9 présente les taux de reprise de la croissance des plants initialement implantés (en %) en 2^{ème} année de production pour les 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* dans les sites de production de Ste-Livrade-sur-lot et Liposthey. Les taux de reprise sont significativement différents en fonction du génotype, du site de production, du bloc et de leur interaction (Tableau II.2.7A). Toutes ressources génétiques confondues, le taux de reprise est fortement supérieur à Liposthey par rapport à Ste-Livrade à $p= 0,05$ (93% et 58% respectivement). A Liposthey, la majorité des ressources ont une reprise supérieure à 86 % seul le génotype E161718 présente une reprise plus aléatoire (70%). Sur le site de Ste-Livrade, il existe une très grande hétérogénéité entre les génotypes, dont les extrêmes sont le génotype E161718 qui ne présente aucune reprise de croissance et Lac4, seul génotype à 100% de reprise de croissance. La forte interaction entre le génotype et le site de production indique un différentiel d'adaptation en fonction des conditions pédoclimatiques (2.2.2 Dispositifs expérimentaux, p 99-101).

A Ste-Livrade, nous observons un fort effet génotype, ainsi qu'une interaction de celui-ci avec le bloc ($p<0,001$; Tableau II.2.7B). A Liposthey la reprise est fortement dépendante du génotype ($p<0,001$) et du bloc ($p<0,01$; Tableau II.2.7C). Elle varie entre 70% (E161718) et 100% (Gawi, D) à Liposthey alors qu'à Ste-Livrade elle varie entre 0% (E161718) et 100% (Lac4) (Figure II.2.9). La comparaison multiple des ressources génétiques nous permet d'identifier les comportements extrêmes pour chaque site. A Liposthey, la majorité des ressources génétiques ont une très bonne reprise ($\geq 94\%$). Ce sont les génotypes (Gawi, D, Eirete, EspLac2, C, SweetStar (S), Septo4, Larrère, Septo5 et Lac4) alors que les autres génotypes (S6030-1, SowNatural (S), Candy (S), EspLac1, E8, GF et FP) présentent une reprise plus faible comprise entre 86% et 92%. A Ste-Livrade, EspLac1, SowNatural, Lac4, C et EspLac2 (reprise $\geq 95\%$) sont significativement différents d'E161718 (reprise de 0%). Le reste des RG montre une reprise très aléatoire comprise entre 17% et 80% (Candy et S6030-1 respectivement). Le peu de différences significatives s'explique par la forte interaction entre le génotype et le bloc randomisé, conduisant à une grande variabilité intra-génotype. Le génotype E161718 est le moins performant sur les 2 sites de production. EspLac1, SowNatural, Lac4, C et EspLac2 révèlent des taux de reprise équivalents entre les 2 sites, correspondant aux ressources génétiques les mieux adaptés à ces 2 conditions de production.

A Ste-Livrade, nous n'observons pas de différences significatives pour le rendement en SGs et ses composantes entre les résultats de 2^{ème} année après 3 et 5 mois d'implantation en 1^{ère} année. Les résultats sont représentés en Annexe A3.

5 Conclusion et discussion

Les objectifs de ce chapitre étaient (1) d'évaluer la variabilité phénotypique de *Stevia rebaudiana* à travers l'évaluation de la productivité, (2) de décomposer les traits impliqués dans le rendement en SGs en terme de quantité et de qualité, et (3) d'identifier les caractères d'intérêt pour la mise en place d'un programme d'amélioration pour une filière BIO en Aquitaine. Pour cela, nous avons rassemblé et évalué en conditions de production une collection de 18 ressources génétiques (15 génotypes et 3 lots de semences) dans 2 environnements, durant 2 années de production dans le cas d'une implantation courte en 1^{ère} année, et au cours de la 2^{ème} année de production dans le cas d'une implantation longue en 1^{ère} année. Le phénotypage a été réalisé au stade bourgeons floraux, et a permis de déterminer le rendement en SGs à travers le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs. Pour caractériser plus finement les composantes du rendement, la biomasse foliaire a été décrite à l'aide de descripteurs de la canopée, et les teneurs de 10 SGs ont permis d'évaluer la composition en SGs. Les ressources génétiques ayant été cultivées durant 2 années, la capacité d'adaptation face à l'hiver a été évaluée grâce aux taux de reprise de croissance en 2^{ème} année.

Toutes conditions confondues dans cette étude, une large variabilité phénotypique est révélée au sein de la collection, en accord avec l'auto-incompatibilité de *Stevia rebaudiana* (Yadav *et al.*, 2011). Les sources de variabilité sont nombreuses et peuvent avoir un impact sur les composantes du rendement étudiées. Sur les 2 sites, les températures minimales moyennes du mois de janvier 2017 ont été négatives, pouvant impacter le taux de reprise. Le nombre de ressources génétiques étudiées est élevé comparé aux autres essais chez *Stevia rebaudiana*, permettant d'apprécier la réponse de cette espèce à ces différentes conditions culturelles et environnementales. La comparaison des différentes conditions de l'étude (sites expérimentaux et durée d'implantation) nous permet de caractériser des tendances générales en fonction des caractères cultureux, et de révéler une forte variabilité des composantes du rendement dépendante du génotype et de son interaction avec l'environnement.

5.1 Variabilité de la productivité de *Stevia rebaudiana*

Le rendement en SGs révèle la productivité de *Stevia rebaudiana*. En 1^{ère} année de production, les rendements en SGs ont varié entre 52 et 205 kg/ha au bout de 3 mois d'implantation, résultant en moyenne à 105 kg/ha à Liposthey et à 124 kg/ha à Ste-Livrade. Ces mêmes plants récoltés en 2^{ème} année ont révélé un rendement compris entre 38 et 220 kg/ha, en moyenne de 83 kg/ha à Liposthey et 90 kg/ha à Ste-Livrade. Les études comparant les dates de plantation révèlent que les plus précoces (au début du printemps) obtiennent de meilleurs rendements de production que des plantations tardives (Taleie *et al.*, 2012). Ainsi, nos plantations au mois de Juin sont définies comme tardives et nous pouvons supposer que les rendements obtenus ne sont pas les optimums des ressources génétiques. Dans ces conditions, un seul génotype (EspLac2) montre une augmentation significative de son rendement en 2^{ème} année, à Ste-Livrade, au contraire de 5 ressources génétiques (Eirete FP, Lac4, D et SowNatural (S)) qui perdent leur rendement sur les 2 sites, tout comme E8 et EspLac1 à Ste-Livrade. Ce résultat montre que l'évolution du rendement l'année suivante est dépendante du génotype. Les plants récoltés uniquement en 2^{ème} année après une implantation prolongée ont montré une gamme de variabilité plus importante, comprise entre 33 et 512 kg/ha à Liposthey (moyenne de 174 kg/ha) et entre 23 et 294 kg/ha à Ste-Livrade (moyenne de 112 kg/ha). Cette évaluation révèle l'impact général positif de l'implantation prolongée à Liposthey sur le rendement, malgré une implantation tardive, et concorde avec les augmentations de rendements décrites dès les 2^{èmes} années de production (ref). Un rendement nettement supérieur est observé pour les génotypes E8, EspLac1, EspLac2, FP, Gawi, GF, Lac4, Septo4 et Septo5 comparé aux rendements obtenus sur les 2 années avec implantation courte. On peut donc supposer qu'à Ste-Livrade les conditions environnementales n'étaient pas optimales pour un établissement suffisant de la culture, quelles que soit les ressources génétiques. Les données météorologiques mensuelles montrent seulement une différence de durée d'ensoleillement, supérieure à Ste-Livrade les 2 mois suivant l'implantation, or ce paramètre devrait stimuler la croissance végétative (Ceunen & Geuns, 2013a). *Stevia rebaudiana* se développe mieux sur des sols de texture sablonneuse (Zaman *et al.*, 2015), nous pouvons donc supposer que la composition du sol à Ste-Livrade est moins optimale pour la totalité de la collection, sachant que l'établissement des plants en 1^{ère} saison de croissance est un facteur important (Angelini *et al.*, 2018). Nous montrons dans cette étude que la productivité de *Stevia rebaudiana* est fortement dépendante du génotype, de son interaction avec l'environnement, et que la durée d'implantation en 1^{ère} année a un fort impact sur l'année suivante.

Le génotype et son interaction avec l'environnement sont les facteurs responsables des gammes de variabilité importantes dans chaque condition de cette étude. Ce résultat est en accord avec les interactions génotype-environnement déjà démontrées (Barbet-Massin, 2015; Parris *et al.*, 2016). Toutes conditions confondues, les génotypes C et D sont plus productifs sur le site de Ste-Livrade, suggérant une meilleure adaptation à une culture sur sols argilo-calcaires irrigués par aspersion. Pour le génotype EspLac2, l'implantation courte à Ste-Livrade et l'implantation longue à Liposthey révèlent de forts rendements similaires (220 et 231 kg/ha). A Ste-Livrade, le génotype FP maintient sa production, parmi les plus performantes en 1^{ère} année. A Liposthey, les génotypes Gawi et FP restent parmi les plus performants quelle que soit la durée d'implantation. Dans le cas d'une implantation prolongée, les génotypes EspLac1 et EspLac2 deviennent parmi les plus performants, avec surtout le génotype GF produisant 517 kg SGs/ha (meilleur rendement toutes conditions confondues de l'étude), qui, pourtant, n'a pas repris sa croissance en implantation courte. Le génotype Gawi apparaît performant dans toutes les conditions de l'étude, ce qui confirme son critère de sélection d'adaptation au climat tempéré (Lankes & Zabala, 2011), et constitue une ressource génétique témoin pour ces conditions.

La forte variabilité de rendement en SGs est le produit de ses 2 composantes, le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs dans les feuilles. Nous avons démontré que le rendement en biomasse foliaire est le trait contribuant majoritairement au rendement en SGs, quel que soit les conditions, et confirme les résultats de précédentes expérimentations françaises (Barbet-Massin, 2015; Barbet-Massin *et al.*, 2015). Les variations importantes de rendements en SGs sont donc principalement la résultante de variations de production de biomasse foliaire. La stabilité générale du rendement en biomasse foliaire entre les 2 années de production (implantation courte) est en accord avec la stabilité de celui-ci en 2^{ème} année démontré pour 2 génotypes en Italie (Andolfi *et al.*, 2006). Les rendements supérieurs obtenus à Liposthey dans le cas d'une implantation prolongée est en accord avec de précédentes études (Taleie *et al.*, 2012; Serfaty *et al.*, 2013; Munz *et al.*, 2018). Ainsi, nous confirmons pour ce site que la durée d'implantation impacte positivement la croissance sur l'année suivante, comme démontré en Israël (Serfaty *et al.*, 2013), et qu'elle est responsable d'un rendement en SGs supérieur.

5.2 Caractérisation de structure de la canopée

Les descripteurs de la canopée utilisés dans cette étude nous permettent de caractériser quantitativement la variabilité d'architecture décrite chez *Stevia rebaudiana* (Tateo *et al.*, 1998). La densité de plantation de notre étude est la plus faible référencée chez *Stevia rebaudiana* (Hastoy *et al.*, 2018), mais elle présente l'avantage d'amoinrir l'effet de la compétition inter-plants sur le développement de la canopée (Munz *et al.*, 2018). Nous pouvons donc supposer que notre étude révèle de manière plus optimale la biomasse aérienne des ressources génétiques. L'identification de combinaison de descripteurs pour expliquer la variabilité du rendement en biomasse indique que différents traits structuraux participent à sa mise en place.

Nous révélons une grande variabilité phénotypique en fonction des ressources génétiques, cependant en fonction de la durée d'implantation, nous n'identifions pas le même nombre de variables nécessaires à la description du rendement en biomasse foliaire. Suite à une implantation courte, seulement 4 descripteurs permettent d'expliquer 79% de la variabilité du rendement en biomasse foliaire, correspondant aux diamètres NS et EO, SSM et LMR. Suite à une implantation longue à Liposthey, 6 descripteurs sont identifiés pour expliquer 86% de variabilité : la surface de la canopée, le nombre de tiges principales, la densité de tige par unité de surface de canopée, SLM, SSM et LMR. Avec l'impact positif de la durée d'implantation prolongée sur le rendement en biomasse foliaire, ce résultat indique une augmentation de la variabilité phénotypique. Même si nous obtenons des différences de régresseurs, ces variables révèlent l'implication de la structure des ports et de la distribution de la biomasse. La structure des ports est caractérisée par la surface au sol représentée par la canopée avec ou sans le nombre et la densité d'axes principaux. La répartition de la biomasse est révélée par les densités de biomasse spécifiques par unité de surface de la canopée et le ratio de biomasse de feuille par rapport à la biomasse aérienne. Ces deux groupes de variables permettent de classer les ressources génétique en 2 grands groupes pour chaque condition, alors que Tateo *et al.* (1998) décrivent 4 architectures chez *Stevia rebaudiana*, dépendantes du nombre d'axes principaux et du développement de ramifications secondaires. Dans les évaluations de la canopée en 2^{ème} année de croissance, nous ne révélons pas d'axe principal unique (2 groupes de Tateo *et al.* (1998)), ce qui est en accord avec la stimulation de la ramification par décapitation chez *Stevia* (Pal *et al.*, 2013) et l'augmentation du nombre de tiges au fil des années (ref).

Nous montrons que les caractéristiques morphologiques dépendent du génotype, de son interaction avec l'environnement et de la durée d'implantation. Les 2 groupes identifiés se

distinguent nettement par la surface de la canopée. Dans le cas d'une implantation courte, ce sont les ressources génétiques montrant la plus grande surface qui sont en moyenne les meilleurs producteurs de biomasse foliaire. A l'inverse, dans le cas d'une implantation longue, les surfaces de canopée plus faibles montrent en moyenne de meilleurs rendements. Dans les 2 cas, les canopées sont associées avec des SSM et LMR intermédiaires, montrant l'importance de la distribution de la biomasse au sein de la surface. Ces résultats suggèrent qu'une biomasse aérienne condensée est préférable pour l'obtention de meilleurs rendements.

A notre connaissance, l'évaluation simultanée de ces 10 descripteurs n'a pas été réalisée auparavant chez *Stevia rebaudiana*. D'intéressantes corrélations ont été répertoriées dans la littérature mais n'impliquent peu de variables descriptives (Yadav *et al.*, 2011). Une première étude a corrélé positivement le nombre de feuilles et de tiges à la biomasse foliaire, sans implication de la taille des plants (Buana, 1958), alors que plus tard le nombre de feuilles, la taille des plants (Buana & Goenadi, 1985), et le nombre de tiges (Chalapathi *et al.*, 1998) ont montré une corrélation positive avec la production de biomasse. De plus, un LMR élevé a été défini comme trait désirable pour la sélection (Yadav *et al.*, 2011). Cependant nous montrons dans cette étude que la taille des plants ne participe pas à la description de la variabilité, et que les LMR et le nombre de tiges élevé n'indiquent pas toujours un rendement en biomasse foliaire supérieur. Une seule étude a réalisé la même approche de régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire chez *Stevia rebaudiana* (Pal *et al.*, 2013). Les auteurs expliquent 92% de la variabilité avec la hauteur des plants, le nombre de tiges et le LAI (Leaf Area Index). Un LAI (surface foliaire par unité de surface de la canopée) supérieur a été observé pour les architectures avec axes principaux dominants par rapport à des architectures buissonnantes et aérées chez *Stevia rebaudiana* (Munz *et al.*, 2018). Sa caractérisation permettrait de compléter le phénotypage de la biomasse aérienne chez *Stévia* et éventuellement de réduire le nombre de variables nécessaire à la description de la biomasse foliaire.

5.3 Caractérisation de la teneur et composition en SGs

Toutes conditions confondues, nous montrons une absence de corrélation entre le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs. Ce résultat est en accord avec une précédente étude qui a montré la forte héritabilité de ces 2 caractères dans une population demi-frère, sans pour autant être corrélés (Brandle & Rosa, 1992). Nous révélons également une gamme de variabilité importante de teneur en SGs au sein de la collection, de 4,5 à 18,4 % w/w, similaire à une population Criola (Barbet-Massin *et al.*, 2016).

Dans cette étude, nous révélons que la teneur en SGs est fortement dépendante du génotype, de son interaction avec l'environnement et de l'année de production. Nous observons une diminution significative générale de la teneur en SGs entre les 2 années de culture suite à une implantation courte, hormis pour les génotypes EspLac1 à Liposthey dont la teneur augmente fortement, et Larrère dont la teneur reste stable sur les 2 sites. A l'inverse, une étude sur un nombre plus réduit de génotypes a montré une augmentation de la teneur en 2^{ème} année, hormis pour un génotype (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Nos résultats seraient plus en accord avec la diminution de la teneur en ST obtenue en Italie (Tavarini & Angelini, 2013). Il est démontré que la teneur en SGs diminue au cours de la floraison (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015), et que le stade bourgeons floraux est optimal en terme de rendement en SGs (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Cependant, ces études cinétiques n'ont pas été réalisées sur des plants en deuxième année de croissance. Nous pouvons donc supposer que la cinétique d'accumulation en SGs en fonction du stade de croissance peut être différente en fonction des années et pourrait expliquer la diminution observée. De manière intéressante, les ressources génétiques révèlent des teneurs similaires en 2^{ème} année de croissance quelle que soit la durée d'implantation. Une étude a montré que la date d'implantation n'a pas d'effet sur la teneur en SGs en 1^{ère} saison de croissance (Taleie *et al.*, 2012). Les résultats obtenus dans cette étude complètent cette information puisque nous ne révélons pas de différences significatives en 2^{ème} année de production en fonction de la durée d'implantation. Ainsi, les génotypes C, EspLac2 et Larrère montrent des teneurs en SGs supérieures à Ste-Livrade. Les meilleurs accumulateurs communs aux 2 années sont Gawi, C et EspLac1 à Ste-Livrade et, EspLac1 et FP à Liposthey.

Les profils en SGs sont évalués à travers la proportion respective de chaque SGs quantifiés par rapport aux SGs totaux. La combinaison des 5 SGs majoritairement accumulés chez *Stevia rebaudiana* (ST, RebA, RebC, DulA et RebF) permet d'expliquer 98% de la variabilité biochimique dans notre étude, et a permis d'expliquer 99% de la variabilité dans une précédente étude évaluant les profils d'un plus grand nombre de génotypes (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Les auteurs classent les 96 génotypes en 4 clusters tandis que nous classons 15 génotypes en 5 ou 6 clusters. Ce résultat indique que les ressources génétiques collectées révèlent une importante variabilité de profils en SGs. Les caractéristiques des clusters des 2 études sont similaires : proportion de RebA nulle ou quasi inexistante, proportion de RebC et RebF supérieure, gradient en fonction du ratio RebA/ST, et proportion de RebA supérieure. Les profils les plus intéressants sont ceux dont la proportion en SGs qualifiés de doux, (RebA, RebD, RebM, RebE) est la plus forte. Au sein de notre collection, nous identifions les profils d'EspLac1, Larrère, FP et Septo5 comme répondant au mieux à ce

critère. Les génotypes D et C de l'EUSTAS font également parti des profils d'intérêt, et en particulier le génotype C qui est le seul à atteindre environ 70% de RebA, caractère pour lequel il a été sélectionné (Lankes & Grosser, 2015).

Dans cette étude, nous montrons que seul le génotype a un fort impact sur les profils en SGs. En effet, les profils de toutes les ressources génétiques sont stables en fonction de l'année de production et de la durée d'implantation. Nous avons observé une proportion de SGs « doux » significativement supérieure à Ste-Livrade pour toute la collection, cependant la différence entre les sites est très faible en terme de proportion, ce qui n'impacte pas le classement des génotypes dans leur cluster respectif. Nous confirmons donc la stabilité générale des profils déterminé par le génotype, quels que soit le site et l'année de production (Barbet-Massin *et al.*, 2016).

5.4 Reprise de la croissance

Les résultats de productivité présentés en 2^{èmes} années ne prennent pas en compte le taux de survie après l'hiver, caractère supplémentaire représentatif de l'adaptation des ressources génétiques aux conditions de l'Aquitaine et qui impacte fortement la pérennité de la production.

Dans cette étude, nous démontrons l'importance de la conduite culturale (voile d'hivernage), de la durée d'implantation, et de l'interaction du génotype et du site de production. D'une manière intéressante, les taux de reprise moyens après l'hiver évoluent de la même manière que le rendement en SGs, précédemment décrit. Pour le site de Liposthey, l'implantation plus longue en 1^{ère} année de croissance influence fortement le taux de reprise après l'hiver. Toutes ressources génétiques confondues et avec protection des parcelles, celui-ci est de 93% avec une implantation de 5 mois, contre 51% avec une implantation de 3 mois, alors qu'à Ste-Livrade le taux de reprise n'est pas influencé par l'implantation en 1^{ère} année (63% pour 3,5 mois d'implantation et 58% pour 5,5 mois). En France, un taux de survie après l'hiver de seulement 17% a été obtenu sur 96 génotypes d'une population Criola, sans protection de la culture (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Un tel écart révèle l'effet positif de la protection par un voile d'hivernage, comme au Japon où le taux de survie augmente et atteint 80% avec paillage (Meng Qingfu Meng Aihua, 1998). Il est établi que *Stevia rebaudiana* nécessite des sols aérés, drainants (Angelini *et al.*, 2018) et que sa croissance est supérieure sur des sols non-calcaires (Zaman *et al.*, 2015), ce qui pourraient expliquer l'importante différence du taux de reprise et de rendement en SGs entre les 2 sites expérimentaux suite à une implantation prolongée. Le sol de Liposthey est sablonneux alors que le sol de Ste-Livrade est argilo-calcaire, et par conséquent plus dense et moins drainant. La rétention d'eau

au niveau du sol conduit à de fortes pertes (Lavini *et al.*, 2008), s'expliquant par la forte sensibilité de *Stevia rebaudiana* à l'engorgement (Pordel *et al.*, 2015).

Malgré la faible reprise générale suite à une implantation courte, 4 génotypes (EspLac1, Lac4, C et EspLac2) montrent une meilleure adaptation comparée au reste de la collection à Ste-Livrade, et 2 génotypes (Eirété et Larrère) à Liposthey. Ces résultats confirment l'importance de l'interaction du génotype avec l'environnement (Barbet-Massin, 2015), et la nécessité de sélectionner des ressources génétiques adaptées à chaque type de sol pour garantir la pérennité de la culture. Il serait intéressant de caractériser le développement racinaire et la mise en réserve des ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* dont la réponse est extrême en fonction des différents types de sol, d'identifier la durée d'implantation minimale nécessaire à la pérennité de la productivité, caractérisée par le rendement en SGs et le taux de survie. Ces 2 traits phénotypiques ne sont pourtant pas corrélés puisque les meilleurs producteurs de SGs ne sont pas forcément les génotypes ayant les meilleurs taux de reprise.

– Chapitre 3 –

Caractérisation des composantes du rendement au cours du développement de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de production

1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous démontrons que le rendement en biomasse foliaire chez *Stevia rebaudiana* est le trait phénotypique le plus impliqué dans le rendement en SGs au stade bourgeons floraux au sein de la collection, quel que soit le site et l'année de production. La caractérisation de la biomasse aérienne par des descripteurs quantitatifs nous permet de classer les ressources génétiques en deux grands groupes selon la surface au sol qu'ils occupent et la distribution de la biomasse au sein de la canopée (Chapitre 2). Ce résultat révèle que différents traits structuraux participent à la mise en place du rendement en biomasse foliaire, et soulève la nécessité de caractériser plus finement la canopée de *Stevia rebaudiana*.

La dynamique des composantes du rendement a été étudiée en conditions contrôlées en fonction de la photopériode (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Cependant, en condition de production en plein champ, les études sont moins nombreuses. Les prélèvements sont limités à 3 stades du développement (végétatif, bourgeons floraux et floraison). Ainsi, la mise en place de la biomasse aérienne au cours du développement végétatif n'a jamais été décrite de façon détaillée. Une étude récente mettant en jeu la comparaison de 2 génotypes de Stévia avec une architecture très différente a révélé des différences significatives de Leaf Area Index (LAI) et de Specific Leaf Area (SLA) (Munz *et al.*, 2018). Le LAI est le ratio de la surface foliaire par la surface au sol occupée par la canopée. Le SLA est représentatif de l'épaisseur des feuilles et est exprimé en cm² par g de masse sèche foliaire. Le LAI impacte l'interception de la lumière (Munz *et al.*, 2018) et le SLA est représentatif de l'activité photosynthétique (Dubey *et al.*, 2017). La production de biomasse étant dépendante de la capacité des plantes à intercepter et utiliser la lumière (Demura & Ye, 2010), il apparait nécessaire de déterminer ces 2 nouvelles variables au cours du développement végétatif, et pour des génotypes dont l'architecture est différente. La production de biomasse foliaire par plant est fortement dépendante de la densité de plantation chez *Stevia rebaudiana* (Kumar *et al.*, 2014). Nos expérimentations ont été réalisées à une densité de 37 500 plants/ha, correspondant aux plus faibles densités référencées chez Stévia. L'avantage d'un tel dispositif est de permettre un développement optimal de la biomasse aérienne sans les contraintes de voisinage susceptibles de modifier le développement des plantes.

En ce qui concerne l'accumulation en SGs, nous avons précédemment démontré que les profils en SGs sont stables entre 2 années sur un même site de production, et qu'il existe peu de différence entre des sites de production. Nous avons également révélé que pour un même génotype, la teneur en SGs est dépendante de l'année et du site de production. Au cours de la

croissance en conditions contrôlées avec des jours longs, les proportions respectives des SGs (principalement du ST et du RebA) évoluent en fonction de l'ontogénie, et que la teneur en SGs totaux augmente graduellement pendant la croissance végétative pour atteindre son maximum à l'initiation des bourgeons floraux (Ceunen & Geuns, 2013a). Cependant cette étude a été réalisée seulement sur un génotype et en conditions contrôlées, et nécessite d'être caractérisée pour un plus grand nombre de génotypes en condition de production.

Au regard de ces résultats, il est apparu nécessaire de caractériser finement la mise en place de la biomasse aérienne et de la teneur en SGs au cours du développement végétatif. Les objectifs de ce chapitre sont (1) d'identifier les différentes composantes du rendement en SGs au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana*, (2) de décrire finement les variables descripteurs de la biomasse aérienne chez *Stevia rebaudiana*, (3) et d'identifier les caractères phénotypiques décrivant la variabilité du rendement en biomasse foliaire. Pour cela, nous avons étudié 5 génotypes représentatifs de la variabilité phénotypique de la collection (Chapitre 2) en condition de production. Ces 5 génotypes retenus sont C, E8, Gawi, Lac4 et Larrère. Les mesures et les prélèvements d'échantillons sont réalisés à 6 moments du cycle biologique au cours de la 2^{ème} année de production. Pour décrire la canopée de ces 5 génotypes, 15 variables sont choisies et les teneurs des différents SGs ont déterminés à partir de la biomasse foliaire sèche.

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériel végétal

Suite au phénotypage en 1^{ère} année de croissance (Chapitre 2), 5 génotypes ont été sélectionnés comme représentant la variabilité de la collection étudiée. Ces 5 génotypes sont C, E8, Gawi, Lac4 et Larrère. Ils se différencient par leur architecture, leur rendement en biomasse foliaire, leur teneur en SGs et leur composition en SGs. Les caractéristiques phénotypiques différenciant ces génotypes sont résumées en Tableau II.3.1.

Tableau II.3.1. Résumé de la variabilité phénotypique des 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* observée en 1^{ère} année de croissance à Liposthey. SSM : Specific Stem Mass ; LMR : Leaf Mass Ratio

Génotype	Biomasse foliaire sèche (kg/ha)	Teneur SGs (% w/w)	Proportion RebA (%)	Surface canopée	SSM	LMR
C	735	12,5	71	Elevée	Faible	Faible
E8	903	9,3	0	Faible	Faible	Elevé
Gawi	1046	13,6	30	Intermédiaire	Elevé	Intermédiaire
Lac4	935	15,5	33	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire
Larrère	718	11,4	46	Elevée	Intermédiaire	Faible

2.2 Méthodes

2.2.1 Dispositif expérimental et conditions de culture

Cette étude a été conduite en 2^{ème} année de croissance sur la parcelle de producteur à Liposthey, implantée le 24 juin 2016. Les conditions de production des plants, le dispositif expérimental en bloc randomisé et la conduite de la culture ont été précédemment décrits dans le Chapitre 2 (p 99-101). Les plants utilisés pour cette étude correspondent aux plants dont l'implantation en 1^{ère} année de croissance a duré 5 mois, c'est-à-dire que la biomasse aérienne a été taillée en décembre 2016. La reprise de la croissance a débuté fin mars 2017.

2.2.2 Prélèvements au cours du développement

Le premier prélèvement de cette étude a été réalisé environ 2 mois après le début de la reprise (24 mai) et correspond au t=0 jour de la cinétique (Tableau II.3.2). 4 prélèvements supplémentaires ont été effectués durant la phase végétative de croissance, à 22, 48, 78 et 91 jours après le premier prélèvement. Le dernier prélèvement pour chaque génotype correspond au stade bourgeons floraux, réalisé à t=99 j pour le génotype dont la floraison est précoce (E8) ou à t=120 j pour le reste des génotypes, qualifiés de tardifs. Pour chaque date de prélèvement, un total de 8 plants / génotypes ont été récoltés, soit 2 plants / bloc / génotype.

Tableau II.3.2. Date de caractérisation des composantes du rendement en 2^{ème} année de croissance et stade ontogénique correspondant pour 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* sur la parcelle expérimentale de Liposthey

Date (2017)	t (jours)	Stade
24 mai	0	Végétatif
15 juin	22	
11 juillet	48	
10 août	78	
23 août	91	
30 août	99 (E8)	Bourgeons floraux
21 septembre	120 (C, Gawi, Lac4, Larrère)	

Tableau II.3.3. Détermination des 15 variables décrivant la biomasse aérienne au cours de la croissance de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana*

Catégorie	Variables	Unit	Description / Formula
Mesurée	Rendement foliaire	kg/ha	$MS_{feuille} \times Densité_{plantation}$
	Rendement tige	kg/ha	$MS_{tige} \times Densité_{plantation}$
	h	m	Hauteur
	ϕ_{NS}	m	Diamètre Nord-Sud
	ϕ_{EO}	m	Diamètre Est-Ouest
	Nombre de tige principale	nb/ha	$nb_{tige} \times Densité$
Calculée	Specific Leaf Area	cm ² /g	$Surface_{feuille} \text{ échantillonnée} / MS_{feuille} \text{ échantillonnée}$
	Surface de la canopée	m ² /ha	$\frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \pi \times Densité_{plantation}$
	Volume de la canopée	m ³ /ha	$\frac{4}{3} \pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \frac{h}{2} \times Densité_{plantation}$
	Densité de tige	nb/m ²	$nb_{tige} / Surface_{canopée}$
	Leaf Mass Ratio	%	$(MS_{feuille} / MS_{feuille+tige}) \times 100$
	Specific Leaf Mass	g/m ²	$MS_{feuille} / Surface_{canopée}$
	Specific Stem Mass	g/m ²	$MS_{tige} / Surface_{canopée}$
	Surface foliaire	cm ²	$SLA \times MS_{feuille}$
	Leaf Area Index	-	$Surface_{foliaire} / Surface_{canopée}$

2.2.3 Caractérisation de la biomasse aérienne

La caractérisation morphologique des plants est similaire à la méthode décrite pour déterminer 12 descripteurs de la canopée en Chapitre 2 (p 102). Dans cette étude, nous caractérisons 3 descripteurs supplémentaires pouvant être impliqués dans la variabilité de la structure de la canopée : le Specific Leaf Area, la surface foliaire et le LAI (Munz *et al.*, 2018).

Les mesures du nombre de tiges principales, hauteur du plant et diamètres du plant (nord-sud, et est-ouest) ont été réalisées. Les plants ont été taillés à la main, à environ 10 cm du sol, pour séparer les feuilles des tiges le jour même. Les feuilles et les tiges ont été séchées séparément en étuve pendant 48h à 50°C. Le rendement à l'hectare a été calculé par le produit des masses sèches et de la densité de plantation. Ces variables quantitatives sont utilisées pour déterminer 12 descripteurs de la canopée (Tableau II.3.3).

Avant le séchage de la biomasse plante entière, les feuilles fraîches ont été mélangées pour prélever aléatoirement 10 feuilles pour chaque plant. Ces échantillonnages de feuilles fraîches ont été scannés pour déterminer leur surface par ImageJ, séchées 48h à 50°C, puis pesées. La surface foliaire et la masse sèche ont permis de déterminer le Specific Leaf Area puis de calculer la surface foliaire du plant et le Leaf Area Index (Tableau II.3.3).

Enfin, le taux de croissance relatif (RGR, Relative Growth Rate) est estimé par l'équation suivante (Hoffmann & Poorter, 2002) :

$$RGR = \frac{\overline{\ln(MS_{t_2})} - \overline{\ln(MS_{t_1})}}{t_2 - t_1}$$

Où RGR est exprimé en mg/g/jour, $\overline{\ln(MS)}$ est la moyenne de la transformation logarithmique des biomasses sèches plantes entière (feuille et tige) à un instant t , t_1 et t_2 sont les 2 temps de prélèvements et leur différence est exprimée en jours.

2.2.4 Détermination de la teneur, proportion et du rendement en SGs

La méthode d'extraction et de quantification des 10 SGs dans la biomasse foliaire sèche a été décrite dans le précédent chapitre (Chapitre 2, p 102). La validation de cette méthode fait l'objet du Chapitre 1 (Partie 2). La teneur de chaque SGs est exprimée en % w/w. La somme des teneurs des 10 SGs constitue la teneur en SGs totaux dans cette étude. La teneur de chaque SGs est rapportée à la teneur en SGs totaux, pour obtenir leur proportion respective et constituer le profil de l'échantillon. Le rendement en glycoside de stéviol, exprimé en kg/ha, est le produit du rendement en biomasse sèche foliaire et de la teneur en SGs.

2.2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R version 3.4.3 (R Core Team, 2015). Les représentations graphiques sont obtenues avec les packages « ggplot2 » (Wickham, 2009), « cowplot » (Wilke, 2017), « gridExtra » (Auguie, 2017) et « extrafont » (Chang, 2014).

2.2.5.1 Analyse de variance

L'analyse de variance de type II des variables quantitatives continues et discrètes a été réalisée par la fonction *Anova* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011) sur le modèle linéaire mixte (1), établi par la fonction *lmer* du package « lme4 » (Bates *et al.*, 2015). Ce modèle a été utilisé pour estimer les moyennes marginales et les erreurs standards avec la fonction *emmeans* du package « emmeans » (Russell, 2018). Le modèle (2) a été utilisé pour la comparaison multiple entre les temps de prélèvement pour chaque génotype par le test HSD de Tukey avec la fonction *cld* du package « emmeans » (Russell, 2018).

$$(1) \text{ lmer } (y \sim A * B * (1|C))$$

$$(2) \text{ lmer } (y \sim B * (1|C))$$

Où, y est la variable mesurée, A est le facteur fixe génotype, B est le facteur fixe temps de prélèvement, C le facteur aléatoire bloc randomisé. Ainsi, les interactions du bloc avec les autres facteurs sont considérées comme facteurs aléatoires.

2.2.5.2 Comparaison des pentes de régression linéaire

La comparaison multiple de l'évolution des traits phénotypiques au cours de temps a été réalisée par la fonction *cld* sur les pentes des régressions linéaires obtenues par la fonction *lstrends*. Ces deux fonctions proviennent du package « emmeans » (Russell, 2018)

2.2.5.3 Corrélation de Spearman

La corrélation entre deux variables numériques a été évaluée par le niveau de significativité de l'association de ces variables par la méthode de Spearman à l'aide de la fonction *cor.test*, et le calcul du coefficient de Spearman (r) par la fonction *cor*. Ces deux fonctions proviennent du package « stats » (R Core Team, 2015).

2.2.5.4 Régression linéaire multiple

Une matrice de corrélation a été construite pour sélectionner uniquement les variables indépendantes pour la régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire, correspondant à des coefficients de corrélation de Pearson $< 0,8$. Le meilleur modèle a été obtenu par la procédure de sélection exhaustive de prédicteurs en fonction du Bayesian Information Criterion (BIC) par les fonctions *regsubsets* et *plot* du package « leaps » (Lumley and Miller, 2017). La détermination du Variance Inflation Factor (VIF) a permis de vérifier l'absence de quasi-colinéarité entre les prédicteurs sélectionnés par la fonction *vif* du package « car » (Fox & Weisberg, 2011). La représentation graphique sous forme de Heatmap a été obtenue par la fonction *heatmap* du package « stats » sur la matrice des moyennes des prédicteurs pour chaque génotype et date de prélèvement (R Core Team, 2015).

Tableau II.3.4. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes du rendement en SGs et ses composantes pour 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* au cours de la 2^{ème} année de croissance

Facteurs	Rendement SGs (kg/ha)		Rendement biomasse foliaire (kg/ha)		Teneur SGs (% w/w)	
	P (> Chi ²)	p<0.001	P (> Chi ²)	p<0.001	P (> Chi ²)	p<0.001
Génotype	2.20E-16	p<0.001	2.20E-16	p<0.001	2.20E-16	p<0.001
Temps	2.20E-16	p<0.001	4.49E-11	p<0.001	2.20E-16	p<0.05
Génotype x Temps	1.92E-04	p<0.001	0.021	p<0.05	3.45E-06	p<0.001

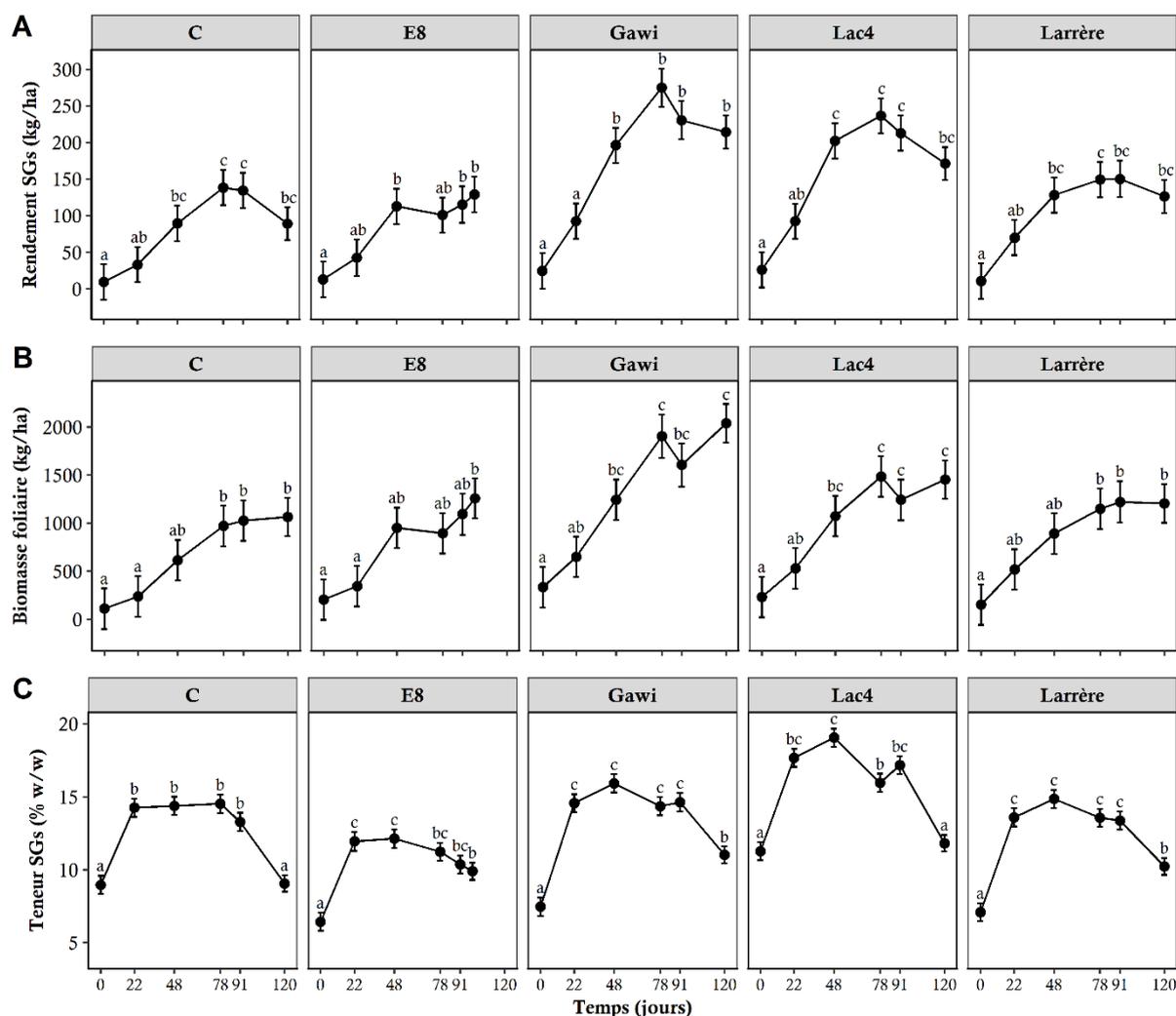


Figure II.3.1. Evolution des composantes du rendement au cours du développement de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de production (A) Rendement en SGs totaux, exprimé en kg/ha, en fonction du temps. (B) Rendement en biomasse foliaire sèche, exprimé en kg/ha, en fonction du temps. (C) Teneur en SGs totaux, exprimés en % w/w, en fonction du temps. Les résultats montrent les moyennes marginales estimées \pm erreur standard, calculés à partir de 8 réplicats biologiques par génotype et par date. L'abscisse est exprimée en nombre de jours après le 1^{er} prélèvement, correspond aux dates suivantes : T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 : 30 août ; t = 120 : 21 septembre (Stade bourgeons floraux). Le résultat de la comparaison multiple des temps de prélèvement pour chaque génotype par le test de Tukey est indiqué par des lettres. Les valeurs ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p=0,05$

3 Résultats

3.1 Cinétique du rendement et ses composantes

Nous avons caractérisé la mise en place du rendement de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* par la détermination du rendement en biomasse foliaire et de la teneur en SGs à 6 temps de prélèvement (5 durant la phase végétative et un dernier au stade bourgeons floraux). L'analyse de variance du rendement en SGs et ses composantes (biomasse foliaire et teneur en SGs) révèle un fort effet du génotype, de la date de prélèvement, et de l'interaction entre ces 2 facteurs ($p < 0.001$; Tableau II.3.4). Ce résultat indique que ces traits phénotypiques sont fortement dépendants du génotype et évoluent au cours de la croissance (Figure II.3.1).

La comparaison multiple des temps de prélèvement pour chaque trait et chaque génotype nous permet de mettre en évidence l'évolution du rendement chez *Stevia rebaudiana* au cours d'un cycle de croissance. Chez les 5 génotypes étudiés, le rendement en SGs (Figure II.3.1A) augmente pendant la phase végétative de croissance et atteint son maximum généralement 78 jours après le premier prélèvement. Après cette date, le rendement diminue (C, Gawi, Lac4 et Larère) ou reste stable (E8). Chez tous les génotypes, la production en biomasse foliaire sèche (Figure II.3.1B) augmente au cours de la croissance végétative de façon linéaire jusqu'à 78 jours, puis celui-ci stagne jusqu'au stade bourgeons floraux (120 jours). Ce résultat indique un ralentissement de la production de biomasse foliaire en fin de phase végétative. La teneur en SGs (Figure II.3.1C) augmente fortement en début de phase végétative (0 à 22 jours), et reste stable jusqu'à la fin de la phase végétative tardive (91 jours pour les génotypes C, Gawi, Lac4 et Larrère et 78 jours pour le génotype E8), puis diminue fortement suivant le génotype au stade bourgeons floraux. Ce résultat indique que le passage en phase reproductrice impacte fortement l'accumulation en SGs dans les feuilles.

Le rendement en SGs est fortement corrélé à la biomasse foliaire ($r = 0.91$; Figure II.3.2A), et faiblement à la teneur en SGs ($r = 0.44$; Figure II.3.2B) sur l'ensemble des temps de prélèvement. Le rendement en biomasse foliaire et la teneur en SGs ne sont pas significativement corrélés ($p > 0.05$; Figure II.3.2C), traduisant de l'indépendance de ces caractères dans la mise en place du rendement. De plus, la biomasse foliaire sèche explique 83% de part de variance du rendement en SGs, alors que la teneur en SGs ne contribue que pour 11%. Ces deux analyses statistiques confirment l'implication prédominante de la biomasse foliaire dans la mise en place du rendement en SGs. Ainsi, les génotypes Gawi et Lac4 sont les meilleurs producteurs de biomasse et le génotype C est le moins bon producteur à tous les temps de prélèvement de l'étude (Figure II.3.1B).

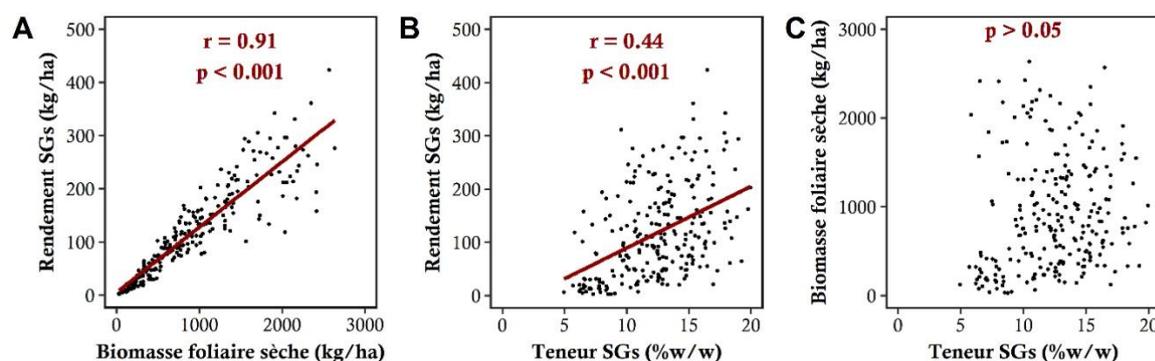


Figure II.3.2. Corrélations entre le rendement en SGs et ses composantes au cours de la croissance de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana*. (A) Rendement en SGs (kg/ha) en fonction du rendement en biomasse foliaire sèche (kg/ha). (B) Rendement en SGs (kg/ha) en fonction de la teneur en SGs (%w/w). (C) Rendement en biomasse foliaire sèche (kg/ha) en fonction de la teneur en SGs (%w/w). Les nuages de points représentent les résultats obtenus pour les 5 génotypes aux 6 dates de prélèvement, soit un total de 260 plants. Le résultat du test de corrélation entre variables est indiqué en rouge par le coefficient de corrélation (r) et la significativité de celui-ci (p). Les droites rouges représentent les corrélations linéaires significatives.

Tableau II.3.5. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes des descripteurs de la canopée pour 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* au cours de la 2^{ème} année de production

Descripteurs de la canopée	Génotype		Temps		Génotype x Temps	
	P	(> Chi ²)	P	(> Chi ²)	P	(> Chi ²)
Rendement feuille (kg/ha)	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	4.44E-11	<i>p</i> <0.001	0.022	<i>p</i> <0.05
Rendement tige (kg/ha)	1.39E-10	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.037	<i>p</i> <0.05
Hauteur (cm)	6.85E-14	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	3.58E-09	<i>p</i> <0.001
Diamètre NS (cm)	0.031	<i>p</i> <0.05	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.0069	<i>p</i> <0.01
Diamètre EO (cm)	0.025	<i>p</i> <0.05	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.0086	<i>p</i> <0.01
Tiges principales (nb/ha)	5.55E-05	<i>p</i> <0.001	4.77E-04	<i>p</i> <0.001	0.29	NS
Densité de tige (nb/m ²)	7.84E-06	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	3.91E-11	<i>p</i> <0.001
Surface (m ² /ha)	0.015	<i>p</i> <0.05	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.041	<i>p</i> <0.05
Volume (m ³ /ha)	1.73E-05	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	1.67E-04	<i>p</i> <0.001
LMR	2.67E-11	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	1.10E-06	<i>p</i> <0.001
SLM (g/m ²)	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	9.70E-05	<i>p</i> <0.001	0.25	NS
SSM (g/m ²)	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	4.65E-16	<i>p</i> <0.001	0.26	NS
SLA (cm ² /g)	6.44E-06	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.0039	<i>p</i> <0.01
SLW g/cm ²	6.25E-06	<i>p</i> <0.001	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.0016	<i>p</i> <0.01
LAI	2.20E-16	<i>p</i> <0.001	0.28	NS	0.0046	<i>p</i> <0.01

3.2 Caractérisation des composantes de la canopée

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à caractériser finement la mise en place de la canopée pour 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de croissance en conditions de production en plein champ. Ces génotypes présentent des morphologies différentes dès les premiers temps de prélèvements (Figure II.3.3A), et qui s'accroissent au cours de la croissance végétative (Figure II.3.3B).



Figure II.3.3. Illustration de la variabilité morphologique de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année de croissance en conditions de production à deux dates de prélèvement. (A) Photos prises le 15 juin 2017 sur la parcelle expérimentale de Liposthey (40, France), correspondant à t=22 jours après prélèvement dans cette étude. Les photos sont à titre indicatif, l'échelle n'est pas respectée. A cette date, la taille des plants variaient entre 25 et 31±3,2 cm. (B) Photos prises le 11 juillet 2017 sur la parcelle expérimentale de Liposthey (40, France) correspondant à t=48 jours après prélèvement dans cette étude. Les photos sont à la même échelle (barre = 10 cm).

A chaque prélèvement, 7 variables sont mesurées: les biomasses sèches foliaires et des tiges, la hauteur et le diamètre des plants, le nombre de tiges principales, et le Specific Leaf Area. Ces variables mesurées ont permis de calculer 8 descripteurs révélant la structure de la canopée : la densité de tige principale, la surface et le volume de la canopée, le Leaf Mass Ratio, le Specific Leaf Mass, le Specific Stem Mass, la surface foliaire et le Leaf Area Index. Ces 15 variables permettent de décrire la mise en place de la biomasse aérienne.

L'analyse de variance de ces descripteurs de la canopée permet de mettre en évidence les facteurs impliqués dans leur variabilité (Tableau II.3.5). Tous les descripteurs de la canopée sont dépendants du génotype.

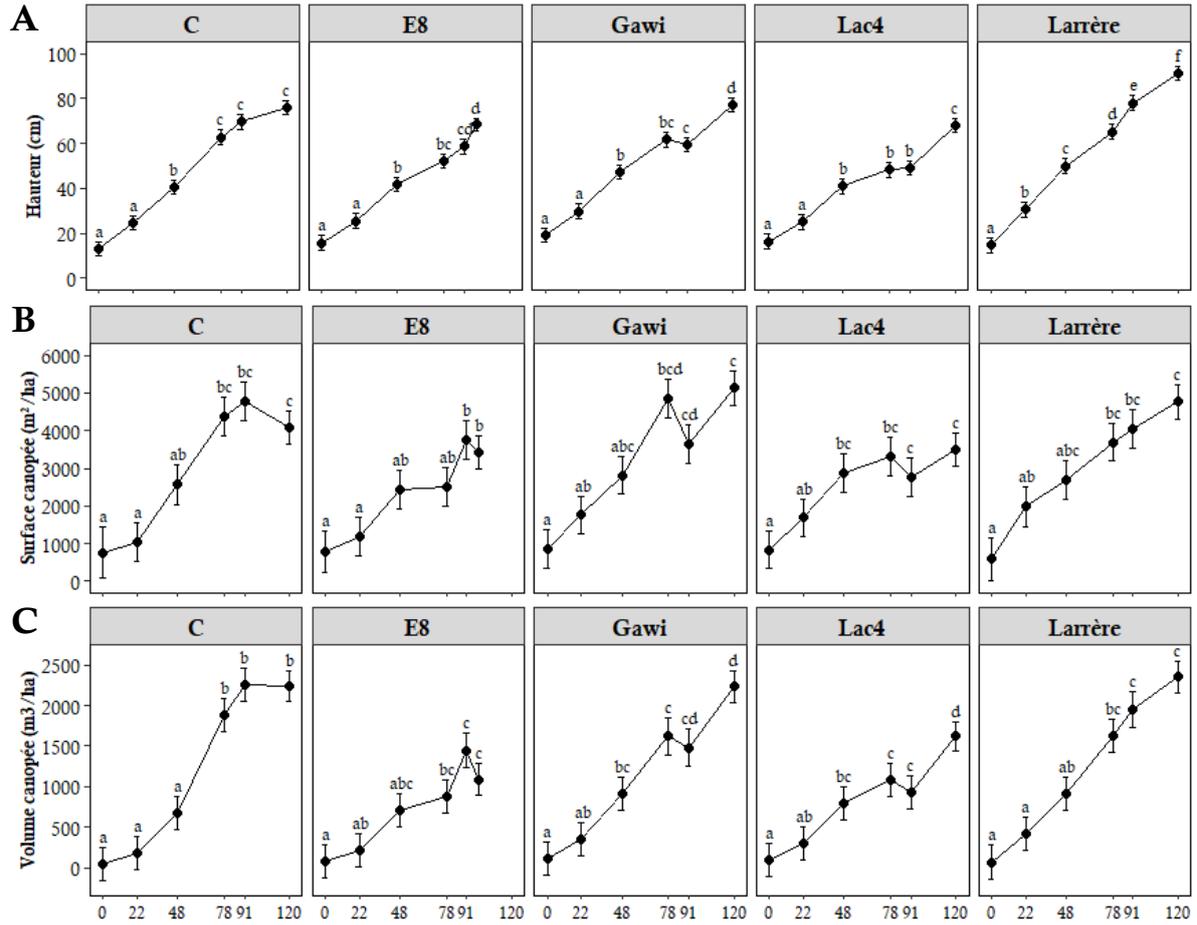


Figure II.3.4. Evolution spatiale de la canopée au cours du développement de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana*. Hauteur (A) et surface au sol de la canopée (B) ont été mesurées pour déterminer le volume de la canopée (C), exprimé en m³/ha. Les résultats montrent les moyennes marginales estimées \pm erreur standard, calculées à partir de 8 réplicats biologiques par génotype et par date. L'abscisse, exprimé en jours, correspond aux dates suivantes : T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 et 120 (30 août et 21 septembre) correspondent au stade bourgeons floraux. Le test de Tukey révèle les différences significatives entre les dates de prélèvements pour chaque génotype. Les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0.05$.

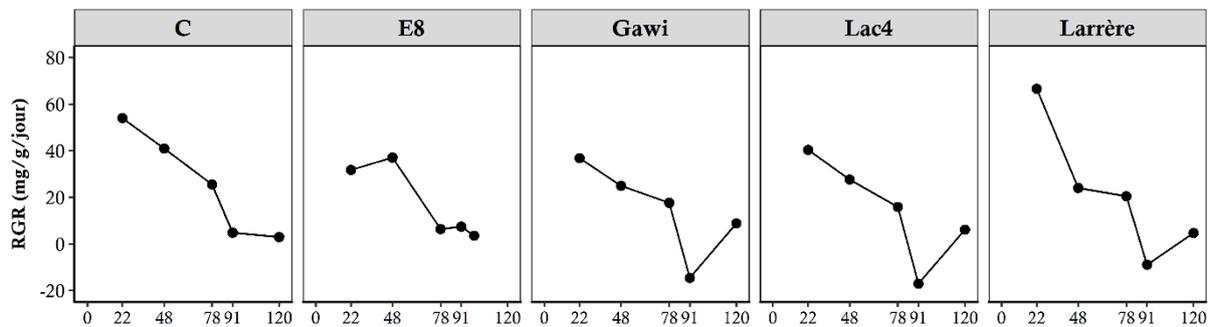


Figure II.3.5. Evolution du taux de croissance relatif (RGR, mg/g/jour) de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* au cours du développement. Les RGR ont été déterminé sur les moyennes de $\ln(\text{MS}_{\text{feuille}})$ entre 2 dates successives.

Le temps de prélèvement influence tous les traits phénotypiques, hormis le LAI ($p > 0,05$). Ce résultat indique que le LAI est génotype-dépendant. Enfin, l'effet non significatif de l'interaction génotype-date de prélèvement pour le nombre de tiges principales, le SLM et le SSM indique que ces traits évoluent de la même manière pour les 5 génotypes au cours du temps. Le reste des variables évoluent en fonction du génotype et son interaction avec le temps de prélèvement.

La progression de la surface au sol représentée par la canopée est variable selon le génotype étudié (Figure II.3.4B). Les génotypes C, Gawi et Larrère révèlent les surfaces de canopée les plus importantes comparés à E8 et Lac4. L'évolution est relativement linéaire chez Gawi et Larrère, alors qu'elle augmente plus lentement pour C, E8 et Lac4. Avant le passage au stade BF, nous observons un ralentissement de la prise de surface au sol.

Le suivi du volume de la canopée, calculé à partir des 2 traits précédents, permet d'observer deux groupes de génotypes (Figure II.3.4C). Les génotypes C, Gawi et Larrère (avec une forte augmentation du volume de la canopée au cours du développement) présentent les canopées les plus volumineuses au stade bourgeons floraux alors que les génotypes E8 et Lac4 les plus faibles. La forte augmentation du volume de la canopée semble principalement due à la capacité de ces génotypes à occuper la surface au sol.

Au cours de la culture, le suivi de la biomasse plante entière permet d'estimer le taux de croissance relatif (RGR) des 5 génotypes. (Figure II.3.5). Entre $t = 0$ et $t = 22$ j, C et Larrère montre un RGR supérieur (54 et 67 mg/g/jour respectivement) comparé à E8, Gawi et Lac4 (entre 31 et 40 mg/g/jour). Ensuite, nous observons une diminution du RGR pour les intervalles de temps suivant pour tous les génotypes. Entre 78 et 91 j après le premier prélèvement, les RGR de Gawi, Lac4 et Larrère atteignent des valeurs négatives, ce qui semblerait indiquer une perte de biomasse aérienne dans cet intervalle de temps. Enfin, entre la fin de la phase végétative et le stade bourgeons floraux, les RGR des 5 génotypes sont les plus bas et relativement équivalents (compris entre 2,8 et 8,9 mg/g/jour).

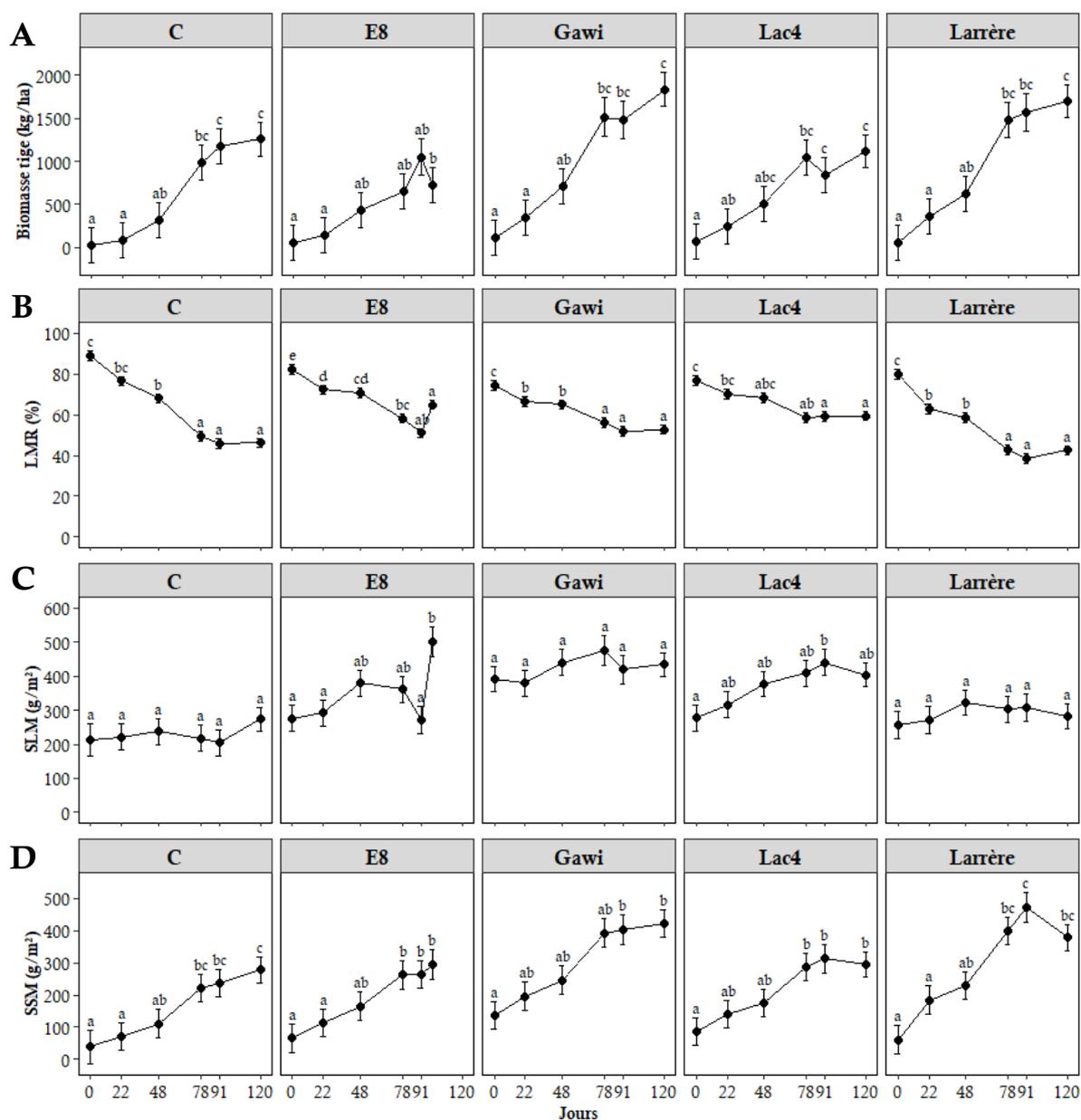


Figure II.3.6. Evolution de la distribution de la biomasse au cours du développement de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana*. (A) Rendement en biomasse de tige sèche, exprimé en kg/ha. (B) Leaf Mass Ratio, exprimé en % de biomasse foliaire par rapport à la biomasse plante entière. (C) Specific Leaf Mass, exprimé en g de biomasse foliaire sèche/m² de surface de la canopée. (D) Specific Stem Mass, exprimé en g de biomasse de tige sèche/m² de surface de la canopée. Les résultats montrent les moyennes marginales estimées ± erreur standard, calculées à partir de 8 réplicats biologiques par génotype et par date. L'abscisse, exprimée en jours, correspond aux dates suivantes : T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 et 120 (30 août et 21 septembre) correspondent au stade bourgeons floraux. Le test de Tukey révèle les différences significatives entre les dates de prélèvements pour chaque génotype. Les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0.05$.

Au sein de la canopée, nous pouvons mettre en évidence la répartition de la biomasse aérienne à travers le LMR (Leaf Mass Ratio), le SLM (Specific Leaf Mass) et le SSM (Specific Stem Mass) (Figure II.3.6). Le LMR est la proportion de biomasse foliaire par rapport à la biomasse aérienne. Le SLM et SSM sont les quantités de biomasse foliaire ou de tige, respectivement, par unité de surface au sol représenté par la canopée. La biomasse sèche de tige (Figure II.3.6A) évolue de la même manière que la biomasse foliaire (Figure II.3.1B), précédemment décrite, et les génotypes Gawi et Larrère sont les plus forts producteurs de tiges (1,8 et 1,6 T/ha). Au cours du développement, le LMR diminue pour tous les génotypes indiquant une diminution de la part de la biomasse foliaire par rapport à la biomasse aérienne (Figure II.3.6B). Les génotypes C et Larrère voient leur LMR diminuer de moitié (90 à 46% et 80 à 43%), tandis que le LMR des génotypes restant diminue entre 17% et 22% seulement. Cette diminution est en accord avec la stabilité ou faible augmentation du SLM au cours de temps, et à l'augmentation significative du SSM (Figure II.3.6C-D). Le génotype C montre la plus faible densité de biomasse foliaire par unité de surface ($SLM \approx 227 \text{ g/m}^2$) et Gawi la plus forte avec en moyenne 423 g/m^2 . Les génotypes Gawi et Larrère montrent les plus forts SSM en fin de croissance ($\geq 380 \text{ g/m}^2$).

Le SLA, indicateur de l'épaisseur des feuilles (Figure II.3.7A), diminue au cours du développement, hormis pour le génotype C pour lequel il reste stable au cours du développement ($\approx 158 \text{ cm}^2/\text{g}$). Cette variable diminue le plus fortement pour les génotypes Gawi et E8 (de 191 à 118 cm^2/g et de 174 à 96 cm^2/g respectivement). En ce qui concerne le LAI, nous ne révélons pas de différences significatives au cours du temps (Figure II.3.7B). Cet indicateur est donc génotype-dépendant. Les génotypes C et Larrère montrent des LAI < 1 contrairement à E8, Gawi et Lac4.

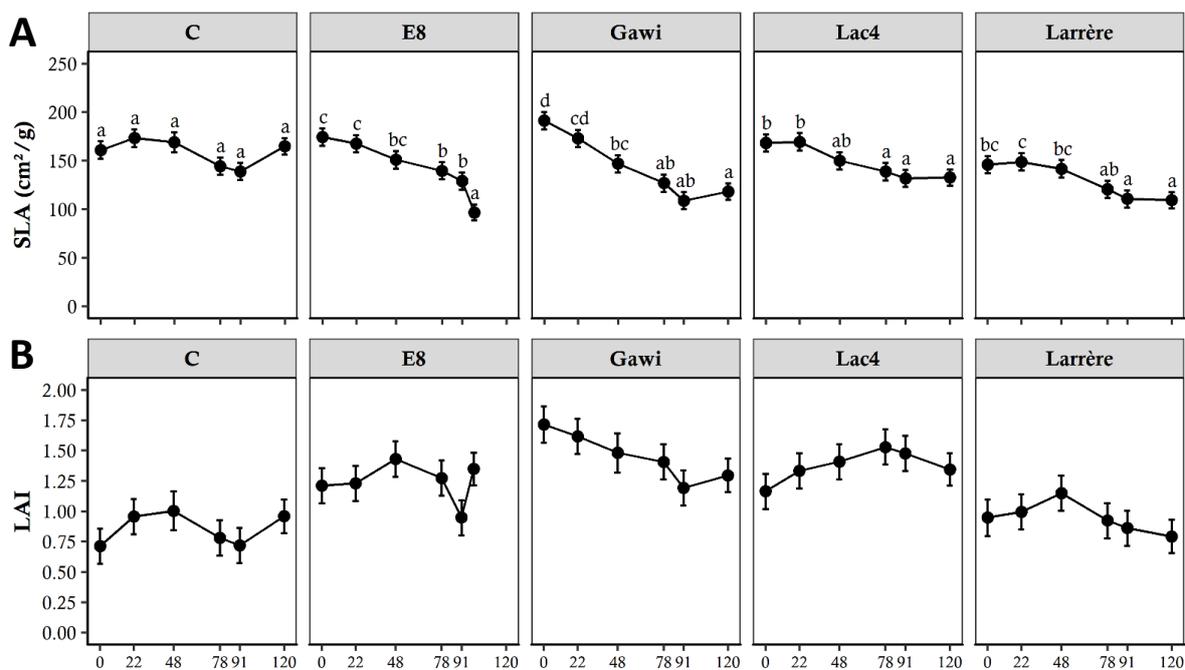


Figure II.3.7. Evolution de composantes de la croissance de au cours du développement de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana*. (A) Specific Leaf Area, exprimé en cm² de surface foliaire/ g de biomasse foliaire sèche. (B) Leaf Area Index, ratio de la surface foliaire du plant par la surface au sol de la canopée. Les résultats montrent les moyennes marginales estimées \pm erreur standard, calculées à partir de 8 réplicats biologiques par génotype et par date. L'abscisse, exprimée en jours, correspond aux dates suivantes : T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 et 120 (30 août et 21 septembre) correspondent au stade bourgeons floraux. Le test de Tukey révèle les différences significatives entre les dates de prélèvements pour chaque génotype. Les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0.05$.

Tableau II.3.6. Table de corrélation entre le rendement en biomasse foliaire et les descripteurs de la canopée. r est coefficient de corrélation de Pearson, P est la probabilité de la significativité de la corrélation linéaire. Les variables sont classées dans l'ordre décroissant du coefficient de corrélation

	Rendement biomasse foliaire (kg/ha)		
	r	P	
Surface foliaire (cm ²)	0.93	9.85E ⁻¹⁰⁹	<i>p</i> < 0.001
Rendement tige (kg/ha)	0.87	1.15E ⁻⁷⁶	<i>p</i> < 0.001
Diamètre EO (cm)	0.80	5.78E ⁻⁶⁵	<i>p</i> < 0.001
Surface canopée (m ² /ha)	0.77	1.50E ⁻⁵⁵	<i>p</i> < 0.001
SSM (g/m ²)	0.73	3.67E ⁻⁴⁶	<i>p</i> < 0.001
Diamètre NS (cm)	0.72	3.75E ⁻⁵⁰	<i>p</i> < 0.001
Volume canopée (m ³ /ha)	0.71	8.53E ⁻⁴⁹	<i>p</i> < 0.001
Hauteur (cm)	0.67	2.58E ⁻³⁹	<i>p</i> < 0.001
SLM (g/m ²)	0.62	2.50E ⁻²³	<i>p</i> < 0.001
Tige (nb/ha)	0.36	9.12E ⁻⁰⁴	<i>p</i> < 0.001
LAI	0.32	1.21E ⁻⁰⁷	<i>p</i> < 0.001
SLA (cm ² /g)	-0.47	5.01E ⁻¹¹	<i>p</i> < 0.001
Densité tige (nb/m ²)	-0.47	1.24E ⁻¹⁵	<i>p</i> < 0.001
LMR (%)	-0.50	9.68E ⁻¹⁹	<i>p</i> < 0.001

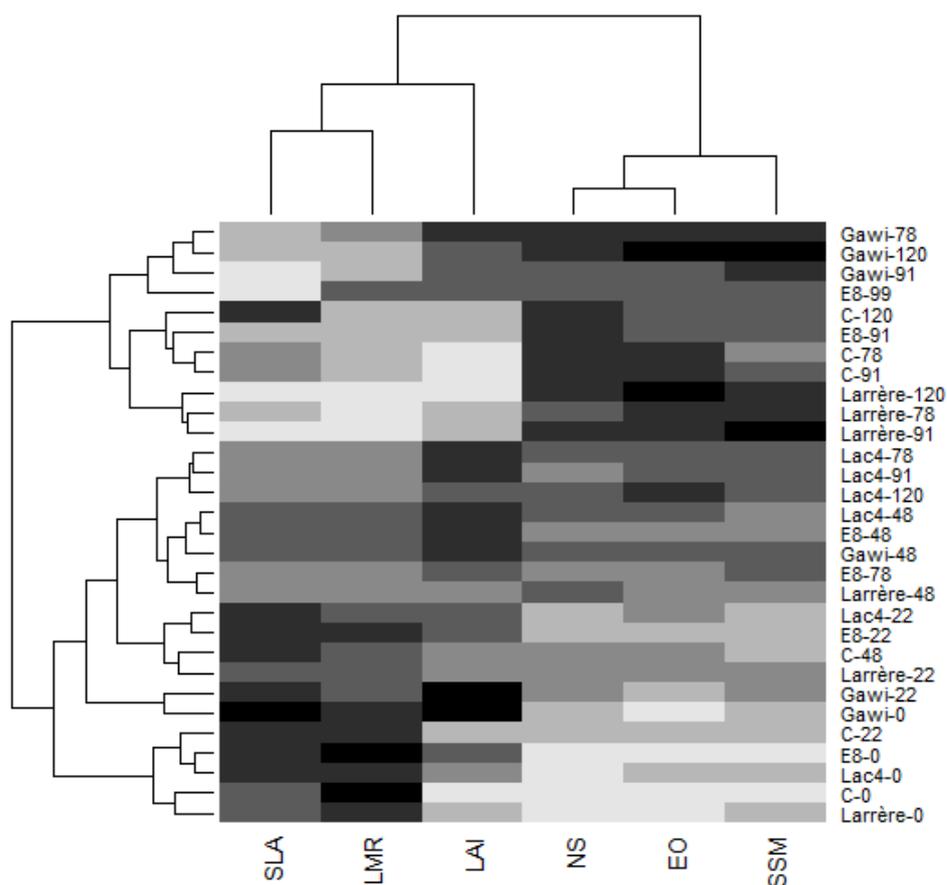


Figure II.3.8. Caractérisation de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* au cours de la 2^{ème} année de croissance selon 6 descripteurs de la canopée. La représentation sous forme de heatmap est obtenue sur la matrice des moyennes marginales estimées pour chaque génotype à chaque date de prélèvement (T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 et 120 (30 août et 21 septembre) correspondent au stade bourgeons floraux). Le gradient de couleur est établi pour chaque variable, avec les valeurs les plus élevées en noir jusqu'aux valeurs les plus faibles en gris clair.

3.3 Identification des descripteurs expliquant la mise en place de la biomasse foliaire

Le rendement en biomasse foliaire est fortement corrélé à sa surface foliaire et au rendement en tige (Tableau II.3.6). Le reste des descripteurs de cette étude montre des corrélations dont le coefficient est $< 0,8$, traduisant des tendances et pouvant être utilisé pour la régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire.

A partir des 12 variables (en excluant la surface foliaire et le rendement en tige), le meilleur modèle linéaire obtenu par sélection exhaustive en fonction du BIC est composé de 6 variables et obtient un coefficient R^2 de 0,95 :

$$y \sim 27.46 a + 33.83 b + 29.75 c + 2.55 d + 250.64 e - 2.40 f$$

Où y est le rendement en biomasse foliaire sèche (kg/ha), a est le diamètre Nord-Sud (cm), b est le diamètre Est-Ouest (cm), c est le Leaf Mass Ratio (%), d est le Specific Stem Mass (g/m²), e est le Leaf Area Index et f le Specific Leaf Area (cm²/g). Ces descripteurs ne montrent pas de colinéarité entre eux (VIF < 6). Ils constituent les variables permettant de décrire la variabilité du rendement en biomasse foliaire au cours du développement.

La représentation sous forme de heatmap permet d'avoir une vue d'ensemble de l'évolution de ces caractères en fonction du génotype et du temps de prélèvement (Figure II.3.8). Ces 6 descripteurs se séparent en 2 catégories avec d'une part le SLA, le LMR et le LAI, et d'autre part les diamètres EO, NS et le SSM. Le SLA et le LMR montrent leur valeur les plus élevées dans les stades précoces du développement (0-22 jours) et diminuent pour atteindre leur valeur les plus faibles en fin de croissance (78-120 jours), contrairement au second groupe de variables. Ces 2 groupes sont en accord avec les corrélations observées entre rendement en biomasse foliaire et surface foliaire puis rendement en tige. Le groupe SLA, LAI et LMR caractérise la surface foliaire tandis que le groupe diamètres et SSM caractérise le rendement en tige.

Dans nos conditions, le génotype produisant le plus de biomasse foliaire est Gawi (2,04 T/ha), suivi du génotype Lac4 (1,45 T/ha). Ces deux génotypes se caractérisent par un SSM et des diamètres élevés, et un SLA et LMR plutôt faibles. Ces caractéristiques sont communes avec le génotype Larrère ou C entre 78 et 120 jours. Cependant Gawi et Lac4 se différencient des autres génotypes grâce à leur LAI plus élevé, c'est à dire une densité de canopée plus dense.

Tableau II.3.7. Table d'ANOVA type II sur modèles linéaires mixtes des proportions en 5 SGs

Facteurs	ST (%)		RebA (%)		RebC (%)		RebF (%)		DulA (%)	
	P (> Chi ²)	p (< Chi ²)	P (> Chi ²)	p (< Chi ²)	P (> Chi ²)	p (< Chi ²)	P (> Chi ²)	p (< Chi ²)	P (> Chi ²)	p (< Chi ²)
G	2.20E-16	p<0.001								
T	2.20E-16	p<0.001	2.20E-16	p<0.001	0.045	p<0.05	0.046	p<0.05	0.000	p<0.001
G x T	1.93E-04	p<0.001	6.77E-05	p<0.001	2.25E-15	p<0.001	5.35E-04	p<0.001	0.709	NS

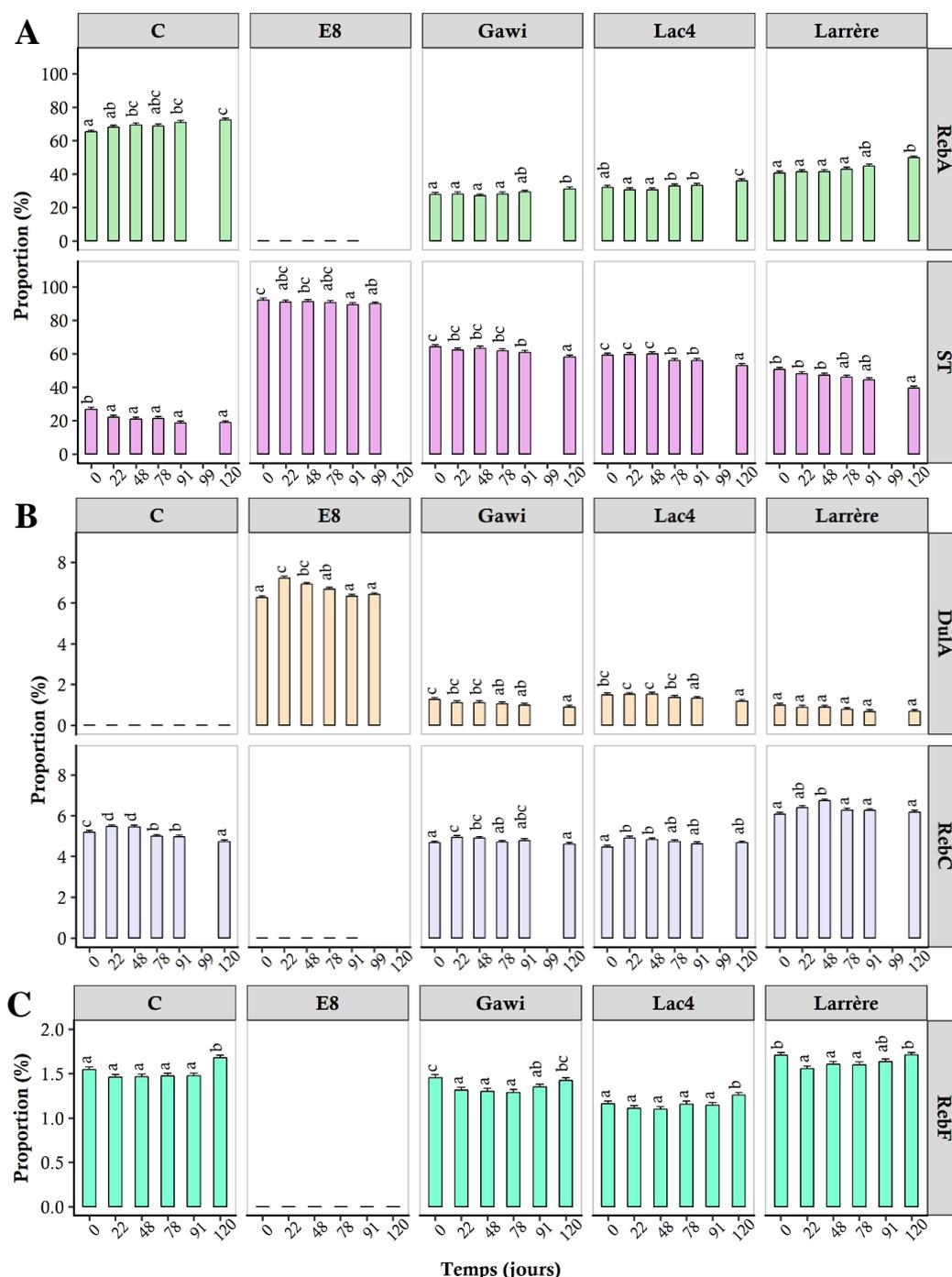


Figure II.3.9. Proportion en 5 SGs majeurs de 5 génotypes de *Stevia rebaudiana* au cours de la 2^{ème} année de production. (A) RebA et ST. (B) DulA et RebC. (C) RebF. Les résultats montrent les moyennes des moindres marginales estimées ± erreur standard, calculées à partir de 8 réplicats biologiques par génotype et par date. L'abscisse, exprimée en jours, correspond aux dates suivantes : T= 0 : 24 mai ; t = 22 : 15 juin ; t = 48 : 11 juillet ; t = 78 : 10 août ; t = 91 : 23 août ; t = 99 : 30 août ; t = 120 : 21 septembre. Le résultat de la comparaison multiple des temps de prélèvement par le test de Tukey est indiqué. Les proportions ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha=0,05$.

3.4 Caractérisation des profils en SGs

L'analyse de variance des proportions des 5 SGs majoritaires révèle un fort effet du génotype, de la date de prélèvement, et de l'interaction entre ces 2 facteurs ($p < 0.001$; Tableau II.3.7). Ce résultat indique que les profils en SGs sont fortement dépendants du génotype et évoluent au cours de la croissance malgré que les variations au cours du temps semblent faibles pour tous les génotypes (Figure II.3.9).

La comparaison multiple des proportions pour chaque génotype révèle des différences significatives en fonction du temps (Figure II.3.9). Les proportions en RebA augmentent (hormis E8 qui n'accumule pas ce composé) et celles de ST diminuent de manières significatives entre $t=0$ et $t=120$ jours pour tous les génotypes. Pour révéler l'amplitude des variations en ST et RebA, nous comparons les coefficients de pente des régressions linéaires de ces proportions en fonction du temps (Tableau II.3.8). Ceux-ci révèlent des différences significatives ce qui signifie que l'amplitude des variations de ces 2 SGs dépend du génotype (Figure II.3.9A ; Tableau II.3.8). Le génotype Larrère montre la plus forte augmentation de la proportion en RebA entre $t=0$ et 120 jours (+9%) et par conséquent la plus forte diminution en ST (-11%). Ces variations sont significativement différentes pour le génotype Gawi, qui montre la plus faible augmentation en RebA (+3%) avec une diminution en ST de -6%. E8, qui n'accumule pas de RebA, est le génotype ayant la plus faible diminution en ST (-2%). De manière étonnante, la pente de régression pour le RebA du génotype C (le plus accumulateur de RebA) est intermédiaire. Hormis pour le génotype Larrère, les variations de proportions sont relativement faibles au cours du temps.

L'évolution des proportions en DulA, RebC et RebF n'est pas linéaire et dépend du génotype. La proportion en DulA de E8 augmente de manière significative durant les temps précoces (22 et 48 jours), puis diminue à 78 jours pour revenir à la valeur initiale à $t=0$ jours. Gawi et Lac4 voient cette proportion en DulA diminuer significativement au cours du temps. La proportion en DulA de Larrère est stable tout au long de sa croissance. Ensuite, tous les génotypes ont leurs teneurs en RebC qui augmentent entre $t=0$ et $t=48$ jours, puis reviennent à leurs valeurs initiales, hormis pour le génotype C pour lequel cette proportion diminue de manières significatives. Les proportions en RebF évoluent à l'inverse de celles du RebC. Cette dernière est stable (C et Lac4) ou diminue de manière significative (Gawi et Larrère) pendant la croissance, puis augmente de manière significative au stade BF ($t=120$ jours). Malgré que ces variations soient significatives, elles restent très faibles voir négligeables à l'échelle du profil en SGs totaux.

Tableau II.3.8. Coefficients de régression linéaire de la proportion en ST et RebA en fonction du temps pour 5 géotypes de *Stevia rebaudiana*. Les lettres représentent le résultat de la comparaison multiple des pentes par le test de Tukey. Au risque $\alpha=0,05$, les pentes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

	ST			RebA		
C	-1.15	± 0.19	ab	1.05	± 0.41	ab
E8	-0.46	± 0.23	b	ND		
Gawi	-0.94	± 0.19	b	0.59	± 0.18	a
Lac4	-1.17	± 0.19	ab	0.80	± 0.18	a
Larrère	-1.77	± 0.19	a	1.54	± 0.18	b

4 Conclusion

Les objectifs de ce chapitre étaient (1) d'identifier les différentes composantes du rendement en SGs au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana*, (2) de décrire finement les variables descripteurs de la biomasse aérienne chez *Stevia rebaudiana*, (3) et d'identifier les caractères phénotypiques décrivant la variabilité du rendement en biomasse foliaire. Pour cela nous avons sélectionné 5 génotypes représentatifs de la population de *Stevia rebaudiana*. Cette étude est la première étude qui identifie de façon détaillée les différentes composantes du rendement en SGs au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana* en plein champ. A travers cette étude (5 génotypes, 6 prélèvements, 14 variables descriptives de la biomasse et l'analyse de la teneur de 10 Sgs), nous montrons que l'évolution du rendement en SGs et ses composantes (biomasse foliaire et teneur en SGs) chez *Stevia rebaudiana* évoluent principalement en fonction du génotype.

4.1 Caractérisation du rendement en SGs au cours de la croissance

Dans cette étude, le rendement en SGs augmente pendant la phase végétative de croissance et atteint son maximum entre 30 et 40 jours avant le stade bourgeons floraux (mi/fin août). Après cette date, le rendement en SGs diminue (C, Gawi, Lac4 et Larère) ou reste stable (E8). Ces résultats différents de ceux obtenus par Barbet-Massin et al. en 2015 où la détermination du rendement pour 3 génotypes à 3 stades de développement (végétatif, bourgeons floraux, floraison) a montré que le stade bourgeons floraux était le stade optimal pour l'obtention des plus forts rendements en SGs. La limitation du nombre de prélèvements dans l'étude de Barbet-Massin et al. en 2015 peut expliquer cette différence de résultats. Dans notre étude, les 6 prélèvements au cours de la croissance permettent un meilleur recouvrement des différents stades de croissance chez *Stevia rebaudiana*. Et dans notre étude, le rendement en SGs maximal est atteint bien avant la formation des bourgeons floraux. Ces résultats soulignent l'importance de connaître le stade de développement de *Stevia rebaudiana* dans les conditions pédoclimatiques de production. Le cycle de développement depuis l'émergence des premières feuilles jusqu'à la sénescence de la plante peut se détailler en de très nombreux stades (stade végétatif précoce, stade végétatif tardif, stade initiation de la floraison, stade bourgeons floraux, stade floraison, stade production de graines, stade sénescence). Le lien qui existe entre développement de *Stevia rebaudiana* et le fonctionnement physiologique voire métabolique de la plante doit être extrêmement fort. Sur le plan scientifique, ces résultats suggèrent de suivre les métabolismes primaires et secondaires conduisant à la formation des SGs en fonction non pas de l'âge temporel de la plante mais plutôt en fonction de l'âge métabolique et fonctionnel.

D'où le besoin à terme de construire un référentiel permettant de décrire facilement les différents stades de développement de *Stevia rebaudiana*. Sur le plan appliqué, ce résultat peut amener à adapter les pratiques culturales en particulier sur la date de récolte de *Stevia rebaudiana* en condition de production.

Dans cette étude nous confirmons que le rendement en SGs est fortement déterminé par le rendement en biomasse foliaire (corrélation positive $r = 0,91$). La production de biomasse foliaire pour les 5 génotypes est non linéaire au cours du temps. En effet, la biomasse foliaire augmente de façon linéaire au cours des 78 premiers jours de l'expérimentation, pour ensuite augmenter plus faiblement ou être stable. Ce résultat indique que la production de biomasse foliaire reste pendant plus de 11 semaines constante et que le ralentissement de la production de biomasse foliaire ne se fait sentir qu'en fin de phase végétative. Ce résultat suggère que bien avant la mise à fleur, la plante initie des changements qui se traduisent par un ralentissement de croissance. Au regard de l'étude portée durant ce travail de thèse, il est impossible de figurer le type de changement mais on peut imaginer que le métabolisme de croissance végétative est en train de se réorienter avec un métabolisme permettant l'initiation des bourgeons floraux. En d'autres termes le métabolisme énergétique et de celui du carbone pourraient être réalloués vers la production de bourgeons floraux. Cette première étude qui caractérise la dynamique du rendement en SGs à travers la biomasse foliaire et la teneur en SGs au cours de la phase végétative de croissance en conditions de production souligne la nécessité de mieux comprendre le lien qui existe entre stade de développement et le fonctionnement métabolique voir cellulaire qui conduisent à l'accumulation de SGs chez *Stevia rebaudiana*.

Malgré une corrélation moins importante entre le rendement en SGs et la teneur en SGs ($r = 0,44$), la stabilité ou la diminution du rendement en SGs au stade bourgeons floraux est principalement due à une forte diminution de la teneur en SGs au stade bourgeons floraux. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Ceunen & Geuns (2013a). Ces auteurs ont caractérisé l'accumulation en SGs en conditions contrôlées avec une photopériode de 16h. Ils montrent que la teneur en SGs atteint son maximum au début de l'apparition des bourgeons floraux, et décroît au cours de leur formation. Ces résultats peuvent s'expliquer par les variations d'expression des gènes spécifiques de la voie des SGs (KA13H et les 3 UGTs) entre la phase végétative et la phase reproductrice (Singh *et al.*, 2017). En effet, les auteurs révèlent une diminution de la transcription des gènes spécifiques de la voie des SGs (KA13H et les 3 UGTs) au moment où la plante passe de la phase végétative à la phase reproductrice.

La comparaison de l'accumulation de SGs dans les feuilles de plants cultivés au champ (notre étude) avec celle de feuilles de plants cultivés en conditions contrôlées (Ceunen & Geuns

2013a) révèle tout de même une dynamique différente au cours de la croissance végétative. Les résultats de Ceunen & Geuns (2013a) montrent une augmentation graduelle au cours de la croissance végétative, alors que nous observons une forte augmentation de la teneur en SGs en début d'expérimentation (t = 22 jours après le premier prélèvement, soit environ 2,5 mois après la reprise de la croissance). Celle-ci reste ensuite stable jusqu'à la fin de la phase végétative. Notre étude est la première qui démontre que la teneur en SGs maximale est atteinte au cours de la croissance végétative en conditions de production, et non pas à l'initiation de la floraison.

4.2 Croissance et traits phénotypiques expliquant la variabilité en biomasse foliaire

La biomasse foliaire est le trait phénotypique prédominant pour l'obtention d'un meilleur rendement en SGs. Nous montrons à travers cette étude que les génotypes Gawi et Lac4 sont les meilleurs producteurs de biomasse foliaire et C le moins bon quel que soit la date de prélèvement. La détermination du taux de croissance relatif (RGR, Relative Growth Rate) pour tous les intervalles de temps de l'expérimentation révèle que les génotypes Gawi et Lac4 ont des RGR plus faibles que le génotype C pour les premiers temps de prélèvement (entre t = 0 et 22 j). Le RGR diminue ensuite pour tous les génotypes pour atteindre une valeur similaire entre la fin de la phase végétative de croissance et le stade bourgeons floraux. La diminution du RGR au cours du développement est cohérente avec l'augmentation de la biomasse (Paine, 2012). Nous pouvons donc supposer que le RGR de Gawi et Lac4 était supérieur avant le premier prélèvement, qui a été réalisé environ 2 mois après le début de la reprise de la croissance sur la parcelle de Liposthey. Ainsi, les résultats obtenus semblent indiquer que le rendement en biomasse foliaire en 2^{ème} année de production est déterminé par la capacité de croissance dès la reprise. Cet aspect n'a pas encore été abordé chez *Stevia rebaudiana*, il serait donc intéressant pour de futures études de réaliser des prélèvements à des temps plus précoces du développement pour déterminer le taux de croissance (RGR) dès la reprise.

Dans cette étude, nous décrivons la mise en place de la biomasse aérienne par la caractérisation de 14 descripteurs. Le rendement en biomasse foliaire est positivement corrélé à la surface foliaire du plant ($r = 0,93$) et au rendement en tige ($r = 0,87$). La régression linéaire multiple du rendement en biomasse foliaire permet d'identifier 6 variables impliquées dans sa variabilité au cours de la croissance de *Stevia rebaudiana* : diamètre Nord-Sud (cm), diamètre Est-Ouest (cm), Leaf Mass Ratio (% biomasse foliaire par rapport à la biomasse aérienne), Specific Stem Mass (g/m^2 , densité de biomasse de tige par unité de surface de la canopée), Leaf Area Index (ratio surface foliaire par surface de la canopée) et Specific Leaf Area (cm^2/g , surface par unité de biomasse foliaire). Ce résultat révèle que le nombre de tiges principales et

la hauteur des plants ne permettent pas d'expliquer le rendement en biomasse, au contraire des conclusions de précédentes études (Buana, 1958; Buana & Goenadi, 1985). Nous démontrons que le SLA et le LMR évolue négativement au cours du développement alors que les diamètres et le SSM évolue positivement pour les 5 génotypes. Le LAI est génotype-dépendant et ne varie pas de manière significative au cours du temps pour chaque génotype. Les génotypes produisant le plus de biomasse foliaire (Gawi et Lac4) se caractérisent par un SSM et des diamètres élevés, un SLA et LMR plutôt faibles, et un LAI supérieur. Ainsi, nous révélons l'impact de la structure de la canopée sur le rendement en biomasse foliaire pour ces 5 génotypes. L'obtention d'un LAI supérieur pour les génotypes produisant le plus de biomasse foliaire et la corrélation négative entre le LAI et le SLA ($r = -0,96$) sont en accord avec les résultats obtenus par Munz *et al.* (2018).

4.3 Evolution de la composition en SGs

Les profils en SGs, définis par la proportion respective de chaque SGs quantifié, sont relativement stables au cours du développement pour les 5 génotypes étudiés. En effet, nous révélons des différences significatives au cours du développement, mais les variations sont très faibles. Les variations les plus importantes sont celles des 2 SGs accumulés majoritairement (ST et RebA). Nous révélons que la proportion de RebA évolue positivement alors que la proportion de ST évolue négativement tout au long de l'étude pour les 5 génotypes. L'amplitude de ces variations est dépendante du génotype. Ce résultat a déjà été observé, se traduisant par une augmentation du ratio RebA/ST tout au long de la croissance en conditions contrôlées (Ceunen & Geuns, 2013a). Cette évolution ne correspond pas avec celle de la teneur en SGs, ce qui signifierait que le déterminisme des proportions en SGs et la teneur en SGs totaux est différent.

– Chapitre 4 –

**Caractérisation de *Septoria* sp. et évaluation
de la réponse de dix génotypes de *Stevia
rebaudiana* vis-à-vis du champignon en
conditions contrôlées**

1 Introduction

Les facteurs d'ordre biotique représentent un des facteurs majeurs pouvant impacter une production en système d'agriculture BIO. Chez *Stevia rebaudiana*, plusieurs agents pathogènes présents sur la culture en production ou en pépinières ont été identifiés à travers le monde. La maladie foliaire la plus fréquemment décrite est la septoriose, causée par le genre fongique *Septoria* sp. (Ishiba *et al.*, 1982; Lovering & Reeleder, 1996; Reeleder, 1999; Bhandari & Harsh, 2006). Les symptômes de nécrose et chlorose occasionnés sur les feuilles par le champignon impactent directement la biomasse foliaire. Les pertes de rendement liées à l'infection par ce champignon n'ont pas été déterminées précisément, mais Reeleder (1999) indique qu'elles pourraient atteindre jusqu'à 50% au Canada chez Stévia. Outre la perte directe de rendement, *Septoria* sp. a la capacité de survivre pendant l'hiver (Reeleder, 1999) ce qui est particulièrement impactant pour une culture pérenne. Dans des essais culturels initiaux, les équipes de la station d'expérimentation INVENIO ont observé des spots nécrotiques entourés de halos chlorotiques en Lot-et-Garonne dès 2014. Ces symptômes concorderaient avec une infection de *Stevia rebaudiana* par *Septoria* sp. La forte incidence présumée et le maintien de l'inoculum au fil des années font de la septoriose une maladie redoutée pour la production BIO de *Stevia rebaudiana*. Dans ce contexte, la lutte génétique, associée à un itinéraire cultural adapté apparaît donc indispensable.

Les travaux de cette thèse ont permis (1) d'isoler et identifier les souches de *Septoria* sp. isolées par leur caractérisation macroscopique, puis moléculaire par une approche de Multiple Loci Sequence Typing (Verkley *et al.*, 2013), (2) de développer un test d'inoculation en conditions contrôlées, et (3) d'évaluer la gamme des réponses à la septoriose en conditions contrôlées pour l'évaluation de la réponse de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* face aux souches de *Septoria* sp. isolées. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Jonathan Gaudin, de l'UMR SAVE (Villenave d'Ornon, France).

Ce chapitre fait l'objet d'une publication scientifique soumise au journal Plant Disease :

2 Characterisation of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for their response to the fungus

C. Hastoy, INRA, Université de Bordeaux, UMR Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France and Oviatis SA, Lacaussade, France; **Z. Le Bihan**, INRA, Université de Bordeaux, UMR Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France and Oviatis SA, Lacaussade, France; **J. Gaudin**, INRA, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, Villenave d'Ornon, France; **P. Cosson**, INRA, Université de Bordeaux, UMR Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France; **D. Rolin** INRA, Université de Bordeaux, UMR Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France and **V. Schurdi-Levraud**, INRA, Université de Bordeaux, UMR Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France.

Corresponding author : V. Schurdi-Levraud

E-mail address : valerie.schurdi-levraud@inra.fr

Keywords

Stevia rebaudiana; *Septoria* sp.; Multiple Loci Sequence Typing; response; controlled inoculation; genotypes screening

GenBank accession numbers for *Septoria* sequences: MH352355, MH352356, MH352357, MH352358, MH352359, MH352360, MH352361, MH352362, MH352363, MH352364, MH352365, MH352366, MH352367, MH352368, MH352369, MH352370, MH352371, MH352372, MH352373, MH352374, MH352375, MH352376, MH352377, MH352378, MH352379, MH352380, MH352381, MH352382, MH352383, MH352384, MH352385, MH352386, MH352387, MH352388, MH352389

Abstract

All over the world, *Stevia rebaudiana* cultivation is developing. *Stevia rebaudiana*, native from Paraguay, accumulates steviol glycosides (SGs) into its leaves. These compounds exhibit a caloric intense sweet taste. Consumer demands for reducing daily sugar intake and for healthy products place *Stevia rebaudiana* production at the crossroad of these demands. Thus the development of sustainable and organic production is needed. *Septoria* leaf spot (SLS) disease caused by *Septoria* sp. is the more frequently and worldwide described leaf disease affecting *Stevia* yield through biomass decrease. The objectives of the research were (1) to characterize morphologically and genetically *Septoria* sp. found into the field in Southwestern France and (2) screen a *Stevia rebaudiana* germplasm from diverse origins through an optimized automated inoculation method under controlled conditions. The five French fungi isolates from the field were identified as belonging to *Septoria* genus. Multiple Loci Sequence Typing allowed to classify the isolates into Subclade 4A established by Verkley et al (2013). They are closely related to *S. lycopersici* and *S. apiicola*. An automated inoculation process was established to screen ten genotypes from different origins. The response to *Septoria* sp. was assessed through visual scoring of symptomatic proportion on whole plantlet, proportion of symptomatic foliar area determined by image analysis and AUDPC calculated from disease proportion scored 12, 15, 18 and 21 days after inoculation. The response of the ten genotypes was shown to be quantitative. We could distinguish moderately susceptible genotypes and highly susceptible ones expressing fast disease progress. Genotypes ranking observed through controlled inoculation was confirmed into the field. This study characterized *Septoria* sp. affecting *S. rebaudiana* in Southwestern France. It provides a useful tool to screen *S. rebaudiana* germplasm. A variability of response to *Septoria* sp. exists in *S. rebaudiana*. This opens the field of breeding strategies for response to SLS and the development of new cultivars for sustainable and organic *S. rebaudiana* production.

2.1 Introduction

Stevia rebaudiana (Bertoni) is an herbaceous perennial plant from the Asteraceae family, native from Paraguay, South America. *Stevia rebaudiana* accumulates steviol glycosides (SGs) into its leaves which exhibit intense and persistent sweet taste, up to 300 times sweeter than sucrose. In Europe and USA, health agencies recommend reducing daily sugar intake in order to limit obesity and diabetes (Carocho, Morales, and Ferreira 2017). *Stevia rebaudiana* and its sweet acaloric molecules constitute therefore a natural alternative to synthetic sweeteners (Carrera-Lanestosa, Moguel-Ordonez, and Segura-Campos 2017). Steviol glycosides were accepted by European Union since 2011 as a food additive (Commission Regulation (EU) 2011). More recently in 2017, dried leaves were also accepted for consumption in Europe (EC 2017). Many national food-based dietary guidelines provide context-specific advice and principles on healthy diets, sane and wellness food. The use of SGs produced by *Stevia rebaudiana* as natural sweetener could play a major role to follow this advice. Thus, *Stevia rebaudiana* production could be at the crossroad of these demands through the development of sustainable and organic production. In France, stevia production has been implemented since 2011 but to move to economically viable organic production, pest management has to be taken into account. In *Stevia* fields, very few pathogens have been described yet. Attention has been paid mainly to fungus diseases directly affecting leaves and thereby yield through biomass decrease. *Alternaria alternata* (Maiti et al. 2007) and *Botrytis cinerea* (Garibaldi et al. 2009), have been described in India and Italy, respectively. But, *Septoria* leaf spot (SLS) disease caused by *Septoria sp.* is the more frequently and worldwide described leaf disease affecting *Stevia*.

Septoria leaf spot (SLS) disease has been described on *Stevia rebaudiana* in Japan (Ishiba, Yokoyama, and Tani 1982), United-States (Lovering and Reeleder 1996), Canada (Reeleder 1999), and more recently in India (Bhandari and Harsh 2006) and in Paraguay (Veia Sanabria and Orrego Fuente 2013). SLS disease is starting with little black or brown spot, surrounded by chlorosis at the plant bottom, on older leaves. Leaves become necrotic, dropped off the plant and the disease progress upward (Reeleder 1999). Extensive study of *Septoria sp.* on other crops gives us knowledge about disease spreading in the field. Conidia of *Septoria tritici* blotch from wheat debris spread the infection vertically up the plant by splash dispersal until it reached the heads (Ficke et al. 2018). For successful infection, it requires moisture on the leaf surface through very wet days (> 10 mm rainfall) or three days with at least 1 mm rain (Fones and Gurr 2015). Rain splash events are also important for epidemic development in tomato, as demonstrated in field trial with *Septoria lycopersici* inoculation (Parker, Nutter, and

Gleason 1997). Authors determined disease progress into the field from 0.3 to 1.3 m/day and disease severity revealed a rapid rate for the development of SLS (Parker, Nutter, and Gleason 1997). In Northern Germany, the average temperature of 13°C, leaf wetness of 92% and precipitation of 0.4 mm per day was observed 20 days before epidemic outbreaks on wheat (Henze et al. 2007). Increasing temperature led to a decrease of latent period, corresponding to the period between the infection and symptoms appearance (Henze et al. 2007).

Stevia rebaudiana is a semi-perennial herb and could be cultivated during 5-6 years (Andolfi, Macchia, and Ceccarini 2006). *Septoria* sp. inoculum in Canada can persist overwinter through *Stevia* leaves buried or left on the soil (Reeleder 1999). In mild climates, *Septoria* sp. represents a real threat to *Stevia* crops due to overwinter capacity and spreading with rain events, leading to potential direct yield losses estimated at 50% of destroyed foliage for susceptible cultivars in Canadian experiments (Reeleder 1999). Chemical control through field treatments are efficient but not sustainable (Angelini et al. 2018; Koehler and Shew 2018). In order to avoid over the application of fungicides, simulation modelling to predict disease epidemics constitutes a key approach and has been set up in wheat (Savary et al. 2015; Pietravalle et al. 2003). Several cultural practices aiming at limiting *Septoria* spread are also recommended (Angelini et al. 2018). Irrigation and residue management appear, in particular, to be key factors to control the disease (Ficke et al. 2018). A complementary major approach is to improve crop resistance to pathogens through breeding (van Bueren et al. 2011). *Stevia rebaudiana* breeding is poorly published. Yadav et al (2011) reviewed breeding programs mainly developed in Canada, USA, Malaysia, China, Japan and India. All these breeding programs were focused on total SGs content and biomass production but none of them seemed to take into account response to pathogens (Yadav et al. 2011). Therefore, there is an urgent need to identify sources of resistance or tolerance in *Stevia rebaudiana* germplasm to develop resistant or tolerant cultivars to these diseases.

The objectives of the research reported below were to characterize phenotypically and genetically the pathogen found into the field in South Western France and screen a *Stevia rebaudiana* germplasm from diverse origins through an optimized inoculation method under controlled conditions.

Abbreviations

AUDPC: Area Under the Disease Progress Curve; DAI: Days After Inoculation; DP: Disease proportion; PSLA: Proportion of Symptomatic Leaf Area; SLS: Septoria Leaf Spot

Table 1. Genetic resources of *Stevia rebaudiana* studied for their response to *Septoria* leaf spot disease through controlled inoculation. Names with * indicate that these genotypes have also been evaluated into the field through natural infection

Provider	Country of the provider	Name	Year of Obtention	Origin
EUSTAS gene bank	Germany	C*	2016	Colombia
		Gawi*	2016	Unknown
STEVIA STORE	Paraguay	Eirete	2015	Paraguay
OVIATIS collection	France	E161718*	2011	Argentina
		E8*	2011	Argentina
		EspLac1*	2013	Spain
		FP	2011	Argentina
		S6030-1*	2015	Israel
		Lac4*	2013	Argentina
		Larrère*	2013	Argentina

Table 2. Isolated strains of *Septoria* genus in field conditions on *Stevia rebaudiana*

Current name	Strain Identification	Year of isolation	Location
<i>Septoria sp.</i>	Sep-14-LIV	2014	Ste-Livrade-sur-lot, France
	Sep-15-LIP	2015	Liposthey, France
	Sep-16-LIV	2016	Ste-Livrade-sur-lot, France
	Sep-17-LIV	2017	Ste-Livrade-sur-lot, France
	Sep-17-LIP	2017	Liposthey, France

2.2 Materials and methods

2.2.1 Materials

2.2.1.1 *Stevia rebaudiana* genotypes

Ten *Stevia rebaudiana* genotypes used in these experiments were chosen from different providers and different origins when known (Table 1). Attention was paid to use clones coming from cuttings and to integrate in the study genotypes that have been phenotyped for SGs yield elsewhere as EUSTAS collection genotypes and “Eirete”.

2.2.1.2 Fungus strains

Diseased leaves samples were collected in farms and experimental fields in Liposthey (44°17'56.9"N 0°53'14.7"W) and Sainte Livrade-sur-Lot (44°25'43.6"N 0°36'53.6"E), France, during four years, leading to 5 sampled strains (Table 2).

2.2.2 Methods

2.2.2.1 Isolation of the *Septoria* sp.

Monitoring experimental and production fields in the South-west of France started in 2014. Diseased leaves of *Stevia rebaudiana* were collected from Liposthey and Sainte-Livrade-sur-Lot fields (France) and incubated at room temperature for 48h in a moist chamber, corresponding to a Plexiglas box with moistened paper in order to promote pathogen development. Strains were isolated by spreading exudate from sporulating pycnidia on MacConkey medium (MacConkey 1905). Cultures were incubated in growth chamber at 22°C with 12h photoperiod.

2.2.2.2 Morphological characterization of *Septoria* sp. and validation of Koch's postulates

For morphological characterization of each strain, mature pycnidia with exuded conidia were removed and placed on a microscope slide with cotton blue (lactic acid with blue methylene) and were observed under microscope (Olympus BH2 series, OSI, France). Validation of Koch's postulates is described in Fig S1.

2.2.2.3 Genotypic characterisation through Multiple Loci Sequence Typing

DNA extraction. Conidia from sporulating pycnidia were spread on cellophane film above OAC medium (Oat-Agar-Chloramphenicol). Cultures were incubated for 10 days at 22°C with 12h photoperiod. Pycnidia and sterile mycelium were harvested and transferred in Eppendorf tubes.

Table 3. Primers used in this study for the classification of *Septoria* species isolated on *Stevia rebaudiana* in field conditions as described by (Verkley *et al.*, 2013)

Locus	Name of the Primer	Primers Sequences (5' to 3')	Orientation	Annealing temperature (°C)
EF-1 α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Forward	52
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	Reverse	
β -TUB	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	Forward	52
	β -Sandy-R	GCRCGNGGVACRTACTTGTT	Reverse	
RPB2	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Forward	49
	fRPB2-414R	ACMANNCCCCARTGNGWRTRTG	Reverse	
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Forward	52
	ACT2Rd	ARRTCRCGDCCRGCCATGTC	Reverse	
CAL	CAL-235F	TTCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTT	Forward	50
	CAL2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	Reverse	
LSU	LSU1Fd	GRATCAGGTAGGRATACCCG	Forward	52
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Reverse	
ITS	ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Forward	52
	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse	

Materials were frozen at -80°C and lyophilised in a freeze-dryer overnight (Alpha 1-4 LDplus, Christ, Germany). Dried tissue was grounded twice for 30 s by glass balls with a grinder (TissueLyser II, Qiagen, France). Resulting powder was extracted by adapted CTAB method (Zolan and Pukkila 1986). 2 µL of extract were used to quantify DNA amount by a spectrophotometer Epoch (BioTek, USA). For each isolated strain, DNA concentration was adjusted at 10 ng/µL and 200 ng/µL for PCR.

PCR amplification and sequencing. *Septoria* species identification followed the protocol described in Verkley et al. (2013) using sequences of 7 loci: actin, calmodulin, β-tubuline, internal transcribed spacer, Translation elongation factor 1-α, 28S nrDNA and RNA polymerase II second largest subunit. Primers are listed in Table 3. PCR amplification was performed in a final volume of 15 µL, containing 20 ng of extracted DNA (or 400 ng only for RPB2 amplification), 1X Buffer DyNAzyme, 0.2 mM of mixed dNTPs, 0.4 µM of each primer and 0.5 U/µL of DyNAzyme II (Thermo Scientific™). PCR amplification steps were: an initial denaturation of 2 min at 94°C followed by 40 cycles at denaturation temperature of 96°C for 45 s, primer annealing at the temperature in Table 3, elongation at 72°C for 90 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. For ACT and RPB2 loci, 40 cycles were separated in 2 phases, differentiated for annealing step. For 10 first cycles, primer annealing started at annealing temperature + 10 °C and temperature was reduced by 1 °C per cycle, for 30 s. For 30 remaining cycles, primer annealing was at the temperature in Table 3 for 30 s. PCR amplification were realized twice and the resulting fragments were sequenced by GENEWIZ (USA) with forward and reverse primer.

Sequence alignment and phylogenetic analysis. Sequence alignment and phylogenetic analysis followed the method developed by (Verkley et al. 2013). Basic alignment of our isolates sequences was first done with the complete sequences of the seven loci found in Genbank using MAFFT v.7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) for each locus. MEGA 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016) was used to build the tree with concatenated sequences by the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The test of phylogeny was done through bootstrap test (1000 replicates). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura, Nei, and Kumar 2004).

2.2.2.4 Screening of *Stevia rebaudiana* response

Inoculum production. The strain Sep-15-LIP was selected for the evaluation of *Stevia rebaudiana* response. The strain was maintained on MAC medium at 4°C. Conidia from sporulating pycnidia were spread on numerous solid OAC medium (Oat-Agar-Chloramphenicol). Cultures were incubated at 22°C with 12h photoperiod during 3 weeks.

Conidia were harvested by adding sterile distilled water, breaking pycnidia with Pasteur pipette and agitating by hand. Total resulting suspension was filtered at 450 µm for discarding pycnidias. Conidia enumeration was made on Malassez cell. Inoculum concentration was adjusted at 10⁵ conidia/mL and Tween 20 was added at 0.01% for plantlet inoculation.

Plant production for controlled inoculation. For the evaluation of *Stevia rebaudiana* susceptibility in controlled conditions, the ten selected genotypes were propagated by stem-cuttings from mother plants in greenhouse. Stem-cutting were placed in commercial plug trays containing Peltracom soil (Greenyard Horticulture France SAS), without nutrient supply. Plantlets were grown in greenhouse conditions under 15h photoperiod for 4 weeks, with variable temperatures according to time: 6h-9h: 18°C, 9h-18h: 22°C, 18h-21h: 20°C, 21h-6h: 16°C. Axillary meristems were removed during vegetative growth in order to avoid secondary ramifications. Then, plantlets were placed in non-regulated greenhouse and were transplanted in pots 10 cm x 10 cm after 5 weeks of growing. Six weeks old plantlets were used for inoculation.

Inoculation in pulverization chamber. Fixed pulverization chamber was used for inoculation of *Stevia rebaudiana* genotypes by *Septoria* strain Sep-15-LIP (Euro-pulvé, Aspach, France) (Fig S2). Parameters of pulverization chamber were set to 4 second of pulverization with flow rate of 1.8 L/min and pressure at 3 bars. To ensure homogeneity of the spray pattern, 5 spray nozzles were used and maximum 10 plants (1 plant per genotype) were arranged in staggered file in the middle of pulverization chamber. Automatic spray allowed to runoff point on whole plants. A total of 16 plants per genotypes were sprayed with prepared inoculum, and 4 control plants per genotype were sprayed with sterile water. Inoculated plants were air dried and transferred to growth chamber. Inoculation was reproduced 3 times during spring 2017. After each inoculation series, pulverization chamber system and walls were washed out by sterile water and clean up by ethanol 70% (w/w). Spray nozzles soaked in ethanol 70% overnight.

Experimental design in growth chamber. Plants were placed in isolated growth chamber with a 400W sodium lamp for 21 days at 20-25°C, 16 h photoperiod and a high hygrometry level. Growth chamber was arranged into five randomized blocks of 10 genotypes, corresponding to Plexiglas cage with water placed in the bottom. Sterile distilled water was sprayed on Plexiglas walls to promote leaf wetness. One block was dedicated to control plants, firstly sprayed and immediately transferred in growth chamber in order to avoid contamination. Inoculated plants were distributed into four remaining blocks. Plants were sub irrigated every 5 days during experiment.

Evaluation of *Stevia rebaudiana* response. Disease development was assessed at 12, 15, 18 and 21 days after inoculation. Disease severity of *Stevia rebaudiana* genotypes under controlled conditions was scored as the disease proportion (DP; necrosis and chlorosis) among whole plant (%). Visual scoring allowed to characterize symptoms development according to genotypes. These 4 times notations allowed to calculate AUDPC (Area Under the Disease Progressive Curve), as follow (Jeger and Viljanen-Rollinson 2001) with $\{x_i\}$ measures of the disease level and t the sample time points in a sequence $\{t_i\}$:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i)$$

At 21 DAI, in order to obtain precise and quantitative response in controlled conditions, leaves from inoculated plant were separated for scanning in color at 300 dpi with an Epson Expression 1640 XL flatbed scan. Resulting scans were analyzed with the software ImageJ (version 1.51). Total foliar area was detected through images transformation in binary, where whole leaves were automatically detected. Selection of symptomatic area was done on colored images by color threshold with hue between 0-47, saturation between 37-255 and brightness between 0-204. These settings allowed to select necrotic and chlorotic part of leaves, according to their color (Figure 1). Symptomatic foliar area was measured and reported in cm². Disease severity was calculated as the proportion of symptomatic leaf area (PSLA) among foliar area (%).

Field evaluation. *Stevia rebaudiana* susceptibility in the field was evaluated through natural infection. A field experiment was implanted in 2016 on a site with high disease pressure in a private farm at Liposthey (44°17'56.9"N 0°53'14.7"W), South West, France as described in Hastoy et al. (2016). In 2017, natural infection occurred between end of July and mid-August. Disease severity was noted once as the disease proportion (DP; necrosis and chlorosis) in terms of whole plant %. Twenty plants of 8 genotypes (Table 1) were scored at flower budding stage the 21th September 2017.

2.2.2.5 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software R version 3.4.3 (R Core Team 2015; Mangiafico 2015). Complete data frame of inoculated plantlets in controlled conditions was cleaned by deleting outliers according to Bonferroni test on Studentised residuals of linear model, from the package “car” (Fox and Weisberg, 2011). Analysis of variance were applied on mixed linear model by using package “lme4” (Bates et al. 2015) and “car” (Fox and Weisberg 2011):

$$lmer(y \sim A + (1|B) + (1|C) + (1|A:B) + (1|A:C) + (1|B:C) + (1|A:B:C))$$

Where y is the quantitative response, A is fixed effect (genotype or time after inoculation), B and C are random effects (inoculation, randomized block and their interaction).

Estimated Marginal Means and standard errors were calculated from mixed model and significant differences between genotypes were determined by Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test from the package "emmeans" (Russell, 2018). Significant differences on symptoms development according to time were analyzed through pairwise comparison of regression slope with the package "emmeans" (Russell, 2018). For data representation, packages "ggplot2", "cowplot", "extrafont" were used (Chang 2014; Wickham 2009; Wilke 2017).

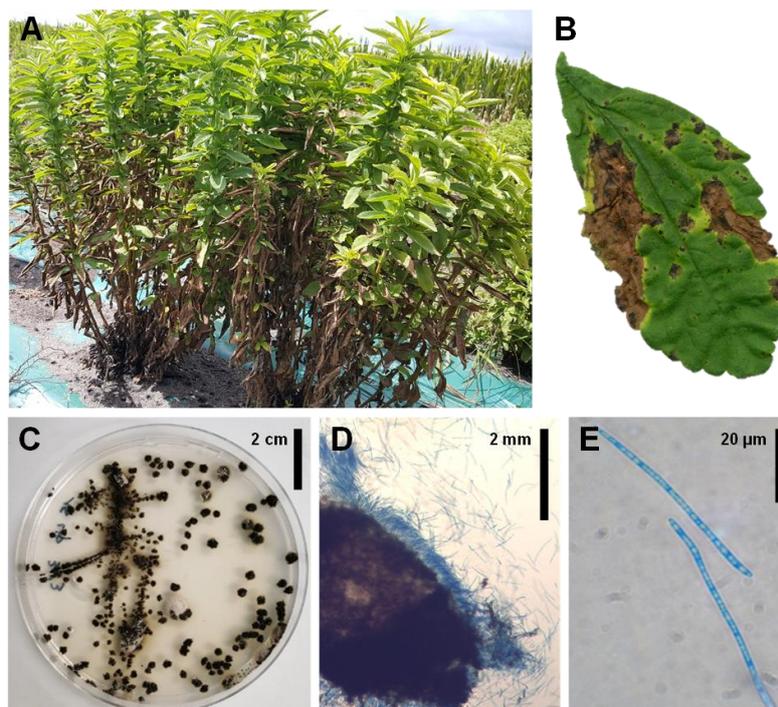


Figure 1. Identification of *Septoria* leaf spot disease on *Stevia rebaudiana* in the South West of France. (A) Symptoms in field conditions in Liposthey (France). (B) Symptomatic leaves after 48 h of incubation in humidity chamber (C) Strain aspect on Murashig & Skoog medium. (D) Characteristic brown pycnidia and (E) conidia of the genus *Septoria*.

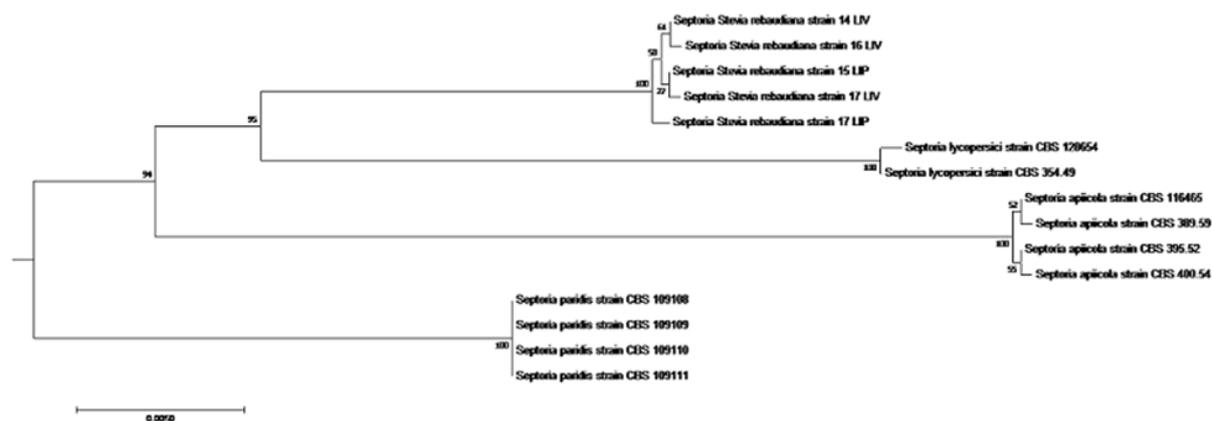


Figure 2. Phylogenetic classification of *Septoria* strains isolated on *Stevia rebaudiana* in France through Multiple Loci Sequence Typing. Subclade 4A established by Verkley et al (2013) is represented. The tree was obtained on concatenate sequences of 241 *Septoria* strains for 7 loci (Fig S3). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura *et al.*, 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 3521 positions in the final dataset. The analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

2.3 Results

2.3.1 Characterization of *Septoria* sp. present in France on *Stevia rebaudiana*

In field experiment, black leaf spots with surrounding chlorosis were observed at the plant bottom and progressed to the top (Figure 1 A-B), corresponding to symptoms previously described as SLS disease on *Stevia rebaudiana* (Veia Sanabria and Orrego Fuente, 2013; Ishiba, Yokoyama, and Tani 1982; Bhandari and Harsh 2006; Reeleder 1999; Lovering and Reeleder 1996). Morphological observations of isolated strains allowed to identify *Septoria* genus (Figure 1 C-E). They produced black and spherical pycnidia, containing hyaline and threadlike pycnidiospora of 55 to 60 μ m x 2 μ m corresponding to partitioned conidia, linked to pycnidia by conidogenous cells. These morphological characteristics correspond to *Septoria* genus (Quaedvlieg et al. 2013). The teleomorph was not observed.

2.3.2 Phylogenetic classification of *Septoria* strains through Multiple Loci Sequence Typing

Multiple Loci Sequence Typing approach give the highest species resolution of the genus *Septoria* (Verkley et al. 2013). Based on this previous study, the 5 isolated strains (Table 2) were sequenced for 7 specific loci and were compared to 241 *Septoria* isolates (Fig. S3). Phylogenetic analysis allowed to classify our isolated strains among the clades of *Septoria* spp. described by Verkley et al (2013). Thus, we confirmed by DNA-based approach that isolated strains on *Stevia rebaudiana* belong to *Septoria* genus. Then, the 5 French isolates are related to subclade 4A (Figure 2). This subclade contains strains of miscellaneous host plants: *Septoria lycopersici* (Solanaceae), *S. paridis* (Trilliaceae and Violaceae) and *S. apiicola* (Apiaceae). On the basis of MLST analysis, it could be concluded that French *Septoria* sp is closely related to *S. lycopersici* and *S. apiicola*. Despite different field origins and year of isolation, the 5 French isolates appear to be phylogenetically very close.

2.3.3 Evaluation of *Stevia rebaudiana* response to *Septoria* in controlled conditions

Response of ten *Stevia rebaudiana* genotypes to *Septoria* strain 15-LIP was characterized by 3 independent automated inoculations. Control plants inoculated with sterile water did not shown any symptom during experiments, confirming that *Septoria* strain was responsible for symptoms appearance. Little black spots appeared around 10 days after inoculation and grew up, turned on necrosis surrounded by tiny chlorotic halo during experiment.

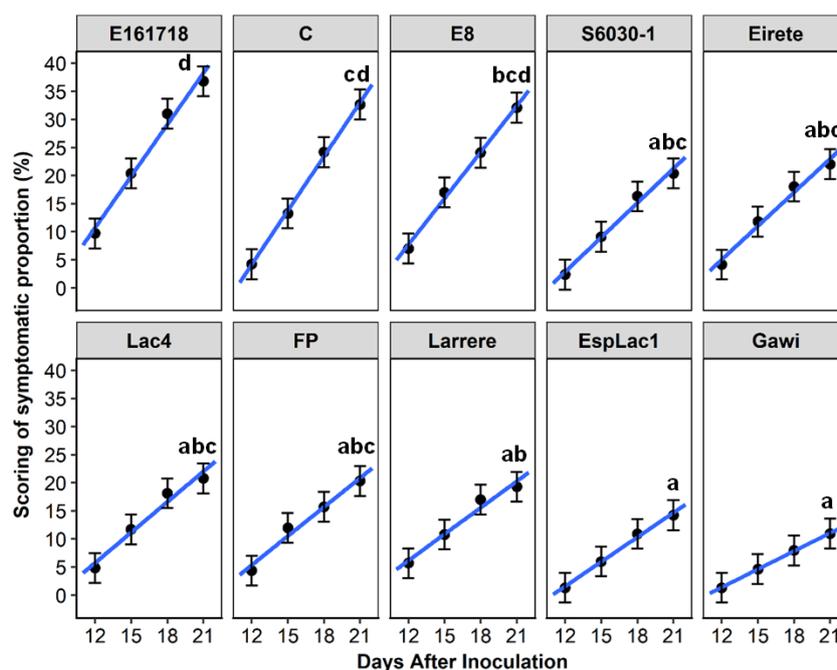


Figure 3. Evolution of *Septoria* leaf spot disease between 12 and 21 days after inoculation on 10 genotypes of *Stevia rebaudiana* after inoculation in controlled conditions. Evolution is revealed by visual scoring of symptomatic proportion on whole plantlet. Results shows Least-Squares Means of 16 plants, repeated 3 times, with standard error, according to time after inoculation. Blue line represents linear mixed model regression. Black letters show the result of multiple comparison at 21 DAI. Symptomatic proportion at 21 DAI with same letter are not significantly different at $P = 0.05$ level.

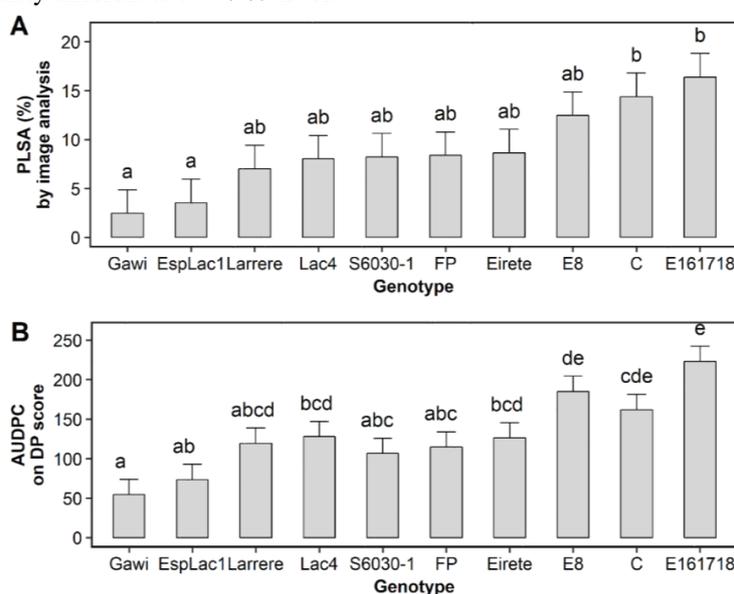


Figure 4. Evaluation of 10 *Stevia rebaudiana* genotypes response in controlled conditions to *Septoria* strain from Southwestern France. (A) Proportion of Symptomatic Foliar Area (PLSA) at 21 DAI, calculated by image analysis. (B) AUDPC calculated from scoring Disease Proportion (DP) at 12, 15, 18 and 21 DAI. Results represent Estimated Marginal Means of 16 plants, repeated 3 times, with standard error. Result of multiple comparison by HSD's Tuckey test and same letter shows no significant difference at $P = 0.05$ level.

At 12 DAI, all tested genotypes were symptomatic, indicating absence of complete resistance into this collection (Figure 3). Analysis of variance for DP score revealed a strong effect of genotype since the first notation ($P < 0.001$; Table S1). At 12 DAI “Gawi” and “EspLac1” were the least symptomatic with less than 5% of the plant being symptomatic. They were significantly different from “E8” and “E161718”, with the highest symptomatic proportion from 5 to 10%. At 21 DAI, “Gawi” and “EspLac1” remain the less susceptible genotypes with less than 10 to 15% of the plants affected, whereas “E161718”, “E8” and “C” appear to be the more susceptible ($P < 0.05$; Figure 3) reaching 50% of symptomatic proportion.

As visual scoring is coarse and can be researcher dependent, we completed the scoring with precise symptomatic foliar area proportion (PSLA) quantification by image analysis at 21 DAI (Figure 4A). Analysis of variance confirmed the genotype effect ($P < 0.001$; Table S1). Genotype ranking was not different between visual scoring and image quantification. Multiple comparison showed only significant difference between the most susceptible genotypes “E161718” and “C” genotypes and the less susceptible ones, “Gawi” and “EspLac1”. PLSA quantification led to lower scores. The susceptible genotypes are scored around 15 % area covered by symptoms whereas the less susceptible express only 3 % of symptomatic part (Figure 4A).

In order to assess the disease evolution according to the genotype, DP were scored between 12 and 21 DAI. It appeared to be linear according to time and regression slopes were significantly different according to the genotype ($P < 0.05$). Multiple comparison on linear regression showed two extreme type of response (Table S2). Highest slope coefficients correspond to faster symptom development in our conditions. This was the case for “E161718”, “C” and “E8” genotypes. The symptoms developed in a slower way in “Gawi”, “EspLac1”, “Larrere” and “FP” genotypes.

AUDPC was calculated from DP scores 4 times after inoculation (Figure 4B). It confirmed that “E161718”, “C” and “E8” genotypes present the faster disease progress and the interesting behavior of “Gawi” and “EspLac1”.

2.3.4 Evaluation of *Stevia rebaudiana* response into the field under natural infection

Scoring of symptomatic proportion occurred at harvesting, at the end of September. Analysis of variance revealed a strong genotype effect ($P < 0.001$; Table S1). Genotype ranking was not different between controlled experiment and response into the field. Into the field, “Gawi” and “EspLac1” are the less susceptible whereas “E161718”, “C” and “E8” are the more susceptible. However, field conditions led to globally higher disease scores than in

controlled conditions (Figure 5). The susceptible “E161718” expressed a symptom proportion of 35-40% and 50% in controlled and field conditions respectively. The less susceptible genotype “Gawi” expressed 10% and 20% symptom proportion in controlled and field conditions respectively.

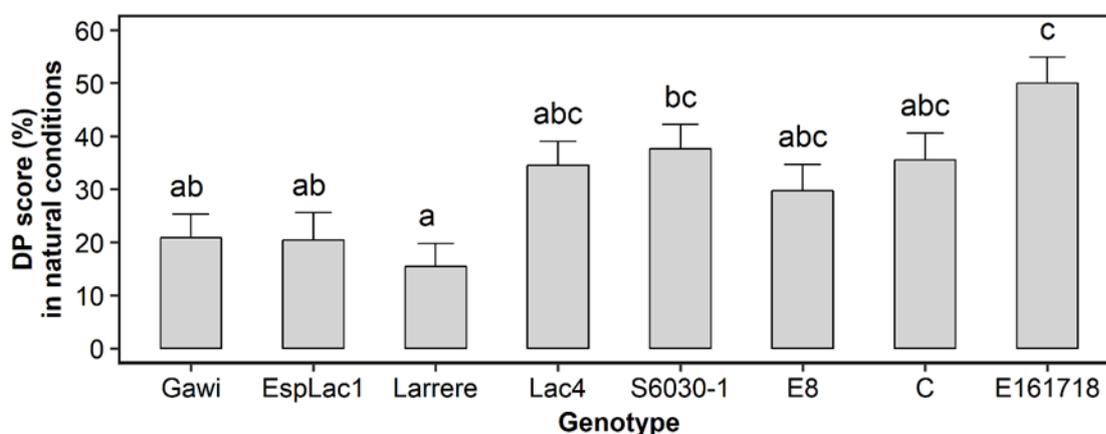


Figure 5. Evaluation of eight *Stevia rebaudiana* genotypes response against *Septoria* strain in the field at Liposthey (France) in September 2017 after natural infection. Disease Proportion (DP) scores were determined at flower budding stage. Results shows Estimated-Marginal Means of between 15 and 24 plants per genotype, distributed on 4 randomised blocks, with standard error. Result of multiple comparison by HSD's Tuckey test and same letter shows no significant difference at $P = 0.05$ level.

2.4 Discussion and conclusion

This the first report of *Septoria* leaf spot (SLS) disease on *Stevia rebaudiana* in France, caused by *Septoria* sp.. Disease presence on remote sites in France and the persistence of *Septoria* isolates on crops and debris over years (Ficke et al. 2018; Reeleder 1999) show the urgent need to find a durable solution for sustainable and organic semi-perennial production of *Stevia rebaudiana*.

In accordance with the fact that no teleomorphs are known on Asteraceae (Verkley and Starink-Willemse 2004), we only observed anamorphs. MLST approach allowed us to classify precisely the French *Septoria* strains isolates. They are phylogenetically related to subclade 4A of the genus *Septoria* (Verkley et al. 2013) containing miscellaneous host plants (Solanaceae, Apiaceae, Violaceae, Trilliaceae and here Asteraceae). Commonly, the host specificity was the principal criterion for species delimitation into this genus. Thus, strains previously identified on *Stevia rebaudiana* was named *Septoria steviae*, as current name (Ishiba, Yokoyama, and Tani 1982). However, host occurrence should not be used as the only character for species identification (Verkley et al. 2013). Extensive infection demonstrated that many *Septoria* spp. could infect multiple plants species within the same genus, but also allied families and genera (Beach 1919; Teterevnikova-Babayana 1987; Quaedvlieg et al. 2013). More recently, multiple family-associations for a single species was confirmed by DNA-based approach (Verkley et al. 2013). Consequently, it was expected that a certain number of previously described taxa are synonyms of species (Quaedvlieg et al. 2013). MLST approach lead to identify *S. lycopersici* as the closest species of French isolated *Septoria*. Therefore, two hypothesis remain for the dissemination of *Septoria* on *S. rebaudiana*. The first hypothesis is that the fungi was present on other hosts before *S. rebaudiana* introduction in cited countries (Reeleder 1999). Indeed, *Septoria* species have the ability to jump successfully to hosts in new family, but this genetic basis is still unclear (Verkley et al. 2013). Thus, as tomato is largely produced in Southwestern France, we could hypothesis that *Septoria* on *S. rebaudiana* could belong to the species complex of *Septoria lycopersici*. Nevertheless, *Septoria lycopersici* although present has been very rarely described in France (Blancard 2017). Therefore, a second hypothesis could emerge. The infection of *S. rebaudiana* by *Septoria* was already described in Japan, (Ishiba, Yokoyama, and Tani 1982). It was also reported in North Carolina (Lovering and Reeleder 1996), in Canada (Reeleder 1999), in India (Bhandari and Harsh 2006) and in Paraguay (Veia Sanabria and Orrego Fuente 2013), in accordance with the wide geographic distribution of *Septoria* genus (Quaedvlieg et al. 2013). Thus, it can be supposed that this fungus coexists with the host in plant's origin country (Paraguay) and could be present in worldwide distributed seed or

plantlets material (Reeleder 1999). This hypothesis is supported by the description of *Septoria* in Paraguay since 1996 (Veia Sanabria and Orrego Fuente 2013) and by seedborne *Septoria* disease on other crop, as lettuce or wheat (Bertus 1972; Shah, Bergstrom, and Ueng 1995). However, there is no evidence of seedborne *Septoria* on *S. rebaudiana*.

We developed a high reliable and homogeneous automated disease screening procedure in controlled conditions for the evaluation of *S. rebaudiana* genotypes response to *Septoria*. In the literature, there is only one other study for the screening of response of 13 arbitrarily selected clonal lines of *S. rebaudiana* available from a breeding program (Reeleder 1999). Authors studied the growth of *Septoria* sp. isolated in Canadian conditions. They developed an assay in controlled conditions through manual pulverization of combined isolates on six weeks old cuttings. They also evaluated *S. rebaudiana* genotypes in field conditions. *S. rebaudiana* response was scored through the proportion of symptomatic leaf area, the percentage of symptomatic leaves and the mean number of lesion per leaf. The two studies differ in terms of the length of the experiment, 21 DAI and 14 DAI, the way of inoculation, automated versus manual, in our study and in Reeleder (1999) respectively, the inoculated strain and the tested germplasm. Nevertheless, they both conclude that quantitative variable response to *Septoria* sp. exist in *S. rebaudiana*. Quantitative gradient regarding the % of leaf area diseased is similar in the two studies from around 3% to 50%. Nevertheless, Reeleder et al. (1999) found two genotypes expressing complete resistance which was not the case in our study.

Our results clearly identified moderately susceptible genotypes “Gawi” and “EspLac1” which present weak disease scoring and a slow disease progress. On the contrary, “E161718”, “E8” and “C” are highly susceptible supported by a fast disease progress. The other tested genotypes present intermediate response as the largely produced “Eirete”.

This genotype ranking response was confirmed into the field. This result indicates that experiments in controlled conditions could be representative of field conditions They provide a faster tool to identify genotype ranking according to their susceptibility. The natural infection in the field present large failings as its stochasticity, the unknown quantity of inoculum, different inoculum pressure and the unknown geography of the inoculation progress into the field. Nevertheless, it constitutes the reality of infection. Field conditions led to higher DP scores could be explained by higher period of symptoms development from early August to end of September. Moreover, *Stevia rebaudiana* canopy structure in the field is complex and could influence disease spread and development, as early demonstrated in wheat (Scott et al. 1985). In pea, optimum canopy structure for the reduction of SLS disease is low foliar area, high internode distances and high mean distance between nodes (Le May et al. 2009). This

architecture could correspond to airy leaf biomass on large ground canopy area or few stem densities for *Stevia rebaudiana*. Genotypes response in field conditions could depend on the interaction between the level of susceptibility and canopy structure in *Stevia rebaudiana*.

This study is a founding work in *Stevia rebaudiana* response to fungal pathogen.

Septoria sp. was characterized through visual observation and DNA-based analysis. To our knowledge, this is the first DNA-based analysis for the molecular characterization of *Septoria* on *S. rebaudiana*. For further study, it will be interesting to characterize worldwide *Septoria* strains isolated on *Stevia* by MLST, particularly with strains from Paraguay, which is *Stevia rebaudiana* origin's country. This knowledge would be helpful to answer the hypothesis of a new species of *Septoria* genus (Ishiba, Yokoyama, and Tani 1982) and its worldwide appearance.

Disease response was phenotyped mainly in terms of proportion of diseased plant, proportion of symptomatic foliar area and disease progress. In wheat, quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch was phenotyped in terms of the degree of host damage as the percentage of leaf area covered lesion but also on variables related to pathogen reproduction as density of pycnidia produced within lesions (Karisto et al. 2017). These two phenotypes are independent. They could help precise the response in *S. rebaudiana/Septoria* interactions. Phenotyping could also be optimized through improving colored image analysis as in wheat (Karisto et al. 2017). In order to precisely demonstrate fungi development within living tissue, *in vivo* chlorophyll fluorescence image analysis could also be used (Rousseau et al. 2013), giving a powerful non-destructive method.

In our study we only screen the genotypes' response to one isolated strain. Difference on aggressiveness was demonstrated among fives populations of *Zymnoseptoria tritici* (causal agent of *Septoria tritici* blotch) from Iran on two wheat cultivars (Abrinbana 2018). For a durable and effective quantitative resistance, it would be necessary to evaluate resistance against a diverse set of isolates from various region (Abrinbana 2018).

The combination of a reliable automated inoculation procedure and quantitative scoring through researcher scoring and image analysis give us a very convenient tool. It will be further used to screen a larger *S. rebaudiana* germplasm collection. But, the material production and whole plant scanning remain time-consuming and cannot be applied to progenies in a breeding program. It would be necessary to develop faster method in order to screen segregating population as done in poplar for example using excised leaf disks (Maxwell, Kruger, and

Stanosz 1997). The consequences of infection in terms of quantity and quality of SGs in the leaves has also to be investigated.

This study constitutes a promising opening for the improvement of *Stevia rebaudiana* resistance against SLS. The optimization of phenotyping tools and the screening of large germplasm open the field of breeding strategies for response to SLS and the development of sustainable and organic *S. rebaudiana* production.

Acknowledgment

C. Hastoy was supported by ANRT n° 2014/0915 funding and Oviatis SA, France. Nouvelle-Aquitaine region supported the work through Cifre specific fundings. Work was partly supported by Research Federation on Integrative Biology and Ecology (Bordeaux University, France). Authors thank Coralie Chesseron (INRA, Bordeaux, France), Justine Peirotte (Fraise Concept', Douville, France) and Mathieu Mouravy (INVENIO, Douville, France) for plant production, Philippe Boutié and Pierre Jannot for support (Oviatis SA and Rouages, Agen, France).

2.5 Literature cited

- Abrinbana, M. 2018. Variation in aggressiveness components of *Zymoseptoria tritici* populations in Iran. *J. Phytopathol.* 166:10–17.
- Andolfi, L., Macchia, M., and Ceccarini, L. 2006. Agronomic-productive Characteristics of Two Genotype of *Stevia Rebaudiana* in Central Italy. *Ital. J. Agron.* 2:257–262.
- Angelini, L. G., Martini, A., Passera, B., and Tavarini, S. 2018. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges. In Springer, Cham, p. 35–85.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., and Walker, S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *J. Stat. Softw.* 1:1–48.
- Beach, W. . 1919. Biologic specialization in the genus *Septoria*. *Am. J. Bot.* 6:1–32.
- Bertus, A. L. 1972. The Eradication of Seed-Borne *Septoria Lactucae* Pass, from Lettuce with Aerated Steam. *J. Hortic. Sci.* 47:259–261.
- Bhandari, S., and Harsh, N. S. K. 2006. First report of *Septoria steviae* on *Stevia rebaudiana* in India. *Indian For.* 132:385.
- Blancard, D. 2017. *Septoria lycopersici* Speg. (1881). EPHITIA INRA. Available at: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20871/Tomate-Septoriose-Septoria-lycopersici>.
- van Bueren, E. T. L., Jones, S. S., Tamm, L., Murphy, K. M., Myers, J. R., Leifert, C., et al. 2011. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 58:193–205
- Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I. C. F. R. 2017. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem. Toxicol.* 107:302–317.
- Carrera-Lanestosa, A., Moguel-Ordóñez, Y., and Segura-Campos, M. 2017. *Stevia rebaudiana* Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *J. Med. Food.* 20:933–943.
- Chang, W. 2014. extrafont: Tools for using fonts. R Packag. version 0.17.
- Commission Regulation (EU). 2011. No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides. *Off. J. Eur. Union.* amending A:L295/205 L295/211.
- EC. 2017. Novel Food Catalogue, *Stevia rebaudiana*. Eur. Com. Available at: http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/index.cfm#.
- Ficke, A., Cowger, C., Bergstrom, G., and Brodal, G. 2018. Understanding yield loss and pathogen biology to improve disease management: *Septoria nodorum* blotch - a case study in

- wheat. *Plant Dis.* 102:696–707.
- Fones, H., and Gurr, S. 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79:3–7.
- Fox, J., and Weisberg, S. 2011. *An R Companion to Applied Regression*. Second. Thousand Oaks (CA): Sage publication.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., and Gullino, M. L. 2009. First Report of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Stevia rebaudiana* in Italy. *Plant Dis.* 93:318
- Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Cavaignac, S., et al. 2016. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes under field conditions in the South west of France for organic production establishment. From F. to Fork, Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan M.C. Geuns Ed. :204.
- Henze, M., Beyer, M., Klink, H., Verreet, J., and Kiel, D.-. 2007. Characterizing Meteorological Scenarios Favorable for *Septoria tritici* Infections in Wheat and Estimation of Latent Periods. *Plant Dis.* 91:1445–1449.
- Ishiba, C., Yokoyama, T., and Tani, T. 1982. Leaf spot disease of *Stevia* caused by *Septoria steviae*. *Ann. Phytopathological Soc. Japan.* 48:24–43.
- Jeger, M. J., and Viljanen-Rollinson, S. L. H. 2001. The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 102:32–40.
- Karisto, P., Hund, A., Yu, K., Anderegg, J., Walter, A., Mascher, F., et al. 2018. Ranking quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in elite wheat cultivars using automated image analysis. *Phytopathology.* 108(5):568-581.
- Koehler, A. M., and Shew, H. D. 2018. Field efficacy and baseline sensitivity of *Septoria steviae* to fungicides used for managing *Septoria* leaf spot of stevia. *Crop Prot.* 109:95–101.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.
- Lovering, N. M., and Reeleder, R. D. 1996. First Report of *Septoria steviae* on *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) in North America. *Plant Dis.* 80:959.
- MacConkey, A. 1905. Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *J. Hyg. (Lond).* 5:333–379
- Maiti, C. K., Sen, S., Acharya, R., and Acharya, K. 2007. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathol.* 56:723–723.
- Mangiafico, S. S. 2015. *A R Companion for the Handbook of Biological Statistics*, version 1.3.2. rcompanion.org.

- Maxwell, D. L., Kruger, E. L., and Stanosz, G. R. 1997. Effects of Water Stress on Colonization of Poplar Stems and Excised Leaf Disks by *Septoria musiva*. *Phytopathology*. 87:381–388
- Le May, C., Ney, B., Lemarchand, E., Schoeny, A., and Tivoli, B. 2009. Effect of pea plant architecture on spatiotemporal epidemic development of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) in the field. *Plant Pathol.* 58:332–343.
- Parker, S. K., Nutter, F. W., and Gleason, M. L. 1997. Directional Spread of *Septoria* Leaf Spot in Tomato Rows. *Plant Dis.* 81:272–276.
- Pietravalle, S., Shaw, M. W., Parker, S. R., and van den Bosch, F. 2003. Modeling of Relationships Between Weather and *Septoria tritici* Epidemics on Winter Wheat: A Critical Approach. *Phytopathology*. 93:1329–1339
- Quaedvlieg, W., Verkley, G. J. M., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, a. C., Swart, W. J., et al. 2013. Sizing up *septoria*. *Stud. Mycol.* 75:307–390.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Reeleder, R. 1999. *Septoria* leaf spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and methods for screening for resistance. *J. Phytopathol.* 147:605–613.
- Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R., et al. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods*. 9:17.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo.* 4:406–425.
- Savary, S., Stetkiewicz, S., Brun, F., and Willocquet, L. 2015. Modelling and mapping potential epidemics of wheat diseases-examples on leaf rust and *Septoria tritici* blotch using EPIWHEAT. *Eur. J. Plant Pathol.* 142:771–790.
- Scott, P. R., Benedikz, P. W., Zones, H. G., and Ford, M. A. 1985. Some effects of canopy structure and microclimate on infection of tall and short wheats by *Septoria nodorum*. *Plant Pathol.* 34:578–593.
- Shah, D., Bergstrom, C., and Ueng, P. . 1995. Initiation of *Septoria Nodorum* Blotch Epidemics in Winter Wheat by Seedborne *Stagnospora nodorum*. *Phytopathology*. 85:452–457.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:11030–11035.
- Teterevnikova-Babayan, D. N. 1987. *Fungi of the genus Septoria in the USSR*. Akademiya Nauk Armyanskoi SSR, Yerevan.

- Veia Sanabria, C. R., and Orrego Fuente, A. L. 2013. Eficiencia de los metodos de lixiviacion y maceracion des extractos vegetales para el control de enfermedades foliares en Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni). *Investig. Agrar.* 10:59–65.
- Verkley, G. J. M., and Starink-Willemse, M. 2004. A phylogenetic study of some *Septoria* species pathogenic to Asteraceae based on ITS ribosomal DNA sequences. *Mycol. Prog.* 3:315–323.
- Verkley, G. J., Quaedvlieg, W., Shin, H. D., and Crous, P. W. 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Stud Mycol.* 75:213–305
- Wickham, H. 2009. *ggplot2 : Elegant Graphics for Data Anamysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilke, C. O. 2017. cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for “ggplot2.” R Packag. cowplot version 0.9.2.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., and Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91:1–27.
- Zolan, M. E., and Pukkila, P. J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* 6:195–200.

2.6 Supplemental data

Table S1. P-value of ANOVA Type II analysis on linear mixed model for disease severity variables (Disease Proportion scores, Area Under the Disease Progress Curve, Proportion of Symptomatic Area) in controlled conditions experiment and field experiment.

Explicative factors	Controlled conditions			Natural condition
	DP scores	AUDPC	PLSA	DP scores
Genotype	2.2e-16 ***	2.2e-16 ***	7.16e-06 ***	***
Time after inoculation	2.2e-16***	-	-	-
Genotype x Time	2.2e-16***	-	-	-

Table S2. Linear regression parameter of Disease Proportion score according to time after inoculation for 10 genotypes of *Stevia rebaudiana* (Figure 4). Result of multiple comparison on slope coefficient by HSD's Tuckey test are indicated by letter. Same letter shows no significant difference at $P = 0.05$ level.

Genotype	Linear regression slope
Gawi	1.07 ± 0.21 a
EspLac1	1.46 ± 0.22 ab
Larrere	1.57 ± 0.21 ab
FP	1.72 ± 0.21 ab
Lac4	1.81 ± 0.21 b
Eirete	1.99 ± 0.21 b
S6030-1	2.04 ± 0.21 bc
E8	2.74 ± 0.21 cd
E161718	3.06 ± 0.21 d
C	3.20 ± 0.22 d



Figure S1. Validation of Koch's postulates

After isolation and morphologic characterisation, inoculum from 2.5 weeks old culture was prepared with conidia from sporulating pycnidia. The inoculum concentration was 10^4 to 10^5 spores/mL. Nine weeks old *Stevia rebaudiana* plants were manually pulverized with an Ecospray. Eight mL inoculum were sprayed per plant. Plants were placed in isolated growth chamber with sodium lamp for 21 days at 20-25°C, 16 h photoperiod and a high hygrometry level. Twenty-one day after inoculation, symptomatic leaves were collected and incubated in moist chamber, corresponding to a Plexiglas box with moistened paper. Strains were re-isolated. We could demonstrate that the same symptoms as those observed in the field could be obtained (picture). Macroscopic description and ITS sequencing confirmed *Septoria* sp.

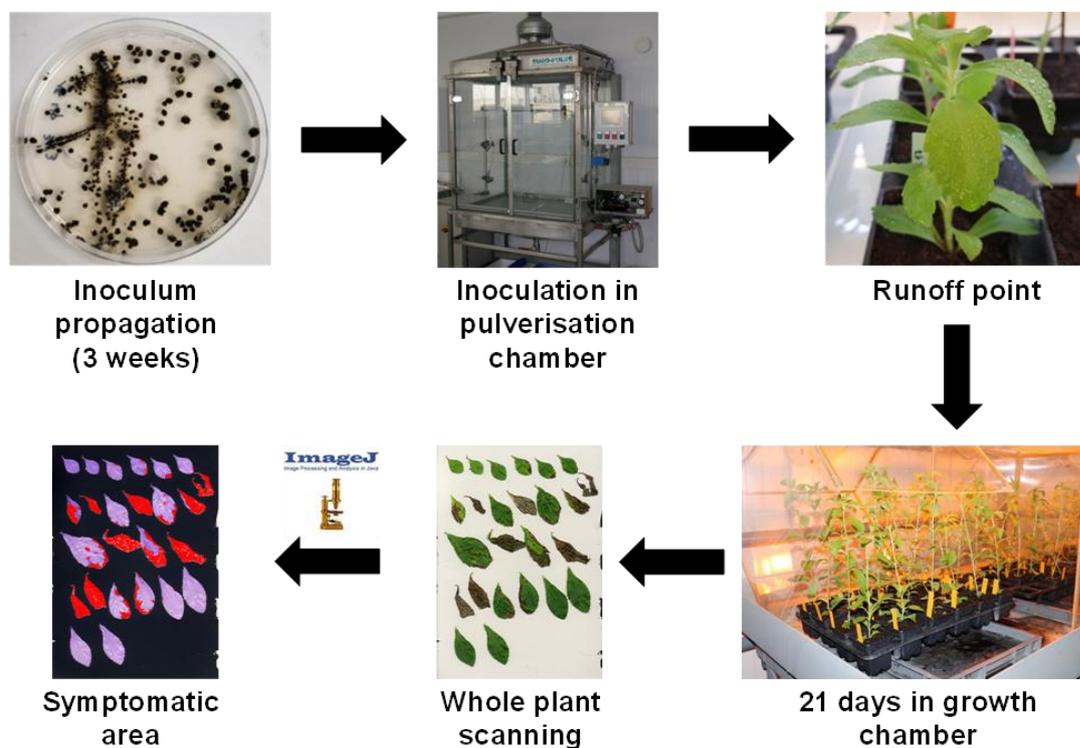


Figure S2. Pipeline of the evaluation of *Stevia rebaudiana* response against *Septoria* strain Sep-15-LIP in controlled conditions and automated inoculation.

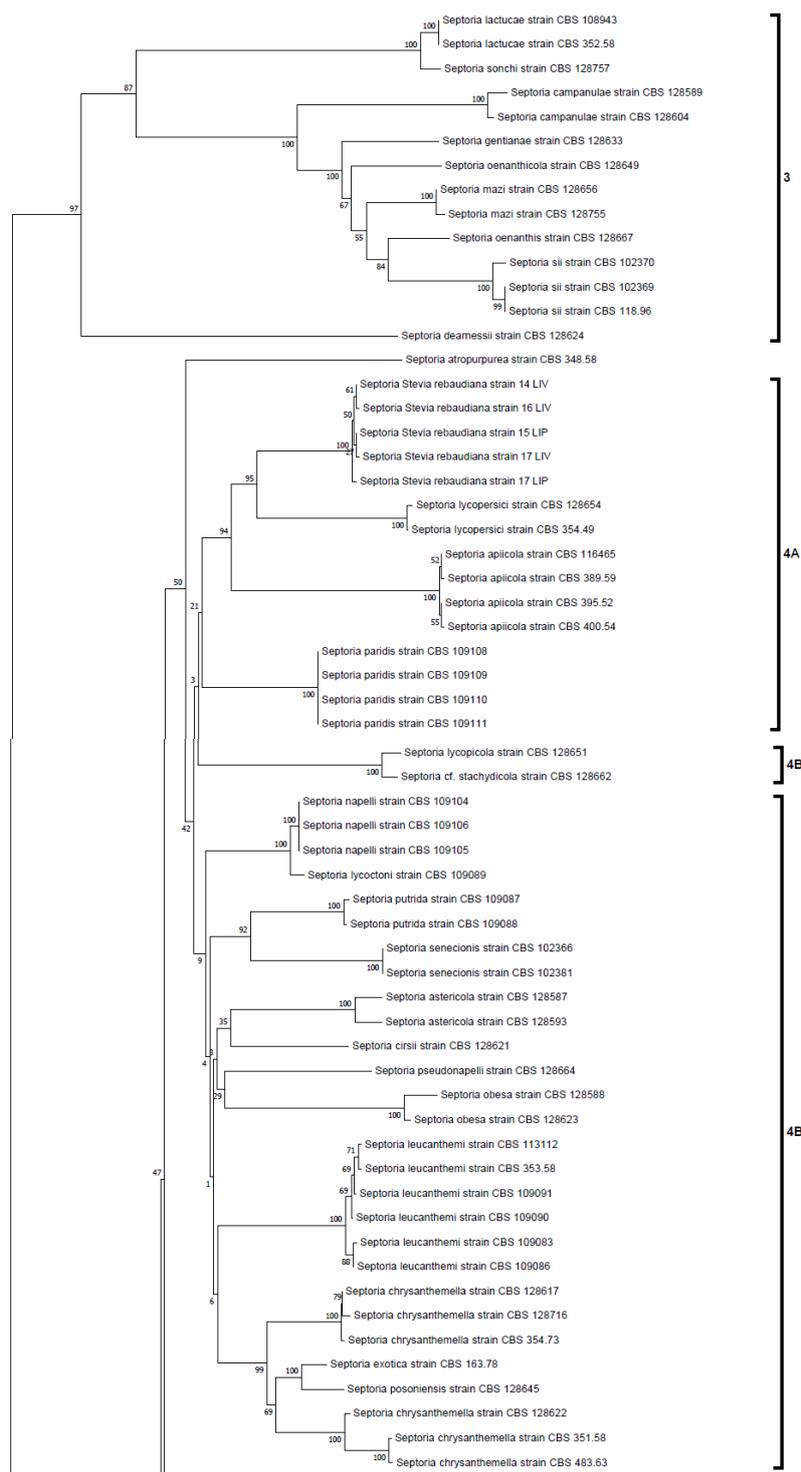


Figure S3.

Phylogenetic classification of *Septoria* strains isolated on *Stevia rebaudiana* in France through Multiple Loci Sequence Typing. The tree was obtained on concatenate sequences of 249 *Septoria* strains for 7 loci (Table 2). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura *et al.*, 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 3521 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

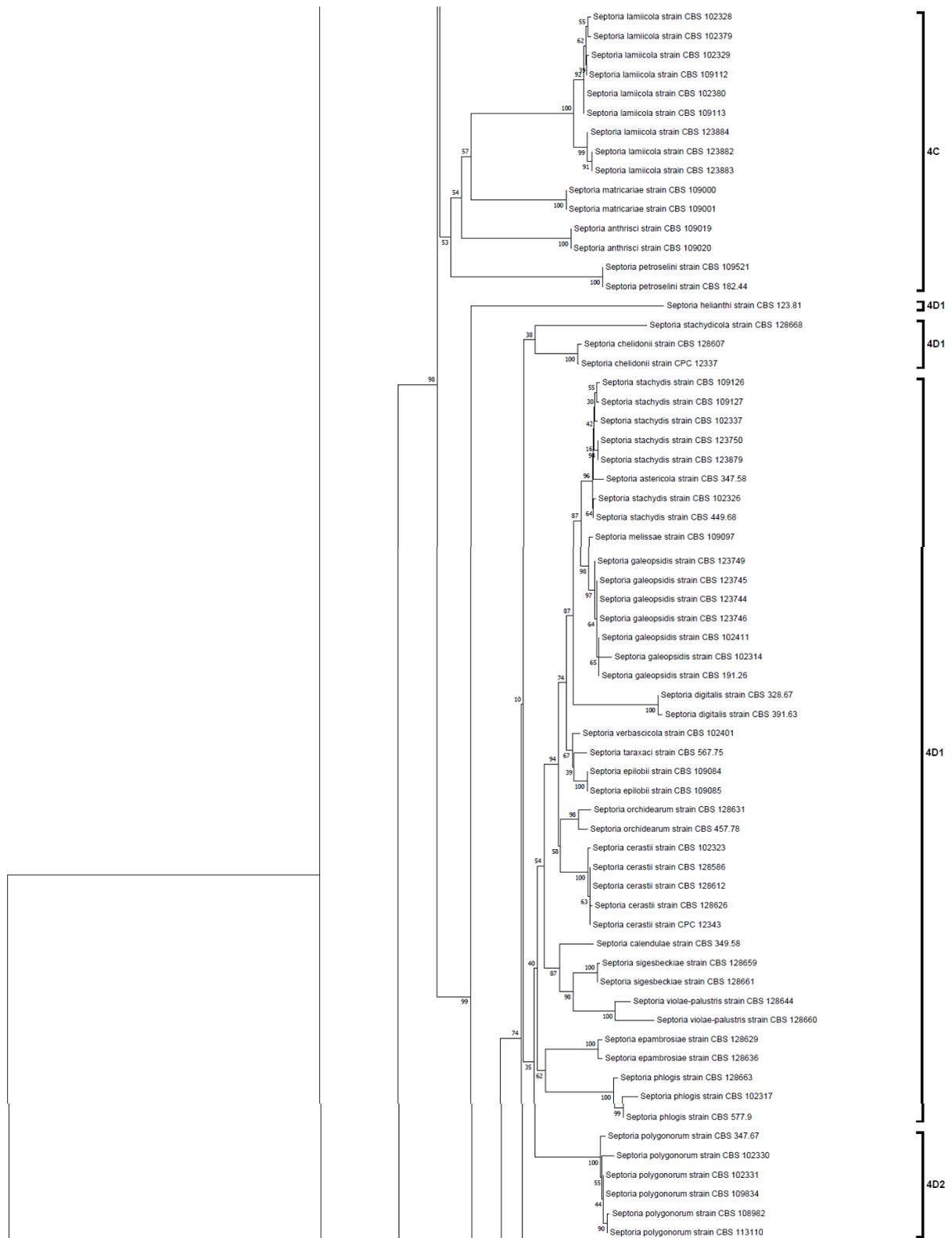


Figure S3

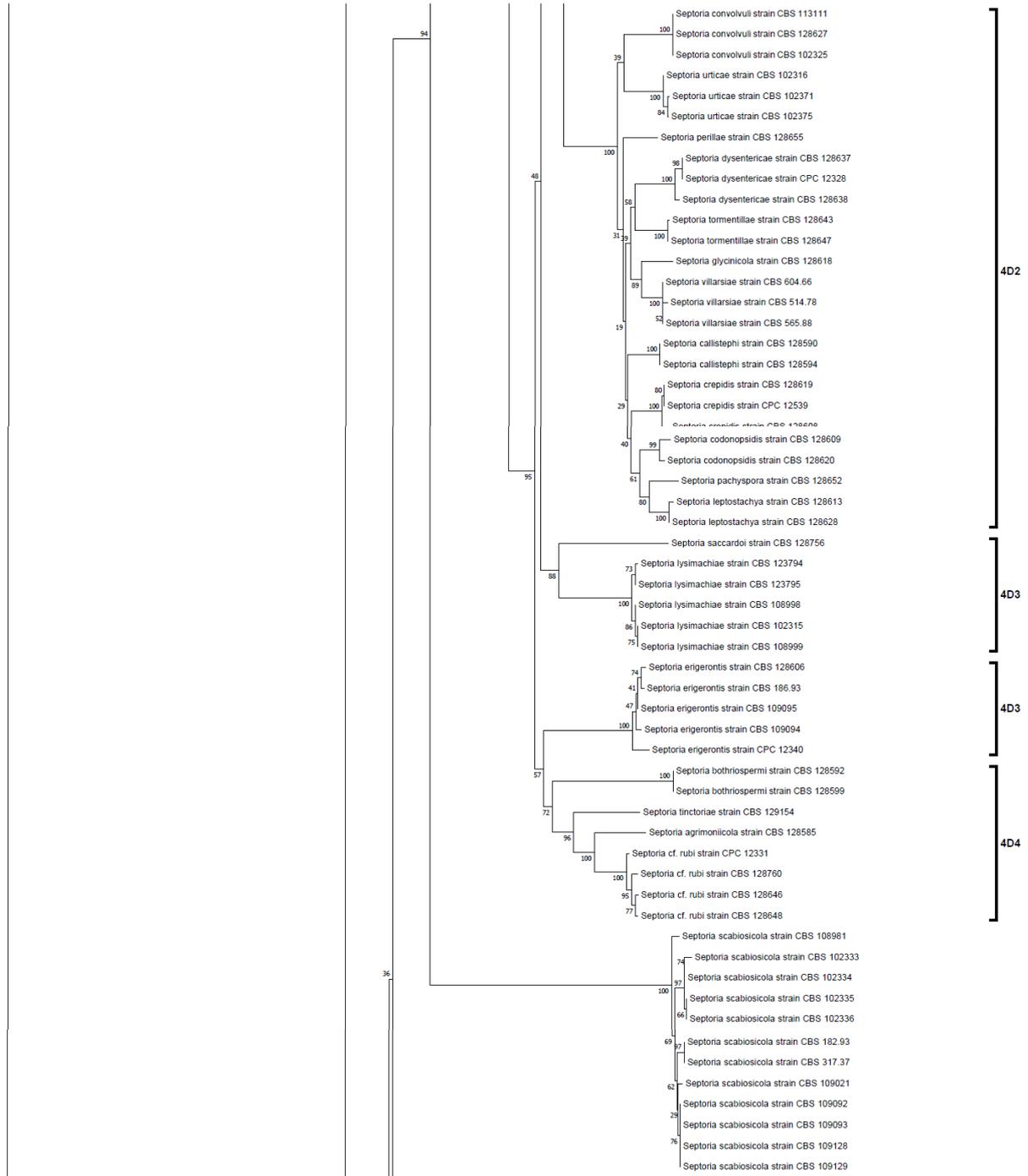


Figure S3

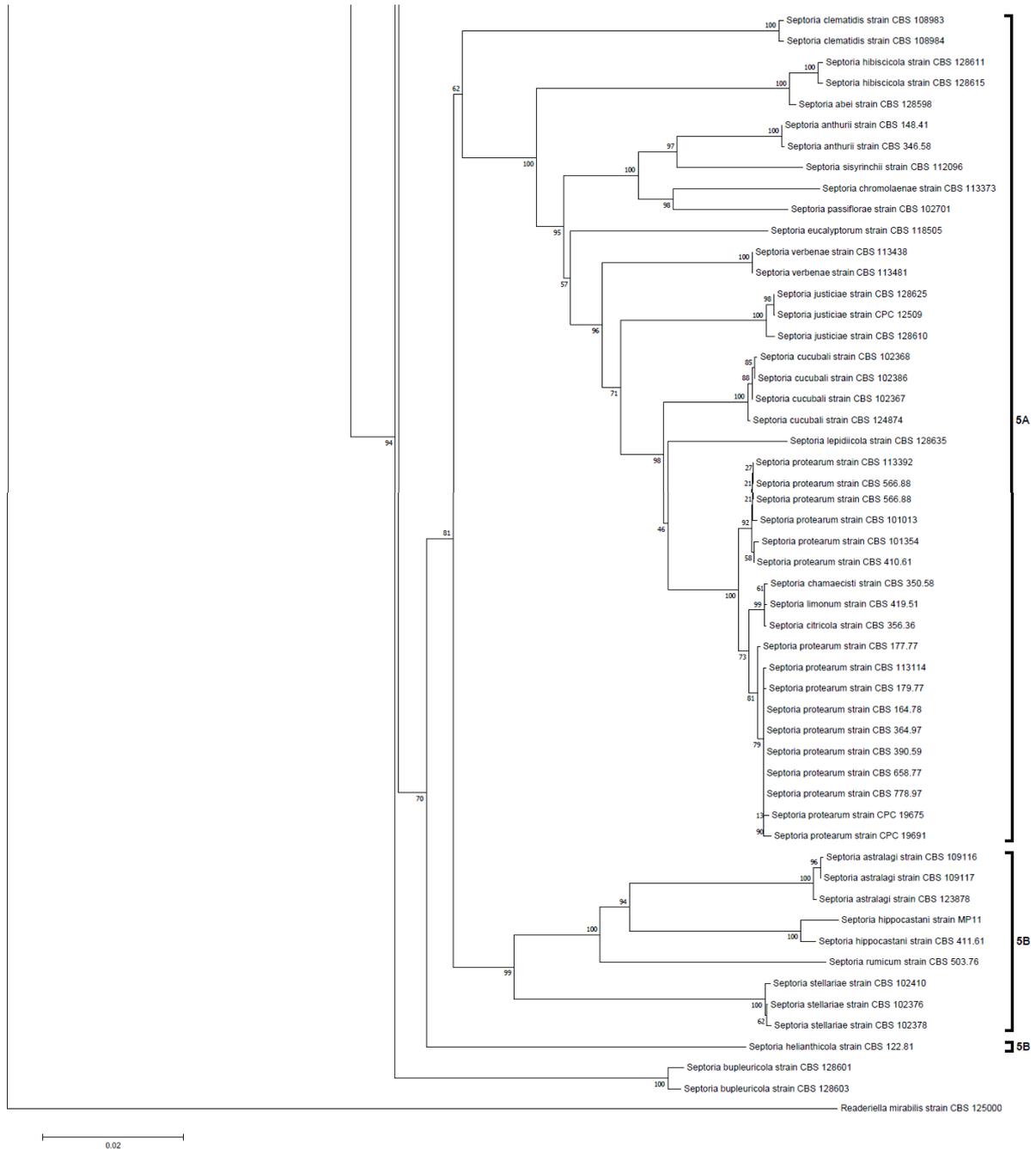


Figure S3. End

– Partie 3 –

Discussion générale et perspectives

L'utilisation des glycosides de stéviol (SGs) en tant qu'édulcorants naturels intenses a fortement augmenté ces dernières années à travers le monde. Le marché mondial de la Stévia ne cesse donc de croître, conduisant à une demande croissante de feuilles, matières premières de cette filière. Le développement de la production dans l'hémisphère nord, comme aux USA ou en Europe, est relativement récent. Cet intérêt est en lien direct avec l'approbation de ces édulcorants à la consommation dans ces pays, et l'augmentation de la prise des parts de marché des édulcorants synthétiques et naturels.

Différentes stratégies de production de ces édulcorants sont apparues. Des approches biotechnologiques ont conduit à la synthèse de SGs en système hétérologue (bactérie ou levure) par ingénierie métabolique (Stephanopoulos & Ajikumar, 2012). Par exemple, cette approche permet à la société Cargill de produire à l'échelle industrielle et de façon rentable deux SGs accumulés minoritairement dans les feuilles de Stévia (RebD et RebM) (Watson, 2018). Avec l'augmentation des surfaces de culture de Stévia (Gantait *et al.*, 2018), la production de feuilles reste une source importante de SGs. A notre connaissance, il n'existe pas de données comparatives montrant l'origine des SGs utilisés par les industries agroalimentaires à l'échelle mondiale.

En Europe, le leader de l'extraction des SGs importe des feuilles de Stévia issues d'agriculture sans engrais chimiques, ni pesticides provenant de l'Inde et du Paraguay (Stevia Natura, 2017). La société Oviatis créé en 2013 est pionnière de la Stévia BIO en France à travers son projet de filière complète BIO (Rabiller, 2016). La filière Aquitaine Stévia Innovation (ASI) se différencie d'autres projets par son souhait de promouvoir l'agriculture locale, de proposer une nouvelle culture (alternative au tabac par exemple) et de fournir aux consommateurs des produits issus de l'agriculture biologique et de procédés de transformation biologiques. L'acceptation très récente des feuilles de Stévia à la consommation en Europe (European Commission, 2017) ouvre un marché particulièrement favorable au développement de la filière BIO d'Oviatis.

En Europe, la culture de *Stevia rebaudiana* est possible (Ferrazzano *et al.*, 2016). Pour répondre à la demande des consommateurs qui souhaitent des produits sains et d'origine naturelle, les projets d'implantation de cette culture vise la mise en place de systèmes d'agriculture raisonnée et/ou biologiques (Hastoy *et al.*, 2015, 2016; Grevsen & Sorensen, 2016; Angelini *et al.*, 2018). Les nombreux essais d'itinéraires culturaux permettent d'avoir des bases solides, mais nécessitent de plus amples travaux pour optimiser la culture de la Stévia en climat tempéré (Angelini *et al.*, 2018). Actuellement, la principale limite de la production européenne est le manque de ressources génétiques adaptées aux conditions pédoclimatiques de chaque pays.

L'objectif du partenariat entre la société Oviatis et l'INRA est de mettre en place un programme de sélection et d'amélioration génétique de *Stevia rebaudiana* pour la culture de celle-ci en Aquitaine en agriculture biologique. Pour répondre aux besoins industriels, cette thèse CIFRE avait pour objectifs de: (1) développer une méthode de quantification robuste des SGs, (2) évaluer la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques en condition pluriannuelle de production et identifier les descripteurs de cette variabilité, (3) caractériser la mise en place des composantes du rendement au cours de la croissance de la plante, et (4) caractériser le champignon *Septoria* sp. affectant la Stévia et évaluer la réponse de ressources génétiques face à ce pathogène. Ces travaux ont conduit au développement d'outils de phénotypage au champ, métabolique et pathologique, permettant l'évaluation de la variabilité d'une collection de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana*, et à l'identification de facteurs ontogéniques, abiotiques et cultureux impliqués dans cette variabilité. Ces travaux constituent les premières connaissances nécessaires à la mise en place d'un programme d'amélioration.

1 La variabilité génotypique de l'espèce *Stevia rebaudiana*

1.1 Les ressources génétiques

Dans cette étude, nous avons caractérisé 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (15 génotypes et 3 lots de semences) en condition de production durant 2 années de croissance dans 2 environnements différents. Jusqu'ici, la majorité des études en conditions extérieures ont évalué entre un génotype ou lot de semence (Lavini *et al.*, 2008; Aladakatti *et al.*, 2012; Taleie *et al.*, 2012; Serfaty *et al.*, 2013), deux génotypes (Megeji *et al.*, 2005), ou trois génotypes (Barbet-Massin, 2015), dont les origines ne sont pas indiquées, hormis quand il s'agit de la variété Criolla (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Avec la forte variabilité décrite chez *Stevia rebaudiana* (Yadav *et al.*, 2011a), les études en Europe ont commencé à publier l'évaluation de ressources génétiques pour identifier les génotypes les mieux adaptés aux conditions pédoclimatiques. On dénombre ainsi le travail réalisé sur les sept génotypes de l'EUSTAS dans les essais au Portugal (Lankes & Zabala, 2011), ou quatre génotypes de l'EUSTAS et quatre lots de semences commerciales au Danemark (Grevsen & Sorensen, 2016). Ainsi, Notre travail constitue la première étude phénotypique pluriannuelle utilisant un grand nombre de ressources génétiques en conditions de production, et de provenances géographiques diverses (Argentine, Colombie, Paraguay, Espagne, Israël).

Nous révélons une importante variabilité phénotypique pour tous les caractères étudiés : le rendement en SGs et en biomasse foliaire, la structure de la canopée, la capacité de survie à l'hiver, la teneur et composition en SGs, et la réponse face à la septoriose. Nos résultats sont en accord avec de précédentes études caractérisant certaines ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Tateo *et al.*, 1998; Reeleder, 1999; Abdullateef & Osman, 2011; Yadav *et al.*, 2011a; Wölwer-Rieck, 2012; Ceunen & Geuns, 2013b; Montoro *et al.*, 2013; Barbet-Massin *et al.*, 2016). Cette forte variabilité phénotypique résulte de l'interaction du génotype et de l'environnement. Cependant, le manque de traçabilité des ressources génétiques, le manque de partage d'informations à propos de leur origine, et la difficulté de se procurer de nouvelles ressources rendent difficile de situer les ressources génétiques étudiées au sein la diversité existante chez *Stevia rebaudiana*. La caractérisation génotypique ainsi que le travail de collecte de nouvelles ressources génétiques sont indispensables à l'évaluation de la diversité de cette espèce, tant au niveau génétique que phénotypique.

1.2 Caractérisation de la diversité génotypique

La caractérisation de la diversité génétique est fondamentale pour identifier les ressources génétiques, les classer en fonction de leur lien phylogénétique et aider à la décision pour choisir les parents en vue d'une amélioration variétale (Amirul Alam *et al.*, 2014).

Les informations génomiques sont très pauvres chez *Stevia rebaudiana*, conduisant à un manque de connaissance de la variabilité génotypique de cette espèce. Il n'existe pas de génome de référence dans les bases de données publiques. Quelques marqueurs moléculaires ont été développés, permettant d'apporter un premier aperçu du polymorphisme et la forte hétérozygotie de cette espèce. La variabilité génotypique de *Stevia rebaudiana* a été caractérisée par des marqueurs moléculaires aléatoires de type RAPD ou ISSR, (Chester *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2016), ou des marqueurs SSRs (Bhandawat *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, des ressources génétiques uniquement « locales » à l'étude ont été caractérisées, ce qui ne permet pas de décrire totalement la variabilité de cette espèce à travers le monde.

Dans le cadre du partenariat Oviatis-INRA, un set de marqueurs de type SSR a été développé pour caractériser la diversité génétique de *Stevia rebaudiana*. Les marqueurs SSRs présentent les avantages de cibler des régions précises du génome et d'être plus informatifs, car très polymorphes. Ceci explique qu'ils soient considérés comme les meilleurs marqueurs pour la caractérisation de la diversité génétique. Ces avantages ont conduit à un fort développement de ces marqueurs chez de nombreuses espèces végétales (Shokeen *et al.*, 2011; Rauscher & Simko, 2013; Jain *et al.*, 2014). 145 génotypes de *Stevia rebaudiana* (incluant des variétés et des populations locales issues d'Argentine) ont été génotypés par 18 marqueurs SSRs, révélant la forte hétérozygotie de l'espèce (Cosson *et al.*, 2018) en accord avec l'auto-incompatibilité sporophytique (Raina *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014). L'analyse des structures de cet ensemble classe ces 145 génotypes en 3 groupes de ressources génétiques (Cosson *et al.*, 2018). Deux d'entre eux sont proches alors qu'un troisième groupe semble se différencier. La proximité phylogénétique de ces groupes, en particulier avec les populations locales indique une amélioration récente pour les variétés. La base génétique utilisée est globalement similaire, sauf pour le troisième groupe. Néanmoins, cette base génétique est riche car présentant une forte diversité allélique. Elle permet alors l'expression de phénotypes variés. Pour de futures études, il serait toutefois pertinent de collecter de nouvelles ressources génétiques, plus particulièrement du pays d'origine (Paraguay, Argentine). Ceci permettrait d'évaluer l'évolution de la diversité de cette espèce et éventuellement d'identifier de nouvelle source de variabilité génétique. La connaissance de cette variabilité est essentielle en tant que réservoir

d'allèles, mais également dans un but de classement afin de disposer d'outils moléculaires permettant le choix des géniteurs et d'éviter l'érosion génétique.

Le principal inconvénient des SSR est qu'ils nécessitent la connaissance des séquences génomiques, même partielles, et leur développement est long et coûteux. L'avantage des SNPs réside dans leur forte densité dans le génome, ce qui les rend préférentiels pour l'identification de régions du génome impliquées dans des caractères d'intérêt (Singh & Singh, 2015), mais ils nécessitent également la connaissance des séquences génomiques. L'enjeu principal pour l'amélioration génétique de la *Stévia* réside dans l'obtention d'informations génomiques pour la création d'une carte génétique, la seule existante chez *Stevia rebaudiana* étant non utilisable à l'heure actuelle (Yao *et al.*, 1999).

Si le développement du séquençage Nouvelle-Génération (Next Generation Sequencing ou NGS) a permis l'assemblage de nombreux nouveaux génomes de référence (Ellegren, 2014), accéder à la diversité génomique d'organismes non modèles (comme c'est le cas pour *Stevia rebaudiana*) reste difficile. Le séquençage d'une petite fraction du génome constitue un moyen d'approcher cette diversité génomique sans passer par le processus long et coûteux d'un génome de référence entier (Narum *et al.*, 2014). Cette technique de séquençage RRL (Reduced-Representation Library) permet l'obtention de données d'une même fraction de génome pour un set de plusieurs individus. Deux approches sont principalement employées aujourd'hui : l'approche RAD-seq (Restriction-site Associated DNA Sequencing) (Davey *et al.*, 2013) et l'approche génotypage par séquençage (GBS ou Genotyping By Sequencing) (Elshire *et al.*, 2011). D'autres approches sont possibles (Paired-End RAD-seq, Double-Digest RAD-seq, ...). Elles permettent de réduire la complexité génomique en ne sélectionnant que les séquences d'ADN associées à des sites enzymatiques de restriction. Des outils d'analyse capables de gérer le type de données obtenues ont déjà été développés, comme par exemple le pipeline Stacks pour l'analyse des données RAD-seq et l'identification de SNPs (Catchen *et al.*, 2013). Ces techniques constituent une bonne opportunité pour les organismes non modèles pour lesquels aucun génome de référence n'est disponible et ont déjà été appliquées avec succès dans plusieurs études (Guajardo *et al.*, 2015; Verdu *et al.*, 2016). Ainsi, un projet collaboratif entre l'INRA et le CBIB (Bordeaux Bioinformatics Center) visant à développer des marqueurs SNPs chez *Stevia rebaudiana* par séquençage RRL a été initié en 2017, ce qui permettra au projet de se doter d'outils puissants de génotypage.

2 Influence des facteurs environnementaux sur la variabilité phénotypique de *Stevia rebaudiana*

A notre connaissance, aucune étude chez *Stevia rebaudiana* n'a caractérisé autant de ressources génétiques simultanément en plein champ en Europe. La caractérisation phénotypique pluriannuelle d'un nombre important de ressources génétiques pour une étude sur *Stevia rebaudiana* permet de révéler l'impact du génotype, des facteurs abiotiques et cultureux sur le phénotypique. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à décomposer les composantes du rendement de l'espèce. Le paragraphe suivant a pour but de faire le bilan de nos résultats concernant l'influence des facteurs ontogéniques, abiotiques et cultureux sur les composantes du rendement.

2.1 Le rendement en biomasse foliaire

L'identification des caractères représentatifs de la croissance et du rendement en biomasse foliaire supérieure constitue un enjeu important du projet pour la sélection et l'amélioration de *Stevia rebaudiana* en vue d'une production pour la filière biologique. La productivité de *Stevia rebaudiana* est définie par le rendement en SGs, résultant du rendement en biomasse foliaire et de la teneur en SGs. Nous avons démontré au cours de cette étude que le rendement en biomasse foliaire détermine le rendement en SGs. Les conditions expérimentales de cette étude révèlent une large variabilité de rendement en biomasse foliaire comprise entre 0,77 et 3,4 T/ha. La comparaison avec d'autres études ne peut pas être réellement faite puisque le rendement évolue positivement avec la densité de plantation à l'hectare, alors que la productivité par plant évolue à l'inverse de la densité (Kumar *et al.*, 2014b). Le rendement en biomasse foliaire dépend du génotype, de son interaction avec l'environnement et de l'année de production en lien avec la durée d'implantation en 1^{ère} année. L'effet génotype-environnement est en accord avec les travaux de Barbet-Massin (2015), ainsi que les résultats obtenus pour les 6 génotypes améliorés par S&W seeds, évalués dans quatre environnements aux Etats-Unis (Parris *et al.*, 2016). Ce résultat illustre la nécessité de sélectionner des ressources génétiques adaptées aux conditions pédoclimatiques de l'Aquitaine, et surtout pour chaque aire de production.

Le rendement supérieur en biomasse foliaire obtenu à Liposthey en 2^{ème} année de croissance ainsi que le taux de survie après l'hiver, suite à une implantation longue en 1^{ère} année de croissance, traduit une implantation plus optimale et confirme que l'établissement de la culture en 1^{ère} année est primordiale pour cultiver *Stevia rebaudiana* de façon pérenne (Angelini *et al.*, 2018). En effet, les durées d'implantation prolongées augmente la croissance et la production de biomasse foliaire dès la 1^{ère} saison de croissance (Taleie *et al.*, 2012; Serfaty *et*

al., 2013; Munz *et al.*, 2018). Dans notre étude, nous pouvons conclure que les conditions de Ste-Livrade (sol argilo-calcaire) ont été moins optimales à l'implantation en 1^{ère} année, quel que soit la durée d'implantation. Ce résultat peut s'expliquer par la croissance supérieure de *Stevia rebaudiana* sur des sols de texture sablonneuse (Zaman *et al.*, 2015) et la nécessité d'un sol drainant à cause de sa sensibilité à l'engorgement (Pordel *et al.*, 2015). Nous pouvons donc supposer que les différences d'implantation entre les deux sites sont dues à une différence de croissance de la biomasse racinaire, mais cet aspect n'a pas encore été abordé dans la littérature chez *Stevia rebaudiana*. Une corrélation positive entre la biomasse foliaire et la biomasse racinaire a été démontrée chez 12 espèces herbacées (Freschet *et al.*, 2015). Chez *Stevia rebaudiana*, une récente étude a montré que la mycorhization promeut le développement du système racinaire de 9% en termes de biomasse, et conduit à une augmentation de la biomasse foliaire de 17% (Tavarini *et al.*, 2017). De plus, la comparaison de système de production annuel et pérenne a été montrée que la biomasse racinaire est supérieure en 2^{ème} année de croissance comparée à une 1^{ère} année (Pal *et al.*, 2015), ce qui coïnciderait avec le rendement en biomasse foliaire supérieur à Liposthey en 2^{ème} année suite à une implantation prolongée en 1^{ère} année de croissance. Ces résultats indiquent que *Stevia rebaudiana* nécessite un temps d'implantation minimal (période entre la plantation et la 1^{ère} coupe de la partie aérienne) pour garantir une augmentation du rendement en biomasse foliaire l'année suivante. Cette période permet d'allouer l'énergie produite par la photosynthèse à la production de biomasse non photosynthétique. Cependant, la comparaison de stratégie de récolte (1 à 3 récolte par an) en condition de production en 1^{ère} année de croissance a montré la même production de biomasse racinaire pour les trois régimes de récolte (Pal *et al.*, 2015). Comparé à notre étude, les auteurs apportent de la fertilisation après la coupe de la partie aérienne. Pour de futures études, il faudrait caractériser le développement du système racinaire de génotypes dont les réponses sont extrêmes dans chaque condition environnementale pour comprendre la balance entre production de biomasse aérienne et racinaire (Freschet *et al.*, 2015).

2.2 Teneur en SGs

Nous avons démontré que la teneur en SGs dépend du génotype, de son interaction avec l'environnement, de l'année de croissance et du stade phénologique.

L'évolution de la teneur en SGs entre les années de croissance est dépendante du génotype, mais nous révélons tout de même une tendance à la diminution en 2^{ème} année. Lorsque nous regardons la dynamique de la teneur en SGs au cours du développement, nous démontrons une forte diminution de celle-ci au stade bourgeons floraux. Ainsi, nous pouvons supposer que la diminution de la teneur en 2^{ème} année est en partie due au stade de récolte (bourgeons floraux

formés). En deuxième année, la teneur en SGs n'est pas influencée par la durée d'implantation, contrairement à la biomasse foliaire.

La caractérisation de la dynamique d'accumulation en SGs au cours de la 2^{ème} année de croissance permet de révéler l'impact du stade physiologique en conditions extérieures. La teneur maximale en SGs est obtenue dans les stades précoces de la croissance végétative. Ce résultat pourrait être cohérent avec la dynamique d'accumulation démontrée à l'échelle d'une feuille en conditions contrôlées (Barbet-Massin, 2015). L'auteur montre que l'accumulation en SGs débute dès l'initiation d'une feuille, et atteint une teneur maximale très rapidement. Ensuite l'expansion de la surface foliaire semble diluer les SGs accumulés, ce qui diminue la teneur dans les feuilles plus âgées (Ceunen & Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Cependant, à l'échelle de la plante entière, la dynamique que nous observons est différente de celle précédemment démontrée en conditions contrôlées (Ceunen & Geuns, 2013a). Les auteurs révèlent une augmentation plutôt linéaire de la teneur en SGs jusqu'au maximum atteint au début de la formation des bourgeons floraux pour des plants de 1^{ère} année. Cette différence soulève la question de la dynamique d'accumulation entre les années de production. Si l'accumulation en SGs est maximale à des temps précoces du développement végétatif à partir de la 2^{ème} année de croissance, cela pourrait permettre une sélection précoce d'individus intéressants pour ce trait.

La diminution de la teneur en SGs au stade bourgeons floraux révélée sur cinq génotypes dans cette étude coïncide avec les études montrant une diminution de celle-ci au cours de la formation des bourgeons floraux (Bondarev *et al.*, 2004; Ceunen, 2012; Barbet-Massin, 2015). Cette diminution pourrait s'expliquer par la reprogrammation transcriptionnelle observée entre la fin de la phase végétative de croissance et le stade bourgeons floraux (Singh *et al.*, 2017). Les auteurs révèlent que l'expression des gènes spécifiques à la voie de biosynthèse des SGs (KA13H, et 3 UGTs) diminue au stade bourgeons floraux, et que l'expression des gènes spécifiques au GAs augmente. Il est admis qu'une fois produits, les SGs sont stockés au sein de la vacuole. Mais avec la surexpression des gènes appartenant à la voie de biosynthèse des SGs pendant la phase végétative de croissance (Singh *et al.*, 2017), on peut se demander si la stabilité de la teneur démontrée dans notre étude résulte d'un équilibre entre synthèse et dégradation des SGs. Cette hypothèse soulève la question de la fonction des SGs pour la plante, pour lesquelles il n'existe que des suppositions, et les mécanismes impliqués dans la régulation de l'accumulation sont inconnus. Il est en effet suggérer que les SGs pourraient servir de molécules de réserve permettant de fournir de l'énergie pendant la floraison et la maturation des graines (Ceunen & Geuns, 2013b).

Au cours de ces travaux de thèse, nous révélons une grande variabilité phénotypique pour tous les caractères mesurés. Dans le cadre d'un programme d'amélioration, cette variabilité est particulièrement avantageuse pour l'étude de la ségrégation des caractères d'intérêt et pour identifier le déterminisme génétique associé.

2.3 Impact sur l'itinéraire cultural

L'itinéraire cultural est énormément étudié pour permettre l'implantation de production en Europe (Angelini *et al.*, 2018). Cependant, ces études sont réalisées sur un nombre réduit de ressources génétiques (Paragraphe 1.1). La comparaison des comportements de 18 ressources génétiques en conditions de production sur deux années de croissance, sur deux sites expérimentaux, en fonction de deux durées d'implantation, permet d'évaluer la variabilité de réponse de *Stevia rebaudiana* aux conditions de la région Nouvelle-Aquitaine). L'interaction entre génotype et environnement est le facteur déterminant de la productivité de *Stevia rebaudiana*, néanmoins à travers cette étude nous pouvons identifier des points clés de l'itinéraire cultural qui pourront servir à son optimisation.

2.3.1 Choix du type de sol et de la durée d'implantation

Tout d'abord, nous mettons en évidence l'importance du type de sol en lien avec la durée d'implantation. Les meilleurs rendements en biomasse foliaire, et par conséquent en SGs, ont été obtenus à Liposthey (sol de texture sableuse) suite à une implantation de 5 mois en 1^{ère} année de croissance. De plus, cette condition a montré les meilleurs taux de reprise de la croissance après l'hiver (93% toutes ressources génétiques confondues). Chez le ray-grass anglais, la reprise de la croissance est positivement corrélée à la réserve en WSC (Water-Soluble Carbohydrate) dans les talles, dont la teneur dépend de la fréquence de récolte (Lee *et al.*, 2009). Nous pouvons donc supposer qu'une durée d'implantation prolongée a permis un meilleur développement du système racinaire et une mise en réserve optimale pour la reprise de la croissance à Liposthey. Il sera donc nécessaire pour l'implantation de production biologique en Nouvelle-Aquitaine de proposer aux agriculteurs des ressources génétiques adaptées à leur type de sol et de permettre une implantation plus précoce des plants (fin avril, début mai), garantissant une récolte en 1^{ère} année et une durée d'implantation suffisante pour la mise en réserve du système racinaire. Une implantation au début du printemps est préférable car une implantation trop précoce (Janvier-Mars) affecte négativement la croissance et le taux de reprise l'année suivante en Israël (Serfaty *et al.*, 2013).

2.3.2 La densité de plantation

La densité de plantation a un fort impact positif sur le rendement en biomasse foliaire ramené à l'hectare (Taleie *et al.*, 2012). Cependant, il est également démontré que l'augmentation de la densité diminue la biomasse foliaire produite par plant (Kumar *et al.*, 2014b). Dans cette étude, nous avons réalisé les expérimentations avec la densité la plus faible répertoriée chez *Stevia rebaudiana*. Nous supposons donc que la canopée est développée de manière optimale. Ainsi, la densité de plantation optimale doit être déterminée en fonction de l'architecture des plants (Munz *et al.*, 2018).

2.3.3 Le stade de récolte

La caractérisation de la mise en place des composantes du rendement en SGs de cinq génotypes de *Stevia rebaudiana* en 2^{ème} année peut permettre d'optimiser la récolte. En effet, nous avons mis en évidence que le rendement en SGs atteint son optimum en fin de croissance végétative. Plus particulièrement, la teneur en SGs diminue parfois fortement entre la fin de la croissance végétative et la formation des bourgeons floraux en fonction du génotype. Ce résultat nuance l'affirmation que ce stade permet d'obtenir le meilleur rendement en SGs (Bondarev *et al.*, 2004; Barbet-Massin, 2015). De plus, nous démontrons également qu'à ce stade, la croissance des tiges est nettement favorisée, conduisant aux valeurs les plus faibles de LMR (Leaf Mass Ratio). Une proportion de tige plus importante n'est pas un trait optimal pour l'effeuillage mécanique. Ces deux résultats semblent indiquer que la récolte doit être faite avant la formation des bourgeons floraux, à l'initiation de la floraison. Au niveau phénologique, cela peut correspondre au moment où les méristèmes apicaux commencent à se différencier.

3 Critères de sélection pour l'amélioration de *Stevia rebaudiana*

3.1 Le rendement en biomasse foliaire définit la productivité de *Stevia rebaudiana*

Dans toutes les expérimentations de l'étude, nous avons démontré que le rendement en biomasse foliaire détermine le rendement en SGs. Nous arrivons donc à la même conclusion que Barbet-Massin (2015), la production de biomasse foliaire est le caractère phénotypique à sélectionner pour améliorer la productivité de *Stevia rebaudiana*. La variabilité de ce trait est dépendante du génotype et de l'interaction génotype-environnement.

La caractérisation de la biomasse aérienne par un grand nombre de variables descriptives nous permet de mettre en évidence la dynamique de sa mise en place au cours du développement chez *Stevia rebaudiana*. Pendant les stades précoces du développement végétatif, le taux de

croissance relatif (RGR) est élevé, conduisant à la prédominance de la production de biomasse foliaire. Ceci se traduit par un Leaf Mass Ratio élevé (LMR; proportion de feuille par rapport à la biomasse plante entière). Le RGR diminue au cours du développement pour atteindre une valeur minimale au stade bourgeons floraux, conduisant à la même dynamique pour le LMR. Nous confirmons donc la diminution du LMR précédemment décrite pour trois génotypes de *Stevia rebaudiana* (Barbet-Massin, 2015). Le Specific Leaf Area (SLA), représentatif de l'épaisseur de la surface foliaire, suit la même dynamique que le RGR et le LMR. Le SLA et le LMR sont donc représentatif du taux de croissance chez *Stevia rebaudiana*. L'implication de ces variables pour la caractérisation de la croissance des plantes a déjà été démontrée (Rees *et al.*, 2010). Au cours du développement, la production de tige est donc privilégiée, conduisant à une augmentation du "Specific Stem Mass" (SSM; densité de biomasse par unité de surface de la canopée). Le Leaf Area Index (LAI; ratio de la surface foliaire par la surface occupée par la canopée) est stable tout au long du développement, ce qui signifie que la surface foliaire et la surface de la canopée restent proportionnelles. Nous avons montré que la dynamique de ces variables est commune au cinq génotypes étudiés. L'étude de la croissance végétative de *Stevia rebaudiana* n'avait pas encore été caractérisée par autant de variables descriptives, ni pour autant de ressources génétiques. Ces résultats constituent des bases pour la caractérisation de la croissance et la mise en place de la biomasse aérienne de cette espèce.

La forte variabilité morphologique de *Stevia rebaudiana* conduit à des différences significatives entre les génotypes pour tous les traits mesurés au stade bourgeons floraux. La caractérisation de la structure de la canopée a permis de révéler la large variabilité morphologique de *Stevia rebaudiana*. La combinaison de plusieurs traits phénotypiques est nécessaire pour la description de la variabilité du rendement en biomasse foliaire, ce qui révèle l'importante variabilité morphologique. Ainsi, nous avons identifié des descripteurs communs aux différentes conditions de l'étude qui permettent d'expliquer sa variabilité au sein de la collection au stade bourgeons floraux : la surface de la canopée (à travers les diamètres nord-sud et est-ouest), le Leaf Mass Ratio, et le Specific Stem Mass. La détermination supplémentaire du LAI et du SLA sur un nombre réduit de génotypes s'est montrée très informative et il serait nécessaire de les déterminer pour toute la collection étudiée. Ces deux variables ont permis d'illustrer la différence entre port droit et port buissonnant (Munz *et al.*, 2018). L'identification des variables expliquant la variabilité du rendement en biomasse est particulièrement intéressante pour cibler les caractères à étudier dans une stratégie d'amélioration. Chez le tabac, cette approche a permis d'identifier également quatre traits morphologiques pour l'amélioration du rendement en biomasse foliaire (Maleki *et al.*, 2011).

Dans cette étude, nous révélons des tendances entre rendement en biomasse et architecture de la canopée, mais ce ne sont pas des corrélations strictes. Dans nos conditions, les meilleurs rendements en biomasse foliaires ont été obtenus en 2^{ème} année de production pour des canopées se développant sur des surfaces au sol moins importantes et qui ont une biomasse aérienne dense. Cette architecture conduit à un LAI supérieur, négativement corrélé au SLA. Pour ces ressources génétiques nous pouvons supposer que leur capacité de perception et d'utilisation de la lumière est supérieure (Demura & Ye, 2010). En effet, il a été montré chez *Stevia rebaudiana* qu'un LAI supérieur ne conduit pas à une interception supérieure du rayonnement lumineux (Munz *et al.*, 2018). Chez le maïs, l'augmentation de la production de biomasse à des LAI élevés résulte d'une activité photosynthétique supérieure (Dwyerl *et al.*, 1991). Chez les espèces herbacées, une relation positive est montrée entre la capacité photosynthétique, le SLA et la teneur en azote dans les feuilles (Dubey *et al.*, 2017). L'assimilation de carbone et d'azote sont également des mécanismes clés de la production de biomasse (Lawlor, 2002). Chez *Stevia rebaudiana*, une seule étude a montré qu'en condition de lumière non limitante la teneur en azote dans les feuilles est positivement corrélée au taux d'assimilation du CO₂ et à la production de biomasse (Barbet-Massin *et al.*, 2015). Ainsi, pour de futures études, il serait pertinent de caractériser la capacité photosynthétique, l'assimilation du carbone et de l'azote en lien avec la structure de la canopée pour identifier les mécanismes mis en jeu au sein des ressources génétiques.

3.2 La capacité de reprise de la croissance après l'hiver garantit la pérennité de la culture

Au cours de cette thèse, nous avons pu évaluer la capacité de reprise de la croissance suite à l'hiver. Ainsi, nous montrons que la protection de parcelles par un voile d'hivernage améliore le taux de reprise par rapport à une autre étude française sans protection (Barbet-Massin *et al.*, 2016). La couverture de la parcelle permet de diminuer la sensibilité au froid de *Stevia rebaudiana*. Cette caractérisation nous permet d'identifier des génotypes particulièrement adaptés aux deux types de sols testés dans cette thèse, contrairement à des ressources génétiques non adaptées allant jusqu'à une absence totale de reprise. Nous pouvons également remarquer que le taux de reprise de la croissance n'est pas en lien direct avec la production de biomasse foliaire. En effet, les génotypes ayant les meilleurs taux de reprise ne sont pas forcément les génotypes les plus productifs. A notre connaissance, il n'existe pas d'études montrant les mécanismes impliqués dans la reprise de la croissance ou la résistance au froid chez *Stevia rebaudiana*.

3.3 La quantité et la proportion des SGs définissent la qualité gustative

3.3.1 La teneur en SGs

A l'état naturel, *Stevia rebaudiana* accumule entre 5 et 10 % w/w (Ceunen & Geuns, 2013c) et la sélection massale a permis d'apporter un gain à ce caractère pour atteindre jusqu'à 20% w/w (Yao *et al.*, 1999). La teneur en SGs de la collection étudiée varie de 4,5 à 18,4% w/w. Cette gamme est la même que celle observée dans une population Criolla de 96 génotypes provenant du Paraguay (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Nous pouvons donc conclure que la collection étudiée représente en majorité la variabilité actuelle de l'espèce *Stevia rebaudiana*. Cependant, une collection d'origine inconnue évaluée en Bulgarie atteint jusqu'à 22% w/w (Denev *et al.*, 2017), et la collection évaluée en Italie représentée par des génotypes du Brésil, du Paraguay et d'Italie atteindrait jusqu'à 27 % w/w (Montoro *et al.*, 2013). De telles teneurs suggèrent qu'il serait possible d'apporter un gain supplémentaire à la collection de notre étude, sachant que la teneur en SGs est un caractère fortement héritable (Brandle & Rosa, 1992), et que les programmes d'amélioration ont réussi à augmenter la teneur et stabilisée ce caractère pour leur variété (Yadav *et al.*, 2011b).

Il a été démontré que l'accumulation supérieure dans les feuilles comparée aux autres organes est en lien avec une expression transcriptionnelle supérieure des gènes de la voie de biosynthèse (Humphrey *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012). Cependant, aucune étude publiée n'a comparé le transcriptome de génotypes dont l'accumulation en SGs est opposée. De plus, l'annotation fonctionnelle du transcriptome de *Stevia rebaudiana* a révélé la présence de 58 familles de facteurs de transcription (Singh *et al.*, 2017). Les plus prédominantes sont les familles de facteurs de transcription de type MYB, bHLH et NAC, dont les implications dans de nombreux mécanismes sont reportées chez d'autres espèces végétales. De la même manière, aucune étude chez *Stevia rebaudiana* n'a évalué l'implication de facteurs de transcription dans la régulation de la voie de biosynthèse des SGs. Il serait donc judicieux de comparer les transcriptomes de génotypes dont l'accumulation est extrêmement opposée pour éventuellement identifier des régulateurs de la voie de biosynthèse et essayer de comprendre les mécanismes impliqués dans la variabilité d'accumulation en SGs dépendante du génotype et de son interaction avec l'environnement.

3.3.2 La composition en SGs

Le caractère dont le déterminisme semble uniquement provenir du génotype est la composition en SGs, que nous avons montré stable, quels que soient l'année, le site de production et le stade phénologique. Les variations observées sont trop faibles pour réellement conclure à un effet de ces différents facteurs. Ce résultat est en accord avec la précédente étude de Barbet-Massin *et al.* (2016). La seule variation qui pourrait être significative est la celle des proportions en ST et RebA au cours du développement. En effet, nous avons montré une évolution positive de la proportion de RebA et négative pour le ST en fonction de l'ontogénie, inférieure à 10 % des SGs totaux. Cette variation a déjà été caractérisée en conditions contrôlées et conduit à une augmentation du ratio RebA/ST (Ceunen & Geuns, 2013a). La stabilité des profils en SGs en fonction du génotype suppose une forte héritabilité de caractère. Ce résultat présente un intérêt évident pour l'amélioration de *Stevia rebaudiana* et serait en accord avec la stabilité des profils revendiqués chez les variétés développées. Il est montré que la présence/absence de RebA et RebC est déterminée par un caractère monogénique (Brandle, 1999). La production des SGs en système hétérologue montre que les UGTs sont suffisantes pour former différents SGs à partir du stéviol (Stephanopoulos & Ajikumar, 2012). On peut donc supposer que le déterminisme de la présence des SGs est dépendant de l'expression d'UGT spécifiques, comme il a été montré que la perte de fonction de l'UGT76G1 conduit à l'arrêt de l'accumulation en RebA (Yang *et al.*, 2014). Cependant, le déterminisme de la proportion de chaque SGs *in planta* est inconnu. Une seule étude a montré que la proportion en RebA et RebC est un caractère multigénique (Brandle, 1999), suggérant une régulation plus complexe. Le profil en SGs est le caractère primordial à sélectionner pour améliorer la saveur des extraits de Stévia.

L'intérêt grandissant de la détermination des profils en SGs provient de leur analyse gustative (Hellfrisch *et al.*, 2012; Espinoza *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2014). L'identification et la quantification d'un maximum de SGs est nécessaire. Dans cette thèse, une méthode de quantification robuste a été développée par HPLC en phase, et nous permet d'identifier et de quantifier les 10 SGs les plus décrits chez *Stevia rebaudiana*. La limite de quantification est à 0,05% w/w, ce qui permet de déterminer de faible teneur. Cependant, un nombre important de SGs peuvent être accumulés à des teneurs inférieures à la limite de quantification de la méthode. Une optimisation serait possible en utilisant un détecteur plus sensible que le détecteur UV à barrette de diode, comme la spectrométrie de masse (Gardana *et al.*, 2010; Pacifico *et al.*, 2017). De plus, cette méthode HPLC analytique est relativement longue (26 min de run par échantillon). Pour le passage d'un grand nombre d'échantillon, il serait avantageux de réduire la durée d'analyse. Pour cela, la méthode d'élution pourrait être transférée en

UHPLC, et permettrait de réduire considérablement le temps d'analyse, à 7-10 min (Nováková *et al.*, 2011). D'autres méthodes analytiques peuvent également être envisagées, principalement le NIRS, déjà développée sur matière sèche chez *Stevia rebaudiana* (Hearn & Subedi, 2009; Munz *et al.*, 2018). L'avantage considérable de cette méthode est qu'elle ne nécessite aucune extraction. Les spectres IR sont déterminés sur matière sèche. La mise au point de cette méthode nécessite la calibration des spectres IR avec une méthode de référence, qui serait la méthode développée par HPLC. La méthode développée par Hearn & Subedi (2009) présente l'inconvénient de ne déterminer que la teneur en SGs totaux, calibrée grâce à la teneur en ST, RebA et RebC. Munz *et al.* (2018) réussissent à quantifier spécifiquement le ST et le RebA, leur méthode est donc plus précise. Le NIRS semble être une méthode peu coûteuse et très rapide pour la détermination de la teneur en SGs totaux. Cependant, la caractérisation des profils en SGs est indispensable à l'amélioration de *Stevia rebaudiana*. Des tests de développement méthodologiques doivent être réalisés pour savoir s'il serait possible de quantifier un plus grand nombre de SGs spécifiquement par NIRS.

3.4 La sensibilité face à la septoriose

Au cours de cette thèse, nous avons confirmé que *Stevia rebaudiana* est atteinte par des maladies foliaires en Nouvelle-Aquitaine. La maladie foliaire la plus référencée chez Stévia est la septoriose, qui entraîne la nécrose foliaire à partir de la base du plant (Ishiba *et al.*, 1982; Lovering & Reeleder, 1996; Reeleder, 1999; Bhandari & Harsh, 2006). Ce pathogène est dispersé vers le haut des plants et vers les plants avoisinants au cours d'évènements pluvieux (Parker *et al.*, 1997). Actuellement, il n'existe pas de données précises sur l'incidence de ce pathogène fongique sur le rendement en SGs en condition de production, que ce soit en terme de perte de biomasse sèche, de teneur ou de composition. Reeleder (1999) estime jusqu'à 50% de perte directe en biomasse foliaire en plein champ au Canada. En France, Barbet-Massin (2015) observe une diminution de la teneur en SGs chez des plants atteints de nécroses foliaires.

Nous avons mis au point un test pour évaluer la réponse de *Stevia rebaudiana* face à *Septoria* sp. en conditions contrôlées. Ce test nous permet de révéler que tous les génotypes sont infectés et nous observons un gradient de sensibilité parmi les 10 génotypes testés. La réponse face à la souche de *Septoria* sp. testée est donc quantitative et confirme les précédents résultats de Reeleder (1999). L'évaluation de la réponse en condition d'infection naturelle nous permet de révéler les mêmes réponses extrêmes. Il semblerait que la réponse face à *Septoria* sp. soit principalement déterminée par le génotype puisque nous identifions les mêmes génotypes sensibles et tolérants en conditions contrôlées et extérieures. Cependant, nous n'avons pas testé toute la collection dans ces deux conditions. L'évaluation de la réponse des ressources

génétiques en conditions extérieures par une inoculation contrôlée paraît indispensable à la poursuite de l'étude pour confirmer les résultats obtenus en conditions contrôlées et extérieur dans le cas d'une infection naturelle. La variabilité de réponse face à la Septoriose suggère qu'il est possible d'apporter un gain génétique pour ce trait (Miedaner *et al.*, 2013; Karisto *et al.*, 2017). La résistance à *Septoria* sp. est un caractère indispensable à sélectionner pour la production en filière BIO en Aquitaine.

La caractérisation de la structure de la canopée réalisée au cours de cette thèse indique qu'un rendement supérieur en biomasse foliaire est atteint lorsque la biomasse est condensée au sein de la surface au sol représentée par la canopée. Ce résultat peut paraître problématique dans le cas d'une infection à *Septoria* sp. En effet, il a été montré que l'architecture chez le blé influence le développement de la maladie provoquée par *Septoria nodorum* (Scott *et al.*, 1985). Les canopées condensées conduisent à un microclimat favorable, retrouvée chez des variétés de faible hauteur. Les auteurs révèlent que les variétés plus grandes développent moins de symptômes grâce à la réduction de la durée d'humidification. Une étude chez le pois a permis d'identifier les traits structuraux favorisant la propagation de *Mycosphaerella pinodes* : le LAI cumulé, c'est-à-dire un LAI important au-dessus du départ d'infection, et la distance moyenne entre les nœuds (Le May *et al.*, 2009). Les auteurs indiquent que de longs entrenœuds réduisent la sévérité de la maladie, et suggèrent de réduire l'impact de cette maladie foliaire à travers l'architecture et la distribution de la surface foliaire. Le test que nous avons développé en conditions contrôlées ne permet pas d'évaluer l'incidence de l'architecture sur l'infection à *Septoria* sp. puisque nous avons travaillé sur des plants ayant une seule tige principale. Il apparaît nécessaire de caractériser la réponse des ressources génétiques en fonction de la structure de la canopée. Il est suggéré de promouvoir la circulation d'air chez *Stevia rebaudiana* pour diminuer la durée d'humidification des feuilles et réduire le développement de maladies foliaires par l'adaptation de l'irrigation et la sélection d'architecture aérée (Angelini *et al.*, 2018). Cependant, la structure de la canopée n'est qu'un des facteurs participant à la réponse aux pathogènes fongiques. Chez le blé, des souches de septoriose d'origines géographiques différentes montrent des niveaux d'agressivité différentes sur des variétés sensibles et modérément sensibles (Abrinbana, 2018). De plus, il existe deux types de résistances indépendantes : résistance affectant la reproduction et résistance affectant le développement du pathogène. Il est possible de les quantifier par analyse d'image (Karisto *et al.*, 2017).

4 Perspectives en vue d'une amélioration génétique

Les résultats de cette étude fournissent à la filière de Stévia BIO en Aquitaine de solides bases pour la mise en place d'un programme d'amélioration génétique de cette espèce. L'évaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques a permis de mettre en évidence l'existence d'une grande variabilité phénotypique au sein de la petite collection rassemblée et de comprendre les critères de sélection à cibler chez cette espèce pour une adaptation au bassin aquitain et pour répondre à la demande des industriels en termes de qualité de profils en SGs.

Différentes stratégies d'amélioration ont déjà été mises en place à travers le monde, amenant à plusieurs dépôts de brevet pour des variétés clonales ou populations. Ces approches ont été basées sur la sélection des caractères d'intérêt par phénotypage, stratégie longue et coûteuse. La sélection assistée par marqueur permet de réduire les temps et les coûts d'analyses phénotypiques. Une telle approche nécessite au préalable l'identification de corrélations statistiques entre caractère d'intérêt et région génomique, qualifiées de pré-breeding. Ce n'est que très récemment que des marqueurs moléculaires de type SNPs ont été utilisés pour la sélection d'individus accumulant plus de RebD et RebM (Markosyan *et al.*, 2017). Un des enjeux principaux de l'amélioration génétique de *Stevia rebaudiana* réside dans l'identification des régions du génome impliquées dans les caractères d'intérêt et la compréhension des mécanismes impliqués dans l'expression de ces caractères.

L'identification de QTL (Quantitative Trait Loci) nécessite la caractérisation du polymorphisme génotypique et phénotypique. Un set de marqueurs SSR a été développé et permet d'identifier et de classer les ressources génétiques en fonction de leur polymorphisme. La poursuite de l'étude nécessite l'obtention de population en ségrégation, d'une carte génétique à haute densité de marqueurs moléculaires et l'étude simultanée de la ségrégation des traits phénotypiques et des marqueurs moléculaires. La difficulté chez *Stevia rebaudiana* réside dans son mode de reproduction puisqu'elle est régie par des phénomènes d'auto-incompatibilité et est dépendante d'insectes polinisateurs (Yadav *et al.*, 2014).

L'approche de Family mapping est utilisée pour de nombreuses espèces hétérozygotes. En effet, cette stratégie s'est montrée efficace chez *Artemisia annua*, une Asteraceae productrice d'artémisine (sésquiterpène) (Graham *et al.*, 2010). Les auteurs ont construit une carte génétique et ont détecté les QTL impliqués dans les composantes du rendement dans une population F1 issue d'un croisement entre parents hétérozygotes. Il peut être ensuite envisagé d'identifier des parents élités au sein d'une population F2 issue de croisements biparentaux. En effet, l'évaluation des traits d'intérêt des descendance issues de croisements réciproques entre

30 génotypes parentaux a permis d'identifier les meilleurs parents pour favoriser l'hétérosis chez *Artemisia annua* (Townsend *et al.*, 2013). Cependant, la stratégie de croisement biparental peut paraître réductrice en terme de variabilité génotypique, les QTL identifiés sont spécifiques au croisement étudié, et les allèles favorables peuvent être difficiles à identifier à cause de l'hétérozygotie. La levée de l'auto-incompatibilité déjà observée au sein de la famille *Asteraceae* (Koseva *et al.*, 2017) permettrait d'obtenir des lignées pures par autofécondation successive, comme chez les espèces autogames (Lübberstedt, 2013). Des génotypes auto-compatibles de *Stevia rebaudiana* ont été brevetés aux USA (Markosyan & Jing, 2018). L'haplodiploïdisation est une autre approche qui permettrait d'obtenir des lignées pures plus rapidement et cette méthode a déjà été mise au point chez *Stevia rebaudiana*, faisant l'objet d'un brevet aux USA (Garnighian, 2012). Cependant, aucune évaluation précise des génotypes ainsi obtenus en conditions de production n'est disponible. La dépression de consanguinité possible dans le cas de l'usage de ces méthodes n'est pas non plus documentée.

La stratégie de génétique d'association pourrait apparaître comme plus robuste pour l'identification de QTL car elle nécessite un germplasm regroupant dans l'idéal le maximum de variabilité génotypique d'une espèce. Dans le cas de *Stevia rebaudiana*, l'absence de collection référencée, le manque de traçabilité et de partage de l'information et des ressources génétiques ne permettent pas actuellement de réaliser une telle approche. Ces contraintes et le caractère réducteur de croisements biparentaux peuvent amener à se diriger vers des populations connectées issus de croisements multi-parentaux, en particulier pour des caractères quantitatifs complexes et fortement variables telle que la biomasse aérienne.

Chez le maïs, cette approche augmente le nombre et la précision des QTLs détectés et permet d'identifier les allèles favorables pour chaque QTL (Blanc *et al.*, 2006). Cette stratégie a permis d'identifier des QTL pour la morphologie aérienne chez *Medicago truncatula* au sein de quatre populations issues de cinq génotypes parentaux (Lagunes Espinoza *et al.*, 2012). Chez *Mentha piperita*, l'étude de huit populations demi-frères a également permis d'évaluer l'héritabilité, le coefficient de variation et le gain génétique pour des traits liés à la production de biomasse et à la composition des huiles (Kumar *et al.*, 2014a). Ces approches de populations connectées ou de croisement multi-parentaux constituent des stratégies adaptées au besoin rapide d'amélioration variétale de *Stevia rebaudiana* pour une culture BIO en Aquitaine.

En parallèle aux travaux de cette thèse, l'optimisation de la méthode de croisements par des insectes pollinisateurs (dans ce cas, les bourdons) et l'identification du stade de maturité des graines en conditions extérieures ont permis d'obtenir une population F1 issue d'un croisement biparental et quatre populations issues de croisements ouverts. Ce matériel végétal constitue les premières populations en ségrégation utilisables pour la détection de QTL. Le développement de marqueurs SNP par séquençage RRL (Reduced-Representation Library) permet d'accroître les outils de génotypage pour le projet. Ces développements technologiques permettent la poursuite du projet de mise en place d'un programme d'amélioration par une nouvelle thèse CIFRE dont l'objectif est d'identifier les régions du génome impliqués dans les caractères d'intérêt caractérisés au cours de cette thèse.

Bibliographie

- Abdelsalam NR, Haraz ASM, Khalid AE, Saleh MSH, Elsheikh AEA. 2016.** Genetic Improvement through selection of different *Stevia rebaudiana* genotypes. *Alexandria Science Exchange Journal* **37**: 10–25.
- Abdullateef RA, Osman M. 2011.** Influence of genetic variation on morphological diversity in accessions of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Biology* **3**: 66–72.
- Abrinbana M. 2018.** Variation in aggressiveness components of *Zymoseptoria tritici* populations in Iran. *Journal of Phytopathology* **166**: 10–17.
- Aladakatti YR, Palled YB, Chetti MB, Halikatti SI, Alagundagi SC, Patil PL. 2012.** Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* **25**: 25–29.
- Allen AM, Thorogood CJ, Hegarty MJ, Lexer C, Hiscock SJ. 2011.** Pollen-pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of *Senecio squalidus*. *Annals of Botany* **108**: 687–698.
- Alvarez Britos ER. 2012a.** Stevia plant named "AKH L4". Plant Patent Application Publication, N° US 2012/0090063 P1. United States.
- Alvarez Britos ER. 2012b.** Stevia plant named "AKH L1". Plant Patent Application Publication, N° US PP23,164 P3. United States.
- Amirul Alam M, Juraimi AS, Rafii MY, Hamid AA, Kamal Uddin M, Alam MZ, Latif M a. 2014.** Genetic improvement of purslane (*Portulaca oleracea* L.) and its future prospects. *Molecular biology reports* **41**: 7395–411.
- Andolfi L, Macchia M, Ceccarini L. 2006.** Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italian Journal of Agronomy* **2**: 257–262.
- Angayarkanni T. 2013.** Biomanagement of root rot and leaf spot disease of *Stevia rebaudiana* using plant growth promoting rhizobacteria. *Avinashilingam University for Women, Tamil Nadu, India*.
- Angelini LG, Martini A, Passera B, Tavarina S. 2018.** Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and associated challenges. In: Mérillon J-M, Ramawat K G (eds.), Sweeteners, Reference Series in Phytochemistry, 35–85. Springer International Publishing AG.
- Aranda-gonzález I, Moguel-ordoñez Y, Betancur-ancona D. 2014.** Validation of HPLC-UV method for determination of minor glycosides contained in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Biomedical Chromatography* **29**: 733–738
- ASC Inc. 2013.** Plant Breeding Research in Agriculture. *Analytical Spectral Devices Inc.*

- Bandillo N, Raghavan C, Muyco PA, Sevilla MAL, Lobina IT, Dilla-Ermita CJ, Tung C-W, McCouch S, Thomson M, Mauleon R, et al. 2013.** Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* **6**: 11.
- Barbet-Massin C. 2015.** Sélectionner et cultiver *Stevia rebaudiana* Bertoni en milieu tempéré: exploration de la variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol. Thèse de doctorat. Université de Toulouse-INP Toulouse. France.
- Barbet-Massin C, Giuliano S, Alletto L, Daydé J, Berger M. 2015.** Nitrogen limitation alters biomass production but enhances steviol glycoside concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS ONE* **10**: 1–16.
- Barbet-Massin C, Giuliano S, Alletto L, Daydé J, Berger M. 2016.** Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition. *Genetic Resources and Crop Evolution* **63**: 685–694.
- Basuki S. 1990.** Effects of black plastic mulch and plant density on the growth of weeds and stevia. *BIOTROP Special Publication* **38**: 107–1.
- Benelli G, Canale A, Romano D, Flamini G, Tavarini S, Martini A, Ascricchi R, Conte G, Mele M, Angelini LG. 2017.** Flower scent bouquet variation and bee pollinator visits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), a source of natural sweeteners. *Arthropod-Plant Interactions*. **11**: 381–388.
- Benhminou A, Ibriz M, Al Faïz C, Douaik A, Zouahri A, Moussadek R, Lage M. 2016.** Estimating water requirements and reference evapotranspiration of *Stevia* in North-Western Morocco. *International Journal of Recent Scientific Research* **7**: 14395–14400.
- Benhmimou A, Ibriz M, Faïz C Al, Gaboun F, Douaik A, Amchra FZ, Khiraoui A, Lage M. 2017.** Effects of planting density and harvesting time on productivity of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Larache Region, Morocco. *International Journal of Plant Research* **7**: 83–89.
- Bertoni MS. 1905.** Le Kaà Hê-é: sa nature et ses propriétés. *Anales Cientificos Paraguayos* **1**: 1–14.
- Bhandari S, Harsh NSK. 2006.** First Report of *Septoria steviae* on *Stevia rebaudiana* in India. *Indian Forester* **132**: 385–385.
- Bhandawat A, Sharma H, Nag A, Singh S. 2014.** Functionally relevant novel microsatellite markers for efficient genotyping in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Genetics* **93**: 75–81.
- Bililign T, Moore C, Tan S, Leeks AT. 2014.** Development and validation of a reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography method for routine identification and purity assessment of high-purity steviol glycoside sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 1384–1389.
- Blanc G, Charcosset A, Mangin B, Gallais A, Moreau L. 2006.** Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: An application in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 206–224.

- Blancard D. 2014.** *Athelia rolfsii* (Sclerotium rolfsii, Pourritures à *Athelia*). *Ephytia* (<http://ephytia.inra.fr>).
- Blancard D. 2018.** Identifier les maladies et les ravageurs. *Ephytia* (<http://ephytia.inra.fr>).
- Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A. 2001.** Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science* **161**: 155–163.
- Bondarev NI, Sukhanova MA, Reshetnyak O V., Nosov AM. 2004.** Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum* **47**: 261–264.
- Brandle J. 1999.** Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science* **79**: 85–92.
- Brandle J. 2001.** *Stevia rebaudiana* with altered steviol glycoside composition. Patent Application Publication. N° US 6,255,557 B1. United States.
- Brandle JE, Richman A, Swanson AK, Chapman BP. 2002.** Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana* : a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology* **50**: 613–622.
- Brandle JE, Rosa N. 1992.** Heritability for yield, leaf : stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science* **72**: 1263–1266.
- Brandle J, Sys EA, Marsolais AA. 1998.** *Stevia* plant named "RSIT 95-166-13". Plant Patent Reference: Plant 10,563. United States.
- Brandle J., Starratt A., Gijzen M. 1998.** *Stevia rebaudiana* : its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science* **78**: 527–536.
- Brandle JE, Telmer PG. 2007.** Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* **68**: 1855–1863.
- Bridel M, Lavieille R. 1931.** Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Bulletin de la société de Chimie Biologique* **13**: 636–655 .
- Brower RJ, Carlson TL, Dang B, Gonzales MD, Kennedy MM, Knutson NE. 2014.** *Stevia* plant with an increased Rebaudioside D content. International Patent Application Publication, N° WO 2014/146084 A1. United States.
- Brusick DJ. 2008.** A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 83–91

- Buana L. 1958.** Determination of the required growth variables in a stevia agronomic experiment. *Menara Perkebunan (Indonesia)* **78**: 527–536.
- Buana L, Goenadi D. 1985.** A study on the correlation between growth and yield in Stevia. *Menara Perkebunan* **53**: 68–71.
- Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. 2008.** Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* **46**: S1–S10.
- Carneiro JWP. 2007.** Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: stages of plant development. *Canadian Journal of Plant Science* **87**: 861–865.
- Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR. 2017.** Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology* **107**: 302–317.
- Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. 2017.** Stevia rebaudiana Bertoni: A natural alternative for treating diseases associated with metabolic syndrome. *Journal of Medicinal Food* **20**: 933–943.
- Carrieri R, Cozzolino E, Tarantino P, Cerrato D, Lahoz E. 2016.** First report of Southern Blight on candyleaf (*Stevia rebaudiana*) caused by *Sclerotium rolfsii* in Italy. *Plant Disease* **100**: 220.
- Casaccia J, Britos R, Bozzano G, Sanabria A, Cantero F. 2016.** Ka'a he'e *Stevia rebaudiana* (Bertoni): La dulce planta de Paraguay para el mundo, alternativa para la diversificación de la finca. Rosanna Britos, Jongdae Park, eds. *Caacupé, Py, IPTA, CIHB, KOPIA*. 116 p.
- Ceunen S. 2012.** Metabolism of steviol glycosides in *Stevia* species. *PhD Thesis. Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, België*.
- Ceunen S, Geuns JMC. 2013a.** Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* **198**: 72–82.
- Ceunen S, Geuns JMC. 2013b.** Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry* **89**: 32–38.
- Ceunen S, Geuns JMC. 2013c.** Steviol Glycosides: chemical diversity, metabolism and function. *Journal of Natural Products* **76**: 1201–1228.
- Chalapathi M., Thimmegowda S, Sridhara S. 1998.** Correlation studies in stevia. *The Indian Journal of Agricultural Sciences* **42**: 137–138.
- Chang KF, Howard RJ, Gaudiol RG, Hwang SF. 1997.** First report of stevia as a host of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **81**: 311–311.

- Chaturvedula VSP, Prakash I. 2011.** Utilization of RP-HPLC fingerprinting analysis for the identification of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology* **1**: 88–92.
- Chaturvedula VSP, Meneni SR. 2017.** A New Penta β -D-Glucopyranosyl Diterpene from *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Organic Chemistry* **07**: 91–98.
- Chatzivassiliou EK, Giakountis A, Testa A, Kienle U, Jungbluth T. 2016.** Natural infection of *Stevia rebaudiana* by *Cucumber mosaic virus* in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. *Plant Disease* **100**: 1029–1029.
- Chatzivassiliou EK, Peters D, Lolos P. 2007.** Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in *Stevia rebaudiana* and *Solanum tuberosum* in Northern Greece. *Plant Disease* **91**: 1205–1205.
- Chavan SS. 2017.** Studies on soilborne diseases of stevia and their management with special reference to sclerotium wilt. *PhD Thesis. University of Agricultural Sciences, Dharwad, India.*
- Chen J, Hou K, Qin P, Liu H, Yi B, Yang W, Wu W. 2014.** RNA-Seq for gene identification and transcript profiling of three *Stevia rebaudiana* genotypes. *BMC genomics* **15**: 571.
- Chen J-M, Xia Y-M, Zhang Y-D, Zhang T-T, Peng Q-R, Fang Y. 2017.** Influence of substrates on the *in vitro* kinetics of steviol glucuronidation and interaction between steviol glycosides metabolites and UGT2B7. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **69**: 472–479 .
- Chester K, Tamboli ET, Parveen R, Ahmad S. 2013.** Genetic and metabolic diversity in *Stevia rebaudiana* using RAPD and HPTLC analysis. *Pharmaceutical biology* **51**: 771–7.
- Davey JW, Cezard T, Fuentes-Utrilla P, Eland C, Gharbi K, Blaxter ML. 2013.** Special features of RAD Sequencing data: Implications for genotyping. *Molecular Ecology* **22**: 3151–3164.
- Demura T, Ye Z-H. 2010.** Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 298–303.
- Denev PN, Uchkunov II, Uchkunov VI, Kratchanova MG. 2017.** Content of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* B.) genotypes cultivated in Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications* **49**: 121–125.
- Dubey P, Raghubanshi AS, Dwivedi AK. 2017.** Relationship among specific leaf area , leaf nitrogen , leaf phosphorus and photosynthetic rate in herbaceous species of tropical dry deciduous in Vindhyan highlands. *Annals of Plant Sciences* **6.02**: 1531–1536.
- Dwyerl LM, Tollenaar M, Stewartl DW. 1991.** Changes in plant density dependence of leaf photosynthesis of maize (*Zea mays* L .) hybrids, 1959 to 1988. *Canadian Journal of Plant Science* **71**: 1–11.

- Ellegren H. 2014.** Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in Ecology and Evolution* **29**: 51–63.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011.** A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* **6**: 1–10.
- Embiale A, Hussein M, Husen A, Sahile S, Mohammed K. 2016.** Differential sensitivity of *Pisum sativum* L. cultivars to water-deficit stress: changes in growth, water status, chlorophyll fluorescence and gas exchange attributes. *Journal of Agronomy* **15**: 45–57.
- Espinoza MI, Vincken J, Sanders M, Castro C, Stieger M, Agosin E. 2014.** Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed *Stevia rebaudiana* commercial extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 11797–11804.
- European Commission. 2017.** *Stevia rebaudiana*. *Novel Food Catalogue*. (https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/)
- European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments). 2011.** Les édulcorants (<https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/sweeteners>).
- FAO (Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture), OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 2017.** *Noms de catégorie et système international de numérotation des additifs alimentaires*. CAC/GL 36-1989.
- Farrar JJ, Davis RM, Canevari WM, Fouche CF. 2000.** First report of *Verticillium dahliae* on *Stevia (Stevia rebaudiana)* in North America. *Plant Disease* **84**: 922–922.
- Faus I, Sisniega H. 2005.** Sweet-tasting proteins. *Biopolymers Online*: 203–210.
- Frederico a. P, Ruas PM, Marin-Morales M a., Ruas CF, Nakajima JN. 1996.** Chromosome studies in some *Stevia Cav.* (Compositae) species from southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics* **19**: 605–610.
- Ferrazzano GF, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Zarrelli A, Di Fabio G, Pollio A. 2016.** Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a non cariogenic sweetener? *Molecules* **21**: 1–12.
- Filippi C V, Aguirre N, Rivas JG, Zubrzycki J, Puebla A, Cordes D, Moreno M V, Fusari CM, Alvarez D, Heinz RA, et al. 2015.** Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biology* **15**: 52.
- Fox J, Weisberg S. 2011.** *An R Companion to Applied Regression*. Second Edition. SAGE Publications Inc.
- Freschet GT, Swart EM, Cornelissen JHC. 2015.** Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources: Key roles of specific leaf area and root mass fraction. *New Phytologist* **206**: 1247–1260.
- Gantait S, Das A, Banerjee J. 2018.** Geographical distribution, botanical description and self-incompatibility mechanism of genus *Stevia*. *Sugar Tech* **20**: 1–10.

- Garibaldi A, Bertetti D, Pensa P, Gullino ML. 2009.** First report of gray mold caused by *Botrytis cinerea* on *Stevia rebaudiana* in Italy. *Plant Disease* **93**: 318–318.
- Garnighian GV. 2012.** Stevia Plant named "T60". Plant Patent Application Publication, N° US PP22,593 P3. United States.
- Geuns JMC, Buyse J, Vankeirsbilck A, Temme EHM, Compennolle F, Toppet S. 2006.** Identification of steviol glucuronide in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 2794–2798.
- Goettemoeller J, Ching A. 1999.** Seed germination in *Stevia rebaudiana*. *J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA Perspectiv*: 510–511.
- Gong L, Gulya TJ, Markell SG, Hulke BS, Qi LL. 2013.** Genetic mapping of rust resistance genes in confection sunflower line HA-R6 and oilseed line RHA 397. *Theoretical and applied genetics* **126**: 2039–49.
- Graham I a, Besser K, Blumer S, Branigan C a, Czechowski T, Elias L, Guterman I, Harvey D, Isaac PG, Khan AM, et al. 2010.** The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science* **327**: 328–331.
- Grevsen K, Sorensen JN. 2016.** 2nd year cultivation results of the Danish ‘Green Stevia’ project—a natural sweetener for organic food products. *From Field to Fork, Proceedings of the 9th Stevia Symposium 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th September 2016, Jan M.C. Geuns editors*: 115–126.
- Guajardo V, Solís S, Sagredo B, Gainza F, Muñoz C, Gasic K, Hinrichsen P. 2015.** Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by genotyping-by-sequencing (GBS). *PLoS ONE* **10**: 1–17.
- Guleria P, Masand S, Yadav SK. 2015.** Diversion of carbon flux from gibberellin to steviol biosynthesis by over-expressing SrKA13H induced dwarfism and abnormality in pollen germination and seed set behaviour of transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3907–3916
- Gutiérrez DG, Muñoz-Schick M, Grossi MA, Rodríguez-Craverro JF, Morales V, Moreira-Muñoz A. 2016.** The genus *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) in Chile: A taxonomical and morphological analysis. *Phytotaxa* **282**: 1–18.
- Haiyan Y, Guo Z, Yulin H, Suzhen H. 2008.** Double clone choiceness F1 *Stevia rebaudianum* hybrid seeds production method. Patent Application Publication, N° CN101213935A. China.
- Haiyan Y, Yongheng Y, Yulin H, Suzhen H. 2012.** Method for production of superior *Stevia rebaudiana* Bertoni F1 generation seeds. Patent Application Publication, N° CN102715074A. China.

- Hajhashemi S, Geuns JMC. 2016.** Gene transcription and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* under polyethylene glycol-induced drought stress in greenhouse cultivation. *FEBS Open Bio* **6**: 937–944.
- Harrington KC, Southward RC, Kitchen KL, He XZ. 2011.** Investigation of herbicides tolerated by *Stevia rebaudiana* crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **39**: 21–33.
- Hastoy C, Cosson P, Sclaunich E, Jannot P, Boutié P, Rolin D, Schurdi-levraud V. 2015.** Towards breeding of new *Stevia rebaudiana* cultivars adapted to organic production in the South West of France : First results on genetic and phenotypic evaluation. *Proceedings of the 8th Stevia Symposium 2015, EUSTAS, University of Bonn, Germany*: 225–232.
- Hastoy C, Cosson P, Sclaunich E, Jannot P, Boutié P, Cavaignac S, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2016.** Organic stevia production and development of Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers as a tool for *Stevia rebaudiana*'s Germplasm characterization and future breeding purposes. *From Field to Fork, Proceedings of the 9th Stevia Symposium 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th September 2016, Jan M.C. Geuns editors*: 127–136.
- Hearn LK, Subedi PP. 2009.** Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**: 165–168.
- Heikal AH, Badawy OM, Hafez AM. 2008.** Genetic relationships among some *Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni)* accessions based on ISSR analysis. *Research Journal of Cell and Molecular Biology* **2**: 1–5.
- Hellfritsch C, Brockhoff A, Stähler F, Meyerhof W, Hofmann T. 2012.** Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 6782–6793.
- Hilal AA, Baiuomy MA. 2000.** First record of fungal diseases of stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) in Egypt. *Egyptian Journal of Agricultural Research* **78**: 1435–1448.
- Hodgins KA, Lai Z, Oliveira LO, Still DW, Scascitelli M, Barker MS, Kane NC, Dempewolf H, Kozik A, Kesseli R V., et al. 2014.** Genomics of compositae crops: reference transcriptome assemblies and evidence of hybridization with wild relatives. *Molecular Ecology Resources* **14**: 166–177.
- Hoffmann WA, Poorter H. 2002.** Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany*: 37–42.
- Hosono F, Komai K, Matsuda K, Mojita K, Morita T. 2001.** Identification of stevia variety by dna identification. Patent Application Publication, N° JP2003009878A. Japan.
- Humphrey T V., Richman AS, Menassa R, Brandle JE. 2006.** Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant Molecular Biology* **61**: 47–62.

- Ibrahim MA, Rodenburg DL, Alves K, Perera WH, Fronczek FR, Bowling J, McChesney JD. 2016a.** Rebaudiosides R and S, minor diterpene glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products* **79**: 1468–1472.
- Ishiba C, Yokoyama T, Tani T. 1982a.** Leaf spot disease of Stevia caused by *Septoria steviae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **48**: 24–43.
- Ishiba C, Yokoyama T, Tani T. 1982b.** Black spot disease of stevia caused by *Alternaria steviae*. *Japanese Journal of Phytopathology* **48**: 44–51.
- Jain S, Kumar A, Mamidi S, McPhee K. 2014.** Genetic diversity and population structure among pea (*Pisum sativum* L.) cultivars as revealed by simple sequence repeat and novel genic markers. *Molecular biotechnology* **56**: 925–38.
- JECFA (JF Expert Committee on Food Additives) meeting. 2004.** Alimate. *Test* **4**: 1–4.
- JECFA (JF Expert Committee on Food Additives) meeting. 2010.** *Compendium of food additive specifications: 73rd meeting*. (Joint FAO/WHO expert committee on food additives, Ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations (Rome) World Health Organization (Geneve).
- Joint Committee For Guides In Metrology. 2012.** International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd Edition. JCGM publishers.
- Kafle GG. 2011.** Some studies on the physiology of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Ph.D Thesis, University Australia, Rockhampton*
- Kafle GG, Midmore DJ, Gautam R. 2017.** Effect of nutrient omission and pH on the biomass and concentration and content of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under hydroponic conditions. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **7**: 136–142
- Kamalakaran A, Valluvarparidasan V, Chitra K, Rajeswari E, Salaheddin K, Ladhakshmi D, Chandrasekaran A. 2007.** First report of root rot of stevia caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Pathology* **56**: 350.
- Karimi M, Ahmadi A, Hashemi J, Abbasi A, Tavarini S, Guglielminetti L, Angelini LG. 2015.** The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae* **183**: 93–99
- Kaur R, Sharma N, Raina R. 2015.** Identification and functional annotation of expressed sequence tags based SSR markers of *Stevia rebaudiana*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **39**: 1–12.
- Khalil SA, Zamir R, Ahmad N. 2014.** Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences* **21**: 566–573.
- Kim MJ, Jin J, Zheng J, Wong L, Chua N-H, Jang I-C. 2015.** Comparative transcriptomics unravel biochemical specialization of leaf tissues of Stevia (*Stevia*

rebaudiana) for diterpenoid production. *Plant Physiology* **169**: 2462–2480

Kim JY, Prescott J, Kim KO. 2017. Emotional responses to sweet foods according to sweet liker status. *Food Quality and Preference* **59**: 1–7.

Kinghorn AD. 2002. *Stevia : the genus Stevia*. Taylor & Francis, London publisher.

Kinghorn a D, Soejarto DD, Nanayakkara NP, Compadre CM, Makapugay HC, Hovanec-Brown JM, Medon PJ, Kamath SK. 1984. A phytochemical screening procedure for sweet ent-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. *Journal of natural products* **47**: 439–444.

Kishore G, Motion M, Hicks PM, Hansen J, Houghton-Larsen J, Hansen EH, Mikelsen MD, Tavares S, Blom C. 2011. Recombinant Production of Steviol Glycosides. International Patent Application, N° WO 2011/153378 A1. United States.

Koehler AM, Brown JA, Huber B, Wehner TC, Shew HD. 2016. First report of *Tomato spotted wilt virus* in *Stevia rebaudiana* in North Carolina. *Plant Disease* **100**: 1251.

Koehler AM, Lookabaugh EC, Shew BB, Shew HD. 2017. First report of pythium root rot of stevia Caused by *Pythium myriotylum*, *P. irregulare* and *P. aphanidermatum* in North Carolina. *Plant Disease* **101**: 1331.

Koehler A, Shew H. 2014a. First report of stem and root rot of stevia caused by *Sclerotium rolfsii* in North Carolina. *Plant Disease* **98**: 1005–1005.

Koehler A, Shew H. 2014b. First report of stem rot of stevia caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in North Carolina. *Plant Disease* **98**: 1433–1433.

Koehler AM, Shew HD. 2017. Enhanced overwintering survival of stevia by QoI fungicides used for management of *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease* **101**: 1417–1421.

Koehler AM, Shew HD. 2018. First report of charcoal rot of stevia caused by *Macrophomina phaseolina* in North Carolina. *Plant Disease* **102**: 241–241.

Koseva B, Crawford DJ, Brown KE, Mort ME, Kelly JK. 2017. The genetic breakdown of sporophytic self-incompatibility in *Tolpis coronopifolia* (Asteraceae). *New Phytologist* **216**: 1256–1267.

Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kaul VK, Kumar S. 2012a. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene* **492**: 276–284.

Kumar B, Mali H, Gupta E. 2014. Genetic variability, character association and path analysis for economic traits in Menthofuran Rich Half-Sib seed progeny of *Mentha piperita* L. *BioMed Research International* **2014**: 7 p.

Kumar R, Sharma S, Sood S. 2014. Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science* **60**: 1731–1745.

- Lagunes Espinoza L del C, Huguet T, Julier B. 2012.** Multi-population QTL detection for aerial morphogenetic traits in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 739–754.
- Lankes C, Zabala U. 2011.** Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *Proceedings of the 5th Stevia Symposium 2011, EUSTAS, Belgium, Jan M.C. Geuns editors*: 75–87.
- Lankes C, Grosser P. 2015.** Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. *Proceedings of the 8th Stevia Symposium 2015, EUSTAS, Germany, 27-28th January 2015, Jan M.C. Geuns editors*: 167–176.
- Lao X, Suwabe K, Niikura S, Kakita M, Iwano M, Takayama S. 2014.** Physiological and genetic analysis of CO₂-induced breakdown of self-incompatibility in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 939–951.
- Lata H, Chandra S, Techen N, Wang Y-H, Khan IA. 2013.** Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker. *American Journal of Plant Sciences* **04**: 964–971.
- Lavini A, Riccardi M, Pulvento C. 2008.** Yield, quality and water consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under different irrigation regimes in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy* **2**: 135–143.
- Lawlor DW. 2002.** Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understandig production systems. *Journal of Experimental Botany* **53**: 773–787.
- Lee JM, Donaghy DJ, Sathish P, Roche JR. 2009.** Interaction between water-soluble carbohydrate reserves and defoliation severity on the regrowth of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)-dominant swards. *Grass and Forage Science* **64**: 266–275.
- Le May C, Ney B, Lemarchand E, Schoeny A, Tivoli B. 2009.** Effect of pea plant architecture on spatiotemporal epidemic development of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) in the field. *Plant Pathology* **58**: 332–343.
- Lentscher K. 2012.** Le marché de la stevia décolle en France. *LeFigaro* (<http://www.lefigaro.fr/societes/2012/09/21/20005-20120921ARTFIG00639-le-marche-de-la-stevia-decolle-en-france.php>).
- Li Y, Baldauf S, Lim EK, Bowles DJ. 2001.** Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 4338–4343.
- Li SW, Bu YC, Markosyan A. 2017a.** Stevia cultivar "817096". Plant Patent Application, N° US 9,668,450 B2. United States.
- Li SW, Bu YC, Markosyan A. 2017b.** Stevia cultivar "814011". Plant Patent Application, N° US 9,668,451 B2. United States.
- Li SW, Bu YC, Markosyan A. 2017c.** Stevia cultivar "807086". Plant Patent Application, N° US 9,675,015 B2. United States.
- Lovering NM, Reeleder RD. 1996.** First report of *Septoria steviae* on stevia (*Stevia rebaudiana*) in North America. *Plant Disease* **80**: 959.

- Macchia M, Andolfi L, Ceccarini L, Angelini LG. 2007.** Effects of temperature, light and pre-chilling on seed germination of *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions. *Italian Journal of Agronomy* **1**: 55–62.
- Madhav H, Bhasker S, Chinnamma M. 2013.** Functional and structural variation of uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT) gene of *Stevia rebaudiana*—UGTSr involved in the synthesis of rebaudioside A. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**: 245–253.
- Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. 2016.** Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews* **74**: 670–689.
- Maiti CK, Sen S, Acharya R, Acharya K. 2007.** First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology* **56**: 723–723.
- Maleki HH, Karimzadeh G, Darvishzadeh R, Sarrafi A. 2011.** Correlation and sequential path analysis of some agronomic traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to improve dry leaf yield. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 1644–1648.
- Mao G, Chaturvedula VSP, Vick JE, Yu O. 2017.** Enzymatic Synthesis and Structural Characterization of Rebaudioside D3, a Minor Steviol Glycoside of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *American Journal of Plant Sciences* **08**: 441–450.
- Markosyan A, Ong SS, Wong YY, Bu YC, Chen JN. 2017.** Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers for Stevia. Patent Application Publication, N° US 2017/0283819 A1. United States.
- Markosyan A, Jing R. 2018.** Self-compatible stevia varieties, breeding methods therefrom and methods of preparing novel compositions using said varieties. Patent Application Publication, N° US 2018/0070553 A1. United States.
- Marsolais AA, Brandle J, Sys EA. 1998.** Stevia plant named "RSIT 94-751". Plant Patent Application, Reference: Plant 10,564. United States.
- Martini A, Tavarini S, Macchia M, Benelli G, Canale A, Romano D, Angelini LG. 2017.** Influence of insect pollinators and harvesting time on the quality of *Stevia rebaudiana* (Bert.) seeds. *Plant Biosystems* **151**: 341–351.
- Mathur S, Bulchandani N, Parihar S, Shekhawat GS. 2017.** Critical review on steviol glycosides: Pharmacological, toxicological and therapeutic aspects of high potency zero caloric sweetener. *International Journal of Pharmacology* **13**: 916–928.
- Mayank, Jaitak V. 2015.** Interaction model of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) with sweet taste receptors: A computational approach. *Phytochemistry* **116**: 12–20
- McInnis SM, Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, Henderson CA, Hiscock SJ. 2005.** Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Plant Molecular Biology* **57**: 659–677.
- Megeji NW, Kumar JK, Singh V, Kaul VK, Ahuja PS. 2005.** Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science* **88**: 801–804.
- Meng Qingfu Meng Aihua. 1998.** Studies on overwintering of *Stevia Rebaudiana* Bertoni

perennial root. *Journal of Hebei Agricultural Sciences* **01**: 005.

Metivier J, Viana AM. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars, and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *Journal of Experimental Botany* **30**: 1211–1222.

Midmore DJ, Rank A, Walsh, K. B, Reyes, R., Gautam, G, Hopkins, K. C. 2012. Further development of the stevia natural sweetener industry. *RIRDC Report* 12/051:55.

Michalik A, Hollinshead J, Jones L, Fleet GWJ, Yu CY, Hu XG, Van Well R, Horne G, Wilson FX, Kato A, et al. 2010. Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Letters* **3**: 136–138.

Michigan States University. 2018. Novel stevia varieties with superior taste profile for Sweeteners. Patent inventors: Warner R, Beaudry R, Hancock J. (<http://msut.technologypublisher.com/technology/22776>).

Miedaner T, Zhao Y, Gowda M, Longin CFH, Korzun V, Ebmeyer E, Kazman E, Reif JC. 2013. Genetic architecture of resistance to *Septoria tritici* blotch in European wheat. *BMC genomics* **14**: 858.

Modi A, Litoriya N, Prajapati V, Rafalia R, Narayanan S. 2014. Transcriptional profiling of genes involved in steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni during plant hardening. *Developmental Dynamics* **243**: 1067–1073.

Modi AR, Raj S, Kanani P, Patel A, Narayanan S. 2013. Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia Rebaudiana* Bertoni treated with steviol as an immediate precursor. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**: 481–488

Mohamed AAA, Ceunen S, Geuns JMC, Van den Ende W, De Ley M. 2011. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1136–1141.

Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. 2017. Characterization of *Stevia* leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. *Food Chemistry* **219**: 329–338.

Montoro P, Molfetta I, Maldini M, Ceccarini L, Piacente S, Pizza C, Macchia M. 2013. Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC–ESI–MS/MS. *Food Chemistry* **141**: 745–753.

Morita T, Bu Y. 1998. Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Patent Application, N° 6,031,157. United States.

Morita T, Morita K, Kanzaki S. 2009. Novel *Stevia* Variety and method of producing sweetener. European Patent Application, N° PCT/JP2009/050878. United States.

- Morita T, Morita K, Komai K. 2007.** Stevia sweetener. European Patent Application, N° PCT/JP2006/303992. United States.
- Munz S, Präger A, Merkt N, Claupein W, Graeff-Hönninger S. 2018.** Leaf area index, light interception, growth and steviol glycoside formation of *Stevia rebaudiana* Bertoni under field conditions in southwestern Germany. *Industrial Crops and Products* **111**: 520–528.
- Mu-zuan C, Wei-lian H, Shao-pang C, De-yao W. 1983.** Observations of the leaf cell vacuole of *Stevia rebaudiana* Bertoni under the electron microscope. *Acta Bot. Sinica* **25**: 426–432.
- Narum S, Buerkle C, Davey JW, Miller M, Hohenloha P. 2014.** Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology* **22**: 2841–2847.
- Nováková L, Veuthey JL, Guillarme D. 2011.** Practical method transfer from high performance liquid chromatography to ultra-high performance liquid chromatography: The importance of frictional heating. *Journal of Chromatography A* **1218**: 7971–7981.
- Oerke EC, Dehne HW. 2004.** Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* **23**: 275–285.
- de Oliveira VM, Forni-Martins ER, Magalhães PM, Alves MN. 2004.** Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* **27**: 215–222.
- Olivier B, Serge AH, Catherine A, Jacques B, Murielle B, Marie-Chantal C-L, Sybil C, Jean-Philippe G, Sabine H, Esther K, et al. 2015.** Review of the nutritional benefits and risks related to intense sweeteners. *Archives of Public Health* **73**: 41.
- Orloff N, Mangold J, Miller Z, Menalled F. 2018.** A meta-analysis of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) and Canada thistle (*Cirsium arvense* L.) management in organic agricultural systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **254**: 264–272.
- Oviatis. 2015.** Nos Défis. on Oviatis website: <http://www.oviatis.fr/>
- Oviatis. 2018.** Itinéraire cultural. on Oviatis website: <http://www.oviatis.fr/>
- Pacifico S, Piccolella S, Nocera P, Tranquillo E, Dal Poggetto F, Catauro M. 2017.** Steviol glycosides content in cultivated *Stevia rebaudiana* Bertoni: A new sweet expectation from the Campania region (Italy). *Journal of Food Composition and Analysis* **63**: 111–120.
- Pal PK, Prasad R, Pathania V. 2013.** Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Plant Physiology* **170**: 1526–1535.
- Pal PK, Mahajan M, Prasad R, Pathania V, Singh B, Ahuja PS. 2015.** Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. *Industrial Crops and Products* **65**: 556–564.
- Pande SS, Gupta P. 2013.** Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* **5**: 26–33.
- Parker SK, Nutter FW, Gleason ML. 1997.** Directional spread of septoria leaf spot in

tomato Rows. *Plant Disease* **81**: 272–276.

Parris CA, Shock CC, Qian M. 2016. Dry leaf and steviol glycoside productivity of *Stevia rebaudiana* in the Western United States. *HortScience* **51**: 1220–1227.

Parris CA, Shock CC, Qian M. 2017. Soil water tension irrigation criteria affects *Stevia rebaudiana* leaf yield and leaf steviol glycoside composition. *HortScience* **52**: 154–161.

Paul H. Li. 1993. Advances in plant cold hardiness. *CRC Press* – 332 pp.

Perera WH, Ghiviriga I, Rodenburg DL, Alves K, Bowling JJ, Avula B, Khan IA, McChesney JD. 2017a. Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Phytochemistry* **135**: 106–114.

Perera WH, Ghiviriga I, Rodenburg DL, Carvalho R, Alves K, McChesney JD. 2017b. Development of a high-performance liquid chromatography procedure to identify known and detect novel C-13 oligosaccharide moieties in diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae): Structure elucidation of rebaudiosides V and W. *Journal of Separation Science* **40**: 3771–3781.

Philippaert K, Pironet A, Mesuere M, Sones W, Vermeiren L, Kerselaers S, Pinto S, Segal A, Antoine N, Gysemans C, et al. 2017. Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nature Communications* **8**: 14733.

Pieri V, Belancic A, Morales S, Stuppner H. 2011. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 4378–4384.

Ping L, Keqin H, Nengbing H. 2015a. Hybrid seed production method for *Stevia rebaudiana*. Patent Application, N° CN105052503A. China.

Ping L, Keqin H, Nengbing H. 2015b. Mating method for *Stevia rebaudiana* hybrid seed production. Patent Application, N° CN105104169A. China.

Ping L, Keqin H, Nengbing H. 2015c. Cultivating method for *Stevia rebaudiana* triploid hybrid seeds. Patent Application, N° CN105104170A. China.

PMR. 2017. Global Stevia Market to Surpass US\$ 565 Mn Value by 2020-end: PMR Analysis. *Persistence Market Research*.
<https://www.persistencemarketresearch.com/mediarelease/stevia-market.asp>.

Pordel R, Esfahani M, Kafi M, Nezami A. 2015. Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni root system to waterlogging and terminal drought stress. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* **6**: 238–247.

- Prakash I, Campbell M, Chaturvedula VSP. 2012.** Catalytic hydrogenation of the sweet principles of *Stevia rebaudiana*, rebaudioside B, rebaudioside C, and rebaudioside D and sensory evaluation of their reduced derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 15126–15136.
- Prakash I, Markosyan A, Bunders C. 2014.** Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods* **3**: 162–175.
- Prakash I, Ma G, Bunders C, Charan R, Ramirez C, Devkota K, Snyder T. 2017.** A novel diterpene glycoside with nine glucose units from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biomolecules* **7**: 10.
- PureCircle Stevia Institute. 2017.** Sequencing of Stevia Plant Genome Revealed for the First Time By PureCircle Stevia Institute at the International Congress of Nutrition. <https://www.purecirclestevia.com/news/press-release/sequencing-of-stevia-plant-genome-revealed-for-the-first-time-by-purecircle-stevia-institute-at-the-international-congress-of-nutrition/>
- PureCircle Stevia Institute. 2017.** What is Stevia? (Scientifically Defined by Global Stevia Institute). <https://www.purecirclestevia.com/about-stevia/what-is-stevia>
- PureCircle Stevia Institute. 2018.** Regulatory Approvals. <https://www.purecirclestevia.com/nutrition-and-health/safety-and-food-policy/regulatory-approvals>
- Purkayastha S, Pugh G, Lynch B, Roberts A, Kwok D, Tarka SM. 2014.** In vitro metabolism of rebaudioside B, D, and M under anaerobic conditions: Comparison with rebaudioside A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **68**: 259–268.
- Purkayastha S, Pugh G, Lynch B, Roberts A, Kwok D, Tarka SM. 2015.** In vitro metabolism of rebaudioside E under anaerobic conditions: Comparison with rebaudioside A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 1–12.
- R Core Team. 2015.** R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria*.
- Rabiller P. 2016.** Oviatis, histoire d'un pionnier de la stévia bio française. *La Tribune*. <https://objectifaquitaine.latribune.fr/agroalimentaire/2016-10-11/oviatis-histoire-d-un-pionnier-de-la-stevia-bio-francaise.html>
- Raina R, Bhandari SK, Chand R, Sharma Y. 2013.** Strategies to improve poor seed germination in *Stevia rebaudiana*, a low calorie sweetener. *Journal of Medicinal Plants Research* **7**: 1793–1799.
- Ramesh K, Singh V, Megeji NW. 2006.** Cultivation of Stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni): A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy* **89**: 137–177.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Ramírez-Madero G, Hernández-Rincón EU. 2016.** Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany* **106**: 238–243.

- Rauscher G, Simko I. 2013.** Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC plant biology* **13**: 11.
- Reeleder R. 1999.** Septoria leaf spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and methods for screening for resistance. *Journal of Phytopathology* **147**: 605–613.
- Rees M, Osborne CP, Woodward FI, Hulme SP, Turnbull LA, Taylor SH. 2010.** Partitioning the Components of Relative Growth Rate: How Important Is Plant Size Variation? *The American Naturalist* **176**: E152–E161.
- Richman A, Swanson A, Humphrey T, Chapman R, McGarvey B, Pocs R, Brandle J. 2004.** Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*: Functional genomics of glucosyltransferases. *The Plant Journal* **41**: 56–67.
- Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Gomez-Diaz RA, Brito-Cordova GX, Gomez-Velasco D V, Lopez-Rocha MJ, Almeda-Valdes P. 2017.** Non-nutritive sweeteners: Evidence on their association with metabolic diseases and potential effects on glucose metabolism and appetite. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* **69**: 129–138.
- Samad A, Dharni S, Singh M, Yadav S, Khan A, Shukla AK. 2011.** First Report of a Natural Infection of *Stevia rebaudiana* by a Group 16SrXXIV Phytoplasma in India. *Plant Disease* **95**: 1582–1582.
- Scott PR, Benedikz PW, Zones HG, Ford MA. 1985.** Some effects of canopy structure and microclimate on infection of tall and short wheats by *Septoria nodorum*. *Plant Pathology* **34**: 578–593.
- Serfaty M, Ibdah M, Fischer R, Chaimovitsh D, Saranga Y, Dudai N. 2013.** Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial Crops and Products* **50**: 731–736.
- Shantanu C. 2018.** Post Harvest Processing for Stevia. <https://www.steviashantanu.com/post-harvest-processing>
- Sharma N, Kaur R, Era V. 2016.** Potential of RAPD and ISSR markers for assessing genetic diversity among *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions. *Indian Journal of Biotechnology* **15**: 95–100.
- Shirsole SS, Khare N, Lakpale N, Kotasthane AS. 2018.** Detection of resistant sources against collar rot of chickpea caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc under field conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **7**: 502–505.
- Shock CC, Parris CA. 2017a.** Stevia plant named "SW 107". Plant Patent Application, N° US PP27,937 P3. United States.
- Shock CC, Parris CA. 2017b.** Stevia plant named "SW 129". Plant Patent Application Publication, N° US 2017/0142885 P1. United States.

Shock CC, Parris CA. 2017c. Stevia plant named "SW227". Plant Patent Application Publication, N° US 2017/0290225 P1. United States.

Shokeen B, Choudhary S, Sethy NK, Bhatia S. 2011. Development of SSR and gene-targeted markers for construction of a framework linkage map of *Catharanthus roseus*. *Annals of Botany* **108**: 321–336.

Singh M, Saharan V, Rajpurohit D, Sen Y, Joshi A, Sharma A. 2017a. Thidiazuron induced direct shoot organogenesis in *Stevia rebaudiana* and assessment of clonal fidelity of regenerated plants by RAPD and ISSR. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**: 1690–1702.

Singh M, Saharan V, Rajpurohit D, Sen Y, Sharma A, Joshi A. 2017c. Criteria for selection of superior *Stevia rebaudiana* plant for propagation establishment. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* **6**: 1362–1365.

Singh BD, Singh AK. 2015. Marker-assisted plant breeding: Principles and practices. *Springer India* 514 pp.

Singh G, Singh G, Singh P, Parmar R, Paul N, Vashist R, Swarnkar MK, Kumar A, Singh S, Singh AK, et al. 2017b. Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. *Scientific Reports* **7**: 1–13.

Singla R, Jaitak V. 2016. Synthesis of rebaudioside A from stevioside and their interaction model with hTAS2R4 bitter taste receptor. *Phytochemistry* **125**: 106–111.

Soejarto DD, Compadre CM, Medon PJ, Kamath SK. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany* **37**: 71–79.

Soejarto DD, Kinghorn AD, Farnsworth NR. 1982. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products* **45**: 590–599.

Soffritti M, Belpoggi F, Degli Esposti D, Lambertini L, Tibaldi E, Rigano A. 2006. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives* **114**: 379–385.

Stephanopoulos G, Ajikumar PK. 2012. Microbial, production of natural sweeteners, diterpenoid steviol glycosides. Patent Application Publication, N° US 2012/0164678 A1. United States.

Stevia Natura. 2017. Les partenaires. <http://www.stevia-natura.fr/publication/index.php?page=page&pere=1&rubrique=16>

Stevia Store. 2018. Stevia Seeds. <http://stevia-store.com/stevia-seeds.html>

Strayer A, Garcia-Maruniak A, Sun X, Schubert T, Sutton B. 2012. First report of *Pseudomonas cichorii* causing leaf spot of *Stevia* detected in Florida. *Plant Disease* **96**: 1690–1690.

- Sun J. 2016.** Development of Stevia and steviol glycosides industry in China. *Proceedings of the 9th Stevia Symposium 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th September 2016, Jan M.C. Geuns editors*: 145–150.
- Sys EA, Marsolais AA, Brandle J. 1998.** Stevia plant named "RSIT 94-1306". Plant Patent Application, Reference: Plant 10,562. United States.
- Tabah DA, McInnis SM, Hiscock SJ. 2004.** Members of the S-receptor kinase multigene family in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae), a species with sporophytic self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* **17**: 131–140.
- Taleie N, Hamidoghli Y, Rabiei B, Hamidoghli S. 2012.** Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* **4**: 298–302.
- Tanaka T, Kohda H, Tanaka O, Chen F-H, Chou W-H, Leu J-L. 1981.** Rubusoside (β -d-Glucosyl Ester of 13-O- β -d-Glucosyl-steviol), a sweet principle of *Rubus chingii* Hu (Rosaceae). *Agricultural and Biological Chemistry* **45**: 2165–2166.
- Tateo F, Mariotti M, Bononi M, Lubian E, Martello S, Cornara L. 1998.** Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. *Italian Journal of Food Science* **10**: 261–267.
- Tavarini S, Angelini LG. 2013.** *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: The effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 2121–2129.
- Tavarini S, Passera B, Martini A, Avio L, Sbrana C. 2017.** Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. *Industrial Crops & Products* **111**: 899–907
- Thompson AL, Michalik A, Nash RJ, Wilson FX, Well R Van, Johnson P, Fleet GWJ, Yu CY, Hu XG, Cooper RI, et al. 2009.** Steviamine, a new class of indolizidine alkaloid [(1R,2S,3R,5R,8aR)-3-hydroxy-methyl-5-methyl-octa-hydro-indolizine-1,2-diolhydro-bromide]. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online* **65**.
- Townsend T, Segura V, Chigeza G, Penfield T, Rae A, Harvey D, Bowles D, Graham IA. 2013.** The use of combining ability analysis to identify elite parents for *Artemisia annua* F1 hybrid production. *PLoS ONE* **8**: e61989.
- Upreti M, Dubois G, Prakash I. 2012.** Synthetic study on the relationship between structure and sweet taste properties of steviol glycosides. *Molecules* **17**: 4186–4196.
- Urban JD, Carakostas MC, Taylor SL. 2015.** Steviol glycoside safety : Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens ? *Food and Chemical Toxicology* **75**: 71–78.

- Verdu CF, Guichoux E, Quevauvillers S, De Thier O, Laizet Y, Delcamp A, Gévaudant F, Monty A, Porté AJ, Lejeune P, et al. 2016.** Dealing with paralogy in RADseq data: in silico detection and single nucleotide polymorphism validation in *Robinia pseudoacacia* L. *Ecology and Evolution* **6**: 7323–7333.
- Vouillamoz J, Wolfram-Schilling E, Carron C-A, Baroffio C. 2015.** Agronomic and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *International Symposium Breeding on Medicinal and Aromatic Plants – BREEDMAP 6, Quellingburg, Germany*
- Wagner V. 2012.** De *Stevia rebaudiana* à la Stévia: Parcours chaotique de ‘l’herbe sucrée’ parmi les édulcorants. *Thèse en Pharmacie, Université de Lorraine*.
- Wang Q. 2016.** High Rebaudioside-A Plant and Methods of Producing the Same and Uses Thereof. Patent Application Publication, N° US 2016/0338396 A1. United States.
- Wang J, Hou B. 2009.** Glycosyltransferases: Key players involved in the modification of plant secondary metabolites. *Frontiers of Biology in China* **4**: 39–46.
- Wang Q, Zhang LY, Li KC. 2017.** High rebaudioside-c plant varietal and compositions extracted therefrom with high rebaudioside-c and total steviol glycoside content. Patent Application Publication, N° US 2017/0290285 A1. United States.
- Wang Q, Zhang YL, Li CK. 2018.** High rebaudioside-a plant varietal, methods of extraction and purification therefrom, of compositions with enhanced rebaudioside-a content and uses of said composition. Patent Application Publication, N° US 2018/0042280 A1. United States.
- Watson E. 2018.** Cargill launches EverSweet fermented steviol glycosides. *Food navigator-usa.com*. <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2018/03/20/Cargill-launches-EverSweet-fermented-steviol-glycosides>
- Weilian H, Muchuan C, Likun Liu Dan L. 1987.** Study on structure of different-staged leaf cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni and distribution of stevioside content. *Journal of Wuhan Botanical Research* **3**.
- Wheeler A, Boileau AC, Winkler PC, Compton JC, Prakash I, Jiang X, Mandarino DA. 2008.** Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 54–60.
- Wölwer-Rieck U. 2012a.** The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 886–895.
- Wölwer-Rieck U, May B, Lankes C, Wüst M. 2014.** Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 2428–2435.
- WSO (World Stevia Organization). 2018.** Regulatory Approval. *World Stevia Organization website* <https://wso-site.com>
- Xiang Z, Hong L. 2012.** Method for cultivating autotetraploid plants of *Stevia rebaudiana*. Patent Application, N° CN102613085A. China.

- Xie Q, Mayes S, Sparkes DL. 2016.** Preanthesis biomass accumulation of plant and plant organs defines yield components in wheat. *European Journal of Agronomy* **81**: 15–26.
- Yadav AK, Singh S, Dhyani D, Ahuja PS. 2011.** A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). *Canadian Journal of Plant Science* **91**: 1–27.
- Yadav AK, Singh S, Bhardwaj G. 2014.** Nuclear DNA content and genome size estimation of *Stevia rebaudiana* using flow cytometry. *Minerva Biotec* **26**: 143–148.
- Yamaguchi S. 2008.** Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of Plant Biology* **59**: 225–251.
- Yamazaki T, Flores HE, Shimomura K, Yoshihira K. 1991.** Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of natural products* **54**: 986–992.
- Yang YH, Huang SZ, Han YL, Yuan HY, Gu CS, Zhao YH. 2014.** Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A: Mutations in UGT76G1, A key gene of steviol glycosides synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **80**: 220–225.
- Yao Y, Ban M, Brandle J. 1999.** A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome* **42**: 657–661.
- Zachokostas P. 2015.** Effects of chemical weed management on the quantitative and qualitative characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni, under Mediterranean Conditions (Karditsa, Thessaly, Greece). *Proceedings of the 8th Stevia Symposium 2015, EUSTAS, Germany, 27-28th January 2015, Jan M.C. Geuns editors*: 5–12.
- Zaidi PH, Vinayan MT, Blümmel M. 2013.** Genetic variability of tropical maize stover quality and the potential for genetic improvement of food-feed value in India. *Field Crops Research* **153**: 94–101.
- Zaman MM, Chowdhury MAH, Chowdhury T. 2015.** Growth parameters and leaf biomass yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. *Journal of Bangladesh Agricultural University* **13**: 31–37.
- Zeng J, Chen A, Li D, Yi B, Wu W. 2013.** Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 5720–5726.
- Zhang H, An S, Hu J, Lin Z, Liu X, Bao H, Chen R. 2018.** Induction, identification and characterization of polyploidy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Biotechnology* **86**: 81–86.
- Zhou X, Liang C, Xu Q, Zhang X, Liang X, Huang Q, Su X. 2012.** Study on chemical constituents of *Angelica keiskei*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae* **18**: 103–105.
- Zimmermann BF. 2018.** Beaming steviol glycoside analysis into the next dimension. *Food Chemistry* **241**: 150–153.

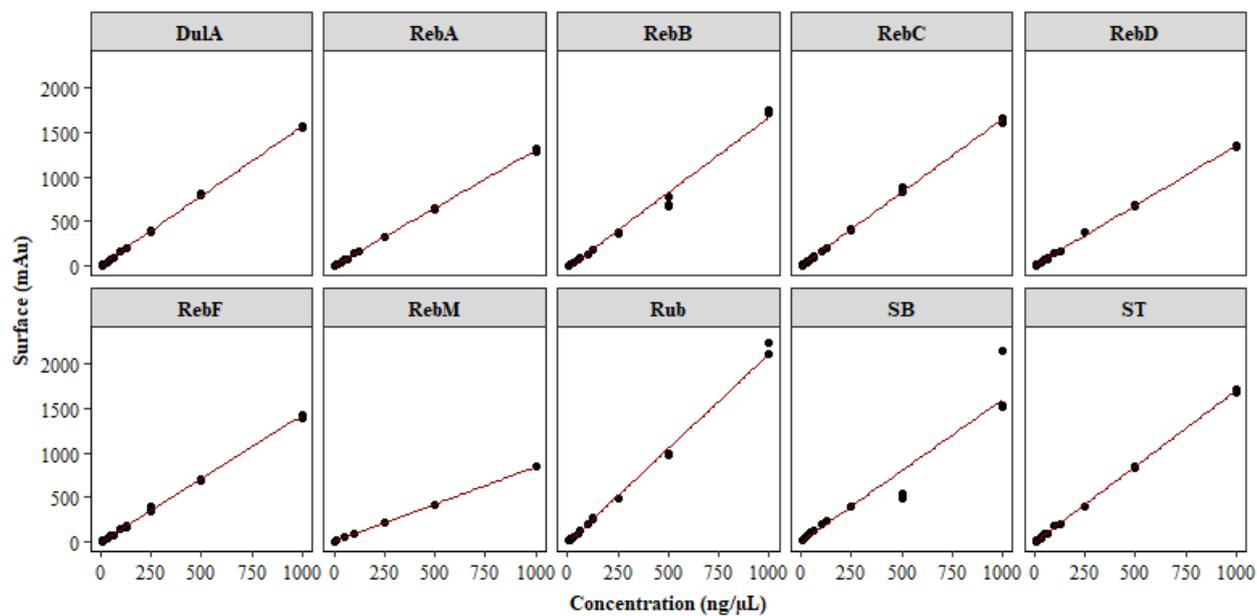
Annexes

Annexe A1. Liste des 46 SGs identifiés chez *Stevia rebaudiana*. Les références suivies d'une étoile sont tirées de Ceunen (2012)

Nom	R1	R2	Références *
Stéviol	H	H	Minne et al., 2004*
Stéviolmonoside	H	β -Glc	Ohta et al., 2010*
Stéviol-19-O- β -D-glucoside	β -Glc	H	Gardana et al., 2010*
Rubusoside	β -Glc	β -Glc	Ohta et al., 2010*
Famille Rebaudioside A [β-Glc-(\pm β-Glc (3-1))-β-Glc(2-1)]			
Stéviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2-1)	Kohda et al., 1976*
Stéviolside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1)	Bridel and Lavieille, 1931*
-	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc	Wu et al., 2012*
Rebaudioside E	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1)	Sakamoto et al., 1977*
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Kohda et al., 1976*
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Kohda et al., 1976*
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Sakamoto et al., 1977*
Rebaudioside D3	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(6-1)	Mao et al., 2017
Rebaudioside I	β -Glc- β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside M	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
-	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(6-1)	Chaturvedula et al., 2011*
Rebaudioside L	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1) β -Glc(6-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside IX	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1) β -Glc(6-1) β -Glc(3-1) β -Glc(2-1)	Prakash et al., 2017
-	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(3-1) β -Glc(6-1)	Chaturvedula and Meneni, 2016
-	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(6-1)	Chaturvedula and Meneni, 2017
Famille Rebaudioside C [α-Rha]			
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1)	Kobayashi et al., 1977*
Dulcoside B	H	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	Sakamoto et al., 1977*
Rebaudioside H	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside H ₁	H	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1) β -Glc(3-1)	Perera et al., 2017b
Rebaudioside K	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside J	β -Glc- α -Rha(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside N	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside O	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Rebaudioside S	β -Glc- α -Rha(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1)	Ibrahim et al., 2016a, 2016b

Famille Rebaudioside F [β-Xyl]			
-	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2-1)	Chaturvedula and Prakash, 2011*
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	Starratt et al., 2002*
-	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Xyl(3-1)	Chaturvedula and Prakash, 2011*
-	β -Glc- β -Xyl(6-1)	β -Glc- β -Glc(2-1)	Chaturvedula and Prakash, 2011*
Rebaudioside T	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Perera et al., 2017a
Rebaudioside R	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Xyl(3-1)	Ibrahim et al., 2016a, 2016b
Rebaudioside V	β -Glc- β -Glc(2-1)	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	Perera et al., 2017b
Famille [β-Glc-β-Glc(3-1)]			
Rebaudioside G	β -Glc	β -Glc- β -Glc(3-1)	Ohta et al., 2010*
Famille Rebaudioside U [α-Ara]			
Rebaudioside U	β -Glc- α -Ara(6-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Perera et al., 2017a
Famille rebaudioside W [α-Rha ; β-Xyl]			
Rebaudioside W	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	Perera et al., 2017b
Famille [β-Fru]			
-	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Fru(3-1)	Chaturvedula et al., 2011*
Famille [α-Glc]			
-	β -Glc- α -Glc(4-1) α -Glc(2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1)	Chaturvedula et al., 2011*
-	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1) α -Glc(3-1)	Chaturvedula et al., 2011*
-	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1) α -Glc(4-1)	Chaturvedula et al., 2011*
Famille [6-deoxy-β-Glc]			
-	β -Glc	β -Glc-6d- β -Glc(2-1)	Chaturvedula et al., 2011*
-	β -Glc	β -Glc-6d- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Chaturvedula et al., 2011*
-	6d- β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	Chaturvedula et al., 2011*

Annexe A2. Représentation graphique des gammes étalons linéaires des 10 SGs quantifiés. Les nuages de points représentent la surface des pics détectés en fonction de la concentration en SGs purs.



Annexe A3. Résultats complets de la caractérisation du rendement en SGs et ses composantes pour 18 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* sur 2 sites expérimentaux. Les histogrammes blancs représentent la 1^{ère} année de récolte (à 3 mois après implantation). Les histogrammes gris clairs représentent la 2^{ème} année de récolte sur les plants récoltés à 3 mois d'implantation en 1^{ère} année. Les histogrammes noirs représentent la 2^{ème} année de récolte pour les plants taillés à 5 mois d'implantation.

