



HAL
open science

Vers l'architecture génétique des caractères de rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana* : caractérisation fine des ressources génétiques

Zoé Le Bihan

► **To cite this version:**

Zoé Le Bihan. Vers l'architecture génétique des caractères de rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana* : caractérisation fine des ressources génétiques. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0014 . tel-03483640

HAL Id: tel-03483640

<https://theses.hal.science/tel-03483640>

Submitted on 16 Dec 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 **Zoé Le Bihan**

**Vers l'architecture génétique des caractères du rendement de *Stevia Rebaudiana*
(Bertoni) : caractérisation fine des ressources génétiques**

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

Soutenu le 11 janvier 2021

Membres du jury :

Pr. François Doignon	Directeur de Recherche Université de Bordeaux	Président du Jury
Dr. Bernadette Julier	Directeur de Recherche INRAE	Rapporteur
Dr. Jean-Marc Gion	Directeur de Recherche CIRAD	Examineur
Dr. Monique Berger	Directeur de Recherche ESA-Purpan	Examineur
Dr. Marc Bardin	Directeur de Recherche INRAE	Rapporteur
Mr. Philippe Boutié	Président d'Oviatis	Invité

Vers l'architecture génétique des caractères de rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana* : caractérisation fine des ressources génétiques

Résumé

Le rejet des édulcorants de synthèse par les consommateurs a conduit ces derniers à privilégier les édulcorants naturels comme les glycosides de stéviol (SG). Ces molécules sont accumulées dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni, plante pérenne originaire du Paraguay, et aujourd'hui cultivée sur tous les continents. Dans le Sud-Ouest de la France, une filière de production en Agriculture Biologique est en développement, sous l'impulsion de la société Oviatis. Ce travail de thèse sous contrat CIFRE s'intéresse à la caractérisation fine des ressources génétiques cultivées sur les traits d'intérêt, et au développement des connaissances et des outils génétiques sur cette culture. La performance agronomique de la stévia a été évaluée par l'étude des composantes du rendement en SG, de l'architecture de la canopée et de la réponse à un agent fongique. Ces travaux ont permis (1) l'adaptation de l'échelle de stades phénologiques BBCH à la culture de la stévia et sa transmission à la filière, (2) l'évaluation des traits du rendement en SG sur 15 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* phénotypées pendant quatre années sur une parcelle expérimentale, (3) l'évaluation de la variabilité de la réponse à une infection de septoriose de ces mêmes ressources génétiques en conditions contrôlées et le développement d'un test d'inoculation sur disques foliaires, (4) d'estimer les paramètres génétiques pour les traits du rendement sur quatre populations de stévia cultivées en plein champ pendant trois ans, (5) enfin de construire des idéotypes de stévia dans le contexte local de production. Ces résultats participent au développement de la stévia dans le Sud-Ouest de la France, et alimentent la mise en place d'un programme d'amélioration pour une production en Agriculture Biologique.

Mots clés: *Stevia rebaudiana*, sélection génétique, biomasse, glycosides de stéviol

Through genetic architecture of traits of steviol glycosides' yield in *Stevia rebaudiana*: fine characterization of genetic resources

Abstract

The rejection of synthetic sweeteners by consumers has led to an increase in the use of natural sweeteners such as steviol glycosides. These molecules are accumulated in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a perennial plant from Paraguay, which is now cultivated on all continents. Oviatis is developing the local production sector in organic agriculture in southwestern France. The objectives of this PhD project under CIFRE contract are to finely characterize the genetic resources cultivated in temperate conditions on the traits of interest and to develop a genetic tools and knowledges on this crop. This work has made it possible to (1) the adaptation of BBCH phenological scale to stevia and its skill transfer to the stevia sector, (2) the phenotyping of steviol glycosides yield on 15 genetic resources of *Stevia rebaudiana* for 4-years of production, (3) evaluate response variability of the same genetic resources to septoria infection and the development of a leaf-disk inoculation test, (4) to estimate genetic parameters for SG yield traits on four populations cultivated in field trial for three years, and finally (5) to build stevia idéotypes for the local production context. These results are contributing to the development of stevia in southwestern France, and will be used to set up a stevia breeding program for local organic agriculture.

Key words: *Stevia rebaudiana*, plant breeding, biomass, steviol glycosides

UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE

71 av. Edouard Bourlaux CS 20032 33882 Villenave d'Ornon Cedex

« Votre doute peut devenir une qualité profitable si vous l'éduquez. Il faut qu'il devienne savant, qu'il se mue en critique. Dès qu'il s'apprête à vous gâcher quelque chose, demandez pourquoi cette chose est laide ; exigez de lui des preuves, soumettez-le à examen, et vous le trouverez sans doute perplexe et embarrassé, peut-être s'insurgera-t-il aussi. Mais ne cédez pas, exigez qu'il fournisse ses raisons, et ne manquez pas d'agir en toutes circonstances en faisant ainsi preuve de vigilance et de rigueur ; le jour viendra où, de destructeur il sera devenu l'un de vos meilleurs artisans – peut-être le plus malin de tous ceux qui construisent votre vie. »

Lettres à un jeune poète, Rainer Maria Rilke.

« L'imprévu ne venant jamais à soi, il faut le traquer partout »

La panthère des neiges, Sylvain Tesson.

Remerciements

Ce doctorat a été réalisé grâce au dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par La Recherche) de l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), dans le cadre d'un partenariat entre l'entreprise Oviatis et l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRAE de Villenave d'Ornon. Le phénotypage au champ a été réalisé en partenariat avec la station expérimentale d'Ychoux de Invenio. Les premiers traitements des échantillons ont été réalisés sur la halle biomasse de l'UMR ISPA de l'INRAE Pierroton. Le phénotypage métabolique a été réalisé au sein du laboratoire Molécules d'Intérêt Biologique, de l'ISVV. Le phénotypage pathologique a été réalisé dans les laboratoires de l'UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE) de l'INRAE Villenave d'Ornon.

Je remercie les membres du jury : François Doignon, qui a été mon tuteur pendant ce doctorat, a accepté sans hésiter d'être le président de ce jury ; Bernadette Julier et Marc Bardin, qui ont accepté d'évaluer ce travail comme rapporteur ; Monique Berger et Jean-Marc Gion qui sont les examinateurs de ce travail de thèse.



Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse Valérie Schurdi-Levraud et Dominique Rolin, la dream-team de la stévia ! Merci pour votre regard exigeant et bienveillant tout au long de cette thèse qui m'a permis de prendre confiance en moi sur ce projet.

Valérie, le projet stévia doit beaucoup à ton enthousiasme et ta bonne humeur, qui rendent le travail tellement plus motivant. Malgré un emploi du temps plus que chargé, tu t'es toujours rendue disponible et à l'écoute quand cela était nécessaire. Je te remercie pour tous les efforts que tu as fournis pour m'assurer un accès aux différents laboratoires

et les meilleures conditions possibles de phénotypage, ainsi que les (nombreuses) relectures de ce manuscrit. Tu as aussi été d'un soutien précieux pour la valorisation des résultats scientifiques, que ce soit dans la rédaction des articles ou la préparation des communications orales. Merci beaucoup d'avoir toujours eu confiance en moi et de m'avoir appris à ne pas me censurer ! Ne t'inquiète pas, la nouvelle génération est là pour travailler à l'égalité homme-femme !

Je pense que je garderai longtemps à l'esprit, nos réunions de travail à échanger sur l'organisation du phénotypage, à réfléchir aux plans des articles, mais aussi les nombreuses discussions à imaginer la recherche de demain sur stévia, et à poser toutes les questions encore en suspens... le tout accompagné de litres de café (pour toi) et de thé (pour moi) ☺ !

Dominique, je te remercie pour tes nombreux conseils, pour nos riches échanges, pour ton regard rieur et ta bonne humeur pendant les réunions. Je pense que ta vision dans la structure des articles et des discussions scientifiques m'a énormément apporté, en particulier en efficacité et en méthode et qu'elle continuera à m'aider dans mon avenir scientifique. Tes propositions dans la construction de la réflexion scientifique m'ont souvent poussé à poser un œil neuf sur le sujet ainsi qu'à prendre du recul sur les résultats. Je te remercie aussi pour tes encouragements et ton soutien pendant la période de rédaction. J'espère ne pas t'avoir trop traumatisé lors de la journée de plantation à Blagon... je crois que tu en gardes plutôt un bon souvenir !

Patrick Cosson, je te remercie grandement pour l'accompagnement sur les parcelles en 2018 avec ton look de cow-boy, les (nombreuses) plantations, l'aide pour la gestion des plants à l'INRAE... on a d'ailleurs bien souvent fait du désherbage côte à côte. Ton accueil dans le bureau d'une doctorante en exil en temps de coronavirus a été salubre et chaleureux, merci encore. Merci surtout pour ton écoute, ton regard et ta réflexion sur le projet, même quand tu râlais c'était intéressant !



Mérodie, sur mes trois années de travail en doctorat j'ai eu quelques occasions de travailler avec toi pendant la thèse et je dois dire que j'ai toujours apprécié ces moments ! Merci pour ton aide, sur l'effeuillage, le travail en serre et certains déplacements sur les parcelles expérimentales. Tu es enjouée, sérieuse et spontanée, bref... c'était toujours un plaisir ! Je suis heureuse d'avoir appris à te connaître en dehors du labo également.

Roxane, je te remercie pour les quelques matinées de phénotypage sur les parcelles, pas de bol... c'était toujours sous une forte chaleur.

Je remercie toute l'équipe d'Oviatis pour leur accueil dans cette entreprise, à qui je souhaite de poursuivre l'aventure de la stévia biologique et le développement de la filière dans le Sud-Ouest. Philippe Boutié, je te remercie pour les échanges très intéressants sur l'aspect production

et transformation et l'avenir de la filière. Merci aussi pour tes retours positifs lors des réunions partenaires.

Cécile Hastoy, tu m'as beaucoup appris sur l'univers de la stévia. Tout d'abord, je te remercie grandement pour ton encadrement de stage (en 2017) et tous les efforts de transmission que tu as mis en œuvre pour me former aux différentes techniques de phénotypage. Notre travail commun s'est transformé au cours de la thèse avec ton passage à temps plein au sein d'Oviatis, mais nos échanges, lors des réunions partenaires ou du transfert de connaissances avec les agriculteurs ont toujours été enrichissants. Merci d'avoir été si disponible au début de ma thèse, et pour tes précieux conseils sur la récolte et les dosages de SG en particulier.

Je remercie également Stéphan Plas et Renaud Galland pour le suivi des parcelles expérimentales à Liposthey et Blagon, qui ont toujours su improviser des solutions... même quand les conditions n'étaient pas du tout favorables ! Merci également aux CDD d'Invenio qui ont aidé au suivi des parcelles en 2018 et 2019 : Gabriel et Samuel.

Je remercie l'équipe de SAVE pour son accueil lors de la mise en œuvre des essais en pathologie végétale, en particulier le gros travail qui a été mené sur la septoriose. Merci à François Delmotte de m'avoir accueillie dans l'unité. Un merci très sincère à Jonathan Gaudin, pour ta participation et ton soutien sur le développement des tests d'inoculation de septoriose. Tu as toujours su te rendre disponible malgré un emploi du temps plus que chargé et les nombreuses sollicitations extérieures. Je suis très heureuse que tu t'épanouisses aujourd'hui à l'INRAE d'Avignon bien que j'ai regretté ta présence « tout feu tout flamme » lors des derniers tests. Merci également à Isabelle Demeaux qui a rendu possible la fin de mes essais après le départ de Jonathan. Je te remercie pour tes nombreux conseils techniques et pratiques dans l'adaptation du test sur disques foliaires, ainsi que pour ta joie de vivre et ta bonne humeur qui ont rendu les essais à SAVE toujours agréables.

Je remercie le laboratoire du MIB de l'ISVV de m'avoir autorisée à réaliser les dosages de glycosides de stéviol pendant toute cette thèse. Et je remercie en particulier Pierre Waffo-Téguo pour son appui et Antonio Palos pour les nombreuses réparations réalisées en toute urgence afin de me permettre de doser des centaines d'échantillons chaque année.

Un merci aussi à toute l'équipe d'A3C, UMR 1332 BFP, INRAE, pour l'accueil des plants de stévia lors des croisements ou pour la conservation.

J'adresse de sincères remerciements aux membres de mon comité de mi-thèse, Jean-Marc Gion, Nicolas Langlade, José Quero-Garcia et François Doignon pour leurs lectures rigoureuses de

mon (très long) rapport, leurs conseils avisés et leurs précieux points de vue. Ce comité m'a permis de poser un regard neuf sur le projet de thèse et m'a donné un nouvel élan.

Je souhaite également remercier de tout cœur l'équipe Virologie, pour ces trois années très chouettes en votre compagnie ! Merci pour les échanges au coin café, les discussions entre deux manip, les pots (BBQ d'été, de thèse, de retraite..) et pour tous ces moments qui font que le quotidien au laboratoire est toujours plaisant en viro ! Merci en particulier aux « amis du midi » : Mélodie, Luc, Amandine Ba, Laurence, David, Valérie, Armelle, Marie, Geneviève, Chantal, pour nos discussions plus ou moins farfelues lors des pauses-déjeuner, les conseils recette, les partages de chocolat, et les nombreux fous rires !

Je remercie Thierry Mauduit pour son aide concernant les soins prodigués aux plants de stévia de la serre HPE ainsi que ses conseils sur la réalisation des boutures.

Je remercie chaleureusement Florence Lartigaut, Chantal Monier, Claudine Dupouy et Véronique Landreau pour leur aide sur tous les points administratifs du projet et le soutien logistique lors des déplacements, en particulier pour le congrès PAG de San Diego. Merci les filles aussi pour vos paroles toujours encourageantes, vous avez été au top !

Je remercie Diako Rasouli, doctorant iranien, qui a travaillé sur le projet stévia au début de mon doctorat en 2018, et a permis d'initier le développement du test d'inoculation de septoriose sur disques foliaires.



Merci beaucoup aux stagiaires qui ont travaillé à mes côtés au projet stévia, Solenne Boutet, Marianne Laurençon, Charlyne Bautista et Léa Nice, vous vous êtes toutes investies à 200% dans vos missions de stage et avez toujours fait preuve de sérieux et de créativité. C'est toujours avec confiance que je vous ai confié des aspects du projet stévia, que ce soit pour mon travail

de thèse ou pour la suite du projet. Un merci très spécial à Solenne Boutet, qui m'a aussi accompagnée pendant toute la période de phénotypage de l'été 2019, et a supporté, pendant deux longs mois, les courbatures aux jambes et la canicule du Sud-Ouest... ta bonne humeur a été salutaire pendant ses longues journées !! Je te souhaite de belles (et plus fraîches) aventures professionnelles et personnelles à Quimper.

Je fais également un clin d'œil aux autres membres de l'association DNAS, regroupant les doctorants du campus de la grande Ferrade : Margot, Alice, Sara, Marie, David et Rodrigo. Malgré nos emplois du temps bien chargés nous avons réussi à re-dynamiser cette association en organisant des événements entre doctorants, des échanges scientifiques et humains qui m'ont toujours beaucoup apporté !

L'aventure du doctorat n'est pas uniquement professionnelle, c'est également un parcours personnel, j'ai la chance d'être entourée de personnes formidables qui ont été présentes à de nombreuses étapes de ma vie, dont celles liées à mes études, puis au doctorat. Je tiens à leur dire un merci très particulier.

Léo O., de La Rochelle à Nantes jusqu'à Bordeaux, en passant par le Portugal, la Thaïlande ou l'Autriche ou encore les USA, on peut dire que notre amitié s'inscrit dans le temps mais aussi dans une belle suite de voyages ! Tu as toujours été présent à des étapes importantes de ma vie et de mes études ! Un énorme merci pour cette formidable vadrouille en Californie début 2020, ces trois semaines ensemble riches en découvertes et en rencontres (la prochaine fois on bossera plus Saint Juste). J'ai grand hâte de poursuivre nos aventures sportivo-culturelles en France et ailleurs, à bord d'un bateau bien sûr.

A mes amis de prépa de Nantes, la bioteamy, Alexandre (dit Poupou), Fanny (dite Fafa), Théo, Charles, Marin (dit Marinou), Léo et Paul, vous auprès de qui mon amour pour la biologie s'est épanouie pendant ces deux années riches et intenses. Merci pour notre belle amitié, qui bien que nous soyons loin les uns des autres, reste un lien fort et précieux.

Alexandre et Léo, je suis vraiment heureuse d'avoir vécu ce doctorat en parallèle du votre, bien que nous soyons un peu en décalé, car nos discussions scientifiques m'ont toujours beaucoup apporté.

Cher Léo M., un grand merci pour nos longues conversations, en face à face ou au téléphone, plus ou moins alcoolisées, mais toujours passionnées, pendant lesquelles on refait quinze fois le monde, en s'échangeant des références de bouquins, de films ou de podcasts incroyables. Merci d'apporter au monde ta révolte joyeuse, et ton regard critique et taquin, et ton style de danse inimitable.

Poupou, fidèle acolyte de cours depuis notre premier projet scientifique ensemble : vive les TIPE, les mini-bananiers, le savon, les comptages de nodules sur la luzerne... Tu as toujours été un ami précieux. Merci pour ton accueil au Québec, et nos balades plus ou moins réussies. J'espère de tout cœur que notre vie future nous permettra de vivre à une distance géographique plus raisonnable !

Fafa, merci pour ta bonne humeur, tes pas de danse endiablés, et ton sourire constant ! Merci d'être une des personnes « liens », avec les week-ends au Bouillon, et partout ailleurs ☺ !

Marinou, passionné de BD et de la mer, merci pour ta générosité, les vacances à Groix, les soirées jeux de société à Nantes et vivement la suite de nos aventures de vacances !

Je souhaite aussi faire une dédicace à mes ami(e)s de BSA. Tout d'abord mes très chères et très précieuses Manon et Fiona, les jolies poupettes. Notre amitié est un lien très important pour moi. Nous avons grandi ensemble, depuis l'école jusqu'à nos premiers pas dans la vie professionnelle, le tout sous le même toit !

Fiona, j'admire ta force et ta détermination ! Depuis les projets de groupe à l'école, jusqu'à présent rien n'a changé dans notre amitié ou presque... Nous partageons toujours les mêmes combats, et le même engagement. Les petits déj en commun à débrieffer les interviews de France Inter me manquent... Heureusement je compte bien continuer mes vacances parisiennes régulières pour retrouver nos habitudes dans ton nouvel appart ☺. Merci d'être cette amie toujours présente et à l'écoute. Que ce soit pour aller prendre un goûter dans un salon de thé, partir en vacances, ou enflammer le dancefloor sur du Earth Wind and Fire, la bonne personne à choisir c'est toujours toi.

Manon, mon petit cœur d'artichaut préféré. Merci pour cette amitié construite dans le quotidien de notre colocation et qui se conserve malgré tes séjours hors de Bordeaux, à La Rochelle ou en Guinée-Bissau. Je ne me lasserai jamais de tes éclats de rire à gorge déployée, de nos enrichissements mutuels avec les partages de podcasts, des petites playlists qui font du bien, de nos aventures romanesques en période de grève de train et de tes réflexions philosophiques... Vivement ton retour dans mon quotidien !

Je n'oublie pas les autres membres de la team des coupines :

Estelle, je voulais te remercier grandement pour ton accueil au top à Montpellier, nos soirées de mamie : soupes – films étaient vraiment parfaites, de même que les séances d'entraînements intensifs dans ta salle de sport ! Gros clin d'œil à ta passion pour les brunchs si possible avec des pancakes toujours plus fluffy !!

Lydie, c'était vraiment chouette de faire la thèse en parallèle de la tienne, en particulier pour vider nos sacs de temps en temps ! Je suis heureuse de poursuivre nos discussions passionnées sur à peu près tous les thèmes comme le féminisme, l'écologie, les jeux de société ou encore, moins commun quand on boit une bière entre copines... les stat !

Hélène, ma niaise adorée, vivement que je vive quelques mois à Champagne-Mouton pour découvrir un peu plus ta Charente natale, et avoir plus de temps pour te rendre visite, pour renouer avec des soirées condensées en bêtise et fous rires.

Audrey, un grand merci pour ton regard toujours positif, ouvert et sans jugement et tes mots motivants à tous les moments difficiles de ce doctorat. J'aime nos discussions sincères et franches, pouvant aller du professionnel au personnel. J'ai hâte de pouvoir re-profiler plus souvent de ton rire communicatif, avec des petits séjours dans ton nouveau chez-toi à Compiègne !

Laure, fournisseur officiel de saucisson de la team coupines mais aussi femme de caractère, toujours partante pour des goûters, des resto, des brunchs ou des sorties, vivement les prochains weekends ensemble !

Ces trois dernières années à Bordeaux ont été riches en rencontres, et en particulier avec deux personnes qui me sont particulièrement chères et ont vécu le quotidien de la thèse à mes côtés pendant bientôt deux ans et demi : Bambi et Barnou ! Nous sommes tous les trois très différents sur beaucoup d'aspects et pourtant si complémentaires dans notre vie rue des Trois-Conils. Bambi, ma jolie tête en l'air, toujours partante que ce soit pour aller boire un verre ou faire des séries de burpees ou d'abdos dans le salon. Le quotidien serait bien moins savoureux sans tes aventures de gaffeuse en tous genres, le nombre invraisemblable de gâteaux cuisinés pendant ces quelques années, tes playlists « evening-latino-chill-relax-tropical », notre avancée la plus lente possible dès que l'on s'engage dans une série, les fous rires, notre regard « ingénieur-ingénieux » sur tout et n'importe quoi, nos crises de folie de psychorigides du rangement, les discussions d'aménagement « Valérie Damidot » à 7h de matin, nos petits repas du soir, les brunchs des dimanches matins. Barnou, notre relation s'apparente presque à une relation frère-sœur (je ne dirais pas qui est le grand des deux...) et m'a beaucoup aidé à relâcher la pression quand j'en avais besoin pendant le doctorat. Merci pour ton enthousiasme et ta motivation pour toujours organiser de nombreux événements chez nous, on se souviendra des soirées vins-fromages, sushis-saké, poké-balls, tajines, couscous... Merci pour ton talent à dédramatiser n'importe quelle situation, et à te moquer de mes défauts en me faisant autant rire.

Bernadette, tu es vite passée de voisine de bureau et d'appart, à amie de Bordeaux ! Je suis très heureuse de la tournure qu'a prise notre relation, et nos petits repas sont toujours des moments que j'apprécie, merci pour ton regard bienveillant et rieur, et nos valeurs partagées.

Ma très chère Juliette, merci d'être le piment de la famille Le Bihan Inguimberty, en théâtralisant les situations quotidiennes et en relativisant les situations difficiles, car tu as le don de sublimer la loose, de me faire rire malgré les larmes. Ton avis et ton regard me permettent souvent d'envisager les situations sous un nouvel angle, qui, bien que nous ne soyons pas toujours d'accord, est toujours intéressant. Notre soutien réciproque et nos encouragements me sont particulièrement précieux !

Papounet et Mamounette, un grand merci pour tout ce que vous m'avez transmis : le goût de l'aventure, du voyage, la curiosité des autres, l'importance du doute et de la remise en question (dans une certaine mesure), l'amour de la littérature, le sens de l'accueil et de la convivialité, un esprit mauvais perdant au jeu (plus marqué côté Le Bihan tout de même), le goût du challenge en sport. Je ne vous dirais jamais assez merci pour votre soutien au quotidien dans tous les projets que j'entreprends, même s'ils vous étonnent ou vous surprennent parfois ! Merci beaucoup pour vos relectures attentives de cette thèse, bien que le sujet vous soit étranger... Vous m'avez toujours fait confiance, tout en étant présent, me permettant de devenir une jeune femme indépendante, et épanouie. Merci pour votre amour inconditionnel, la tendresse et la joie, toujours présentes au sein de notre famille.

Je fais également une petite dédicace à Mamie Niniche et Mamie Isabelle, à leur soutien, leurs douces pensées et leur amour indéfectible.

Mon Paul, merci pour ton soutien sans faille, dans nos aventures communes comme individuelles. Il m'est bien difficile d'écrire en quelques mots ce qui nous lie l'un à l'autre. Ce lien solide, robuste, face au temps et à la distance, qui se nourrit d'amour, d'admiration et de respect. Je suis si heureuse et si fière de partager ta vie depuis ces longues années, de construire ma vie d'adulte avec toi basée sur nos valeurs communes. Mon choix de faire ce doctorat n'était certainement pas le plus facile pour nous, mais tu l'as accepté, conscient de son importance pour moi. Alors, après 5 années d'aller-retours Bordeaux – Nantes et 1 an et demi entre Bordeaux et Champagne-Mouton, il est grand temps que notre futur s'inscrive dans un même lieu géographique et au sein d'un même foyer, peu importe l'endroit finalement. J'ai hâte de découvrir cet avenir (en) commun, si bien accompagnée !

Table des matières

PARTIE 1.....	1
CONTEXTE ECONOMIQUE ET SCIENTIFIQUE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
CONTEXTE ECONOMIQUE ET SCIENTIFIQUE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ..	2
CHAPITRE 1. <i>STEVIA REBAUDIANA</i> BERTONI : ORIGINE ET DESCRIPTION	2
1.1. <i>Origine, classification et habitat naturel</i>	2
1.2. <i>Description botanique</i>	3
1.3. <i>Cycle de développement</i>	5
1.3.1. Développement végétatif.....	5
1.3.2. Cycle de reproduction	6
CHAPITRE 2.LES EDULCORANTS ET LEUR MARCHÉ.....	8
2.1. <i>Les différentes familles d'édulcorants</i>	8
2.2. <i>Marché et consommation des édulcorants intenses</i>	9
2.3. <i>Historique et évolution de l'utilisation de <i>S. rebaudiana</i></i>	10
2.4. <i>Evolution de la législation autour des SG et de la stévia</i>	11
CHAPITRE 3.LES GLYCOSIDES DE STEVIOL (SG) : RESPONSABLES DU POUVOIR EDULCORANT DE LA STEVIA.....	12
3.1. <i>Structure et diversité de ces composés</i>	12
3.1.1. Structure chimique des composés	12
3.1.2. Diversité des composés	12
3.1.3. Présence de SG chez d'autres plantes que <i>Stevia rebaudiana</i>	14
3.1.4. Production synthétique des SG.....	14
3.2. <i>Voie de synthèse des SG</i>	15
3.2.1. Etapes de la voie de biosynthèse des SG et leurs localisations	15
3.2.1.1. La voie de synthèse du MEP permettant la synthèse des précurseurs du GGPP	17
3.2.1.2. La voie commune aux SG et gibbérélines	17
3.2.1.3. La voie spécifique aux SG.....	17
3.2.2. Régulation génétique de la voie de biosynthèse des SG	21
3.3. <i>Facteurs de variabilité de l'accumulation des SG chez <i>Stevia rebaudiana</i></i>	23
3.3.1. Selon les organes.....	23
3.3.2. Selon la période du cycle de développement	24

3.3.3.	Selon les ressources génétiques et leurs conditions de production	25
3.4.	<i>Rôle des SG dans la plante</i>	28
3.4.1.	Précurseurs des gibbérellines	28
3.4.2.	Molécules de stockage d'énergie	29
3.4.3.	Osmolytes.....	30
3.4.4.	Des pièges à ROS, les espèces réactives de l'oxygène	30
3.4.5.	Défenses contre les ravageurs	31
3.5.	<i>Caractéristiques organoleptiques des SG</i>	32
3.6.	<i>Métabolisation et impact des SG sur la santé humaine</i>	34
3.6.1.	Métabolisation des SG par l'homme	34
3.6.2.	Impact sur la santé humaine	35
CHAPITRE 4. CULTURE DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> EN CONDITIONS DE PRODUCTIONS		
TEMPEREES.....		37
4.1.	<i>Production agricole de la stévia</i>	37
4.2.	<i>Implantation de la culture</i>	38
4.2.1.	Conditions pédoclimatiques adaptées à la culture de la stévia.....	38
4.2.2.	Production du matériel végétal.....	39
4.2.3.	Conditions de plantation de la culture.....	41
4.3.	<i>Intrants</i>	42
4.3.1.	Apports hydriques	42
4.3.2.	Nutrition N-P-K.....	42
4.4.	<i>Pérennité de la culture en conditions tempérées</i>	43
4.5.	<i>Stress biotiques impactant la production</i>	43
4.6.	<i>Récolte et variabilité du rendement</i>	50
CHAPITRE 5. UN AGENT FONGIQUE MAJEUR DE LA STEVIA : <i>SEPTORIA</i> SP.....		
5.1.	<i>Description de Septoria sp.</i>	53
5.2.	<i>Cycle de développement des Septoria sp.</i>	53
5.3.	<i>Lutte contre Septoria sp.</i>	56
CHAPITRE 6. AMELIORATION GENETIQUE DE <i>S. REBAUDIANA</i>		
6.1.	<i>Le contexte de l'amélioration génétique chez <i>S. rebaudiana</i></i>	59
6.1.1.	Un secteur organisé autour d'entreprises privées.....	59
6.1.2.	Une recherche publique en sélection sur stévia encore confidentielle	60
6.1.3.	La plupart des variétés de stévia sont protégées par un brevet ou des populations de graines peu identifiées.....	61
6.2.	<i>La sélection de <i>S. rebaudiana</i> cumule les contraintes</i>	69

6.2.1.	Des contraintes liées à la pérennité de la culture et à l'auto-incompatibilité	69
6.2.2.	Des contraintes liées au manque de caractérisation de la diversité génétique de de <i>S. rebaudiana</i> dans le monde	72
6.2.3.	Des contraintes liées à un manque d'information génomique disponibles sur stévia .	76
6.2.3.1.	Description du génome	76
6.2.3.2.	Données de séquençage	76
6.2.3.3.	Peu d'outils de description de la diversité génétique chez <i>S. rebaudiana</i>	77
6.2.3.4.	Une première carte génétique de la stévia incomplète (Yao <i>et al.</i> , 1999)	79
6.3.	<i>Sélectionner la stévia : sur quels caractères ?</i>	80
6.3.1.	Caractères des composants du rendement en glycosides de stéviol : la biomasse foliaire et la production en SG	80
6.3.1.1.	Biomasse foliaire : objectif d'augmentation du rendement	80
6.3.1.2.	Production en SG : teneur et composition	81
6.3.2.	Caractères de développement de l'architecture des plants	81
6.3.3.	Caractères des stades reproductifs	82
6.3.4.	Caractères face aux stress biotiques et abiotiques	82
6.4.	<i>Stratégies actuelles</i>	85
6.4.1.	Stratégies développées sur <i>S. rebaudiana</i>	85
6.4.1.1.	Sélection massale	85
6.4.1.2.	Création de variété clonale	86
6.4.1.3.	Sélection récurrente et cultivars synthétiques	87
6.4.1.4.	Rétrocroisements	88
6.4.1.5.	Stratégies pour une production en agriculture biologique	88
6.4.2.	Perspectives pour l'amélioration génétique de la stévia	89
6.4.2.1.	Création de lignées homozygotes	89
6.4.2.2.	Augmentation de la ploïdie	89
6.4.2.3.	Mutagenèse et plants transgéniques	90
6.4.2.4.	Développement de la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM)	91
CHAPITRE 7. CONTEXTE LOCAL ET OBJECTIFS DE LA THESE		94
7.1.	<i>Contexte local : la filière Aquitaine Stévia Innovation</i>	94
7.2.	<i>Contexte de la recherche, et objectifs de thèse</i>	98

PARTIE 2 – RESULTATS DES TRAVAUX DE RECHERCHE DU DOCTORAT ... 103

CHAPITRE 1. CONSTRUCTION DE L'ECHELLE BBCH DE DESCRIPTION DES STADES

PHENOLOGIQUES CHEZ <i>STEVIA REBAUDIANA</i>	104
1.1. <i>Introduction</i>	104
1.2. <i>Article scientifique</i>	106
1.3. <i>Transfert des connaissances vers la filière</i>	119
1.4. <i>Perspectives et conclusions</i>	121

CHAPITRE 2. ETUDE DE LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE D'UNE COLLECTION DE RESSOURCES

GENETIQUES DE <i>S. REBAUDIANA</i> EN CONDITIONS DE PRODUCTION	123
2.1. <i>Introduction</i>	123
2.2. <i>To cut or not to cut? That is the question in Stevia rebaudiana Bertoni production for first year harvest</i>	127
2.3. <i>Phénotypage des ressources génétiques en 2H sur 5 années de production</i>	186
2.3.1. <i>Matériels et méthodes</i>	187
2.3.1.1. <i>Matériel végétal</i>	187
2.3.1.2. <i>Design expérimental</i>	187
2.3.1.3. <i>Traits mesurés</i>	187
2.3.1.4. <i>Evaluation des paramètres de l'environnement</i>	189
2.3.1.5. <i>Analyses statistiques</i>	189
2.3.2. <i>Résultats</i>	192
2.3.2.1. <i>Accumulation de températures avec le SGDD</i>	192
2.3.2.2. <i>Etude du taux de reprise sur 5 années de production</i>	197
2.3.2.3. <i>Etude du rendement sur 4 années de production en implantation longue</i>	200
2.3.2.3.1. <i>Descriptions des composantes du rendement en glycosides de stéviol</i>	200
2.3.2.3.2. <i>Descriptions du rendement cumulé (kg/ha)</i>	205
2.3.2.3.3. <i>Description des profils en glycosides de stéviol</i>	208
2.3.2.4. <i>Suivi des variables de l'architecture des plants de stévia</i>	212
2.3.2.5. <i>Synthèse des résultats des ressources génétiques étudiées sur les traits d'intérêt agronomique</i>	216
2.3.2.6. <i>Discussion</i>	218

CHAPITRE 3. DESCRIPTION D'*ATHELIA ROLFSII* SUR *STEVIA* ET DEVELOPPEMENT D'UN TEST

POUR ETUDIER LA REPONSE DE <i>STEVIA REBAUDIANA</i> A LA SEPTORIOSE	225
3.1. <i>Détection et identification de <i>Athelia rolfsii</i> sur <i>Stevia rebaudiana</i></i>	227
3.1.1. <i><i>Athelia rolfsii</i> infectant <i>Stevia rebaudiana</i></i>	227
3.1.2. <i>Short-note</i>	229

3.2.	<i>Variabilité phénotypique de la réponse de ressources génétiques de Stevia rebaudiana à une infection par Septoria sp.</i>	234
3.2.1.	Etude de la variabilité de réponse de plantes entières de <i>Stevia rebaudiana</i> à une infection de <i>Septoria sp.</i>	234
3.2.1.1.	Introduction	234
3.2.1.2.	Matériel et méthodes	235
3.2.1.2.1.	Matériels.....	235
3.2.1.2.1.1.	Matériel végétal.....	235
3.2.1.2.1.2.	Matériel fongique	236
3.2.1.2.2.	Méthodes mises en œuvre pour l'inoculation.....	237
3.2.1.2.2.1.	Design expérimental.....	237
3.2.1.2.2.2.	Maintien et production de l'inoculum	237
3.2.1.2.2.3.	Production des plants.....	238
3.2.1.2.2.4.	Inoculation en chambre à pulvérisation.....	238
3.2.1.2.2.5.	Design expérimental en chambre de culture.....	239
3.2.1.2.2.6.	Evaluation de la réponse des génotypes testés	240
3.2.1.2.2.7.	Analyses statistiques.....	240
3.2.1.3.	Résultats	242
3.2.1.3.1.	Vérification de la reproductibilité du test d'inoculation grâce aux génotypes référents.....	242
3.2.1.3.2.	Evolution du score de symptômes sur 21 jours après inoculation.....	242
3.2.1.3.3.	Area Under Disease Progress Curve (AUDPC)	246
3.2.1.3.4.	Score de maladie à 21 JAI avec analyses sur ImageJ.....	247
3.2.1.4.	Discussion et perspectives	249
3.3.	<i>Développement d'un test de phénotypage de la sensibilité à Septoria sp. sur disques de feuilles de S. rebaudiana</i>	258
CHAPITRE 4. VERS LA SELECTION PARTICIPATIVE POUR LA FILIERE DE LA STEVIA EN AGRICULTURE BIOLOGIQUE.....		
		292
4.1.	<i>Estimation of genetic parameters in Stevia rebaudiana breeding progenies</i>	293
4.2.	<i>Construction d'un idéotype de Stevia rebaudiana pour la production en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France par la mise en œuvre de sélection participative</i>	336
4.2.1.	Introduction	336
4.2.2.	Démarche pour la co-construction d'un idéotype avec les acteurs de la filière	340
4.2.2.1.	Cahier des charges pour la constitution d'un idéotype de stévia.....	340
4.2.2.1.1.	Contexte de la filière dans le Sud-Ouest de la France.....	340

4.2.2.1.2. Les variétés de stévia utilisées aujourd'hui	341
4.2.2.2. Contexte d'utilisation des variétés.....	342
4.2.2.2.1. Contexte environnemental et agronomique.....	342
4.2.2.2.2. Contexte économique.....	343
4.2.2.2.3. Contexte réglementaire	343
4.2.2.3. Acteurs impliqués dans la démarche	344
4.2.2.3.1. Présentation des acteurs	344
4.2.2.3.2. Contraintes et motivations des acteurs	346
4.2.2.4. Cahier des charges des idéotypes	349
4.2.2.5. Construction des idéotypes en réponse au(x) cahier(s) des charges.....	350
4.2.2.6. Conclusion et perspectives sur la construction d'un idéotype de stévia.....	354
BILAN DES RESULTATS OBTENUS.....	358
DISCUSSION GENERALE	362
CHAPITRE 1.LA NECESSITE DE COLLECTER ET CARACTERISER DE NOUVELLES RESSOURCES GENETIQUES.	363
1.1. <i>La collection Oviatis – INRAE (Villenave d'Ornon).....</i>	363
1.2. <i>Quelques autres collections existent dans le monde</i>	364
1.3. <i>La nécessité d'enrichir les collections de ressources génétiques</i>	364
1.3.1. Accessibilité des ressources génétiques	365
1.3.2. Conservation et caractérisation des ressources génétiques	366
CHAPITRE 2.OPTIMISER LE PHENOTYPAGE: UNE NECESSITE POUR L'AMELIORATION DE LA STEVIA ET LE DEVELOPPEMENT DE LA FILIERE.	368
2.1. <i>Les outils de phénotypage sur la culture de la stévia ont été faiblement développés jusqu'à présent et les connaissances restent limitées.....</i>	369
2.2. <i>Les outils de phénotypage pouvant être développés sur les traits étudiés dans le cadre de projet sont nombreux.....</i>	372
2.2.1. Perspectives sur l'étude de la biomasse foliaire et de l'architecture de la stévia	372
2.2.2. Le phénotypage des SG, vers le développement d'outils à plus haut débit.....	374
2.2.3. Le phénotypage des traits de sensibilité aux agents pathogènes est nécessaire pour l'amélioration génétique de la stévia pour une production en agriculture biologique.	375
2.3. <i>L'identification de nouveaux traits d'intérêt pour le phénotypage de Stevia rebaudiana</i>	377
2.3.1. L'architecture du système racinaire de la stévia et sa physiologie sont encore largement méconnus.....	377

2.3.2. L'étude des traits en lien avec la floraison permettra de mieux cibler la date de récolte.....	381
CHAPITRE 3. PERSPECTIVES POUR LA DESCRIPTION DE L'ARCHITECTURE GENETIQUE DES TRAITES D'INTERET ET LA MISE EN ŒUVRE DE STRATEGIES DE SELECTION SUR STEVIA	383
3.1. <i>Les résultats de ce travail de recherche permettent d'initier le programme d'amélioration de la stévia en collaboration avec les acteurs de la filière.</i>	<i>383</i>
3.2. <i>Stratégies pour l'amélioration génétique de la stévia dans le contexte d'une production locale en agriculture biologique.....</i>	<i>385</i>
3.2.1. La stratégie employée jusqu'à présent : sélection massale et identification de clones élite.....	385
3.2.2. Les variétés synthétiques : une stratégie à long terme pour l'amélioration de la stévia.....	386
3.2.3. Les apports de la sélection assistée par marqueurs	386
3.2.4. Conditions pour la mise en œuvre de la SAM sur l'amélioration de la stévia	387
3.3. <i>Développer l'information génomique pour améliorer la stévia.....</i>	<i>389</i>
3.3.1. Le développement de marqueurs moléculaires est facilité par la publication de la séquence du génome de la stévia.....	389
3.3.2. Ces outils moléculaires devront permettre la construction de cartes génétiques robustes.....	390
3.3.3. Investigation de l'effet GxE	391
3.3.4. GWAS, sélection génomique, et New Plant Breeding Techniques : autant d'approches avec un fort potentiel chez les cultures pérennes, dont la stévia.	393
PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL DE RECHERCHE.....	394
VERS LE DEVELOPPEMENT LA FILIERE STEVIA DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE ET LA POURSUITE DES EFFORTS DE RECHERCHE A L'INRAE DE VILLENAVE D'ORNON	394
1.1. <i>Perspectives de développement de la filière stévia en Agriculture Biologique .</i>	<i>395</i>
1.1.1. L'apport des résultats de cette thèse.....	395
1.1.2. Les objectifs de l'entreprise Oviatis des prochaines années	397
1.2. <i>Perspectives de recherche pour le projet stévia.....</i>	<i>398</i>
CONCLUSION.....	400
BIBLIOGRAPHIE.....	402

Liste des figures et des tableaux :

Partie 1

Chapitre 1

Figure 1.2.a : Parcelle expérimentale de stévia localisée à Blagon (33) en troisième année de production en août (crédit photo : Zoé Le Bihan).....3

Figure 1.2.b : Capitule de *Stevia rebaudiana*. Photo prise sur une plante en troisième année de production en septembre (crédit photo : Zoé Le Bihan).....4

Figure 1.2.c : Graines de *Stevia rebaudiana*. A droite une graine de couleur claire qui est stérile et à gauche une graine de couleur foncée qui est fertile (crédit photo : Zoé Le Bihan)...5

Chapitre 2

Figure 2.1 : Formule chimique du sucralose (A) et de l'aspartame (B).....9

Figure 2.3 : Produits utilisant de la poudre de stévia ou des glycosides de stéviol lancés sur le marché ces cinq dernières années (crédit photo : CocaCola, PepsiCo, Danone, PurVia, Oviatis, PureCircle, Zevia).....10

Chapitre 3

Figure 3.1.1.a : Structure aglycone des glycosides de stéviol : noyau de stéviol (SV), avec les localisations des liaisons des radicaux R1 et R2 (O'Brien-Nabors, 2016).....12

Table 3.1.2: Tableau de synthèse des 10 principaux glycosides de stéviol identifiés chez *Stevia rebaudiana* (adapté de Hastoy, 2018).....13

Figure 3.2.1.a : Etapes de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol et leurs localisations dans la cellule végétale (d'après Hastoy, 2018 ; Petit, 2019 ; Brandle and Telmer, 2007).....16

Tableau 3.2.1.3 : Présentation des UGTs connues chez *S. rebaudiana*, des réactions qu'elles catalysent et leur place dans la voie de synthèse des SG, les flèches en pointillés symbolisent les réactions qui sont supprimées.....19

Figure 3.2.1.b : Représentation des principaux SG produits par *Stevia rebaudiana*, avec leurs résidus osidiques et les UGTs impliquées dans leur synthèse (d'après Petit, 2019).....20

Figure 3.3.2 : Synthèse de l'évolution de la teneur en SG dans les feuilles pendant le cycle de développement de *S. rebaudiana* (d'après Ceunen and Geuns, 2013a ; Barbet-Massin, 2015 ; Hastoy, 2018).....25

Figure 3.6.1 : Représentation schématique de la métabolisation des glycosides de stéviol chez l'Homme et le rat, avec R1 et R2 les groupements mono ou polyosidiques (Lesniarek, 2015).....35

Chapitre 4

Figure 4.1 : Zones de production de stévia (d'après Gantait *et al.*, 2018 ; Ciriminna *et al.*, 2018).....37

Figure 4.2.2.a : Semis réalisés en pépinière lors de test d'enrobage des graines de stévia (Crédit photo : Cécile Hastoy).....	39
Figure 4.2.2.b : Boutures produites en serre pour implantation d'une parcelle en plein champ dans le Lot-et-Garonne (47) (Source photo : Cécile Hastoy).....	40
Tableau 4.4 : Liste des agents pathogènes identifiés sur <i>Stevia rebaudiana</i> . Présentation du type, symptômes décrits, localisation, et les références.....	46-49
Figure 4.6 : Parcelle expérimentale localisée à Blagon (33), les plants de stévia sont en troisième année de production, juillet 2019 (Crédit photo : Zoé Le Bihan).....	50
Chapitre 5	
Figure 5.1: Résumé des différentes étapes d'infection de <i>Septoria</i> sp. (d'après Steinberg, 2015).....	54
Figure 5.2: Présentation de la septoriose sur stévia.....	55
Chapitre 6	
Figure 6.2.1 : (A) Liste des 10 structures ayant le plus déposé de brevets à propos de l'amélioration de la stévia et des modalités d'extraction des glycosides de stéviol, avec le nombre de brevets déposés par entreprises. (B) Nombre de brevets à propos de l'amélioration de la stévia et des modalités d'extraction des glycosides de stéviol déposés par années.....	59
Tableau 6.1.3: Liste des brevets déposés sur les variétés de <i>S. rebaudiana</i> depuis 1998, (adapté d'après Hastoy, 2018).....	63-68
Tableau 6.2.2 : Origine et type de matériel caractérisé dans l'étude de Cosson <i>et al.</i> , (2019).	73
Figure 6.2.2 : Ressources génétiques caractérisant les différents clusters génétiques de l'article de Cosson <i>et al.</i> , (2019).....	74
Tableau 6.2.3.3. : Présentation du type de marqueurs développés sur <i>Stevia rebaudiana</i> , leur nombre testés et développés.....	78
Figure 6.2.3.4. : Première carte génétique développée sur <i>S. rebaudiana</i> avec des marqueurs RAPD (Yao <i>et al.</i> , 1999).....	79
Figure 6.3: Synthèse des différents critères de sélection sur <i>Stevia rebaudiana</i> en conditions de cultures tempérées.....	84
Figure 7.1 : Présentation des acteurs investis dans le projet ASI, ainsi que leur relation (Source : Oviatis).....	96
Tableau 7.1 : Prévision de production de biomasse foliaire pour la filière (Source : Oviatis).....	97
Synthèse des objectifs du projet de thèse.....	101

Partie 2

Chapitre 1

Figure 1.3 : Fiche technique de communication de l'échelle BBCH pour la filière de la stévia.....	120
---	-----

Chapitre 2

Figure 2.3.1.3 : Suivi expérimental réalisé sur les plants non récoltés en première année de production.....	187
Tableau 2.3.1.3 : Présentation des variables de description de l'architecture des plants.....	189
Figure 2.3.2.1.a : Evolution du Sum of Growing Degree Day (SGDD) pour les quatre années de production (2016, 2017, 2017 et 2019) de <i>S. rebaudiana</i> sur une parcelle expérimentale localisée à Liposthey (40).....	193
Tableau 2.3.2.1.a : Coefficient directeur de la régression linéaire entre les jours et le SGDD pour chaque année d'étude.....	193
Tableau 2.3.2.1.b : Table d'ANOVA sur les modèles linéaires appliqués aux paramètres environnementaux : températures (°c), pluviométrie (mm) et Sum of Growing Degree Day (SGDD) (°C/j), selon le facteur année.....	194
Figure 2.3.2.1.b : Températures (°C) mensuelles pour les cinq années d'étude de la production de <i>S. rebaudiana</i> sur une parcelle expérimentale de Liposthey (40).....	195
Figure 2.3.2.1.c : Pluviométries (mm) mensuelles pour les cinq années d'étude de la production de <i>S. rebaudiana</i> sur une parcelle expérimentale de Liposthey (40).....	196
Figure 2.3.2.2 : Taux de reprise en deuxième, troisième, quatrième et cinquième année de production pour les 15 ressources génétiques de <i>S. rebaudiana</i> implantées sur une parcelle expérimentale localisée à Liposthey (40), Sud-Ouest de la France, d'après deux modalités de récolte en première année de production.....	198
Table 2.3.2.2 : Table d'ANOVA sur le modèle linéaire généralisé appliqué à la reprise selon la modalité de reprise et l'année.....	199
Figure 2.3.2.3.1.a: Présentation du rendement en glycosides de stéviol et de ses composants pour 15 ressources génétiques de <i>S. rebaudiana</i> implantées sur une parcelle expérimentale à Liposthey (40), dans le Sud-Ouest de la France et évaluées jusqu'en quatrième année de production.....	202
Tableau 2.3.2.3.1.a: Table d'ANOVA sur les analyses de variance des composants du rendement.....	203
Figure 2.3.2.3.1.b : Matrice de corrélations de Pearson pour les composants du rendement.....	204
Figure 2.3.2.3.2.c : Présentation du rendement cumulé en glycosides de stéviol.....	206
Tableau 2.3.2.3.2.b: Table d'ANOVA sur les analyses de variance des composants du rendement.....	207

Figure 2.3.2.3.3.a : Présentation des profils en glycosides de stéviol pour les 15 génotypes étudiés sur les trois années de mesure.....	209
Tableau 2.3.2.3.3.a : Table d'ANOVA de l'analyse de variance des proportions en glycosides de stéviol sucrés.....	210
Figure 2.3.2.3.3.b : Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les proportions des 5 SG majeurs (DulA : Dulcoside A, RebA = Rebaudioside A, RebC = Rebaudioside C, RebF = Rebaudioside F, ST= Stevioside) pour les 15 ressources génétiques étudiées sur 3 années de production.....	210
Figure 2.3.2.3.3.c : Matrice de corrélation de Pearson des proportions de 10 SG.....	211
Figure 2.3.2.4.a : Présentation du Harvest Index (%) pour les 15 ressources génétiques de <i>S. rebaudiana</i> implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40).....	212
Figure 2.3.2.4.b : Présentation de la densité de tiges (nb tiges / m ²) pour les 15 ressources génétique de <i>S. rebaudiana</i> implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40)....	213
Figure 2.3.2.4.c : Présentation de l'évolution du volume de la canopée (m ³) pour les 15 ressources génétiques de <i>S. rebaudiana</i> implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40).....	214
Figure 2.3.2.5 : Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les traits d'intérêt agronomiques de <i>S. rebaudiana</i>	216
Chapitre 3	
Tableau 3.2.1.3.1.1.: Ressources génétiques de <i>Stevia rebaudiana</i> testées pour évaluer leur réponse à une inoculation de <i>Septoria</i> sp.....	235
Figure 3.2.1.2.1.2.: Présentation de la morphologie de <i>Septoria</i> sp.....	236
Figure 3.2.1.2.2.1. : Présentation du design expérimental des inoculations pour les 18 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> testés sur la sensibilité à la septoriose entre 2017 et 2019..	237
Tableau 3.2.1.2.2.3. : Variation du réglage de la température en serre selon les heures de la journée.....	238
Figure 3.2.1.2.2.5 : (A) Chambre à pulvérisation Euro-pulvé équipée de buses à jet plats. (B) Inoculation sur 10 plants de stévia.....	239
Tableau 3.2.1.3.1. : Table d'ANOVA sur des modèles linéaires mixtes sur le score de symptômes (t=21 JAI).....	242
Tableau 3.2.1.3.2.a : Table d'ANOVA sur des modèles linéaires mixtes sur les variables de la sévérité de maladie en conditions contrôlées.....	243
Figure 3.2.1.3.2.: Evolution de la maladie de Septoriose entre 12 et 21 jours après inoculation sur 18 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> inoculés en conditions contrôlées.....	244
Tableau 3.2.1.3.2.b : Coefficients de pentes de régression linéaire du score de symptômes selon la date de notation pour les 18 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> testés.....	245
Figure 3.2.1.3.3. : Score d'AUDPC pour les 18 génotypes de <i>Stevia rebaudiana</i> inoculés par <i>Septoria</i> sp.....	247

Figure 3.2.1.3.4. : Pourcentage de surface foliaire atteinte (PLSA) pour les 18 géotypes de *Stevia rebaudiana* inoculés par *Septoria* sp.....248

Figure 3.2.1.4 : Dynamiques de la paroi pendant l'infection d'un agent fongique (d'après Bellincampi *et al.*, 2014).....254

Chapitre 4

Figure 4.2.2.5: Fiche technique permettant une synthèse des propositions sur l'idéotype de stévia dans le contexte de production de la filière en Agriculture Biologique du Sud-Ouest de la France.....353

Figure 4.2.2.6 : Schéma de la démarche de conception-évaluation d'idéotypes (Debaeke *et al.*, 2014).....354

Bilan des résultats obtenus

Synthèse des principaux résultats obtenus pour chaque axe de recherche.....361

Discussion générale

Figure 5.2.a : Dispositifs RhizoTubes développés par la plateforme 4PMI, INRAE Dijon, par Jeudy *et al.*, (2016).....378

Figure 5.2.b: Système d'étude des racines par la mise en place de tubes minirhizotron (Johnson *et al.*, 2001).....379

Productions scientifiques

1. Productions écrites et animations scientifiques

1.1. Publications scientifiques

Hastoy C, Le Bihan Z, Gaudin J, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2019.

First report of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance.

Publication acceptée par le journal Plant Disease,

Le Bihan Z, Gaudin J, Robledo-Garcia F, Hastoy C, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2019

First report of *Athelia rolfsii* on *Stevia rebaudiana* in southwestern France

Publication acceptée par le journal Plant Disease

Le Bihan Z, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2020

Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the BBCH scale

Publication acceptée par le journal Annals of Applied Biology

Le Bihan Z, Hastoy C, Cosson P, Boutié P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2020

To cut or not to cut? That is the question in *Stevia rebaudiana* Bertoni production for first year harvest.

Publication soumise au journal Industrial Crops and Products

1.2. Animations scientifiques

- 15 présentations orales d'avancement des travaux dans le cadre des réunions entre les partenaires impliqués dans la thèse CIFRE (Oviatis, INRAE, Invenio)
- Poster dans le cadre des Journées Jeunes chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, Paris, AgroParicTech, 20-21 septembre 2018 :

Le Bihan Z, Hastoy C, Gaudin J, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2019. Screening for *Stevia rebaudiana* response to Septoria Leaf Blotch in controlled conditions.

- Poster dans le cadre des Journées des doctorants de l'Ecole Doctorale SVS de l'Université de Bordeaux, Talence Haut-Carré, 14 mai 2019 :

Le Bihan Z, Hastoy C, Gaudin J, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. 2019. Phenotypic characterization of new genetic resources of *Stevia rebaudiana* for the trait Septoria Leaf Blotch susceptibility towards the development of a leaf disk assay

- 1 présentation orale dans le cadre des réunions scientifiques de l'équipe virologie de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE, Villenave d'Ornon, France :

« Phenotypic characterization of steviol glycosides yield's traits on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) genetic resources » 30 avril 2019

- 2 présentations orales dans le cadre des animations scientifiques de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE, Villenave d'Ornon :

« Genetic architecture of steviol glycosides yield's traits on *Stevia rebaudiana* (Bertoni): phenotypic characterization of genetic resources, genetic map development and detection of steviol glycosides yield traits QTLs » 20 mai 2019

« *Stevia rebaudiana*: genetic resources diversity, through phenotypic and genotypic evaluation towards stevia implantation in southwestern France » 20 janvier 2020

- Présentation dans le cadre des Journées Jeunes chercheurs du département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, Avignon, INRA, 14-15 juin 2019 :

« Phenotyping and genotyping of *Stevia rebaudiana* to characterize a germplasm collection: towards a breeding program adapted to an organic production in South West of France »

- Présentation dans le cadre du work-shop Compositae du congrès Plant and Animal Genome 2020, San Diego, USA, 11-15 janvier 2020 :

« *Stevia rebaudiana*: cultivated and landraces phenotypic and genotypic diversity, through yield components mapping »

1.3. Construction d'une culture scientifique

- Participation à la journée technique : « Observer et caractériser les plantes : les avancées du phénotypage à haut-débit au service de l'amélioration, la nutrition et de la protection des plantes » organisée par l'Institut Carnot Plant2Pro et Agri Sud-Ouest Innovation à l'INRAE de Toulouse
- Suivi des séminaires organisés par l'INRAE de Villenave d'Ornon

1.4. Formations complémentaires

2018 : Formations transverses

- Formation « From observation to extrapolation » dans la thématique « Maitriser les techniques et outils utiles dans la recherche », 6h, Université de Bordeaux
- Formation « Réussir son intégration en entreprise : négociation du contrat de travail » dans la thématique « Préparer sa poursuite de carrière professionnelle », 7h, Université de Bordeaux
- Formation à distance « Intégrité scientifique dans les secteurs de la recherche », 15h, MOOC Université de Bordeaux
- Formation « Management : Découvrir les fondamentaux du management dans la gestion du personnel », 12h, Université de Bordeaux

2019 : Formations disciplinaires

- Formation « Bio-informatique Niveau 1 – Analyses bio-informatiques des séquences moléculaires « Optimisation et stratégies » », 30h, INRAE Villenave d'Ornon
- Formation « Statistiques : Multidimensionnelles », 18h, INRAE Villenave d'Ornon
- Formation « Statistiques : Modèle linéaire », 17h, INRAE Villenave d'Ornon
- Formation « Statistiques : Modèle linéaire généralisé », 15h, INRAE Villenave d'Ornon
- Formation « Génétique quantitative évolutive », 34h, Université de Montpellier

2. Activités transversales

- Participation à des rencontres avec les agriculteurs cultivant la stévia et Oviatis (2018 et 2020)

- Encadrement de stagiaires et CDD en 2018 :
 - Sasha Benasouli, Service civique, aide au phénotypage 1 à 2 journées par semaine pendant la période de récolte
- Encadrement de stagiaire et CDD en 2019 :
 - Solenne Boutet, Master 1, pendant 4 mois
 - Marianne Laurençon, Licence 3, 8 semaines
 - Isabelle Ardurat, CDD technicien pour aide au phénotypage à la récolte, 1 mois

- Membre actif de l'association des doctorants de l'INRAE, Villenave d'Ornon, DNAS (2 ans) :
 - Accueil et intégration des nouveaux doctorants « Welcome Party » - octobre 2019
 - Organisation d'une journée « Doctorants du Campus Vert » - juin 2019

- Rédaction des rapports d'activité annuels pour l'Agence Nationale de Recherche et Technologie – Décembre 2018 et 2019

Abbréviations :

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

AB : Agriculture Biologique

Acétyl-CoA: acétylcoenzyme A

ACN : Acétonitrile

ACP : Analyse en Composante Principale

AIC : Akaike Information Criteria

APA : Accès et le partage des Avantages

ASI : Aquitaine Stévia Innovation

AUDPC : Area Under Disease Progressive Curve

BBCH : Biologisch Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry

BIC : Bayésian Information Criteria

CDB : Convention sur la Diversité Biologique

CDP : ent-copalyl diphosphate

CMK : 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase

CMS : 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase

CPPS : ent-copalylpyrophosphate synthase

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAI : Days After Inoculation

DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate

DulA : Dulcoside A

DulB : Dulcoside B

DXP : deoxyxylulose-5-phosphate

DXR : DXP reductoisomérase

DXS : deoxyxylulose-5-phosphate synthase

EARL : Entreprise Agricole à Responsabilité Limitée

EST : Expressed Sequence Tag

EUSTAS : European Stevia Association

G3P : glycéraldéhyde 3-phosphate

GB : Gibbérélines

GCA : General Combining Ability

GDD : Growing Degree Day

GGPP : géranylgéranyl diphosphate

GGPPS : géranylgéranyl diphosphate synthase

GR : Growth Rate

GWAS : Genome Wide Association Study

h^2 : héritabilité au sens étroit

H^2 : héritabilité au sens large

HDR : (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl disphateréductase

HDS : 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate synthase

HI : Harvest Index

HMBPP : hydroxyméthylbutenyl 4-diphosphate

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl CoA

HMGR : HMG-CoA réductase

HMGS : HMG-COA synthase

HSD : Honestly Significant Difference

IAA : Industrie Agro-Alimentaire

IAN : Instituto Agronomico Nacional

IDI : isopentényl-diphosphate delta-isomérase

INRAE : Institut national de recherché pour l'environnement et l'agriculture

INTA : Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuraria

IPP : isopentenyl-pyrophosphate

ISSR : Inter-Simple Sequence Repeat

JAI : Jours Après Inoculation

KA13H : acide ent-kaurénoïque 13-hydroxylase

KAO : acide ent-haurénoïque oxydase

KO : ent-kaurène oxidase

KS : ent-copalyl diphosphate synthase

LED : Light Emitting Diode

LMR : Leaf Mass Ratio

MAC: Mac Conkey

MCS : 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erithriitol 2,4-cyclophosphate synthase

MeCPP : 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate

MEP : 2-C-méthylérythritol-4-phosphate

MPK : MVP kinase

MVA : acide mévalonique

MVK : MVA kinase

MVP : 5-phosphomévalonate

MVPP : 5-diphosphométvalonate

New Plant Breeding Techniques : NPBT

NGS : Next Generation Sequencing

NIRS : Near Infrared Spectroscopy

NPK : Azote, Phosphore, Potassium

OAC: Oat Agar Chloramphenicol

OAD : Outils d'Aide à la Décision

OP : Organisation de producteurs

PG : Polygalacturonases

PGIP : Polygalacturonases

PGM : Plantes Génétiquement Modifiées

PLSA : Percentage of Leaf Symptomatic Area

PMD : MVPP décarboxylase

PME : Pectin Methylesterases

PR : Patogenesis related

QTL : Quatitative Trait Locus

R&D : Recherche et Développement

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RebA : rebaudioside A

RebB : rebaudioside B

RebD : Rebaudioside D

RebE : Rebaudioside E

RebF : rebaudioside F

RebG : rebaudioside G

RebI : rebaudioside I

RebJ : rebaudioside J

RebK : rebaudioside K

RebM : rebaudioside M

RebN : rebaudioside N

REML : Restricted maximum likelihood

RG : Ressources génétiques

RNCP : Registro Nacional de Cultivares Protegidos

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

ROS : reactive oxygen species

Rub : Rubudioside

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

SB : Steviolbioside

SCA : Specific Combining Ability

SG : glycosides de stéviol

SGDD : Sum of Growing Degree Day

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSR : Simple Sequence Repeat

ST : stéviolside

SV : stéviol

UDP : Uridine diphosphate glucose

UE : Union Européenne

UGT : UDP-glycosyltransferase

Liste des unités :

cM : centiMorgan

ha : hectare

m : mètre

g : gramm

L : litre

M : molaire

T : tonne (10^3 kg)

% w/w : weight/weight ; poids/poids

°C : Degré Celsius

Partie 1
Contexte économique et scientifique
Revue bibliographique

Contexte économique et scientifique : revue bibliographique

Chapitre 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni : origine et description

1.1. Origine, classification et habitat naturel

L'espèce *Stevia rebaudiana* Bertoni fait partie de la famille des *Asteraceae*. Cette plante herbacée et pérenne est originaire du Paraguay. Surnommée « Kaáhe'é », ses propriétés sucrantes sont connues depuis des centaines d'années car les Indiens Guarani, habitants de la région du Nord-Est du Paraguay, en utilisent les feuilles pour sucrer le maté (Lewis, 1992). Le botaniste Moisés Santiago Bertoni fut le premier à étudier et décrire la stévia (Kinghorn, 2002; Ramesh *et al.*, 2006). Il la nomma d'abord *Eupatorium rebaudianum*, mais en 1905 M. S. Bertoni identifie l'espèce comme appartenant au genre *Stevia*, sa dénomination change pour devenir celle utilisée de nos jours : *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bertoni, 1905).

Le genre *Stevia* regroupe jusqu'à 300 espèces originaires d'Amérique du Nord et du Sud (Robinson and King, 1977; Soejarto, 2002; Rodríguez-Cravero *et al.*, 2019). Ces plantes sont des herbes pérennes ou petits arbustes que l'on trouve sur des terrains plutôt semi-secs et montagneux (Soejarto, 2002). Le climat dans lequel cette culture se développe normalement est un climat subtropical, avec de très grands écarts de températures pouvant aller de -6°C à 43°C (Sumida, 1982), ainsi que de fortes précipitations annuelles, 1400 mm en moyenne. On la retrouve sur des prairies humides et peu fertiles au pH acide et souvent sableuses (Shock, 1982).

Stevia rebaudiana est l'espèce la plus étudiée du genre *Stevia* du fait de sa production de molécules édulcorantes localisée principalement dans les feuilles : les glycosides de stéviol (SG). Il faudra attendre 1931 pour que deux chimistes français identifient la première de ces molécules à l'origine du goût sucré de la stévia : le stéviolside (ST) (Bridel and Lavieille, 1931). *S. rebaudiana* n'est pas l'unique espèce du genre à produire des SG, la présence de stéviolside a été identifiée chez *Stevia phlebophylla* A. Gray, une plante provenant du Mexique, mais celle-ci est aujourd'hui disparue (Soejarto *et al.*, 1983). Le rubusoside, a également été identifié chez d'autres espèces que *S. rebaudiana* mais en des quantités bien moins importantes. Il s'agit de *Rubus suavissimus* S. Lee (Ohtani *et al.*, 1992), *Rubus chingii* Hu (Tanaka *et al.*, 1981) et *Angelica Keiskei* (Zhou *et al.*, 2012) appartenant à la famille des *Rosaceae* pour les deux premières et des *Apiaceae* pour la dernière.

1.2. Description botanique

Stevia rebaudiana est une plante pérenne. Elle possède des tiges principales qui se ramifient en produisant des pousses secondaires annuelles. A l'état sauvage la plante est peu ramifiée, présente souvent une seule tige principale, les branches et les feuilles sont couvertes de poils blanchâtres, sa taille varie entre 30 et 50 cm (Soejarto, 2002). A l'état cultivé, les tiges principales produisent de nombreuses tiges secondaires qui forment une couronne dense de forme ronde (Figure 1.2.a) et sa taille est comprise entre 70 et 80 cm mais peut atteindre 140 cm (Soejarto, 2002). Ses feuilles sont simples, opposées et subsessiles, de formes et de tailles très variées allant de l'ovale à une forme oblongue et présentant un bord dentelé (Barbet-Massin, 2015; Angelini *et al.*, 2018). Les feuilles les plus larges et longues sont les plus anciennes (Rodríguez-Cravero *et al.*, 2019). Les feuilles et tiges de stévia présentent à leur surface des trichomes, qui sont de fines excroissances pouvant prendre plusieurs formes : allongées, coniques, glandulaires ou encore doublées (Rodríguez-Cravero *et al.*, 2019).



Figure 1.2.a : Parcelle expérimentale de stévia localisée à Blagon (33) en troisième année de production en août (crédit photo : Zoé Le Bihan).

Les racines des plants de stévia sont fasciculées, filiformes et peu ramifiées (Angelini *et al.*, 2018). Elles forment une structure pérenne que l'on retrouve dans les horizons supérieurs du sol pendant la durée d'implantation de la stévia (Carneiro, 1990; Soejarto, 2002).

Les fleurs sont tubulaires, petites, d'un aspect blanchâtre et hermaphrodites (Soejarto, 2002). Elles sont composées d'un ensemble de fleurons entouré par un involucre (Hastoy, 2018) et possèdent des poils externes (Ramesh *et al.*, 2006). Le capitule est composé de plusieurs inflorescences densément regroupées en corymbe qui sont situées à l'extrémité des branches (Figure 1.2.b).



Figure 1.2.b : Capitule de *Stevia rebaudiana*. Photo prise sur une plante en troisième année de production en septembre (crédit photo : Zoé Le Bihan).

Les graines sont composées d'un petit endosperme et de poils fins disposés en corolle qui composent le pappus et facilitent la dispersion aérienne (Ramesh *et al.*, 2006). Lorsqu'elles sont vides et ne contiennent pas d'embryon leur couleur est pâle, en revanche les graines issues d'une vraie fécondation ont une couleur plus sombre (Yadav *et al.*, 2011; Raina *et al.*, 2013) (Figure 1.2.c).



Figure 1.2.c : Graines de *Stevia rebaudiana*. A droite une graine de couleur claire qui est stérile et à gauche une graine de couleur foncée qui est fertile (crédit photo : Zoé Le Bihan).

1.3. Cycle de développement

Une première description partielle du cycle de développement de *Stevia rebaudiana* a été réalisée par Tateo *et al.* (1998). Des observations morphologiques de plantes originaires du Paraguay ont permis aux auteurs de décrire quatre modes de croissance différents associés à des architectures de la canopée. La caractérisation du cycle de reproduction n'avait pas été réalisée dans cette étude. Par la suite, une étude s'est penchée sur la description complète du cycle de développement de stévia (Carneiro, 2007), séparant les stades végétatifs des stades reproductifs. Enfin, le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a permis la construction d'une échelle BBCH de la stévia (Le Bihan *et al.*, 2020), qui sera présenté dans le premier chapitre des résultats.

1.3.1. Développement végétatif

Le premier stade est celui de la germination avec le développement des cotylédons. Ensuite *S. rebaudiana* entre dans une phase de forte croissance végétative jusqu'à ce que plusieurs tiges se soient développées et forment une couronne. Des tiges secondaires et tertiaires peuvent se développer pendant cette phase. Cela correspond aux différents types de croissance dans l'étude de Tateo *et al.* (1998) : une principale tige avec des bourgeons secondaires peu développés, une tige principale ramifiée avec des tiges secondaires, une tige principale ramifiée par des tiges secondaires très développées, et enfin plusieurs tiges principales pouvant être ramifiées. Dans

la description de Carneiro, 2007 cela correspond au stade de croissance et de ramification des plantes.

La durée de ce stade est très variable, et dépend de la photopériode sous laquelle est cultivée la plante. Cette culture se développe dans son espace naturel sous une photopériode qualifiée de « courte » dans la bibliographie, c'est-à-dire autour de 13h d'ensoleillement (Brandle, Starratt, *et al.*, 1998). Cependant, il est possible de la cultiver sous une photopériode « longue », avec en moyenne 16 h d'ensoleillement, ce qui a pour effet de rallonger la période végétative et de stimuler la croissance en début de cycle par rapport à une photopériode « courte », avec 8h d'ensoleillement (Metivier and Viana, 1979; Ceunen and Geuns, 2013a).

1.3.2. Cycle de reproduction

L'initiation du cycle de reproduction est marquée par la formation des bourgeons floraux, suivie de l'anthèse, du développement des graines et enfin de leur dispersion par le vent (Carneiro, 2007). Ce cycle s'étale sur environ 30 jours (Raina *et al.*, 2013), mais cette valeur moyenne cache une grande variabilité, Martini *et al.*, (2017) ont observé des cycles de reproduction pouvant durer jusqu'à 50 jours. Il existe une grande gamme de variabilité sur l'initiation de la floraison allant de fin-août pour les géotypes les plus précoces à mi-septembre pour les plus tardifs sous climats tempérés (Hastoy, 2018). Lors de la formation des bourgeons floraux, les apex des tiges se différencient pour former les structures florales. De petites feuilles fines et pointues apparaissent : ce sont les bractées, caractéristiques de ce changement morphologique. La formation des bourgeons floraux entraîne également une diminution de production de nouvelles tiges et de biomasse foliaire (Barbet-Massin, 2015). A la fin du stade de développement des bourgeons floraux, les anthères sont matures et on observe le début de la déhiscence. Lors de l'ouverture des fleurs, les anthères sont au maximum de déhiscence ce qui permet la libération du pollen. Dans le même temps, le stigmate finit son développement et il pourra capter les grains de pollen lors de la pleine floraison (Raina *et al.*, 2013).

L'allo-pollinisation chez *Stevia rebaudiana* est une étape obligatoire de la reproduction car cette plante est auto-incompatible (Yadav *et al.*, 2011; Raina *et al.*, 2013; Uçar *et al.*, 2015). Cette auto-incompatibilité se traduit par la non-adhésion du pollen d'une plante sur son propre stigmate (Yadav *et al.*, 2014). Le mécanisme d'auto-incompatibilité est sporophytique (Raina *et al.*, 2013), c'est-à-dire que les deux parents ne peuvent pas partager d'allèles identiques pour les gènes d'incompatibilité (Dickinson *et al.*, 2003).

La pollinisation de *Stevia rebaudiana* est entomophile, elle est réalisée grâce aux insectes pollinisateurs, et non par dispersion aérienne (Yadav *et al.*, 2014). La viabilité du pollen varie

de 36,5% à 99,6% selon le génotype considéré et son environnement de production (Budeguer *et al.*, 2018). Les pollinisateurs observés sur stévia sont majoritairement de la famille des Hyménoptères (Apidae) et des Diptères (Syrphidae) (Martini *et al.*, 2017a; Benelli *et al.*, 2017). La fréquence des visites des pollinisateurs dépend de la variabilité des composés volatiles émis par les fleurs des plants de stévia. Il y a une augmentation de visites sur les génotypes produisant plus de limonène (diterpène) et une diminution sur les génotypes produisant du δ -élémène (sesquiterpène) et du bicyclogermacrène (sesquiterpène) (Benelli *et al.*, 2017).

Après la pollinisation, deux types de graines vont être produits : des akènes clairs, issus d'autofécondation et donc vides d'embryon, et des akènes foncés issus de fécondation croisée et qui pourront germer (Goettemoeller and Ching, 1999 ; Raina *et al.*, 2013). Le taux de germination peut être impacté par de nombreux facteurs : les conditions climatiques de floraison et de formation des graines (Yadav *et al.*, 2011), la date de récolte, avec une diminution significative du pourcentage de germination lors des récoltes tardives (Martini *et al.*, 2017a), ou encore les conditions de germination, bien meilleures dans des conditions de températures entre 20 et 25°C (Uçar *et al.*, 2016).

Chapitre 2. Les édulcorants et leur marché

2.1. Les différentes familles d'édulcorants

La production agricole mondiale de sucre est issue principalement de deux cultures : la betterave sucrière et la canne à sucre. Ces deux cultures produisent 176 millions de tonnes de sucre, saccharose, pour la période 2015-2016 (Eggleston *et al.*, 2017). Parmi les principaux producteurs, le Brésil représente 23% de la production mondiale en 2016, l'Inde 13% et l'Union Européenne 9% (Foreign Agricultural Service/ USDA, 2017). Depuis quelques années la production de sucre est stable mais le marché du sucre est en augmentation, avec une consommation accrue de produits sucrés dans les pays en voie de développement (Popkin *et al.*, 2012), en particulier en Amérique du Sud (Eggleston *et al.*, 2017). Ces pays adoptent un mode d'alimentation basé sur le modèle des pays occidentaux, ce qui entraîne une forte augmentation de produits ultra-transformés et de produits sucrés dans leur régime alimentaire (Zobel *et al.*, 2016).

Cette forte progression de la part du sucre dans le régime alimentaire de nombreux pays favorise l'augmentation de l'obésité ou du diabète de type 2 dans le monde (Zobel *et al.*, 2016 ; Freeman *et al.*, 2018). Le régime alimentaire est un facteur clé dans la prévalence de ces maladies (Hall, 2018) mais il est associé à d'autres facteurs comme la sédentarité, des troubles psychologiques, des troubles hormonaux ou des facteurs génétiques (Pozza and Isidori, 2018). La proportion de l'obésité dans le monde est aujourd'hui qualifiée d'épidémique (Reilly *et al.*, 2018) et représente un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays. Emery *et al.* (2007) ont estimé les dépenses de santé liées à l'obésité en France à 2,6 milliards d'euros. Au niveau mondial, le coût de l'obésité est estimé à 2,8% du PIB mondial (Dobbs *et al.*, 2014).

Le rejet des produits très sucrés par les consommateurs a poussé l'industrie agro-alimentaire à développer des alternatives au sucre : ce sont les molécules édulcorantes. Les édulcorants sont définis comme des molécules naturelles ou synthétiques ayant un pouvoir sucrant plus intense que le saccharose lors de la consommation en stimulant des récepteurs de la langue (Hutteau and Mathlouthi, 1998) et en apportant peu ou pas de calories. Ces édulcorants se divisent en deux catégories, les édulcorants de charge, et les édulcorants intenses. Les premiers ont un pouvoir sucrant variant entre 0,5 et 1,3 fois celui du saccharose, les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire sont le sorbitol, le mannitol et le maltitol (Tappy, 2018).

Les édulcorants dits intenses, dont le pouvoir sucrant est jusqu'à 500 fois plus intense que celui du saccharose, se divisent entre les édulcorants synthétiques, comme l'aspartame, le sucralose, la saccharine, l'advantame, le neotame (Tandel, 2011) (Figure 2.1) et les édulcorants naturels comme les glycosides de stéviol, issus de la stévia, ou le mogroside, provenant du « Monk fruit » (Sylvetsky and Rother, 2016). Ces dernières années, les édulcorants intenses ont été de plus en plus utilisés dans la préparation des produits transformés (Sylvetsky and Rother, 2016).

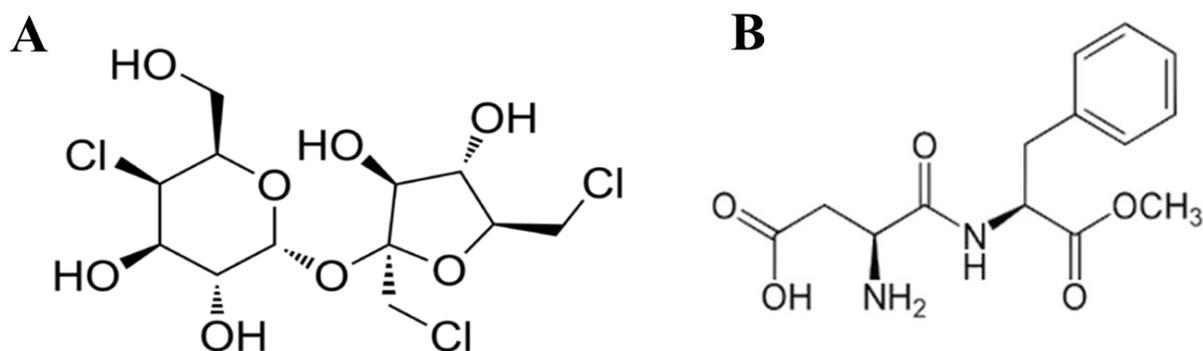


Figure 2.1 : Formule chimique du sucralose (A) et de l'aspartame (B).

2.2. Marché et consommation des édulcorants intenses

L'utilisation du premier édulcorant intense remonte aux années 1800 avec la découverte de la saccharine utilisée à des fins médicales pour les diabétiques. La commercialisation des édulcorants débute après la Seconde guerre mondiale avec la saccharine, et leur usage s'est largement démocratisé à partir des années 1980 avec l'autorisation de mise sur le marché de produits contenant de l'aspartame en 1981 et du sucralose en 1999 (Schiffman and Rother, 2013). Dans le même temps, un fort marketing sur ces produits ainsi que la popularisation de régimes à base de produits allégés ont grandement favorisé l'utilisation quotidienne des édulcorants intenses (Peña, 2010). Au début de leur commercialisation, ces édulcorants se retrouvaient majoritairement dans les boissons gazeuses. A présent, ils se retrouvent dans les produits laitiers, comme les yaourts « light » ou encore les céréales pour enfants (Sylvetsky and Rother, 2016). Dans les nouvelles formulations de produits transformés, l'ajout d'édulcorants est devenu la norme, avec 75% en contenant entre 2005 et 2009, que ce soit des édulcorants de charge ou intenses, ou les deux (Ng *et al.*, 2012).

Au niveau mondial, le marché des édulcorants intenses a un taux de croissance annuel moyen de 5,1% entre 2008 et 2015. Fin 2020, il devrait atteindre 2,2 milliards de dollars (Sylvetsky and

Rother, 2016). Les consommateurs rejettent l'aspartame, suspecté de favoriser des problèmes de santé comme des dégénérescences des tissus des glandes salivaires ou le développement de certaines tumeurs (Zafar, 2017; Naik *et al.*, 2018), et se tournent vers des produits naturels, qu'ils perçoivent comme meilleurs pour leur santé. Dans ce contexte, la part des glycosides de stéviol (SG) est en augmentation sur le marché des édulcorants.

2.3. Historique et évolution de l'utilisation de *S. rebaudiana*

Les Indiens Guarani utilisent de façon traditionnelle les feuilles de stévia pour sucrer le maté, depuis plus de 1500 ans (Brandle, Starratt, *et al.*, 1998). Après l'identification scientifique des propriétés sucrantes de la stévia, son utilisation commerciale a commencé au Japon dans les années 1970 (Sumida, 1980). Par la suite, l'attrait pour les édulcorants naturels des pays occidentaux a favorisé le développement des SG et de la stévia. Aujourd'hui, l'Asie est la principale zone de consommation de SG, suivie de l'Amérique du Nord (Mordor Intelligence, 2019).



Figure 2.3 : Produits utilisant de la poudre de stévia ou des glycosides de stéviol lancés sur le marché ces cinq dernières années (crédit photo : CocaCola, PepsiCo, Danone, PurVia, Oviatis, PureCircle, Zevia).

Le nombre de produits sucrés avec des extraits de stévia est en forte augmentation avec plus de 14 000 produits alimentaires lancés sur le marché mondial entre 2011 et 2016 (Mintel Global New Products Database, 2017). Aujourd'hui, on retrouve principalement les glycosides de

stéviol dans des boissons de type soda, mais également dans des produits de boulangerie (Esaulko *et al.*, 2019), des produits laitiers ou encore comme édulcorants de table (Market Research Firm, 2017) (Figure 2.3).

2.4. Evolution de la législation autour des SG et de la stévia

L'évolution récente de la législation a favorisé le développement des glycosides de stéviol comme édulcorants. Au Japon, leur utilisation est autorisée après l'interdiction de la saccharine dans les années 1970 (Carakostas *et al.*, 2008). En 2009, la FDA (Food and Drug Administration) américaine approuve l'utilisation de ces édulcorants comme additifs alimentaires. La France a d'abord réglementé l'utilisation du Rebaudioside A (un glycoside de stéviol accumulé dans les feuilles de stévia) en 2009 qui devait être d'une pureté de 97% (AFSSA, 2009), puis l'EFSA (European Food Safety Authority) a approuvé l'utilisation des SG en 2011 dans le Règlement (UE) n°1131/2011 de la commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du Règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement européen *portant sur les glycosides de stéviol*. Dans l'Union Européenne, les SG sont considérés comme des additifs alimentaires : soit une « substance habituellement non consommée comme aliment en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation » définis dans le Règlement (CE) n°1333/2008. Ils doivent être signalés sous le code E960, être d'une pureté de 95% et leur dose journalière a été fixée à 4mg/kg mc/j (Règlement (UE) N°1131/2011). La commercialisation de plante à des fins alimentaires en Europe relève du Règlement (CE) n°258/97, *relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires*, et la stévia y était considérée comme « Novel Food ». Cependant, depuis 2017 l'Union Européenne a retiré la stévia de la législation des « Novel Food » et l'utilisation des feuilles de stévia est désormais régulée par la législation appliquée pour les infusions (IFOAM EU, 2017).

Chapitre 3. Les glycosides de stéviol (SG) : responsables du pouvoir édulcorant de la stévia

Les glycosides de stéviol sont des métabolites secondaires issus de la voie de synthèse du 2C-méthyl-D-erythritol (MEP). Ils sont principalement produits dans les feuilles, à des concentrations autour de 12 %w/w mais pouvant aller jusqu'à 25%w/w. Dans les feuilles, une part importante du flux de carbone est allouée à la biosynthèse des glycosides de stéviol via cette voie du MEP (Petit, 2019).

3.1. Structure et diversité de ces composés

3.1.1. Structure chimique des composés

Les glycosides de stéviol (SG), responsables du goût sucré de la stévia, sont des diterpènes (C₂₀) ent-kaurène tétracycliques organisés sur une structure aglycone : un noyau de stéviol (SV). La source de variabilité des SG réside dans le nombre et la nature des résidus osidiques qui seront liés à la structure aglycone, au niveau du R1 par une liaison osidique, au niveau du R2 par une liaison ester (Figure 3.1.1.a) (Ceunen and Geuns, 2013e). Les résidus osidiques sont principalement du β -glucose, α -rhamnose, β -xylose et β -fructose (Barbet-Massin, 2015).

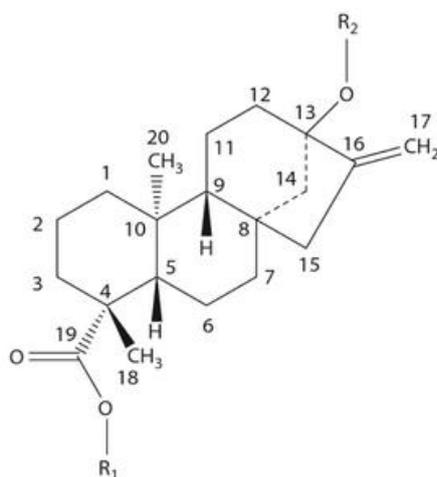


Figure 3.1.1.a : Structure aglycone des glycosides de stéviol : noyau de stéviol (SV), avec les localisations des liaisons des radicaux R1 et R2 (O'Brien-Nabors, 2016).

3.1.2. Diversité des composés

Le premier SG identifié est le stéviolside (ST) (Bridel and Lavieille, 1931), c'est le glycoside de stéviol majoritairement accumulé chez *S. rebaudiana* (Ceunen and Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Par la suite, d'autres SG accumulés en quantité significative ont été identifiés :

les rebaudiosides A et B (RebA, RebB) (Kohda *et al.*, 1976), le rebaudioside C (RebC) (Sakamoto *et al.*, 1977a), le rebaudioside D et E (RebD, RebE) (Sakamoto *et al.*, 1977b), le rebaudioside F (RebF) (Starratt *et al.*, 2002), le dulcoside A et B (DulA, DulB) (Kobayashi *et al.*, 1977) et le steviolbioside (SB) (Kohda *et al.*, 1976), le rebaudioside M et le rubusoside (Ohta *et al.*, 2010). Aujourd’hui, plus de 46 SGs ont été identifiés comme présents chez *S. rebaudiana* (Chaturvedula *et al.*, 2011; Ceunen and Geuns, 2013e; Prakash *et al.*, 2014; Prakash and Chaturvedula, 2014; Ibrahim *et al.*, 2016; Chaturvedula and Meneni, 2017; Mao *et al.*, 2017; Perera *et al.*, 2017, 2019). Les 10 SG majoritairement accumulés dans la stévia sont présentés dans le tableau 3.1.2. En plus du ST, le RebA est également fortement accumulé dans la stévia (Ceunen and Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015).

Table 3.1.2: Tableau de synthèse des 10 principaux glycosides de steviol identifiés chez *Stevia rebaudiana* (adapté de Hastoy, 2018)

Nom	R1	R2	Teneurs (%w/w)	Pouvoir sucrant	Perception par l’homme	Références
Stevioside	β -Glc	β -Glc β -Glc (2-1)	5-10	250-300	Amer	Bridel and Lavieille, 1931
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	2-5	250-400	Sucré	Kohda <i>et al.</i> , 1976
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1) β -Glc(3-1)	1	50-120	Amer	Sakamoto <i>et al.</i> , 1977
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2-1)	0,5	50-120	Amer	Kobayashi <i>et al.</i> , 1977
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	0,2	300-350	Sucré	Kohda <i>et al.</i> , 1976
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2-1) β -Glc(3-1)	0,2		Non connue	Starratt <i>et al.</i> , 2002
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc (2-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	0,2	250-400	Sucré	Sakamoto <i>et al.</i> , 1977
Steviolbioside	H	β -Glc β -Glc (2-1)	0,1	100-125	Amer	Kohda <i>et al.</i> , 1976
Rubusoside	β -Glc	β -Glc			Amer	Ohta <i>et al.</i> 2010
Rebaudioside M	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)	β -Glc- β -Glc(2-1) β -Glc(3-1)		200-350	Sucré	Ohta <i>et al.</i> 2010

3.1.3. Présence de SG chez d'autres plantes que *Stevia rebaudiana*

Les SG sont accumulés par d'autres espèces végétales. Dans le genre *Stevia*, 18 espèces donnent une saveur sucrée (Soejarto *et al.*, 1983), mais seule *Stevia phlebophylla* a une propriété sucrante aussi importante à celle de *S. rebaudiana*. Cependant *S. phlebophylla* semble avoir disparu aujourd'hui (Soejarto *et al.*, 1983 ; Ceunen *et al.*, 2016). Dans d'autres genres, certaines espèces ont la capacité d'accumuler des SG : les Rosaceae *Rubus suavissimus* et *Rubus chingii* accumulent majoritairement du Rubusoside (Tanaka *et al.*, 1981 ; Ohtani *et al.*, 1992) ainsi que d'autres SG très minoritairement. Enfin une Apiaceae *Angelica keiskei* présente, elle aussi, des traces de rubusoside (Zhou *et al.*, 2012). Les concentrations accumulées dans ces espèces sont très faibles par rapport à celles accumulées chez *Stevia rebaudiana* et ne présentent pas d'intérêt agricole pour la production de SG.

3.1.4. Production synthétique des SG

La recherche sur la production de SG de synthèse a pris de plus en plus d'ampleur ces dernières années. L'objectif de ces recherches est la synthèse de SG, en particulier ceux d'intérêt gustatif comme le RebA, le RedD et le RebM, par un protocole de fermentation du saccharose et du dextrose par des levures génétiquement modifiées (PureCircle *et al.*, 2016 ; Cargill, 2018). Ces levures expriment des gènes de la voie métabolique des SG leur permettant de réaliser cette transformation. Deux entreprises ont particulièrement travaillé sur cette innovation ces dernières années : Evolva (Suisse) et Cargill (Etats-Unis) et sont aujourd'hui les principaux fournisseurs de RebM et RebD synthétiques à PepsiCo et CocaCola (Meienberg *et al.*, 2015). D'autres entreprises se font également une place sur ce marché encore restreint : l'américain Stevia First et le néerlandais DSM. La production de SG synthétiques est directement en compétition avec la production agricole de stévia, c'est pour pourquoi le gouvernement du Paraguay recherche une méthode d'analyse permettant de distinguer les deux types de SG, naturels et synthétiques, afin d'informer les consommateurs de la nature des SG dans les produits consommés (Meienberg *et al.*, 2015).

3.2. Voie de synthèse des SG

3.2.1. Etapes de la voie de biosynthèse des SG et leurs localisations

La voie de synthèse des SG est en partie identique à celle des gibbéréllines (GB) (Brandle and Telmer, 2007). En effet, ces deux voies partagent la formation du précurseur géranylgeranyl diphosphate (GGPP), issu de la voie du 2C-méthyl-D-erythritol (MEP). Le GGPP va ensuite être cyclisé deux fois avant d'être oxydé, formant l'acide ent-kaurénoïque, dernière molécule commune entre la voie des SG et des GB. Enfin, les uridine-diphosphate glycosyltransférases (UGT), enzymes spécifiques de la voie des SG, vont glycosyler des résidus osidiques sur le noyau de stéviol formant les divers SG. Les SG seront finalement stockés dans la vacuole.

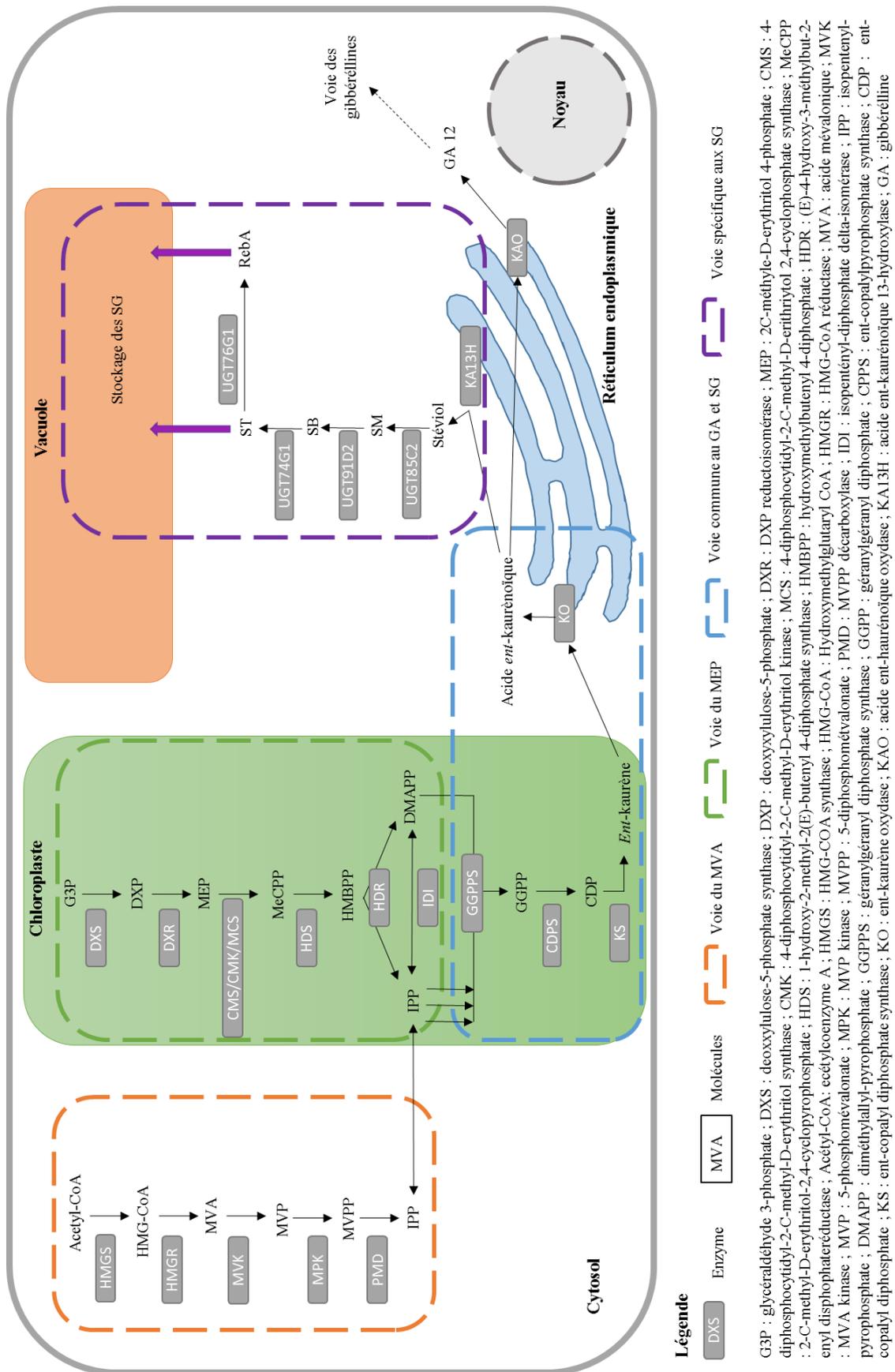


Figure 3.2.1.a : Etapes de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol et leurs localisations dans la cellule végétale (d'après Hastoy, 2018 ; Petit, 2019 ; Brandle and Telmer, 2007)

3.2.1.1. *La voie de synthèse du MEP permettant la synthèse des précurseurs du GGPP*

La voie de synthèse 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) est impliquée dans la synthèse des SG (Totté *et al.*, 2000, 2003). Cette voie du MEP a lieu dans les plastes (chloroplastes) et sert à la synthèse de mono, di, tétra et sesquiterpènes (Tholl, 2015). La première étape de cette voie est la conversion du glycéraldéhyde 3-phosphate G3P en deoxyxylulose-5-phosphate (DXP) par l'enzyme DXP synthase (DXS) (Figure 3.2.1.a), qui sera ensuite réduite et réarrangée par DXP reductoisomérase (DXR) pour former le MEP (Brandle and Telmer, 2007). L'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) sont les deux molécules résultant de la voie du MEP, mais l'IPP peut également être synthétisé par la voie du mévalonate cytoplasmique (MVA). Cette deuxième voie est impliquée dans la synthèse des sesquiterpènes (Wu *et al.*, 2006).

3.2.1.2. *La voie commune aux SG et gibbérélines*

L'IPP et le DMAPP vont subir trois condensations successives réalisées par le GGDP synthase (GGDPS) pour former le géranylgeranyl diphosphate (GGDP) (Figure 3.2.1.a). Une cyclisation va être opérée sur le GGDP par l'enzyme ent-copalyl diphosphate synthase (CDPS) pour former l'ent-copalyl diphosphate (CDP). Une seconde cyclisation ionisation-dépendante est ensuite réalisée sur le CDP par l'ent-kaurène synthase (KS), libérant le kaurène (Brandle and Telmer, 2007). Ces enzymes ont été identifiées sur stévia (Richman *et al.*, 1999). Le kaurène est ensuite transféré dans le cytosol où il sera oxydé en acide kaurénoïque dans une réaction catalysée par la kaurène oxydase (KO). Cette enzyme est une cytochrome p450 localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 3.2.1.a). C'est la dernière étape commune des voies de synthèse des SG et des gibbérélines. Par la suite, l'acide kaurénoïque est catalysé en GB₁₂ par la KAO, ce qui correspond à la suite de la voie de biosynthèse des gibbérélines. Il peut également être hydroxylé en position 13 par l'acide ent-kaurénoïque 13-hydroxylase (KA13H) pour former le stéviol, correspondant au début de la voie de synthèse des SG.

3.2.1.3. *La voie spécifique aux SG*

Le stéviol est la base de la structure chimique des SG. Les étapes de synthèse des SG sont catalysées par des uridine-diphosphate glycosyltransférases (UGT), qui vont greffer sur le noyau de stéviol un résidu osidique, la plupart du temps à partir de l'UDP-glucose. Les UGT réalisent une glycosylation sur des molécules très variées et souvent à la fin des voies des métabolites secondaires (Gachon *et al.*, 2005). Chez stévia, les enzymes impliquées dans la voie des SG ne sont pas encore toutes identifiées. Brandle *et al.*, (1999) avait identifié que RebA et RebC étaient synthétisés par la même enzyme. Par la suite, une librairie d'EST de feuilles de

stévia a permis l'identification de 45 UGT candidates (Brandle *et al.*, 2002). Parmi ces candidats, l'activité de trois enzymes, l'UGT85C2, l'UGT74G1 et l'UGT76G1 a pu être identifiée (Richman *et al.*, 2005). Kishore *et al.*, (2013) ont identifié l'UGT91D2. Enfin, Li *et al.*, (2018) ont identifié l'UGT73E1 et l'UGT76G3. La ou les réactions pouvant être catalysées par ces UGT ne sont pas toutes connues et les études réalisées sur ces enzymes permettent d'améliorer les connaissances sur la voie de biosynthèse des SG, comme présenté dans le tableau 3.2.1.3.

Des études de corrélation entre les proportions relatives des SG ont cependant permis de construire la voie de biosynthèse la plus probable (Figure 3.2.1.b). La partie de la biosynthèse la mieux caractérisée est celle produisant le RebA, SG le plus accumulé après le ST. L'UGT85C2 catalyse la glycosylation du stéviol en C13 pour former le stéviolmonoside (Brandle *et al.*, 2002). L'UGT91D2 catalyse la réaction entre le stéviolmonoside et le stéviolbioside (Kishore *et al.*, 2013). Les UGT74G1 et UGT73E1 ont une action de glycosylation du C19, et interviennent dans la conversion du stéviolbioside en stévioside (Li *et al.*, 2018 ; Brandle *et al.*, 2002). Enfin l'UGT76G1 transforme le stévioside en rebaudioside A (Brandle *et al.*, 2002).

Les SG sont stockés dans la vacuole (Brandle and Telmer, 2007). Le stéviol est transformé directement dans le cytosol par les UGTs qui sont localisées dans le cytosol (Humphrey *et al.*, 2006). La fin de voie de la biosynthèse des SG est donc entièrement réalisée dans le cytosol. Les UGTs n'étant pas liées à la vacuole, il y aurait un mécanisme de transport des SG dans la vacuole (Humphrey *et al.*, 2006), où les SG sont stockés (Figure 3.2.1.a). Le mécanisme de transfert des SG dans la vacuole n'est cependant pas été clairement identifié (Brandle and Telmer, 2007).

Tableau 3.2.1.3 : Présentation des UGTs connues chez *S. rebaudiana*, des réactions qu'elles catalysent et leur place dans la voie de synthèse des SG, les flèches en pointillés symbolisent les réactions qui sont supposées.

Nom	Réaction	Donneur de sucre	Intervention dans la voie des SG	Références
UGT85C2	Liaison β -1 noyau de stéviol en C ₁₃	UDP-glucose	<ul style="list-style-type: none"> • Stéviol \rightarrow stéviolmonoside • Steviol-19-O-glucoside - - \blacktriangleright Rubudioside 	Brandle <i>et al.</i> , 2002 Richman <i>et al.</i> , 2005
UGT76G1	Liaison β -1,3	UDP-glucose	<ul style="list-style-type: none"> • ST \rightarrow RebA • SB - - \blacktriangleright RebB • DulA - - \blacktriangleright RebC • Inconnu - - \blacktriangleright RebF 	Brandle <i>et al.</i> , 2002 Kim <i>et al.</i> , 2019 Richman <i>et al.</i> , 2005
UGT74G1	Liaison β -1 sur le noyau de stéviol en C ₁₉	UDP-glucose	<ul style="list-style-type: none"> • Stéviol - - \blacktriangleright Stéviol-19-O-glucoside • SM - - \blacktriangleright Rubudioside 	Brandle <i>et al.</i> , 2002 Richman <i>et al.</i> , 2005 Guleria et Yadav, 2015
UGT91D2	Liaison α -1,2 ou β -1,2	UDP-glucose	<ul style="list-style-type: none"> • SM \rightarrow SB • Rub - - \blacktriangleright ST 	Kishore <i>et al.</i> , 2013
UGT73E1	Liaison β -1 sur le noyau de stéviol en C ₁₉	UDP-glucose	<ul style="list-style-type: none"> • Mêmes réactions que l'UGT74G1 	Li <i>et al.</i> , 2018
UGT76G3	Non identifiée	UDP-glucose	Non connue	Li <i>et al.</i> , 2018

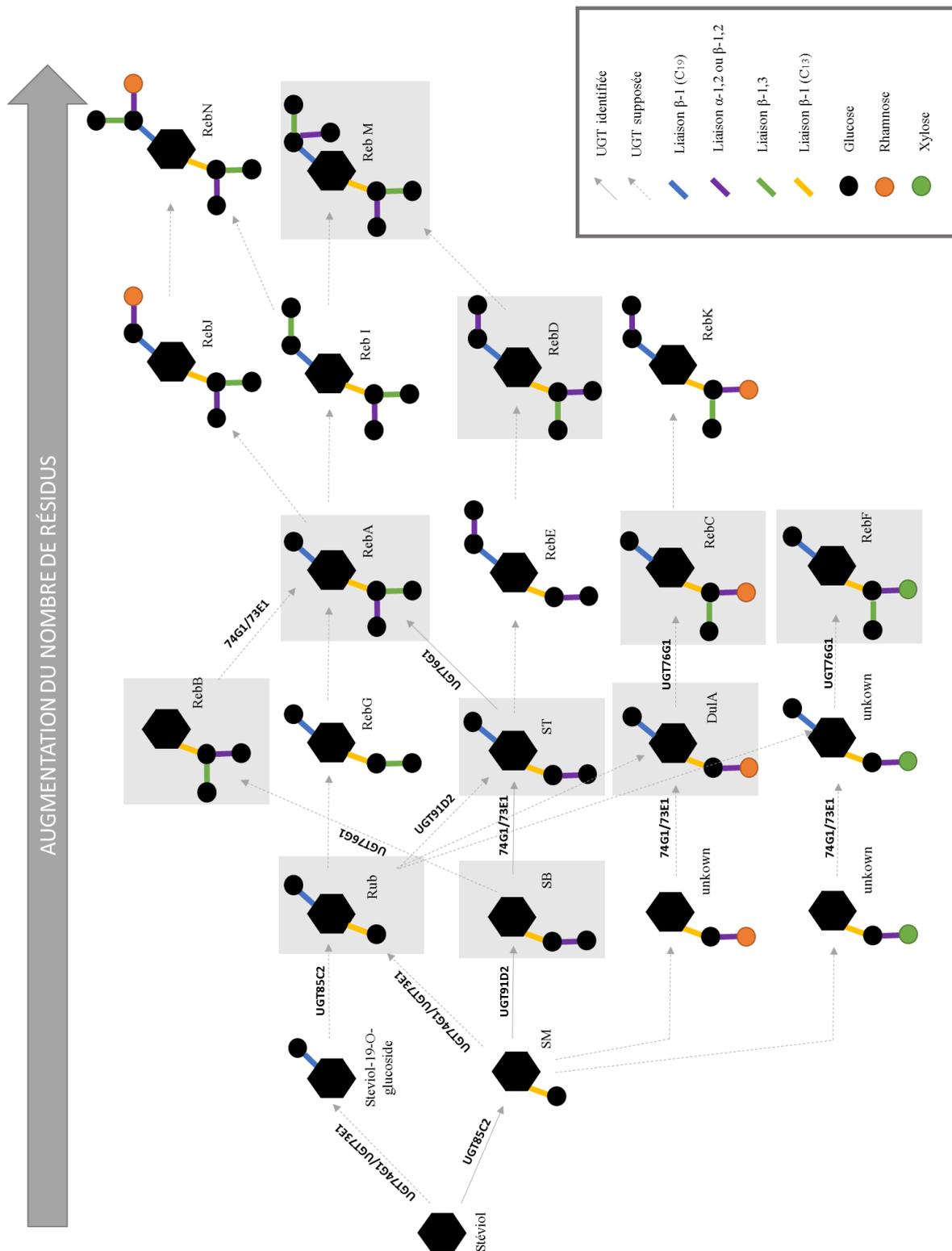


Figure 3.2.1.b : Représentation des principaux SG produits par *Stevia rebaudiana*, avec leurs résidus osidiques et les UGTs impliquées dans leur synthèse (d'après Petit, 2019). Les SG sur fonds grisés sont ceux qui seront étudiés dans la partie expérimentale de cette thèse.

3.2.2. Régulation génétique de la voie de biosynthèse des SG

L'étude de la régulation génétique des différents gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse des SG a été réalisée par des analyses de ségrégation des caractères, l'étude du transcriptome de stévia mais aussi l'analyse de la sur-expression ou du silencing de certains gènes de cette voie chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Les premières analyses de ségrégation des caractères, dans une descendance de type F2 issue de deux croisements entre deux groupes de géniteurs au profil en SG divergents, ont mis en évidence que la synthèse de RebA était contrôlée par un gène unique (Brandle *et al.*, 1999), qui code pour l'enzyme UGT76G1. Une surexpression du gène codant pour l'UGT76G1 chez des plants de stévia permet une amélioration du ratio RebA/ST, ainsi qu'une amélioration du ratio RebC/DulA, sans provoquer de conséquence sur le phénotype visuel des individus (Kim *et al.*, 2019). Pour les auteurs, la surexpression de l'UGT76G1 serait un moyen efficace de produire des variétés plus productives en RebA. A ce jour, ces plants n'ont pas été testés en production. Ce résultat est cohérent avec le positionnement de l'UGT76G1 dans la voie de biosynthèse des SG (Figure 3.2.1.b).

Chez *Arabidopsis thaliana*, une surexpression de *SrKA13H*, gène impliqué dans la première étape de la voie spécifique des SG, permet la production de stéviol chez des plants qui n'en produisaient pas. Cette surexpression entraîne une diminution des teneurs en gibbéréline (GB), supposant une redirection d'une partie du flux métabolique dédié aux GB vers la voie des SG (Guleria *et al.*, 2015). Guleria *et al.*, (2014) ont montré qu'une surexpression du gène codant pour l'UGT85C2 chez *A. thaliana* provoque une diminution de la production de biomasse, ainsi que de la teneur en gibbérélines, en chlorophylles et en SG. Chez ces mêmes individus, des gènes de la voie du MEP, codant pour les enzymes GGDPS, CDPS et KAO, sont significativement moins exprimés. Les auteurs supposent que l'UGT85C2 aurait un rôle de régulation sur les voies de biosynthèse des SG, gibbérélines et chlorophylles.

Un silencing de ces deux gènes chez *S. rebaudiana*, *SrKA13H* et *SrUGT85C2*, entraîne un blocage du flux métabolique vers la voie des SG qui est réorienté vers la voie des GB (Guleria and Yadav, 2013). Ces deux gènes sont identifiés comme gènes régulateurs du flux de carbone entre voie des SG et voie des GB. L'étude de la voie commune entre les SG et les GB a permis d'identifier une séparation temporelle et spatiale de ces deux voies de biosynthèses (Richman *et al.*, 1999).

Kumar *et al.*, (2012) ont étudié l'expression de 15 gènes de la voie de synthèse des SG dans différents tissus de *S. rebaudiana* pendant le développement végétatif. L'expression de ces

gènes est moindre dans les racines et les tiges par rapport aux feuilles, ces dernières étant les organes accumulant le plus de SG. Il identifie également l'importance des gènes *SrDXR* (voie du MEP) et *SrKO* dans la régulation de l'accumulation des SG, l'expression de *SrKO* étant positivement corrélée à la teneur en SG mesurée dans les feuilles. Ces résultats confirment les conclusions de Humphrey *et al.*, (2006), concernant le rôle majeur de KO dans la biosynthèse du stéviol. Enfin, Kumar *et al.*, (2012) observent une diminution de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des SG entre les feuilles en développement et les feuilles plus vieilles, ce qui expliquerait d'après les auteurs la diminution de la teneur en SG mesurée dans les feuilles les plus vieilles.

L'étude de l'influence de l'environnement sur l'expression de 15 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse a montré qu'une température de 25°C permettait une transcription maximale de ces différents gènes (Yang *et al.*, 2015). Une "down" régulation est observée en condition de stress thermique, 15°C ou 35°C, ainsi qu'en condition de déshydratation. En revanche, aucune variation de transcription n'a été observée sous différentes conditions de photopériode, les auteurs précisent que les plantes n'ont été soumises à ces photopériodes que pendant 5 jours, période peut-être trop courte pour que la photopériode influe la transcription.

Enfin, des études ont mesuré la transcription de ces gènes à différents stades phénologiques. Singh *et al.*, (2017) ont identifié que *DXS* présente une expression plus importante au stade végétatif que lors des stades reproductifs (bourgeons floraux et floraison). Les gènes spécifiques de la voie des SG : *KAI3H*, *UGT85C2*, *UGT74G1* et *UGT76G1* présentent le même schéma. Les auteurs y voient une explication de la diminution de la teneur des SG au moment du passage aux stades reproductifs. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats de Guleria *et al.*, (2014) qui montrent qu'une surexpression du gène codant pour l'*UGT85C2* entraîne justement une diminution de l'accumulation en SG.

Dans une autre étude de la transcription des gènes de la voie de biosynthèse, des résultats très différents sont observés par Yang *et al.*, (2015). Les auteurs ont observé que le stade d'apparition des bourgeons floraux est marqué par la transcription maximale des gènes *DXS*, *DXR*, *GGDPS* et *UGT74G1*. Lors de la floraison la transcription des gènes *KO*, *CMK* et *UGT85C2* augmente par rapport à leur niveau au stade bourgeons floraux. Enfin *UGT76G12* ne présente des changements de transcription que lors de ces stades phénologiques.

Le peu d'études portant sur ces questions ne permet pas d'avoir une vision claire et précise sur la transcription des gènes de biosynthèse des SG à différents stades phénologiques.

3.3. Facteurs de variabilité de l'accumulation des SG chez *Stevia rebaudiana*

La caractérisation de l'accumulation des SG dans un plant de stévia peut se faire *via* deux indicateurs. Le premier est la teneur en SG accumulés dans la plante, c'est un indicateur quantitatif qui exprime le pourcentage de SG présent par rapport à la matière sèche, noté %w/w. Le deuxième est le profil en SG de la plante. Il est caractérisé qualitativement, par la présence ou l'absence des différents SG identifiés dans la plante, et quantitativement, par la proportion relative de chaque SG par rapport à l'ensemble des SG produits par la plante.

3.3.1. Selon les organes

Si tous les organes de la stévia contiennent des SG, ils ne présentent pas ces SG dans des proportions identiques. Le dosage des SG dans les différents tissus de la stévia cultivée *in vitro* a mis en évidence que les feuilles étaient les organes accumulant le plus de SG, suivies des fleurs, des tiges, des graines et enfin des racines (Bondarev *et al.*, 2003). Une autre étude a identifié un autre ordre des organes accumulant le plus de SG avec les feuilles suivies des jeunes pousses, des racines et enfin des fleurs (Rajasekaran *et al.*, 2007). Ces résultats ont été précisés par des études sur plants de stévia cultivés en serre. Ceunen and Geuns, (2013a) ont observé que ce sont les racines qui contiennent le moins de SG, teneur allant de 0.1 à 0.25% w/w. De même, les tiges accumulent peu de SG, et présentent une teneur faible à la base du plant, 0,5 %w/w qui augmente jusqu'à l'apex à 1,5%w/w. Les structures florales présentent des teneurs variables, très faibles pour les akènes, les pistils et les pétales, allant de 0,2 à 0,7%w/w mais plus importantes pour l'involucre, comprises entre 5 et 7%w/w (Ceunen and Geuns, 2013a).

Les feuilles concentrent le plus de SG, principalement stockés dans la vacuole (Chen *et al.*, 1983; Brandle and Telmer, 2007). La teneur moyenne des SG dans les feuilles est de 10 à 12% w/w (Angelini *et al.*, 2018), elle serait cependant plus faible chez les feuilles les plus âgées et proche de la senescence et augmenterait jusqu'aux feuilles proches de l'apex (Bondarev *et al.*, 2003 ; Ceunen and Geuns, 2013a ; Barbet-Massin, 2015). Une autre étude portée par Barbet-Massin, (2015) n'observe pas de variabilité du profil en SG entre les différents étages foliaires, avec une stabilité des SG testés.

3.3.2. Selon la période du cycle de développement

La concentration en SG des organes végétaux est variable selon la période du cycle de développement de la culture, l'âge de la plante, et les conditions de production dans lesquelles sont cultivés les plants de stévia.

La teneur des SG dans les organes végétaux aériens, feuilles et tiges, augmente pendant la croissance végétative (Ceunen and Geuns, 2013a). La teneur en SG des feuilles augmente rapidement lors des premiers stades de développement puis se stabilise (Barbet-Massin, 2015). Au contraire, la teneur de SG diminue dans les racines pendant la croissance végétative (Ceunen and Geuns, 2013a). La teneur des SG dans le plant augmente pendant le développement végétatif et atteint un maximum lors du stade des bourgeons floraux à initiation de la floraison (Ceunen and Geuns, 2013a ; Barbet-Massin, 2015). Pendant la floraison, la teneur des SG décroît jusqu'à 50% (Barbet-Massin, 2015). Ceunen & Geuns, (2013a) identifient une légère diminution suivie d'une stagnation de la teneur. Ils émettent plusieurs hypothèses pour expliquer la diminution de la teneur de SG après le début de la floraison : l'augmentation de feuilles en sénescence, la diminution de la production de biomasse foliaire au profit des organes de reproduction, et le transport des SG dans les organes reproducteurs (Ceunen and Geuns, 2013a). Cependant, ces connaissances ont principalement été développées sur des plants en première année de production cultivés en serre. Une étude menée en condition de culture au champ, sur cinq génotypes d'origine variée et en deuxième année de production, démontre que la teneur en SG augmente en début de phase végétative, puis se stabilise pendant le reste du développement végétatif. Dès l'initiation de la floraison, la teneur en SG diminue (Hastoy, 2018) (Figure 3.3.2).

De plus, Hastoy, (2018) observe une stabilité du profil en SG entre les stades précoces du développement et la date de récolte, ce résultat avait déjà été observé dans des études précédentes (Nakamura and Tamura, 1985 ; Barbet-Massin *et al.*, 2016), c'est-à-dire que le type de SG produit au cours de la croissance ne change pas, et leur proportion relative non plus.

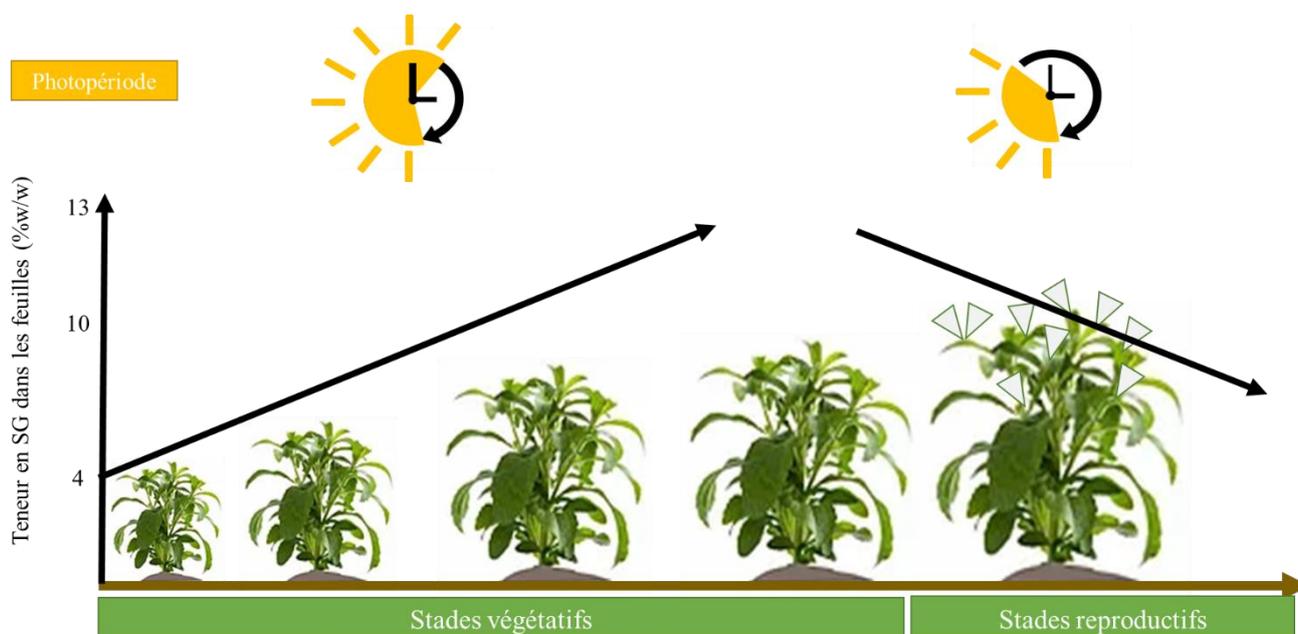


Figure 3.3.2 : Synthèse de l'évolution de la teneur en SG dans les feuilles pendant le cycle de développement de *S. rebaudiana* (d'après Ceunen and Geuns, 2013a ; Barbet-Massin, 2015 ; Hastoy, 2018).

3.3.3. Selon les ressources génétiques utilisées en production et leurs conditions de production

Chez stévia, la teneur en SG mesurée à la récolte présente une grande variabilité. Celle-ci dépend du génotype étudié, de son environnement de production, et de l'interaction génotype x environnement. Des collections de ressources génétiques ont été testées dans des conditions de cultures tempérées. En Italie, 25 génotypes provenant du Sud du Brésil et du Paraguay présentent des teneurs variant entre 9 et 27 %w/w, les concentrations élevées sont liées à la forte teneur en SG (Montoro *et al.*, 2013). En Bulgarie, Denev *et al.*, (2017) ont testé 24 génotypes (dont l'origine n'est pas précisée), et obtiennent une gamme de teneurs en SG comprise entre 9 %w/w et 22 %w/w, proche de l'étude précédente. En Allemagne, la teneur en SG mesurée sur 2 génotypes, provenant d'une entreprise israélienne Hishtil Ltd., varie entre 9.12 et 12.85 %w/w (Munz *et al.*, 2018). Cette faible variation semble être liée au nombre de génotypes testés. Des teneurs plus basses sont mesurées par Barbet-Massin *et al.*, (2016), entre 4.5 et 12.3 %w/w pour une population de 96 génotypes de type « Criola ». De la même manière, l'étude de Hastoy, Cosson, *et al.*, (2019) présente des teneurs comprises entre 4.5 et 18.4 %w/w au sein d'une collection de 15 ressources génétiques d'origine mondiales. Enfin aux Etats-Unis, 6 cultivars de S&W Seed Company cultivés dans quatre sites produisent des teneurs variant de 8.27 à 14.22 %w/w (Parris *et al.*, 2016). Pour un même génotype, la teneur en SG produite est

peu variable selon le site de culture (Parris *et al.*, 2016 ; Libik-Konieczny *et al.*, 2018 ; Hastoy, 2018).

Un effet de la photopériode a été observé sur l'accumulation en SG chez *S. rebaudiana* (Metivier and Viana, 1979). Une photopériode « longue », 16h d'ensoleillement, a pour effet d'augmenter par quatre le taux de stéviolside dans la plante, par rapport à une photopériode courte, 8h d'ensoleillement. La qualité de la lumière reçue par la plante impacte également la production de SG, on observe une augmentation de la teneur de SG dans les feuilles lors d'une exposition à des LED rouges / rouge sombre (Yoneda *et al.*, 2017).

L'âge de la culture et l'année de production sont également un facteur de variation de la teneur en SG. En condition de production au champ, les plants en deuxième année de production ont une teneur plus élevée de 40% en moyenne par rapport à la première année (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Dans cette étude, un seul génotype sur un total de 19 génotypes présente une diminution de la teneur en SG. Au contraire, la teneur en SG entre la première et la deuxième année diminue ou stagne pour la majorité des 15 génotypes étudiés par Hastoy, (2018), à l'exception de deux génotypes dont la teneur augmente significativement entre la première et la deuxième année.

Il est difficile de statuer sur la variabilité du profil en SG et de la teneur selon le site de production. Les ressources génétiques de stévia étant mal caractérisées (point qui sera développé en chapitre 6 de l'introduction), la comparaison entre les études est malaisée.

Dans certaines études, le profil en SG est considéré comme stable entre les années de culture pour un même génotype, mais des différences sont observées en lien avec le site de culture. En 2018, Hastoy n'identifie pas de variation du profil en SG sur les deux années de production en France, pour un même génotype. Cependant, pour un génotype donné, cette étude observe une variation du profil en SG entre les deux sites de production (Landes et Lot-et-Garonne). Une autre étude menée dans le Sud-Ouest de la France sur deux années de production indique que l'âge de la culture semble influencer sur la proportion des SG mineurs, Dulcoside A, Rebaudioside C, Rebaudioside F (Barbet-Massin *et al.*, 2016). Alors que les SG majeurs, Stéviolside et Rebaudioside A restent stables. Parris *et al.*, (2016) observent également de faibles variations entre quatre sites de production pour le ST.

L'évaluation des profils de SG peut s'effectuer par le ratio entre la proportion de RebA de la proportion de ST, ou le ratio de la proportion des SG présentant un goût sucré sur la proportion des SG présentant un goût amer. Dans la littérature, les profils en SG décrits sont très divers

allant du très riche en RebA, avec 72% à une absence de RebA (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019). Une grande diversité des SG mineurs entre les ressources génétiques testés est également observée par Hastoy, Cosson, *et al.*, (2019). Ces études ont montré que les profils en SG étaient génotype-spécifiques.

3.4. Rôle des SG dans la plante

Les SG sont principalement accumulés dans les feuilles de stévia et peuvent représenter jusqu'à 25% w/w de la masse sèche des feuilles. La production de métabolites secondaires en de telles quantités requiert un coût énergétique en carbone non négligeable pour la plante. Si le rôle des SG pour la plante de stévia n'a pas encore été élucidé, plusieurs hypothèses ont été évoquées dans la littérature et certaines ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Les rôles supposés des SG sont nombreux : ce serait des molécules précurseurs des gibbérélines, des molécules de stockage de réserve de carbone facilement re-mobilisables, des osmolytes susceptibles de contribuer à la régulation du potentiel hydrique, voire des pièges à ROS (reactive oxygen species) ou des molécules de défense contre les ravageurs. L'hypothèse d'un avantage adaptatif des espèces produisant une grande variabilité de molécules a déjà été évoquée pour la stévia (Barbet-Massin, 2015). Le stockage de molécules sucrées, appétentes pour l'homme, aurait aidé à la propagation de la plante (Brandle and Telmer, 2007).

3.4.1. Précurseurs des gibbérélines

La voie de biosynthèse des gibbérélines et celle des SG sont très proches, comme cela a été présenté dans le paragraphe 3.2.1.2. Cela a amené des auteurs à envisager une activité gibbéréline-like pour le stéviol (Ruddat *et al.*, 1963; Ceunen and Geuns, 2013e). Ceunen and Geuns, (2013c) ont testé l'activité biologique du stéviol obtenant des résultats très contradictoires, dépendant du génotype, et des conditions environnementales. Ces auteurs supposent que le stéviol aurait besoin d'être activé en une molécule gibbéréline-like. Il aurait alors un rôle de précurseur et non d'analogue. A ce jour, GB₂₀ est la seule gibbéréline identifiée chez *S. rebaudiana* (Alves and Ruddat, 1979) et son hydroxylation en C₁₃ est un argument en faveur du rôle précurseur du stéviol pour les GB. Cependant, les concentrations de GB₂₀ dans les feuilles sont inférieures de 25 à 2500 fois à celles du stéviol. Cela suppose qu'une quantité très faible de stéviol serait utilisée comme précurseur des GB (Petit, 2019). De plus, la conversion directe du stéviol en GB n'est pas fonctionnelle chez stévia (Alves, 1976). Ceunen and Geuns, (2013c) supposent que le stéviol est rapidement glycosylé dans la voie de biosynthèse des SG empêchant ainsi sa mobilisation dans la voie de synthèse des GB. Finalement, ces résultats suggèrent que les SG n'auraient pas un impact marqué sur la voie des GB (Barbet-Massin, 2015).

3.4.2. Molécules de stockage d'énergie

L'amidon est la principale réserve d'énergie chez les plantes vasculaires, mais joue également un rôle dans la gestion des stress abiotiques (Thalman and Santelia, 2017). Les lipides stockés dans les graines ou les fruits sont également très représentés chez les végétaux (Murphy, 1993). La forte teneur des SG produits par les plants de stévia et leur stockage dans la vacuole ont conduit certains auteurs à s'interroger sur un rôle de réserve de carbone et d'énergie. Avec une teneur plus élevée dans les feuilles en développement par rapport aux feuilles sénescentes (Bondarev *et al.*, 2003 ; De Guzman, 2010 ; Ceunen and Geuns, 2013a), plusieurs hypothèses ont été envisagées. La première serait un stockage à court-terme des SG. La synthèse dans les feuilles en développement serait réalisée en parallèle d'un phénomène de catabolisme des SG. Dans les feuilles en sénescence ce catabolisme excèderait la synthèse des SG, expliquant la diminution de la teneur en SG (De Guzman, 2010). Un essai a démontré une grande stabilité de la teneur en SG en condition de stress léger (Ceunen and Geuns, 2013d). De plus, une exposition à des concentrations élevées en CO₂ permet une accumulation d'amidon mais pas de SG (De Guzman, 2010 ; De Guzman *et al.*, 2018). Enfin, les teneurs en SG ne sont pas impactées par le changement jour / nuit au contraire de l'amidon (Ceunen and Geuns, 2013c ; De Guzman *et al.*, 2018). Ces résultats rendent l'hypothèse de stockage à court terme caduque. La deuxième hypothèse serait un rôle de stockage à long terme des SG qui seraient synthétisés dans les feuilles en développement et catabolisés dans les feuilles en sénescence. En effet, chez certaines espèces végétales, les molécules du métabolisme secondaires sont mobilisées lors de la pollinisation et atteignent leur concentration maximale pendant la floraison avant de diminuer pendant la production des graines (Çırak *et al.*, 2007 ; Fattahi *et al.*, 2016). Cette hypothèse proposée par De Guzman, 2010 va dans le sens de ce qui a été observé chez stévia pendant la croissance, avec une diminution de la teneur en SG au début de la floraison (Ceunen and Geuns, 2013a ; Barbet-Massin, 2015). Ces résultats sont des arguments favorables au rôle de stockage long terme pour les SG.

3.4.3. Osmolytes

En condition de stress hydrique, des mécanismes d'ajustement osmotique se mettent en place dans les végétaux pour maintenir un potentiel hydrique des cellules favorable à l'absorption d'eau. Le potentiel hydrique des cellules végétales diminue *via* l'accumulation d'osmolytes, des composés minéraux ou organiques qui n'affectent pas les fonctions métaboliques, même à de fortes concentrations (Ahanger *et al.*, 2014). Ces osmolytes organiques peuvent être des sucres, des acides aminés et leurs dérivés ou des polyols et sont principalement accumulés dans le cytosol ou la vacuole (Rhodes *et al.*, 2002).

L'hypothèse que les SG ont un rôle dans l'osmorégulation a été établie par De Guzman, (2010). Peu d'études ont été réalisées sur ce rôle potentiel des SG. Une participation de ces molécules à l'osmorégulation supposerait des variations de concentrations très marquées en condition de stress hydrique. La teneur des SG dans les feuilles de stévia s'est révélée stable même en conditions de stress hydrique intense (De Guzman, 2010). L'augmentation de l'osmolarité des feuilles de stévia en conditions de stress hydrique a pu être observée, sans variation de la concentration en ST et RebA (De Guzman *et al.*, 2018). S'ils sont effectivement impliqués dans la régulation osmotique, leur contribution est qualifiée de mineure (Barbet-Massin, 2015).

3.4.4. Des pièges à ROS, les espèces réactives de l'oxygène

Les ROS (reactive oxygen species) sont des molécules possédant un radical oxygéné pouvant produire des radicaux libres oxygénés (Mhamdi and Breusegem, 2018). Elles sont impliquées dans les réponses oxydatives de la plante et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires des végétaux, comme la réponse aux stress biotiques ou abiotiques et peuvent engendrer l'apoptose (Parent *et al.*, 2008). Une accumulation excédentaire des ROS peut causer des dommages oxydatifs aux protéines, lipides ou à l'ADN. La régulation de la concentration des ROS dans les cellules passe par des mécanismes de détoxifications enzymatiques ou non. Chez stévia, des pièges à ROS ont été identifiés pour l'acide folique, le pyrogallol, les flavonoïdes et des composés phénoliques (Kim *et al.*, 2011), ainsi que les SG (Geuns and Struyf, 2010 ; Stoyanova *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2011). La diminution de la teneur en SG au moment de la floraison serait la conséquence de la réaction avec les ROS (Ceunen and Geuns, 2013e).

3.4.5. Défenses contre les ravageurs

Chez les plantes, les terpénoïdes sont souvent impliqués dans des processus de défense contre les ravageurs (Tholl, 2015 ; Hernán Martínez, 2019), et leur accumulation dans les trichomes par exemple, peut repousser les insectes consommant les feuilles. L'effet dissuasif de la stévia a été testé sur plusieurs insectes. Metivier and Viana, (1979) ont démontré qu'*Epicauta adomaria*, un coléoptère, était repoussé par les feuilles de stévia. Les SG ont un effet dissuasif sur *Schieaphis graminum* de la famille des Homoptera (Nanayakkara *et al.*, 1987), ainsi que sur la sauterelle *Valanga irregulis* (De Guzman, 2010). Les insectes n'ont pas consommé de stévia et se sont laissé mourir de faim. Enfin le stévioside s'est révélé toxique pour les larves de *Spodoptera frugiperda* (Lowery, 2017). Ces effets n'ont pas été observés sur l'araignée *teranychis uticae* (De Guzman, 2010), suggérant un effet spécifique selon les arthropodes considérés. A l'inverse, les SG ont un effet appétent sur les mammifères, conséquence du goût sucré qu'ils procurent. Dans son milieu naturel, la stévia est consommée par des herbivores du type bétail (Soejarto, 2002). En conditions contrôlées, des cochons d'Inde cobayes augmentent leur consommation alimentaire lors d'une ration supplémentée en feuilles de stévia (De Guzman, 2010).

3.5. Caractéristiques organoleptiques des SG

Le goût de la stévia est associé à la fois à des saveurs amères et sucrées (Soejarto *et al.*, 1983) ainsi qu'à un goût métallique ou réglisse (Espinoza *et al.*, 2014). La persistance de ce goût de réglisse et d'amertume lors de la consommation pose problème à certains consommateurs. Des auteurs suggèrent que des molécules co-extraites avec les SG mais difficilement détectables, comme les alcaloïdes indolizidiniques, seraient à l'origine de l'amertume des extraits de SG (Michalik *et al.*, 2010), bien que le goût de ces molécules n'ait pas été étudié. Plusieurs études ont d'ailleurs évalué les propriétés organoleptiques de produits sucrés avec des SG pour estimer la perception de l'amertume dans ces produits (Shah *et al.*, 2010 ; Karp *et al.*, 2017). La perception des saveurs se fait par des récepteurs localisés sur les papilles linguales, ils permettent de distinguer l'amertume, l'acidité, le sucré, le salé et l'umami (Lindemann, 1996, 2001). La perception d'amertume qui suit une dégustation de SG a été reliée à deux récepteurs gustatifs : hTAS2R4 et hTAS2R14 (Hellfritsch *et al.*, 2012). De même, la perception du sucré engendrée par la consommation de SG est liée à deux récepteurs gustatifs : hTAS1R2 et hTAS1R3 (Hellfritsch *et al.*, 2012). La consommation de SG active également l'activité du canal TRPM5 (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5), qui est impliqué dans l'activité des cellules de réception du goût de type II, permettant la réception des saveurs sucrées, amères et umami (Philippaert *et al.*, 2017).

Cependant, tous les SG ne stimulent pas de la même façon les différents récepteurs linguaux, du fait de la variabilité de leur structure chimique, c'est-à-dire des résidus osidiques présents sur le noyau de stéviol. En effet, la présence d'un disaccharide ou l'augmentation de la longueur des chaînes de résidus osidiques en C₁₃ entraîne une plus forte saveur sucrée (Hellfritsch *et al.*, 2012) confirmant l'hypothèse de DuBois and Stephenson, (1985). Au contraire, la présence de certains résidus osidiques, comme le α -rhamnose induit plutôt des saveurs amères (Hellfritsch *et al.*, 2012). A l'aide d'un panel formé, cette étude a également décrit la concentration à laquelle la consommation d'un SG déclenche une saveur sucrée ou amère. Ce test réalisé sur 8 SG (ST, RebA, RebC, RebD, DulA, RebB, SB, Rub) a mis en évidence que la saveur sucrée est perçue à de faibles concentrations pour tous les SG, comprises entre 5,3 et 32,9 μ M. Au contraire, pour certains SG une faible concentration va provoquer directement une saveur amère, dès 23 μ M, alors que certains ne la provoqueront qu'à une concentration très élevée, jusqu'à 194 μ M. Dans une autre étude, les propriétés organoleptiques du RebM ont été

caractérisées, la consommation de ce SG entraîne une saveur sucrée et réduit la perception de l'acidité et de l'astringence (Prakash *et al.*, 2014).

Cela permet de classer les SG selon la saveur qu'ils provoquent principalement : ceux qui donneront une saveur principalement sucrée : RebA, RebD, RebM, ReBB ; ceux qui donneront une saveur principalement amère : ST, RebC, DulA, Rub et SB ; et enfin ceux qui n'ont pas été identifiés au niveau organoleptique : RebF.

3.6. Métabolisation et impact des SG sur la santé humaine

3.6.1. Métabolisation des SG par l'homme

La métabolisation des SG a été étudiée chez l'humain comme sur des modèles animaux (porcs, rats ou souris) révélant des résultats similaires (Magnuson *et al.*, 2016) (Figure 3.6.1). Le ST ne peut pas être métabolisé par les enzymes salivaires, les enzymes du pancréas ni les sécrétions gastriques (Hutapea *et al.*, 1997). Une étude *in vitro* a mis en évidence l'hydrolyse du ST et du RebA par la microflore fécale en stéviol, le stéviol n'étant pas ensuite hydrolysé par cette microflore (Gardana *et al.*, 2003). En effet, chez l'humain, après l'ingestion le RebA et ST vont subir un clivage des liaisons osidiques dans l'intestin grêle et le gros intestin par la flore intestinale (Wheeler *et al.*, 2008). Cette étape a été identifiée comme étant principalement réalisée par des bactéries intestinales de type : bifidobactéries, coliformes et lactobacilles (Gardana *et al.*, 2003; Renwick and Tarka, 2008). Des résultats identiques ont été obtenus pour le RebA, RebB, RebD, RebE, RebF, RebM, DulA et SB, le devenir des SG se différenciant uniquement par la vitesse d'hydrolyse allant de très rapide, comme pour le RebD, à très lente comme pour le RebF (Purkayastha *et al.*, 2016). Le stéviol issu du clivage est absorbé puis transporté dans le foie pour être transformé en glucuronide de stéviol par l'UDP-glycucuronosyltransférase UGT2B7 (Chen *et al.*, 2018). Le glucuronide de stéviol est relargué dans le sang, puis filtré par les reins et enfin éliminé via les urines (Geuns *et al.*, 2006 ; Wheeler *et al.*, 2008). On retrouve également de faibles quantités de stéviol dans les fèces (Wheeler *et al.*, 2008) mais pas dans les urines (Geuns *et al.*, 2006).

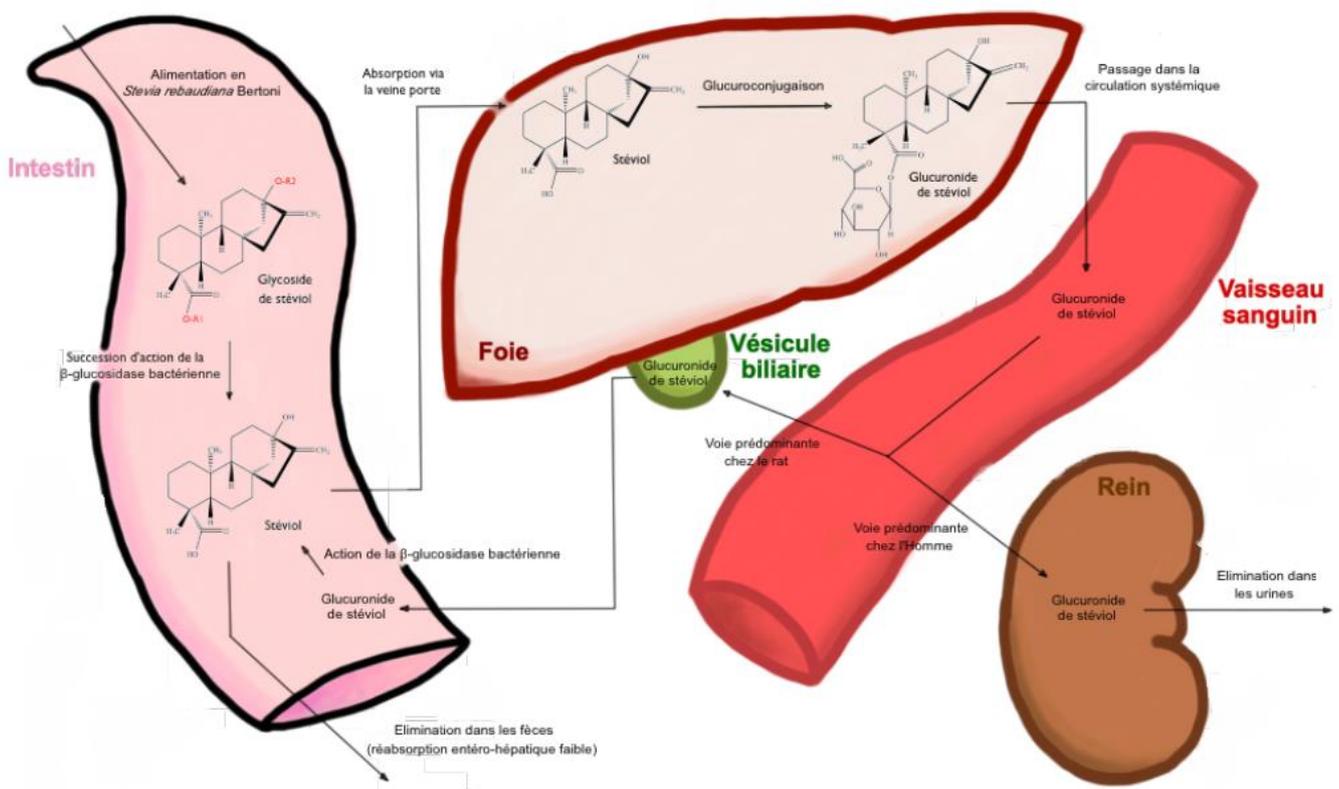


Figure 3.6.1 : Représentation schématique de la métabolisation des glycosides de stéviol chez l'Homme et le rat, avec R1 et R2 les groupements mono ou polyosidiques (Lesniarek, 2015).

3.6.2. Impact sur la santé humaine

La consommation de feuilles de stévia ou de glycosides de stéviol semble être adaptée pour les diabétiques. Sa consommation ne provoque pas de pic glycémique, du fait de ses propriétés édulcorantes (Carakostas *et al.*, 2008). Une étude sur des testeurs sains et diabétiques (Type I et Type II) a montré que la consommation de glycosides de stéviol était adaptée à ces trois types de consommateurs, car n'engendrant pas une augmentation du glucose sanguin après les repas (Barriocanal *et al.*, 2008). Pour les diabétiques de type II, ce résultat a été confirmé par Ritu and Nandini, (2016). Cette étude a également démontré que la consommation de SG entraîne une diminution de la faim. La consommation d'extraits de stévia en amont du repas, entraîne chez des testeurs sains une diminution de la prise alimentaire, du glucose sanguin postprandial ainsi que du pic d'insuline postprandial par rapport à une prise de saccharose, confirmant le potentiel édulcorant de la stévia pour des personnes diabétiques (Anton *et al.*, 2010). Ritu and Nandini, (2016) émettent l'hypothèse d'un effet bénéfique des SG sur la prévention des maladies cardiovasculaires chez les personnes atteintes de diabète de type II, cependant ce résultat n'a pas été démontré.

Il apparaît cependant nécessaire d'approfondir les études sur l'intérêt des SG dans le traitement de l'obésité. En effet, l'impact sur l'obésité des édulcorants reste critiqué, car certaines études ont mis en évidence une augmentation de la prise alimentaire lors de la substitution du sucre par ces produits dans les régimes alimentaires (Blundell and Hill, 1987; Naismith and Rhodes, 1995). En effet, la consommation d'édulcorants intenses avant les repas par des souris pendant un mois, entraîne une augmentation de la masse adipeuse et une augmentation de production de leptine dans les tissus adipeux, hormone régulant le stockage des acides gras, par rapport au groupe témoin (Mitsutomi *et al.*, 2014). Une étude démontre une prise de poids significative chez les rats femelles consommant du RebD pendant un mois. De nouveau, les doses testées sont bien supérieures à celles autorisées dans la réglementation (Nikiforov *et al.*, 2013).

A notre connaissance, il n'existe pas d'études investiguant l'effet de la consommation quotidienne de SG chez l'humain pendant une très longue période de temps. La plupart des études testant la toxicité des SG ont été réalisées en conditions *in vitro* (Matsui *et al.*, 1996 ; Mathur *et al.*, 2017), cependant certaines études portent directement sur des modèles animaux ou sur l'humain (Anton *et al.*, 2010 ; Nikiforov *et al.*, 2013). La consommation de SG ne semble pas entraîner d'impact sur la flore intestinale (Gardana *et al.*, 2003 ; Renwick and Tarka, 2008). Des revues bibliographiques indiquent que la stévia aurait un effet antioxydant et anticancer (Mathur *et al.*, 2017 ; Carrera-Lanestosa *et al.*, 2017).

Le stéviol aurait un effet génotoxique sur les cellules de rats cultivées *in vitro* dans des concentrations extrêmement élevées (Matsui *et al.*, 1996). Cependant, les concentrations testées ne relèvent pas d'un niveau consommable. Une revue conclut à un faible potentiel allergène de la stévia et des SG, bien que certains enfants atteints d'eczéma ou déjà allergiques présentent des réactions positives à des tests d'allergie (Urban *et al.*, 2015). Cependant, les auteurs mettent en avant le très faible nombre d'études sur le sujet, invitant à reconsidérer cette question après des investigations plus poussées. Urban *et al.*, (2015) conclut que l'augmentation de la consommation de stévia et ses extraits dans les années à venir permettra de mieux connaître les risques allergiques de cette plante. Cette conclusion peut être élargie aux autres versants de la toxicité, qui seront mieux évalués dans les prochaines années par la démocratisation de la stévia et des SG dans les produits quotidiennement consommés.

Chapitre 4. Culture de *Stevia rebaudiana* en conditions de productions tempérées

4.1. Production agricole de la stévia

La production agricole de la stévia était à l'origine localisée au Japon, historiquement le premier consommateur. Par la suite d'autres pays de l'Est et Sud-Est de l'Asie, Vietnam, Thaïlande, Corée du Sud et Chine, ont commencé à en produire également. Dès 2001, la majorité de la stévia consommée au Japon était cultivée en Chine (Mizutani and Tanaka, 2002). Aujourd'hui, la Chine est le premier producteur mondial de stévia, et représentait 80% de la production en 2016, avec des productions allant de 50 000 à 60 000 tonnes de feuilles sèches par an (Sun, 2016). D'autres pays produisent des quantités significatives de stévia : l'Inde, la Corée du Sud, l'Indonésie, le Mexique, les Etats-Unis, le Canada, le Paraguay et l'Argentine (Gantait *et al.*, 2018). La culture de la stévia s'étend rapidement à de nouveaux pays comme la Turquie, le Kenya ou encore le Maroc (Ciriminna *et al.*, 2018) (Figure 4.1).



Figure 4.1 : Zones de production de stévia (d'après Gantait *et al.*, 2018 ; Ciriminna *et al.*, 2018).

4.2. Implantation de la culture

4.2.1. Conditions pédoclimatiques adaptées à la culture de la stévia

Si le climat d'origine de la stévia est de type semi-humide ou subtropical (Soejarto, 2002), cette plante peut également être cultivée en conditions de climat tempéré. En Europe, de nombreuses études ont été menées depuis plus de 15 ans : au Portugal (Lankes and Grosser, 2015; Reis *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2019), en Allemagne (Woelwer-Rieck *et al.*, 2010; Lankes and Zabala, 2011; Munz *et al.*, 2018) en Hongrie (Takács-Hájos *et al.*, 2019), au Danemark (Grevsen *et al.*, 2015), en Italie (Andolfi *et al.*, 2006; Tavarini and Angelini, 2013), en Grèce (Vasilakoglou *et al.*, 2016; Zachokostas, 2016), en Suisse (Vouillamoz *et al.*, 2016), en France (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019) en Pologne (Libik-Konieczny *et al.*, 2018), en Bulgarie (Denev *et al.*, 2017).

Dans la plupart des conditions pédoclimatiques étudiées, la stévia peut être cultivée comme une pérenne, car elle supporte des températures allant de 0-2°C à 35°C (Sumida, 1980). Cependant, elle est sensible au gel et peut subir des lésions foliaires lors des températures en dessous de 0°C (Moraes *et al.*, 2013). Cela explique pourquoi dans certaines régions de l'Allemagne, la survie à l'hiver est trop faible pour cultiver la stévia comme culture pérenne (Lankes and Zabala, 2011). Les températures idéales pour son développement végétatif sont 25°C (jour) / 20°C (nuit), alors que la diminution des températures à 15°C / 10°C provoque une diminution du rendement jusqu'à 60% (Mizukami *et al.*, 1983). La culture de la stévia est également possible dans des zones semi-arides ou des régions salines si une seule récolte est réalisée (Reis *et al.*, 2015).

Cette culture est fortement sensible aux variations de photopériode. Une photopériode qualifiée de courte, en dessous de 12h de soleil, entraîne une floraison précoce (Metivier and Viana, 1979; Ceunen and Geuns, 2013a), alors qu'une photopériode qualifiée de longue, autour de 16h de soleil, augmente la durée de croissance végétative ainsi que la teneur de SG présents dans les feuilles (Ceunen and Geuns, 2013a; Balbin and Salazar, 2017).

Dans son habitat naturel, la stévia se développe sur des sols sableux s'adaptant à des sols acides, et peu fertiles. Dans le cadre de sa culture la stévia sera cultivée sur des sols légers, bien drainants et riches en matière organique (Angelini *et al.*, 2018).

4.2.2. Production du matériel végétal

La question du mode de production des plants est primordiale dans le cadre de la mise en place d'une filière de production de stévia. Il s'agit de déterminer quel est le mode de production le plus adapté selon l'utilisation de ces plants. Pour la culture de la stévia, plusieurs solutions peuvent être envisagées : les semences, les boutures réalisées par des pépiniéristes ou encore des boutures réalisées en *in vitro*.

- Semis

Le principal avantage de l'utilisation du semis pour la propagation de la stévia est le faible coût de production issue de cette méthode (Angelini *et al.*, 2018), permettant une diminution de moitié par rapport aux boutures. La production de graines n'est pas possible en monoculture d'un génotype (Raina *et al.*, 2013) du fait de l'auto-incompatibilité de la stévia, présenté paragraphe 1.3.2. Cela nécessite donc de réaliser des croisements entre des plants génétiquement différents pour permettre une bonne production de graines fertiles. Le taux de germination des graines de stévia observé est très variable, entre 17,3 et 97,3% selon les plants croisés (Martini *et al.*, 2017a). Il ne permet pas de réaliser un semis direct et impose une production par pépiniériste avant la plantation. Cependant, une récolte des graines réalisée en novembre améliore le taux de germination de lots de semences (Martini *et al.*, 2017a). Cette méthode de production de plants a ses limites, actuellement il existe une grande variabilité entre les lignées parentales ne permettant pas d'obtenir des descendants homogènes.



Figure 4.2.2.a : Semis réalisés en pépinière lors de test d'enrobage des graines de stévia (Crédit photo : Cécile Hastoy).

- Multiplication végétative

- *In vitro*

Le bouturage *in vitro* est également un bon moyen pour produire des plants de stévia. Contrairement à la production par graines, le bouturage « *in vitro* » produit des clones, assurant ainsi une homogénéité de rendement. La technique d'induction de cal présente un fort taux de réussite (Khalil *et al.*, 2014). Le coût de cette technique est en revanche élevé. Elle ne peut donc pas être utilisée dans le cadre de la plantation d'une parcelle agricole, mais peut être envisagée pour produire des plants à des fins de recherche ou comme pieds mères pour du bouturage.

- Bouturage

Un bouturage en serre chez des pépiniéristes est une autre solution envisageable pour la production de plants de stévia car elle permet la production de clones issus de pieds mères. Le taux de réussite de cette méthode dépend des techniques mises en œuvre, notamment l'utilisation d'hormones de croissance (Ingle and Venugopal, 2009). Le coût est intermédiaire entre les méthodes *in vitro* et le semis, ce qui peut être un bon compromis pour implanter une parcelle de clones. La production de boutures en serre requiert cependant d'avoir les infrastructures adaptées, des pieds mères en nombre suffisant et de la main d'œuvre formée.



Figure 4.2.2.b : Boutures produites en serre pour implantation d'une parcelle en plein champ dans le Lot-et-Garonne (47) (Source photo : Cécile Hastoy).

4.2.3. Conditions de plantation de la culture

La culture de *S. rebaudiana* dans les zones de climat tempéré, comme l'Europe de l'Ouest s'étale d'avril- mai avec la reprise de la croissance après l'hiver jusqu'à septembre qui marque la dernière récolte de la saison.

Le précédent cultural est un critère important pour l'implantation. Il est déconseillé de cultiver la stévia en monoculture. Une rotation à moyen – long terme peut être envisagée avec des cultures appartenant à d'autres familles et n'étant pas touchées par les mêmes maladies, comme les Fabacées ou des céréales d'hiver (Ramesh *et al.*, 2006). Les Fabacées en particulier ont également l'avantage d'enrichir le sol en azote (Thilakarathna *et al.*, 2016). La préparation du sol dépend de plusieurs facteurs spécifiques à chaque exploitation : type de sol, présence d'adventices ou encore la durée de la culture. Angelini *et al.*, (2018) préconisent cependant de faire un travail plus en surface afin de limiter la compaction des sols, pouvant être délétère à une culture pérenne comme la stévia.

Dans la cadre d'une implantation de la culture de la stévia dans des zones tempérées, sa date de plantation est conseillée en avril / mai, lorsque les températures extérieures augmentent et permettent au sol de se réchauffer (Ramesh *et al.*, 2006). Cette date de plantation laisse également un temps d'implantation suffisant aux plants avant la récolte en première année ou la coupe pré-hiver. En effet, une durée d'implantation trop courte entraînerait une diminution du rendement (Hastoy, 2018).

La stévia peut être plantée sur des bâches en plastique en plein champ, installation à compléter avec un système d'irrigation en goutte à goutte. Ce type d'implantation permet de limiter la compétition avec les adventices lors des premiers mois du développement de la plante (Angelini *et al.*, 2018), de limiter la sécheresse du sol et de maintenir une température du sol plus élevée. En agriculture biologique, des bâches biodégradables peuvent être utilisées.

La densité de plantation est variable selon le type de sol et les équipements des agriculteurs, dans la littérature elle varie de 27 300 plants/ha (Fabre and Guigal-Merle, 2013) à 166 667 plants/ha (Gomes *et al.*, 2018). Une forte augmentation de la densité entraîne une diminution du développement végétatif du plant et une augmentation de la teneur en SG (Benhmimou *et al.*, 2017), se traduisant par une augmentation du rendement en biomasse foliaire à l'hectare (Kumar *et al.*, 2014). La densité idéale se situerait entre 80 000 et 100 000 plants/ha (Donalisio *et al.*, 1982).

4.3. Intrants

4.3.1. Apports hydriques

Le choix d'un sol drainant doit être privilégié pour *S. rebaudiana* car elle est très sensible à l'eau stagnante. En effet, des sols saturés en eau entraînent une forte diminution de la croissance des racines et des tiges, du fait de la privation d'apport d'O₂, et une diminution de la teneur en SG produite dans les feuilles (Pordel *et al.*, 2015). Les sols retenant l'eau sur une longue période sont peu adaptés à la culture de la stévia, un apport fréquent en faible quantité est préconisé (Angelini *et al.*, 2018).

Les périodes de sécheresse impactent également le rendement de stévia. Dans son étude Lavini *et al.*, (2008) ont testé trois modalités d'irrigation sur deux années de culture, une première permettant de satisfaire les besoins en eau de la plante puis deux avec une réduction de 33 ou de 66% de l'eau d'irrigation. Sur ces deux années, les rendements en biomasse et en SG ont été bien plus importants pour la première modalité que pour les suivantes. Le rendement cumulé de la modalité bien irriguée est 40% plus élevé que celui de la modalité irriguée à 33%. Une étude similaire a montré une diminution par 6 du rendement en SG entre une modalité normalement irriguée et une culture sans irrigation (Pacifico *et al.*, 2017).

Ces résultats sont confirmés par Karimi *et al.*, (2015) qui ont démontré, en conditions contrôlées, qu'un intervalle d'irrigation de 8 jours était suffisant pour obtenir un rendement normal mais qu'un espacement de l'apport hydrique à 12 jours entraîne une diminution de la teneur en SG, en particulier de RebA et DulA, de la biomasse foliaire et donc du rendement en SG. Une perte de la teneur en SG est également observée (Hajihashemi and Geuns, 2016). Un événement de sécheresse aura cependant un impact moindre sur le développement racinaire que la stagnation en eau (Pordel *et al.*, 2015). En France, la Chambre d'Agriculture de l'Hérault a déterminé que la stévia nécessitait une irrigation moyenne de 300 mm entre mai et octobre (Fabre and Guigal-Merle, 2013).

4.3.2. Nutrition N-P-K

La fertilisation nécessaire à *S. rebaudiana* est plutôt faible (Shock, 1982). Angelini and Tavarini, (2014) ont calculé les quantités de N-P-K (azote, phosphore, potassium), qui sont de 14.9/1.9/22.4 kg pour produire 1 tonne de biomasse pour des plants en première année de production et de 14.9/2.8/28.5 kg en deuxième année de production, avec une utilisation de cette ressource principalement pour produire de la biomasse foliaire (80% du N total). Lors

d'un apport réduit, à 74% de la dose recommandée, certains génotypes maintiennent la même biomasse foliaire qu'en apport habituel, alors que la biomasse diminue pour certains génotypes (Vasilakoglou *et al.*, 2016). Une étude française a montré qu'un doublement de l'apport d'azote (60 kg N/ha à 120 kg N/ha) entraîne une augmentation du rendement en biomasse foliaire (Barbet-Massin *et al.*, 2015). Cependant, cela va de pair avec une diminution du rendement en SG jusqu'à 35% selon le génotype considéré.

Une déficience en macronutriment, N, P, K, Ca, Mg, ou B, entraîne une diminution du développement de la biomasse foliaire (Lima Filho and Malavolta, 1997) et peut provoquer des symptômes de chlorose ou nécrose des apex (Utumi *et al.*, 1999). Une diminution de la biomasse racinaire a également été observée (Kafle *et al.*, 2017). L'absence de Cu entraîne une diminution significative de la teneur en SG (Kafle *et al.*, 2017). Enfin, si une diminution d'apport d'azote est corrélée à une baisse de biomasse foliaire allant jusqu'à 50% pour certains génotypes, cela entraîne une augmentation de la teneur en SG dans les feuilles (Barbet-Massin *et al.*, 2015).

4.4. Pérennité de la culture en conditions tempérées

La durée de culture de la stévia en conditions tempérées est un point de l'itinéraire cultural encore peu étudié. En Allemagne, une étude avait démontré l'impossibilité de cultiver la stévia comme une plante pérenne, du fait de l'importante mortalité après le premier hiver (Lankes and Zabala, 2011). Dans d'autres zones au climat hivernal moins rigoureux, la culture de la stévia en tant que pérenne est possible. Cependant, la plupart des études en Europe durent d'une à trois années (Barbet-Massin, 2015 ; Vasilakoglou *et al.*, 2016 ; Zachokostas, 2016). Une étude italienne a cependant mis en évidence une augmentation de la biomasse foliaire de la première année et jusqu'à la cinquième ou sixième année de production selon les génotypes, avec un doublement de la biomasse, puis la production de biomasse foliaire diminue jusqu'à la huitième année (Andolfi *et al.*, 2006).

4.5. Stress biotiques impactant la production

Les stress biotiques diminuant les rendements des cultures agricoles peuvent résulter de la présence d'adventices, de ravageurs des cultures ou encore d'agents pathogènes. Les adventices sont des plantes qui poussent spontanément sur une parcelle agricole et entrent en compétition

pour les ressources (eau, intrants) avec la culture agricole (Bourgeois *et al.*, 2019). Les pertes financières occasionnées par les adventices sur des grandes cultures vont de 8 \$/ha pour l'orge à 56 \$/ha pour le sorgho (Llewellyn *et al.*, 2016). Les ravageurs et les agents pathogènes vont utiliser la culture pour réaliser une partie ou la totalité de leur cycle de développement (habitat, lieu de reproduction, ponte...). Les ravageurs des cultures, comme les insectes, représentent un enjeu majeur en agriculture. Aujourd'hui ils engendrent une diminution de 5 à 20 % des cultures qu'ils attaquent, mais dans les années à venir, du fait de l'augmentation des températures, leur impact sur les rendements devrait augmenter de 10 à 25 % (Deutsch *et al.*, 2018). Quant aux agents pathogènes, ils engendrent des diminutions du rendement du fait de la mortalité des plants, mais peuvent également provoquer des symptômes qui vont dégrader la valeur commerciale du produit, comme des malformations des fruits ou des tâches (Fried *et al.*, 2017).

S. rebaudiana est très sensible à la présence d'adventices sur la parcelle, particulièrement lors des premiers stades de développement, entre avril et mai, (Angelini *et al.*, 2018; Hastoy, 2018). Ceci impose un contrôle précoce de ces adventices (Barbet-Massin, 2015). Les adventices peuvent également impacter la récolte de stévia (Ramesh *et al.*, 2006). Si des traitements herbicides peuvent être envisagés dans le cadre d'une production conventionnelle, ils peuvent engendrer des résistances (Heap, 2014). Pour une culture en agriculture biologique, des désherbages mécaniques ou un paillage sont une bonne alternative (Todd, 2010). Un travail sur les rotations, la couverture du sol et l'agencement de la plantation peuvent également aider à diminuer le développement des adventices (Angelini *et al.*, 2018).

La littérature scientifique rapporte peu de diminutions significatives du rendement de stévia causées par des ravageurs. En conditions de culture en serre, lors de la production de jeunes plants avant plantation par exemple, la stévia est sensible aux ravageurs communément retrouvés en ces conditions, comme les pucerons ou encore les aleurodes (Angelini *et al.*, 2018). En conditions de culture en champ, les dommages liés aux ravageurs des cultures sont rares, bien que pucerons, aleurodes ou encore sauterelles aient été identifiés sur des cultures n'engendrant que de faibles diminutions de rendement (Li, 2000).

Plusieurs agents pathogènes ont pu être identifiés sur *S. rebaudiana* causant des pertes notables de rendement du fait des symptômes foliaires ou racinaires qu'ils engendrent (Tableau 4.4).

Au sein des différentes zones de production, trois agents pathogènes fongiques sont particulièrement problématiques : *Septoria* sp., *Alternaria alternata* et *Sclerotium rolfsii* aussi nommé *Athelia rolfsii*.

Peu de méthodes de lutte ont été décrites sur stévia pour contrer ces agents pathogènes fongiques. Des publications ont montré l'efficacité de méthodes de luttés alternatives aux fongicides de synthèse pour contrôler le développement d'*Alternaria alternata*. L'étude de Tanova and Kaschieva, (2018) indique que des extraits végétaux de thym et peuplier sont efficaces pour lutter contre une infection du champignon sur de petites zones. L'utilisation de bactéries antagonistes : *Pseudomonas* BRL-1 (Sen *et al.*, 2012) ou *Bacillus subtilis* AUB1 et AUB2 (Devi *et al.*, 2010), permettrait une diminution de plus de 80% des symptômes foliaires. De même, pour lutter contre *Sclerotium rolfsii*, l'étude de Koehler and Shew, (2017a), a prouvé l'efficacité de l'azoxystrobine et du pyraclostrobine, fongicides de la famille des QoI (Quinone outside inhibitors). L'utilisation de produits de biocontrôles, comme *Trichoderma harzianum* ou des dérivés du lait, comme du beurre fermenté, a également montré des résultats satisfaisants pour limiter le développement de l'agent fongique (Angayarkanni *et al.*, 2012; Shwetha and Hegde, 2012). Pour lutter contre *Septoria* sp. des fongicides de synthèse sont efficaces, comme le difénoconazole limitant à moins de 10% les nécroses foliaires (Koehler and Shew, 2018), des fongicides naturels comme le cuivre peuvent également être utilisés, voir détails chapitre 5 de l'introduction.

Tableau 4.4 : Liste des agents pathogènes identifiés sur *Stevia rebaudiana*. Présentation du type, symptômes décrits, localisation, et les références.

Agent pathogène	Type	Symptômes	Localisation	Références
<i>Alternaria alternata</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches foliaires noires	Inde Mexique Bulgarie	(Maiti <i>et al.</i> , 2007; Arturo <i>et al.</i> , 2009; Uchkunov <i>et al.</i> , 2015)
<i>Alternaria steviae</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches foliaires noires	Japon Egypte Chine	(Ishiba <i>et al.</i> , 1982a ; Hilal and Baiuomy, 2000 ; Yan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ascochyta sp.</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches sur feuilles et tiges d'une couleur brun clair et d'un halo brun foncé	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Botrytis cinerea</i>	Champignon (Ascomycète)	Moisissure grise sur les feuilles	Italie Egypte	(Hilal and Baiuomy, 2000 ; Bertetti <i>et al.</i> , 2009 ; Garibaldi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Cercospora sp.</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches décolorées présentant une auréole brune	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Curvularia sp.</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches nécrotiques et chlorotiques sur les feuilles	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Colletotrichum sp.</i>	Champignon (Ascomycète)	Tâches foliaires blanchâtres	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)

		devenant brunes en séchant		
<i>Drechslera</i> sp. <i>Helmintosporium</i> sp.	Champignon (Ascomycète)	Tâches brunes présentant un point noir au centre	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Champignon (Ascomycète)	Flétrissement des plants	Mexique Egypte Mexique	(Hilal and Baiuomy, 2000 ; Leyva-Mir <i>et</i> <i>al.</i> , 2018 ; Díaz- Gutiérrez <i>et al.</i> , 2019)
<i>Fusarium</i> <i>semitectum</i> <i>F. solani</i>	Champignon (Ascomycète)	Pourriture racinaire	Mexique Egypte Inde	(Hilal and Baiuomy, 2000; Arturo <i>et al.</i> , 2009 ; Chavan, 2017)
<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	Champignon (Ascomycète)	Pourriture racinaires et du collet, chancres noirs	Etats-Unis Egypte	(Hilal and Baiuomy, 2000; Koehler and Shew, 2017b)
<i>Nigrospora</i> sp.	Champignon (Ascomycète)	Tâches brunes foliaires	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Phomopsis</i> sp.	Champignon (Ascomycète)	Chancre sur la tige avec présence de pynides, feuilles beige pâle	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Septoria</i> sp.	Champignon (Ascomycète)	Nécroses et chloroses foliaires	Japon Canada Etats-Unis Inde France	(Ishiba, Yokoyama, <i>et</i> <i>al.</i> , 1982; Lovering, 1996; Reeleder, 1999; Bhandari and

				Harsh, 2006; Sanabria and Fuente, 2013; Hastoy, Le Bihan, <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thielavipsis sp.</i>	Champignon (Ascomycète)	Nécrose des racines	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Verticilium dahliae</i>	Champignon (Ascomycète)	Jaunissement et flétrissement des plants	Amérique du nord Italie Chine	(Lixin <i>et al.</i> , 1987; Farrar <i>et al.</i> , 2000; Da Lio <i>et al.</i> , 2019)
<i>Rhizoctonia sp.</i>	Champignon (Basidiomycète)	Pourriture de la tige et des racines, tâches brunes des feuilles	Mexique	(Arturo <i>et al.</i> , 2009; Chavan, 2017)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Champignon (Basidiomycète)	Nécroses des racines et du collet, jaunissement des feuilles	Egypte	(Hilal and Baiuomy, 2000)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Champignon (Basidiomycète)	Pourriture du collet et des racines, flétrissement des plants	Egypte Etat-Unis Grèce Inde Italie	(Hilal and Baiuomy, 2000; Kamalakkanan <i>et al.</i> , 2007; Koehler and Shew, 2014a; Carrieri <i>et al.</i> , 2015; Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2015; Chavan, 2017)

<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Champignon (Basidiomycète)	Pourriture des feuilles et du collet, flétrissement des plants	Canada Etats-Unis	(Chang <i>et al.</i> , 1997; Koehler and Shew, 2014b)
<i>Pythium myriotylum</i> , <i>P. irregulare</i> , <i>P. aphanidermatum</i>	Oomycète	Pourritures racinaires, lésions du collet, jaunissement des feuilles	Etats-Unis	(Koehler <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Bactérie	Tâches brunes aux extrémités des feuilles s'élargissant sur toute la feuille	Etats-Unis	(Strayer <i>et al.</i> , 2012)
<i>Phytoplasma</i>	Mollicute	–	Inde	(Samad <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	Virus	Tâches nécrotiques, mosaïque verte à jaune des feuilles	Espagne	(Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2015)
Tomato Spotted Wilt Virus	Virus	Tâches chlorotiques à nécrotiques, apparition d'un bronzage sur les feuilles	Etats-Unis Grèce	(Chatzivassiliou <i>et al.</i> , 2007; Koehler <i>et al.</i> , 2016)

4.6. Récolte et variabilité du rendement

Les feuilles sont les organes accumulant le plus de SG, c'est donc la biomasse foliaire qui est récoltée sur la stévia. Le rendement en SG (kg/ha) de la stévia se décompose en deux indicateurs clés: la biomasse foliaire (kg/ha) et la teneur en SG (%w/w). Hastoy, (2018) a montré que la teneur en SG explique à 20% la variance observée sur le rendement en SG alors que la biomasse foliaire explique 75% de cette variance. Comme présenté dans le paragraphe 3.3, la teneur en SG peut varier selon l'organe de la plante, la période du cycle de développement, la photopériode, le matériel génétique utilisé et les conditions de production. De même, la production en biomasse foliaire est très variable selon les méthodes culturales employées, le nombre de récoltes, la date des récoltes réalisées ainsi que les ressources génétiques cultivées. Ces variations de méthodes culturales ou de matériel génétique utilisés ont un impact considérable sur le rendement en SG observés.



Figure 4.6 : Parcelle expérimentale localisée à Blagon (33), les plants de stévia sont en troisième année de production, juillet 2019 (Crédit photo : Zoé Le Bihan).

La date de récolte optimale ne connaît pas pour l'instant de consensus au sein de la communauté scientifique travaillant sur la stévia. L'étude de la variabilité du rendement en SG selon la date de récolte a été testée en Italie à quatre dates de récoltes différentes entre fin juin et fin août, révélant un rendement en SG maximal à la date du 3 août, soit bien avant la floraison (Pacífico *et al.*, 2017). Les résultats de rendement en SG de cette étude sont estimés à partir d'un

échantillon de 10 feuilles par plant. Au contraire, l'étude de Ceunen and Geuns, (2013a) réalisée en serre, a montré un maintien du rendement en SG jusqu'à la floraison, suivi d'une diminution lors de l'initiation de la floraison. Ils recommandent donc une récolte au début de la floraison pour obtenir un rendement maximal, soit en septembre dans nos climats. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études en conditions de culture en serre (Yang *et al.*, 2015; Barbet-Massin, 2015). Dans cette étude menée en Italie en conditions de production au champ Tavarini and Angelini, (2013) préconisent une récolte en septembre pour augmenter le ratio RebA/ST. Enfin, dans une étude en conditions de culture au champ, un suivi de la mise en place de la biomasse au cours de la croissance indique un rendement maximal une trentaine de jours avant l'initiation de la floraison, soit mi-août (Hastoy, 2018).

Sous un climat proche de son environnement naturel *S. rebaudiana* est récoltée plusieurs fois dans l'année, 3 à 5 fois en moyenne et jusqu'à 7 fois en Indonésie par exemple (Singh and Rao, 2005). Sous un climat tempéré, des études ont comparé le rendement obtenu avec une seule récolte au moment de la formation des bourgeons floraux ou deux récoltes, la première pendant la période de croissance végétative (juin-juillet) et la deuxième lors de la formation des bourgeons floraux. (Moraes *et al.*, 2013) a montré qu'une unique récolte permettait un rendement plus élevé que deux récoltes. Une étude américaine comparant les performances de cultivars de stévia avec une ou deux récoltes n'a pas observé de différences significatives entre les deux itinéraires culturaux (Parris *et al.*, 2016).

La variabilité de production de la biomasse foliaire et de rendement en SG est très large selon les zones de production, les méthodes de production mais aussi les géotypes cultivés sur les parcelles. Toutes les informations ne sont pas systématiquement disponibles, les auteurs ne mesurent pas toujours le rendement en SG. En première année de production, Barbet-Massin *et al.*, (2015) obtiennent des résultats allant de 37,6 à 190 g/plant de biomasse foliaire sèche pour des individus avec un fort apport azoté, correspondant à une diminution de 8,4 à 3,5 g/plant de rendement en SG. Toujours dans le Sud-Ouest de la France, les rendements en biomasse foliaire vont de 20 g/plant à 91 g/plant, et de 1 à 14 g/plant pour le rendement en SG (Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019). Aux Etats-Unis, Parris *et al.*, (2016) obtiennent des rendements en biomasse foliaire allant de 25,8 à 88 g/plant pour un rendement en SG variant entre 2,6 et 10,3 g/plant. Au Portugal en zones arides, les rendements en biomasse foliaire varient de 33,7 à 56 g/plant (Reis *et al.*, 2015). Enfin en Pologne, les rendements en biomasse foliaire enregistrés vont de 33 à 103 g/plant (Libik-Konieczny *et al.*, 2018).

Une grande variabilité de rendement en SG et en biomasse foliaire a pu être observée dans les différentes études menées en Europe, comme présenté dans ce paragraphe. Cependant, il faut comparer les performances des génotypes avec précaution car la caractérisation génétique des plants de stévia utilisés dans les essais de production est rarement connue ou précisée. Dans la plupart des études, le pays d'origine ou l'entreprise de production est spécifiée mais les liens génétiques entre ces ressources ne sont pas indiqués. Des noms utilisés par les entreprises de vente de semences comme Rebaudiana, Sugar Love, AX, X4 ou encore Candy de Genesis Seed sont utilisés (Parris *et al.*, 2016; Munz *et al.*, 2018; Libik-Konieczny *et al.*, 2018) mais ne définissent pas clairement les fonds génétiques. Barbet-Massin *et al.*, (2016) ont testé une population issue de Criola, plant peu sélectionné provenant du Paraguay. Une étude a évalué 15 génotypes dans le Sud-Ouest de la France (Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019) qui ont été caractérisés génétiquement (Cosson *et al.*, 2019).

Chapitre 5. Un agent fongique majeur de la stévia : *Septoria* sp.

5.1. Description de *Septoria* sp.

Plus de 2000 isolats de *Septoria* sp. sont décrits (Verkley *et al.*, 2004). Il s'agit d'un champignon ascomycète classé dans la famille des *Mycosphaerellaceae*. Le genre *Septoria* correspond aux morphes asexués, les formes sexuées associées étant classées parmi les *Mycosphaerella* et *Sphaerulina* (Verkley *et al.*, 2013). De façon générale, les champignons du genre *Septoria* forment des pycnides produisant des conidies lisses pouvant être filiformes ou cylindriques (Sutton, 1980; Verkley *et al.*, 2013). Les isolats identifiés sur stévia forment des pycnides cylindriques et noires, qui à maturité excrètent des conidies contenues dans un cirrhe d'aspect visqueux. Les conidies sont hyalines, filiformes, cloisonnées, d'une longueur de 52.7µm environ (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Lorsqu'elles sont conservées sur milieux de culture (Oat Agar Chloramphenicol (OAC) ou MAC (MacConkey, 1905)), les isolats de *Septoria* sp. collectés sur stévia se caractérisent par des colonies de pycnides brunes associées à la production d'un mycélium stérile (Hastoy, 2018).

5.2. Cycle de développement des *Septoria* sp.

Le développement et la diffusion de cet agent pathogène a été décrit et étudié sur de nombreuses cultures. Par exemple, *Septoria tritici* se développe sur le blé, *Septoria petroselini* sur le persil et *Septoria lycopersici* sur la tomate (Endrinal and Geling, 1940; Sanderson, 1972; Kurt and Tok, 2006). Le blé étant la culture la plus documentée, c'est le cycle de la septoriose sur cette culture qui sera décrit ci-après (Steinberg, 2015) (Figure 5.1). A l'échelle de la feuille, les conidies déposées à la surface des feuilles vont germer (Eyal, 1987), lorsque l'humidité est assez importante, et former un hyphe qui pénètre dans la plante via les stomates (Duncan and Howard, 2000). La propagation du champignon dans l'hôte se fait par les espaces intercellulaires (Kema *et al.*, 1996). Puis les hyphes fongiques commencent à former des réseaux dans le mésophylle de la feuille (Shetty *et al.*, 2003). Entre 3 à 11 jours après l'infection, les hyphes remplissent les cavités sub-stomatales et les pré-pycnides s'y forment (Duncan and Howard, 2000). Pendant cette période, l'infection est encore asymptomatique et, à la fin de la formation des pré-pycnides, les premières lésions chlorotiques commencent à apparaître. Au

bout de 10 à 12 jours le champignon commence à former des pycnides visibles sur la face supérieure des feuilles, qui vont mûrir et excréter des conidies (Cohen and Eyal, 1993), ce qui correspond à l'apparition des symptômes nécrotiques. Par la suite, ces conidies seront dispersées par l'eau et contamineront d'autres feuilles (Suffert *et al.*, 2011).

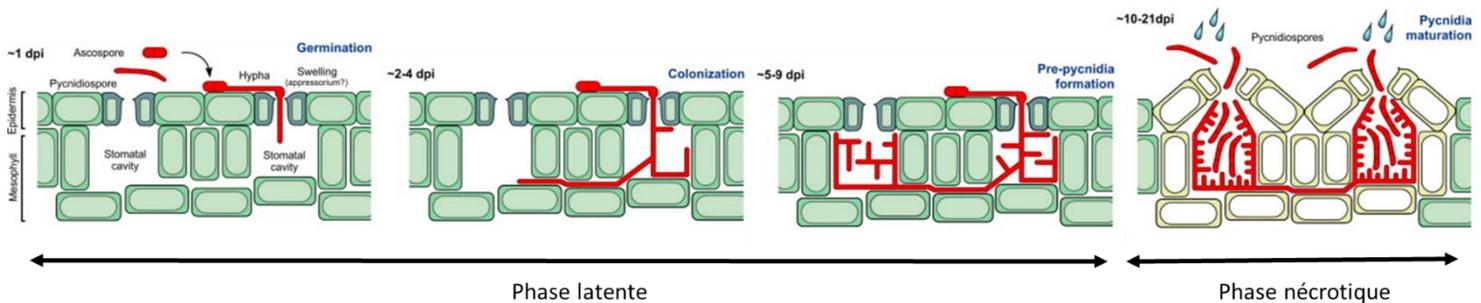


Figure 5.1: Résumé des différentes étapes d'infection de *Septoria* sp. (d'après Steinberg, 2015).

A l'échelle de la parcelle, les résidus de culture de l'année précédente peuvent être infectés et vont maintenir un inoculum fongique entre deux cycles de production, pendant la saison hivernale (Mehra *et al.*, 2015). Lors de l'augmentation des températures, les pycnides se développent à partir des résidus et produisent des conidies. Ces conidies sont dispersées par l'eau et elles vont infecter les feuilles les plus proches du sol par les éclaboussures dues à la pluie ou l'irrigation (Suffert *et al.*, 2011; Ficke *et al.*, 2017). Pendant la croissance de la stévia, l'agent fongique va se développer depuis les feuilles de la base jusqu'aux feuilles terminales (Koehler and Shew, 2018). Les conditions environnementales peuvent favoriser ou diminuer le développement de l'agent pathogène. L'humectation des feuilles (Chungu *et al.*, 2001), du fait de l'irrigation ou de la pluie, et une température entre 20 et 23°C (Kurt and Tok, 2006; Fones and Gurr, 2015) sont des facteurs favorisant le développement du champignon. Au contraire, des hivers froids, avec des températures en-dessous de 0°C, peuvent réduire la sévérité de l'épidémie pendant l'été (Suffert *et al.*, 2011). Les conditions de culture du Sud-Ouest de la France conviennent particulièrement bien au développement de la maladie, avec un climat océanique caractérisé par des hivers doux et des étés chauds et humides (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). De plus, *Stevia rebaudiana* est une plante pérenne pouvant être cultivée pendant 5 à 6 ans dans les conditions de l'Europe du Sud-Ouest (Andolfi *et al.*, 2006), qui est la plupart du temps irriguée par aspersion (Angelini *et al.*, 2018). Ces deux paramètres de la culture de la stévia tendent à maintenir un inoculum de septoriose pendant l'hiver et à favoriser une propagation rapide de la maladie. Le cycle de développement de l'agent pathogène de la septoriose sur stévia n'a pas été étudié. On peut cependant supposer qu'il doit être proche de celui du blé ou de la tomate.

Septoria spp sur stévia

La septoriose est la maladie foliaire la plus décrite sur *S. rebaudiana*. Elle est présente dans toutes les zones de productions et peut entraîner une défoliation totale des plants (Koehler and Shew, 2018). Les symptômes observés sont des tâches chloro-nécrotiques provoquées par le champignon pathogène *Septoria* sp. (Reeleder, 1999). Ces tâches peuvent se généraliser et dessécher complètement les feuilles. Le champignon pathogène a tout d'abord été décrit sur stévia au Japon (Ishiba, Yokoyama, *et al.*, 1982). Cette équipe l'a identifié comme *Septoria steviae* sans réaliser d'identification moléculaire. Par la suite, cet agent fongique a été observé aux Etats-Unis (Lovering, 1996), au Canada (Reeleder, 1999), en Inde (Bhandari and Harsh, 2006), au Paraguay (Sanabria and Fuente, 2013) et plus récemment en France (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Chez la stévia, seule la forme anamorphe a été décrite, *Septoria steviae* (Koehler and Shew, 2018).

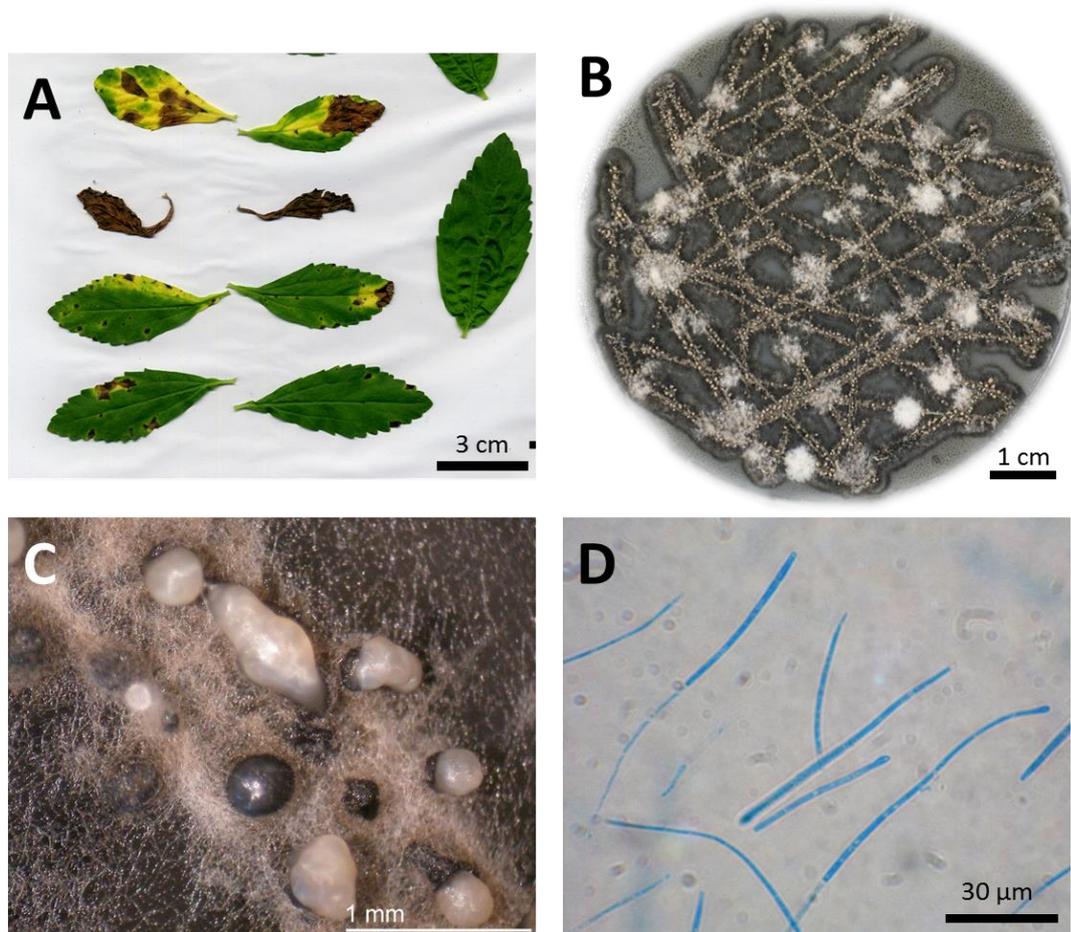


Figure 5.2: Présentation de la septoriose sur stévia. (A) Symptômes de nécroses et chloroses foliaires sur feuilles de stévia (B) Colonies cultivées sur milieu OAC, (C) pycnides (forme sphériques et noires) exsudant des cirrhes contenant des conidies, (D) conidies mise en suspension et colorées par bleu de méthylène.

L'origine de l'infection de la septoriose sur stévia n'est pas clairement établie. Plusieurs hypothèses ont été décrites. Hastoy, Le Bihan, *et al.*, (2019) évoquent la possibilité d'une adaptation de l'agent fongique à un nouvel hôte ; par exemple de la tomate à la stévia. Reeleder, (1999) suggère l'introduction commune de la septoriose avec son hôte lors des débuts de culture de stévia dans les pays occidentaux. Pour Hastoy, Le Bihan, *et al.*, (2019), l'observation de la septoriose sur stévia au Japon (Ishiba, Yokoyama, *et al.*, 1982) lors des premières introductions de stévia et l'actuelle répartition mondiale de *Septoria* sp. associée à la stévia confirmerait cette deuxième hypothèse.

5.3. Lutte contre *Septoria* sp.

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées pour contrôler la propagation de *Septoria* sp. L'application de certains fongicides est efficace. Koehler and Shew, (2018) ont montré que les molécules actives comme l'azoxystrobin, le chlorothalonil et le difénoconazole permettaient de maintenir le pourcentage de sévérité de la maladie sous un seuil de 5% de dommages. Cependant, les fongicides utilisés peuvent perdre leur efficacité avec l'émergence de souches résistantes, comme cela a pu être le cas pour le blé (Torriani *et al.*, 2009). De plus, dans le contexte d'une culture en agriculture biologique en Europe, l'utilisation des produits phytosanitaires de synthèse est interdite (Règlement (CE) 834/2007). Des produits phytosanitaires naturels comme le cuivre ou les agents de bio-contrôle sont autorisés, mais leur efficacité est limitée et ils peuvent entraîner de nouvelles problématiques, comme une accumulation dans les sols qui génère une phytotoxicité chez les légumes à feuilles (Chiou and Hsu, 2019). Des méthodes prophylactiques peuvent permettre de limiter le développement et la propagation du champignon. Le choix des techniques d'irrigation (goutte à goutte), la gestion des résidus de culture, et le choix d'allonger le cycle des rotations sont les méthodes principalement utilisées (Ficke *et al.*, 2017). Pour autant, les techniques de prophylaxie ne permettent pas toujours la même efficacité que les produits phytosanitaires utilisés en conventionnel. L'emploi de variétés exprimant de la résistance ou de la tolérance peut aussi être associé aux méthodes décrites précédemment permettant une nouvelle barrière au développement de l'agent pathogène sur la culture. Pour une production en agriculture biologique, la moindre efficacité de ces différentes méthodes de lutte par rapport aux méthodes conventionnelles nécessite la mise en œuvre de ces leviers à différentes échelles.

A ce jour, le trait de sensibilité à la septoriose a été peu étudié sur *Stevia rebaudiana*. Un phénotypage de la réponse de 13 génotypes de *Stevia rebaudiana* à une inoculation de *Septoria* sp. a été réalisé par Reeleder en 1999. Les plants testés ont été choisis parmi des lignées clonales d'un programme d'amélioration à Delhi et sont décrits comme issus d'accessions provenant d'Amérique du Sud. Cette étude a identifié une variabilité de réponses pour les différents génotypes, ainsi que deux génotypes sans symptôme ce qui signifierait l'existence d'une résistance totale. Cependant, les plantes ont été observées pendant 14 jours seulement après inoculation, ce qui suggère que l'apparition des symptômes pourrait simplement être repoussée chez certains génotypes. Une étude française a permis de classer 10 génotypes en collection à l'INRAE de Villenave d'Ornon selon leur réponse à une inoculation d'une souche de septoriose locale (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Le suivi de l'évolution des symptômes est réalisé pendant 21 jours après inoculation par des évaluations visuelles du pourcentage de symptômes et par analyses d'images. Cet essai a montré que la réponse de ces génotypes présente une grande variabilité allant de très sensible à très peu sensible, sans résistance totale cependant. Si ces premiers résultats sont prometteurs concernant la présence de tolérance ou de résistances partielles à la septoriose chez stévia, aucune n'a clairement été identifiée à ce jour.

Les mécanismes de sensibilité à la septoriose ont été plus étudiés, en particulier sur blé ou sur tomate, permettant d'identifier des sources de résistance. Chez le blé, des gènes de résistance majeurs, appelés les gènes *Stb*, permettent d'avoir une résistance totale. Aujourd'hui plus de 20 gènes de type *Stb* sont connus (Chartrain *et al.*, 2009; Tabib Ghaffary *et al.*, 2011; Tidd *et al.*, 2019). Le plus utilisé dans les schémas de sélection en Europe est le gène *Stb6*, identifié par Brading *et al.*, (2002). Il confère une résistance gène pour gène et protège les variétés des isolats portant l'allèle *AvrSrb6*. *Stb6* code pour une protéine de type WAK (wall-associated receptor kinase) qui détecte la présence d'un effecteur apoplastique (Saintenac *et al.*, 2018). *AvrStb6* code pour une petite protéine responsable du phénotype d'avirulence (Zhong *et al.*, 2017). Des protéines homologues n'ont pas pu être identifiées chez d'autres espèces de *Septoria*. Zhong *et al.*, (2017) supposent que la présence de *AvrStb6* active les mécanismes de défense des plantes exprimant *Stb6*. Cependant, cette catégorie de gènes de résistance qualitative peuvent se révéler peu durables dans le temps et le plus souvent très spécifiques d'une interaction hôte / isolat (Brown *et al.*, 2015). Les stratégies préconisées pour l'intégration et le maintien durable de résistances consistent souvent à réaliser un pyramidage des différents gènes de résistance unique (Chartrain *et al.*, 2004; Tabib Ghaffary *et al.*, 2011). De nombreux auteurs suggèrent de porter les efforts de recherche sur l'identification de gènes de résistances quantitatives à effets

additifs, et de les associer par pyramidage permettant de limiter les contournements de résistance, que ce soit sur le pathosystème septoriose-blé (Ghaffary *et al.*, 2018; Yates *et al.*, 2019), ou d'autres pathosystème (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Des résistances quantitatives ont d'ailleurs été identifiées par détection de QTL sur des populations biparentales ou des études GWAS (Brown *et al.*, 2015; Vagndorf *et al.*, 2017; Arraiano and Brown, 2017; Muqaddasi *et al.*, 2019). Ces résultats obtenus sur le blé suggèrent un potentiel prometteur pour l'identification de résistance chez stévia.

Chapitre 6. Amélioration génétique de *S. rebaudiana*

6.1. Le contexte de l'amélioration génétique chez *S. rebaudiana*

6.1.1. Un secteur organisé autour d'entreprises privées

Aujourd'hui, la recherche sur l'amélioration génétique de *S. rebaudiana* est principalement structurée autour de grandes multinationales : PureCircle ®, Pepsi Co, Coca-Cola ®, DSM, Evolva, Mc Neil Nutritionals, LLC, Suntory Holdings and Cargill ® (Tavarini *et al.*, 2018) ou des sélectionneurs privés comme S&W (Etats-Unis). Comme présenté paragraphe 2.2, ces entreprises se sont tournées vers les SG en raison du rejet de l'aspartame par les consommateurs. Pour maîtriser et développer la production des SG, ces entreprises ont entrepris des démarches filières, en s'impliquant depuis l'amélioration génétique et la production jusqu'à l'extraction et à l'utilisation des SG. Des efforts conséquents sur l'amélioration génétique de la stévia afin de produire des SG en plus grande quantité et de meilleure qualité ont donc été déployés. Cette stratégie a eu pour principale conséquence un développement des outils pour l'amélioration génétique de stévia mais sans publication des résultats scientifiques associés.

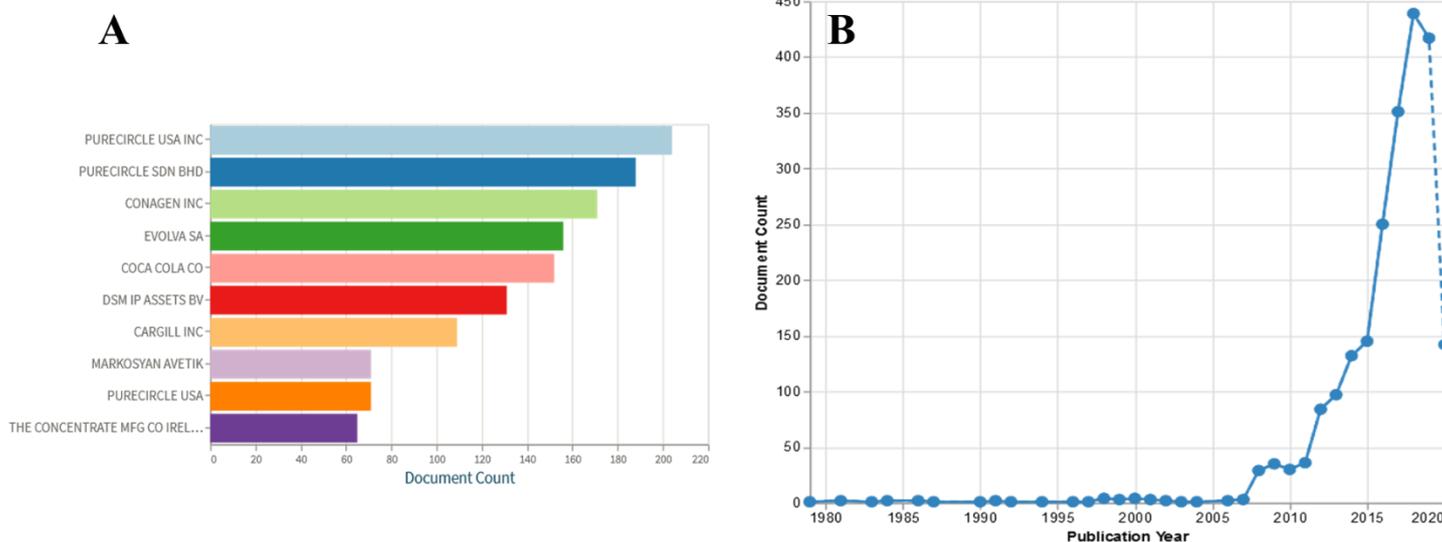


Figure 6.2.1 : (A) Liste des 10 structures ayant le plus déposé de brevets à propos de l'amélioration de la stévia et des modalités d'extraction des glycosides de stéviol, avec le nombre de brevets déposés par entreprises. (B) Nombre de brevets à propos de l'amélioration de la stévia et des modalités d'extraction des glycosides de stéviol déposés par années. Source : Lens.org, consulté le 27 août 2020.

6.1.2. Une recherche publique en sélection sur stévia encore confidentielle

Quelques équipes de recherche dans le monde travaillent sur l'amélioration de la stévia. Les premières équipes de recherche étudiant l'amélioration de stévia se sont développées au Japon et en Amérique du Sud, et ont principalement mis en œuvre des stratégies de sélection massale. En Amérique du Sud, les équipes de l'Instituto Paraguayo de Tecnologia Agraria (IPTA) au Paraguay travaillent au développement de la filière dans ce pays. En Argentine, c'est l'Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA) qui est en charge de la recherche sur la stévia. En Asie, la Chine travaille également sur l'amélioration de la stévia, mais les résultats ne sont pas accessibles car publiés en chinois, une importante partie de la recherche est conduite par des compagnies privées. En Inde, la recherche se divise également entre acteurs privés et publiques, avec quelques équipes travaillant sur la production agricole (Kamalakaran *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010), ou sur le développement d'outils moléculaires (Bhandawat *et al.*, 2015).

Ces programmes d'amélioration travaillent dans des conditions de culture de la stévia très différentes de celles existant en zones tempérées. En effet, les contraintes des itinéraires culturaux ne sont pas du tout les mêmes. En zones tempérées par exemple, la question de la survie à l'hiver est centrale. En zones chaudes la culture est souvent récoltée quatre fois, contre deux récoltes maximum en zones tempérées. Les objectifs et les critères de sélection peuvent varier et les plants sélectionnés en conditions tropicales ne sont donc pas toujours adaptés à un environnement tempéré. La culture de la stévia se développant dans ces nouveaux environnements, quelques équipes de recherche ont commencé à travailler sur ces questions. Aux Etats-Unis, l'équipe de Ryan Warner, Michigan State University, étudie les performances de la stévia dans les conditions locales, et développe un projet de sélection pour une production américaine. Todd Wehner a également constitué une équipe à la North Carolina University et travaille en collaboration avec PepsiCo, développant en particulier un axe de recherche sur la description et la lutte contre deux pathogènes : *Septoria* sp. et *Sclerotium rolfsii*. En Europe, les deux équipes françaises sont chacune en collaboration avec des entreprises privées : l'INRAE de Villenave d'Ornon, menée par Valérie Schurdi-Levraud, travaille avec Oviatis dont je fais partie, et Purpan Toulouse, menée par Monique Berger, travaille avec PepsiCo. Les thématiques de recherche de l'équipe de Toulouse sont orientées sur les besoins en fertilisation de la stévia et une meilleure compréhension de la voie de synthèse spécifique des SG. En Italie, l'équipe de Luciana Angelini (Université de Pise), est également très dynamique, et développe des axes de recherches sur l'agronomie et la pollinisation de la culture. Enfin en Belgique, Jan Geuns a lancé l'European Stevia Association, EUSTAS, il y a une dizaine d'années. Cette association,

plutôt orientée vers la biochimie, est à l'interface avec la santé humaine. Elle a permis la création d'une petite collection de ressources génétiques, ainsi que l'organisation de quelques congrès en Europe. A ce jour, l'association n'est plus active.

Finalement, la recherche sur l'amélioration génétique de *S. rebaudiana* est aujourd'hui principalement portée par le secteur privé, et la recherche publique sur le sujet est encore confidentielle, avec quelques équipes impliquées dans les différentes zones de production. Ce manque de recherche publique est problématique car le développement d'outils en amont, nécessaires à la sélection est rare et les connaissances développées par les industries privées ne sont pas accessibles. C'est pourquoi le matériel végétal disponible sur cette culture est soit des populations de graines dont l'origine est mal identifiée, soit des variétés protégées par un brevet, dont l'accès est limité.

6.1.3. La plupart des variétés de stévia sont protégées par un brevet ou des populations de graines peu identifiées

Le matériel végétal utilisé pour la production de stévia est principalement issu de croisements ouverts entre parents sélectionnés pour leurs performances agronomiques (Hastoy, 2018), ainsi que des variétés clonales et des variétés synthétiques. A ce jour, la plupart du matériel végétal n'est pas protégé. Quelques variétés issues de programmes de sélection font cependant l'objet d'un brevet, et certaines sont également inscrites dans un catalogue officiel en Amérique du Sud. A notre connaissance, aucune variété n'est inscrite en Europe. Le problème majeur de cette situation est le manque de traçabilité du matériel génétique de stévia vendu ou échangé.

Il est d'ailleurs souvent difficile de savoir quel matériel génétique est utilisé dans les études de phénotypage ou de diversité génétique sur stévia. Certaines équipes utilisent des noms correspondant au site de prélèvement ou au site de culture, d'autres des noms génériques comme « SugarLove », « Rebaudiana », « AX », « Candy » correspondant souvent à des lots de semences (Parris *et al.*, 2016; Munz *et al.*, 2018; Libik-Konieczny *et al.*, 2018). Ces noms génériques ne donnent aucune indication sur le fond génétique des ressources utilisées.

Les variétés qui sont plus communément retrouvées pour la production sont nommées « Criolla », « Morita », « Katupyry » et « Eirete » (Casaccia *et al.*, 2016). Les variétés Morita, clonale ou population, sont issues de plusieurs processus de sélection au Japon et sont caractérisées par une forte proportion en RebA (Boku *et al.*, 2000; Morita and Bu, 2000; Morita *et al.*, 2006, 2009). « Criolla », « Eirete » et « Katupyry » sont issues du travail de sélection réalisé au Paraguay, adaptées aux conditions de production locales. « Criolla » est la « variété » la plus ancienne, et a des performances plutôt faibles, avec un rendement en dessous de la

moyenne, à 1200 kg/ha et un ratio RebA/ST plutôt faible (Casaccia *et al.*, 2016). Cependant, cette « variété » est propagée par semis et est constituée d'un mélange de génotypes de morphologies et phénologies différentes. « Eirete » (IAN/VC-142) est la première variété clonale paraguayenne et a été développée par l'Instituto Agronomico Nacional (IAN). Elle est enregistrée au Registro Nacional de Cultivares Protegidos du Paraguay (RNCP). Elle se multiplie par bouturage, ce qui lui donne l'avantage d'être plus uniforme au champ, avec un bon rendement en biomasse, atteignant 3500kg/ha, et une teneur de SG allant jusqu'à 22% w/w, dont 10% de RebA. Enfin, « Katupyry » (KH-IAN VC 135), variété clonale aussi, a été sélectionnée par l'IAN par sélection massale et est également enregistré au RNCP. Sa multiplication se fait donc par bouturage. Elle est qualifiée de rustique, et peu sensible aux maladies fongiques, au sclérotium et à la septoriose, aux périodes de stress hydriques et à la faible fertilisation. Son rendement en feuilles est très élevé, allant jusqu'à 4000 kg/ha et son profil en SG est équivalent à celui de « Eirete ».

Cependant, la traçabilité de ce matériel génétique n'est pas assurée car aujourd'hui ces noms sont utilisés pour vendre des lots de semences, ne garantissant pas des comportements similaires à ceux décrits précédemment (Hastoy, 2018). Chez Stevia Store par exemple, des lots de semences nommés « Eirete I », « Eirete II » ou « Katupyry » sont proposés à la vente. De même, que « Morita II » et « Morita III » sont vendues pour une forte proportion en RebA, plus de 50% du profil en SG (Stevia Store, 2018).

Au niveau Européen, il existe l'European Stevia Association (EUSTAS) qui référence 6 génotypes : « C », « D », « E », « F », « Gawi » et « K » (Lankes and Grosser, 2015). Le clone « Gawi » a été sélectionné pour son adaptation au climat tempéré (Lankes and Zabala, 2011) et « C » pour sa teneur en RebA (Lankes and Grosser, 2015).

Certaines variétés sont protégées par un brevet national ou international, comme présenté dans le tableau 6.1.3. La plupart de ces dépôts de brevets ont été réalisés par des entreprises privées.

Tableau 6.1.3: Liste des brevets déposés sur les variétés de *S. rebaudiana* depuis 1998, (adapté d'après Hastoy, 2018).

Cessionnaire	Pays	Brevet	Nom variété	Propriétés	Type de variétés	Inventeurs
Cargil Inc	USA	EP2966990A1	ATCC accession SC0419 x SC0435 Tent 1 SC0422 x SC0312 Tent 2	Forte teneur en RebD (0,5 – %w/w) Reb1 > 4%w/w et <15%w/w RebM + RebE+RebN > 0.5 %w/w	Clone / Reproduction sexuée	(Brower <i>et al.</i> , 2016)
GLC Life Tech Corporation	Canada	US20160338396A1	-	Forte teneur en RebA (7-20 %w/w) Forte teneur en SG totaux (15-28 %w/w)	Clone / Reproduction sexuée	(Wang, 2016)
	Canada	US20170290285A1	-	Forte teneur en RebC (3-8 %w/w) Forte teneur en SG totaux (10-13 %w/w)	Clone / Reproduction sexuée	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
	Canada	US20180042280A1	-	Forte teneur en RebA (6-20 %w/w) Forte teneur en SG totaux (15-28 %w/w)	Clone / Reproduction sexuée	(Wang, ZHANG, <i>et al.</i> , 2016)

Lommerse Holding BV	USA	USPP29009P2	STEVILOMM	Vigueur de croissance Tolérance au froid Tolérance à la chaleur Forte concentration en SG (Clone	(Lommerse, 2018)
	USA	USPP30361P2	LOSTE1517 Issu de 3662/1 x 3668/12	Tolérance au froid Architecture compacte Forte concentration en SG (>10% w/w)	Clone	(Lommerse, 2019)
Minister of Agriculture and Agri-Food Canada	Canada	US6255557B1	AC Black Bird	Forte teneur en SG (> 14 %w/w) Fort ratio RebA/ST (<9.1)	Cultivar synthétique	(Brandle, 2001)
Morita Kagaku Kogyo C., Ltd	Japon	US6031157A	ATCC Accession No PTA-444 (SF-6)	Fort ratio RebA/ST (<2.56)	Reproduction sexuée	(Morita and Bu, 2000)
	Japon	EP1856967A1	Morita variety No FERM BP-10353	Fort ratio RebA/ST (> 4) Résistance contre <i>Septoria</i> sp et <i>Alternaria</i> sp	Reproduction sexuée	(Morita <i>et al.</i> , 2006)
	Japon	WO2009/093610	F1ST No FERM BP-10870	Faible teneur en RebA (<1 %w/w)	Reproduction sexuée	(Morita <i>et al.</i> , 2009)
Pure Circle	Malaisie	USPP23164P3	AKHL1	Floraison tardive	Clone	(Britos, 2012)

Sdn Bhd				<p>Forte production de biomasse (4.5t sur 3 récoltes)</p> <p>Forte teneur en RebA (11.5 %w/w ; 89% / SG totaux)</p> <p>Résistance aux maladies foliaires</p>		
	Malaisie	US 2012/0090063	AKHL4	<p>Floraison précoce</p> <p>Forte production en biomasse (4.5 t sur 3 récoltes)</p> <p>Forte teneur en RebA (11.5 %w/w ; 89% / SG totaux)</p> <p>Résistance aux maladies foliaires</p>	Clone	(Britos, 2013)
PureCircle	Malaisie	US20170283819A1	-	Forte teneur en RebD (0,6-3,3% w/w) Forte teneur en RebM (0,5-1,15 % w/w)	Clone / Reproduction sexuée	(Markosyan <i>et al.</i> , 2017)
	Chine	US 9668450 B2	817096 CGMCC No. 9703	Forte teneur en RebD (3,25 % w/w)	Clone / Reproduction sexuée	(Li, Bu, <i>et al.</i> , 2017a)

	Chine	US 9675015 B2	807086 CGMCC No. 9702	Forte teneur en RebD (1,55 % w/w), RebM (1,0 % w/w) 2,7 T/ha de feuilles sèches	Clone / Reproduction sexuée	(Li, Bu, <i>et al.</i> , 2017b)
	Chine	US 9668451B2	814011 CGMCC No. 9701	Forte teneur en RebA (8,45 % w/w), RebD (1,11 % w/w), RebM (1,12 % w/w) 1,5 T/ha de feuilles sèches	Clone / Reproduction sexuée	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	Malaisie	US20180070553A1	314018 CGMCC No. 11712 16139002 CGMCC No. 11697	Identification de génotypes auto-compatibles et obtention d'une descendance	Clone / Reproduction sexuée	(Markosyan <i>et al.</i> , 2018)
Royal Sweet International Technologies Ltd. Part.	Canada	USPP10564P	RSIT 94-751	Forte teneur en RebA (11.6 % w/w)	Clone	(Marsolais <i>et al.</i> , 1998)
	Canada	USPP10562P	RSIT 94 1306	Forte teneur en ST (14 % w/w)	Clone	(Sys <i>et al.</i> , 1998)
	Canada	USPP10563	RSIT 95-166-13	Forte teneur en RebC (14 % w/w)	Clone	(Brandle, Sys, <i>et al.</i> , 1998)
S&W Seed Company	USA	US 2017/0142885 P1	SW 129	Forte vigueur Rendement en biomasse foliaire de 2,3 T/ha Forte teneur en SGs totaux (17,5 % w/w)	Clone	(Shock and Parris, 2017c)

				Forte teneur en RebA (77 %/SGs totaux) Floraison tardive		
	USA	USPP27937P3	SW 107	Forte vigueur Rendement en biomasse foliaire de 2 T/ha Forte teneur en SGs totaux (16,9 % w/w) Forte teneur en RebA (62 %/SGs totaux) Excellent survie à l'hiver	Clone	(Shock and Parris, 2017b)
	USA	US 2017/0290225 P1	SW 227	Forte vigueur Rendement en biomasse foliaire de 5,5 T/ha Forte teneur en RebA (10,7 % w/w ; 80,4 % / SGs totaux)	Clone	(Shock and Parris, 2018)
	USA	USPP27815P3	SW 201	Floraison tardive Forte teneur en SG (>18% w/w) Forte teneur en RebA (11% w/w) et 60% / SG totaux Bonne survie à l'hiver	Clone	(Shock and Parris, 2017a)

Sweet Green Field Holdings LLC	USA	US PP22, 593 P3	T60	<p>Forte teneur en RebA (> 12%w/w; < 82% / SG totaux)</p> <p>Résistance sécheresse, sols argileux</p> <p>Résistance contre <i>Fusarium</i> sp, <i>Sclerotinia</i> sp.</p>	Multiplication végétative	(Garnighian, 2012)
--------------------------------	-----	-----------------	-----	---	---------------------------	--------------------

6.2. La sélection de *S. rebaudiana* cumule les contraintes

L'amélioration génétique des plantes a pour objectif de répondre à la demande humaine en orientant et/ou en augmentant les performances d'une culture agronomique. Les caractères retenus peuvent être extrêmement variés selon les usages de l'espèce concernée. Les caractères liés à la quantité et qualité du rendement, et la réponse aux changements environnementaux biotiques, comme la pression des ravageurs ou abiotiques restent majeurs. Afin d'atteindre cet objectif, le sélectionneur cherche à optimiser la valeur d'un ou de plusieurs caractères d'intérêt grâce à la variabilité génétique naturellement présente dans l'espèce qu'il étudie et la combinaison d'allèles ou par des variabilités induites de façon aléatoire ou ciblée.

6.2.1. Des contraintes liées à la pérennité de la culture et à l'auto-incompatibilité

De nombreuses contraintes doivent être prises en compte pour l'amélioration des plantes pérennes, car elles limitent les stratégies pouvant être mises en œuvre sur ces cultures. Encore plus que pour les cultures annuelles, les cycles de sélection des cultures pérennes sont extrêmement longs car ils nécessitent l'évaluation phénotypique des ressources génétiques et des descendances pendant plusieurs cycles de production (McClure *et al.*, 2014). Par ailleurs, chez certaines espèces, le phénotypage ne peut être réalisé qu'après le stade juvénile. Des dizaines d'années sont parfois nécessaires pour produire des descendances et évaluer leurs phénotypes sur les traits d'intérêts agronomiques. Par exemple la maturité est atteinte après 2 à 3 années de production chez les pêchers (Desnoues, 2015) alors qu'il faut attendre 8 à 9 ans chez les avocatiers (García Vázquez, 2019). Il est difficile de se passer de l'évaluation au stade adulte car il y a souvent une forte variabilité phénotypique entre le stade juvénile et le stade adulte, et des grandes variations dans l'héritabilité sont observées entre ces stades (Kainer *et al.*, 2015).

La mise en place de programmes d'amélioration sur des plantes pérennes engendre également de nombreux coûts financiers car elle nécessite le suivi d'un grand nombre de plants pendant plusieurs années (Kainer *et al.*, 2015). En plus du coût financier de la mise en place du design expérimental, l'évaluation du phénotype des descendances est très chronophage et requière de grandes infrastructures (McClure *et al.*, 2014). Une production des descendants en pépinière avant l'implantation est nécessaire, ensuite leurs évaluations phénotypiques sont souvent longues à réaliser. De plus, l'évaluation phénotypique peut passer par la destruction du plant, en particulier pour évaluer le rendement en biomasse (Kainer *et al.*, 2015).

De plus, certaines plantes pérennes rencontrent des problèmes de dépression de consanguinité en particulier lorsque leur mode de reproduction est l'autogamie (McClure *et al.*, 2014).

Les cultures pérennes sont assez peu améliorées, et certains des cultivars commercialisés sont issus de ce que certains auteurs nomment les « chance seedlings » (McClure *et al.*, 2014), qui sont propagées sous la forme de variété clonale. C'est en effet le cas de la variété d'avocat « Hass » qui représente 90% de la production mondiale aujourd'hui (Talavera *et al.*, 2019) ou de plusieurs cultivars de mangue (Krishna and Singh, 2007). Ces deux constats expliquent pourquoi la diversité des cultivars élités est si restreinte chez les cultures pérennes.

A cela s'ajoute des contraintes communes aux cultures annuelles et pérennes mais qui sont accentuées par le caractère pérenne des plants étudiés. L'existence de corrélations génétiques entre deux traits d'intérêt peut affecter la précision et l'importance des gains génétiques obtenus pour des sélections sur traits multiples, ce qui peut conduire à une sélection artificielle (Kainer *et al.*, 2015). L'étude des traits complexes, comme la production de biomasse foliaire, est délicate car ces traits sont souvent contrôlés par un grand nombre d'allèles différents ayant tous un effet faible sur la variabilité du trait. L'étude de ces traits requiert des analyses sur un grand nombre de croisements contrôlés, pour détecter ces différents loci (Kainer *et al.*, 2015), or la production et l'évaluation d'un grand nombre de descendants peut être limitée.

Enfin, le mode de reproduction allogame stricte de certaines plantes pérennes, dont la stévia, est également une contrainte pour l'amélioration génétique de ces cultures. Le type de descendances pouvant être produit est limité. En effet, il n'est pas possible de réaliser d'autofécondation pour l'obtention de plants homozygotes. Les descendances utilisées sont souvent des F1, des populations bi-parentales de pleins frères, ou des populations issues de rétrocroisements (Nduwumuremyi *et al.*, 2013). Ce type de population a été utilisé pour améliorer l'épinette noire (Lenz *et al.*, 2017), la mangue (Maia *et al.*, 2016) ainsi que de la noix de macadamia (Topp *et al.*, 2019). Des populations de type polycross peuvent aussi être utilisées, elles sont issues des croisements dans un groupe de cultivars et constituées de demi-frères (Stoskopf *et al.*, 2019). C'est la stratégie mise en œuvre pour l'amélioration de la mûre par exemple (Vijayan *et al.*, 2018). Cette stratégie est une des étapes du développement des variétés synthétiques et convient bien aux plantes allogames strictes, permettant une alternative aux variétés clonales propagées végétativement (Nduwumuremyi *et al.*, 2013).

Enfin, la production et l'évaluation d'un grand nombre de populations étant limitées, il est rare d'avoir des designs diallèles (c'est-à-dire des populations issues de tous les croisements

possibles entre un set de géniteurs) qui sont pourtant les designs permettant d'obtenir plus d'informations sur les parents (Nduwururemyi *et al.*, 2013).

S. rebaudiana concentre la plupart de ces contraintes. C'est une plante pérenne, parfois qualifiée de « semi-pérenne » (Barbet-Massin *et al.*, 2016), du fait de son maintien entre 5 et 6 ans sur une même parcelle, en conditions de cultures tempérées. La durée d'évaluation phénotypique est donc moins longue que pour la plupart des cultures pérennes. De plus, la stévia produit des fleurs et des graines dès la première année de culture, permettant de produire une descendance plus précocement que chez la plupart des cultures pérennes. Aucune littérature n'a comparé la fertilité des plants de stévia selon leur âge. C'est une espèce allogame stricte. Le taux de germination des graines peut être très variable, des taux allant de 17,3 à 97,3% ont été mesurés par Martini *et al.*, (2017), mais il est généralement faible (Yadav *et al.*, 2011 ; Angelini *et al.*, 2018).

Aux contraintes liées à la pérennité et au mode de reproduction allogame de la stévia s'ajoutent des contraintes supplémentaires majeures qui sont spécifiques au contexte de l'amélioration génétique de la stévia. C'est une culture qualifiée d'orpheline, c'est-à-dire que peu d'outils génétiques ou de phénotypage ont été développés sur cette culture, et son mode de culture est très éloigné des Astéracées les plus étudiées, comme le tournesol ou la laitue, ce qui ne permet pas de s'appuyer sur les connaissances développées sur ces autres cultures de la même famille. Les ressources génétiques ne sont ni rassemblées, ni identifiées et le manque de traçabilité ne permet pas de comparer les évaluations phénotypiques sur cette culture. La seule collection européenne de stévia, de l'EUSTAS ne comprend que 8 génotypes. Enfin, les outils génétiques sont principalement développés par des privés et rarement accessibles car non publiés.

6.2.2. Des contraintes liées au manque de caractérisation de la diversité génétique de *S. rebaudiana* dans le monde

La diversité génétique de *S. rebaudiana* est globalement mal caractérisée. Ce phénomène est tout d'abord la conséquence d'un problème de traçabilité des ressources génétiques qui circulent dans le monde. De plus, la stévia est peu pourvue en outils moléculaires permettant de décrire son génome. Enfin, l'expansion de la culture de la stévia et les échanges de plants / semences ont été peu encadrés au niveau législatif.

Quelques études ont utilisé des marqueurs moléculaires pour caractériser la diversité génétique de la stévia, mais la plupart ont été réalisées sur un faible nombre d'individus, souvent sélectionnés localement. C'est le cas pour les études conduites en Inde (Bhandawat *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015), dans lesquelles 40 individus du CSIR Institute et 12 génotypes locaux ont été caractérisés.

L'étude de Cosson *et al.*, (2019) est à ce jour celle qui a caractérisé le panel le plus important pour la diversité génétique de stévia, permettant de caractériser 145 génotypes : dont 114 génotypes cultivés et 31 génotypes sauvages. Comme présenté dans le tableau 6.5.1, les génotypes cultivés proviennent de différentes zones de production, et ont principalement été obtenus par lots de semences. Les génotypes sauvages proviennent de différentes provinces du Nord de l'Argentine et appartiennent à la collection de l'INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Enfin, les deux génotypes provenant de Cuba sont issus de la collection du New York Botanical Garden Herbarium et ont été collectés en 1927 et 1931, soit avant l'introduction de la stévia au Japon.

Tableau 6.2.2 : Origine et type de matériel caractérisé dans l'étude de Cosson *et al.*, (2019).

Identification	Type de matériel	Origine
Cult_CAN	Génotypes cultivés	Canada
Cult_CHI	Génotypes cultivés	Chine
Cult_FRA	Génotypes cultivés	France
Cult_GER	Génotypes cultivés	Allemagne
Cult_ISR	Génotypes cultivés	Israël
Cult_NET	Génotypes cultivés	Pays-Bas
Cult_SPA	Génotypes cultivés	Espagne
Lr_FOR	Génotypes sauvages	Argentine
Lr_JUJ	Génotypes sauvages	Argentine
Lr_MIS	Génotypes sauvages	Argentine
Lr_TUC	Génotypes sauvages	Argentine
Lr_CUB	Génotypes sauvages	Cuba

Dans cette analyse, les auteurs identifient 3 clusters génétiques, le premier et le troisième clusters sont principalement constitués de génotypes cultivés, alors que le cluster 2 regroupe des génotypes sauvages. Le cluster 1 est composé de génotypes d'origine très variées : Canada, Allemagne et Israël. D'après les auteurs, il est caractéristique des nombreux échanges et ventes de lots de semences de stévia partout dans le monde. Le génotype utilisé pour caractériser ce groupe est « Gawi » issu de la collection de l'EUSTAS en Allemagne. Le cluster 3 regroupe également des génotypes cultivés, dont certains issus de lots de semences vendus sous le nom « Criolla ». Enfin, le cluster 2 regroupe tous les génotypes sauvages provenant d'Argentine et de Cuba ainsi que certains génotypes cultivés connus comme les variétés les plus anciennement sélectionnées, et largement diffusées dans le monde : « EireteI » « EireteII » ou encore « MoritaIII ». Ce cluster présente également des cultivars appartenant à la collection de l'EUSTAS.

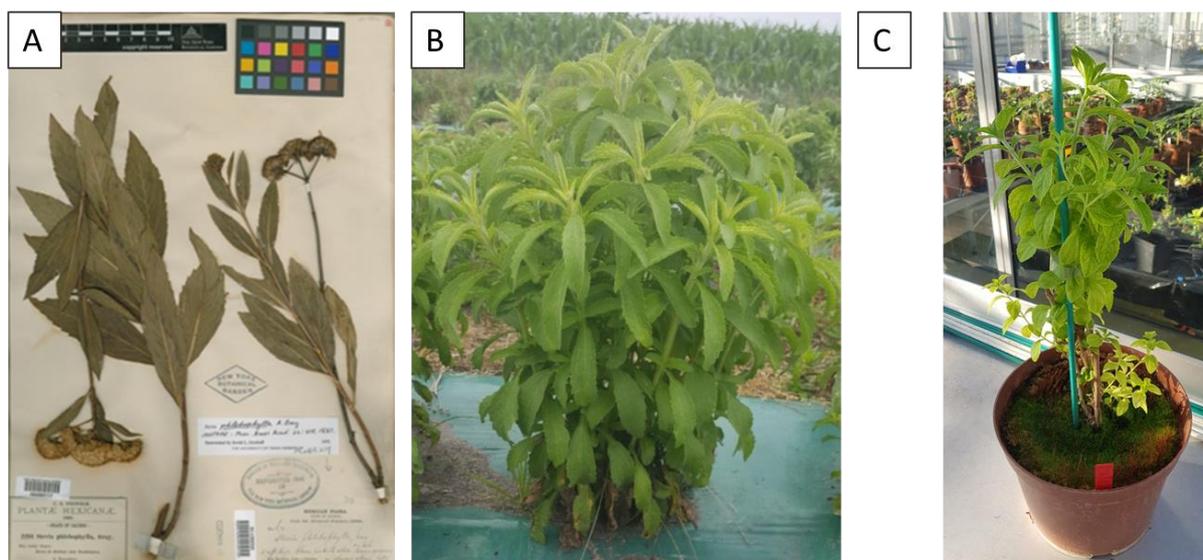


Figure 6.2.2 : Ressources génétiques caractérisant les différents clusters génétiques de l'article de Cosson *et al.*, (2019). (A) Génotypes sauvages collectés au New York Botanical Garden de Cuba, (B) Génotype « Gawi » faisant partie de la collection EUSATS (Crédit photo : Cécile Hastoy), (C) Génotype du type « Criolla » faisant partie de la collection de l'INRAE de Villenave d'Ornon (Crédit photo : Léa Nice).

Les individus du cluster 2 se différencient légèrement des autres clusters par une meilleure composition en glycosides de stéviol, avec un profil plus sucré que les individus des autres clusters.

La législation sur les échanges des ressources génétiques de stévia est en pleine évolution. Depuis 2016, un collectif d'Indiens Guaranis, des territoires Pai Tavytera et Kaiowa, localisés à la frontière entre le Paraguay et le Brésil, s'organisent pour faire reconnaître leurs droits en tant que détenteurs des connaissances traditionnelles sur *S. rebaudiana*. Ils s'appuient la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), adoptée le 22 mai 1992 et entrée en vigueur le 29 décembre 1993, qui aide à la réglementation des échanges de ressources génétiques et des connaissances traditionnelles qui y sont associées, pouvant être utilisées à des fins commerciales ou de recherches (Glowka *et al.*, 1996).

L'Accès et le Partage des Avantages (APA) a pour objectif de partager de manière juste et équitable les avantages issus de l'accès et de l'utilisation d'une ressource, entre les utilisateurs de cette ressource et ses fournisseurs. Cependant, l'APA est difficile à mettre en œuvre car de nombreux pays n'ont pas légiféré sur ce point, et ne possèdent pas les structures adaptées pour traiter ces demandes. En 2012, le Protocole de Nagoya a permis de compléter la CDB en intégrant des mesures plus précises et contraignantes au niveau juridique. L'accès à une

ressource génétique passe par une demande aux fournisseurs des ressources, et conditionné par un accord entre le fournisseur et l'utilisateur. Les Etats ayant ratifié le Protocole de Nagoya doivent mettre en place des protocoles clairs de demande d'accès à la ressource, permettant la mise en place des accords (Buck and Hamilton, 2011).

En s'appuyant sur le Protocole de Nagoya et la CDB, le collectif des Indiens Guarani dénoncent une « usurpation de [leurs] savoirs et de la biodiversité par les multinationales » et demandent un partage des avantages, comme cela est spécifié dans les deux textes cités. Cependant, si le Brésil et le Paraguay ont tous deux signé la CDB, seul le Brésil a ratifié le Protocole de Nagoya. Les obligations sur les APA n'étant pas légiférées au Paraguay, il en résulte un flou juridique n'obligeant pas les entreprises à l'APA. En 2017, une négociation a été lancée entre le collectif des Guaranis et des multinationales utilisant des ressources génétiques de stévia et pouvoir sucrant des SG. Une partie de ces entreprises, comme Coca-Cola, refuse cependant de participer aux discussions.

6.2.3. Des contraintes liées à un manque d'information génomique disponibles sur stévia

6.2.3.1. Description du génome

La stévia est une espèce diploïde ($2n=22$) (Frederico *et al.*, 1996) dont la taille du génome est estimée à $1C=1330$ Mbp (Yadav *et al.*, 2014), ce qui correspond à environ 10 fois le génome d'*A. thaliana*. Des génotypes triploïdes ($2n=33$) et tétraploïdes ($2n=44$) ont déjà été observés, résultant de malformations des gamètes (Yadav *et al.*, 2011). Dans le genre *Stevia*, le nombre de chromosomes le plus commun est $x=11$ (Frederico *et al.*, 1996), mais les espèces *S. jujuyensis*, *S. organensis* et *S. lucida* sont à $x=12$ (Coleman, 1968 ; Galiano, 1987 ; Galiano and Hunziker, 1987). Son génome est très hétérozygote, ce qui est souvent le cas chez les espèces auto-incompatibles. Elle est souvent qualifiée d'espèce « orpheline » du fait des faibles connaissances disponibles, que ce soit en agronomie ou en génétique. Si *S. rebaudiana* fait partie de la famille des *Asteraceae*, il est difficile de s'appuyer sur les cultures plus connues et étudiées de cette famille, la plupart n'étant pas cultivée pour les mêmes aspects, comme le tournesol, dont la partie récoltée est la fleur.

6.2.3.2. Données de séquençage

A partir des années 2000, des premières informations de séquençage commencent à être disponibles sur stévia. (Brandle *et al.*, 2002), publie le séquençage d'une librairie d'ADNc de 5548 Expressed Sequence Tag (EST) issus de feuilles de stévia sur NCBI. L'objectif de ce séquençage était d'élucider la voie de synthèse des SG. Le matériel génétique utilisé pour ce séquençage n'est pas précisé dans l'étude. En 2014, le projet American Compositae Genome permet le séquençage et la publication de séquences d'EST, issues d'un transcriptome de 15 espèces de Compositae, comprenant des espèces cultivées comme l'endive (*Cichorium endivia*) et sauvages comme le sumpweed (*Iva annua*) (Hodgins *et al.*, 2014). Cette étude a permis de produire pour *S. rebaudiana* 150 258 séquences d'EST, disponibles sur les bases de données. Le génome d'un cultivar de stévia a été séquençé par un consortium entre PureCircle®, Coca-Cola® et Keygene® (Schauer *et al.*, 2017), mais les séquences n'ont pas été publiées. L'équipe américaine dirigée par Ryan Warner, Michigan State University, travaille également sur la publication du génome de stévia, et souhaite la publier début 2021. En janvier 2020, le premier génome de la stévia a été publié uniquement sur la base de données NCBI (GenBank : GCA_009936405.1) par la société Iridian Genomes (O'Neill and Pirro, 2020). Le génotype séquençé se nomme VGN1BUR7E3.

6.2.3.3. Peu d'outils de description de la diversité génétique chez *S. rebaudiana*

Les quelques outils moléculaires développés sur stévia sont présentés dans le Tableau 6.2.3.3. Un set de 183 marqueurs RAPD a été développé sur une population de 100 individus (Yao *et al.*, 1999). Par la suite, 20 marqueurs RAPD sont utilisés pour caractériser la diversité de 11 accessions collectées en Inde, permettant l'identification de 2 clusters génétiques (Chester *et al.*, 2013). Enfin, (Abdelsalam *et al.*, 2016), a développé 8 RAPD sur 19 accessions identifiant également 2 clusters génétiques, l'origine des accessions n'est pas précisée dans l'étude. Des marqueurs ISSR ont également été développés sur stévia, (Heikal *et al.*, 2008) en développant 7 pour caractériser 6 accessions. Sharma *et al.*, (2016) présentent le développement de 26 ISSR et 21 RADP sur 16 accessions locales (Inde). Enfin, un article de 2020 fait état du développement de 10 RAPD sur 10 génotypes de stévia provenant d'Afrique, d'Europe et d'Asie (Dyduch-Siemińska *et al.*, 2020).

L'usage des RAPD et des ISSR est certes facile et peu coûteux, mais ce sont des outils très peu reproductibles (Schulman, 2007). Leur usage pour caractériser la diversité génétique de stévia est donc peu intéressant.

Bhandawat *et al.*, (2015) et Kaur *et al.*, (2015) publient les premières études sur le développement de marqueurs SSR sur stévia basée sur les données de séquençage publiées par Brandle *et al.*, (2002). Cela a permis le développement de 17 et 52 SSR, permettant de caractériser la diversité au sein de 40 génotypes issus du CSIR Institute en Inde, ainsi que 12 génotypes du nord de l'Inde. En 2019, les 150 258 séquences d'EST de stévia publiées dans l'American Compositae Genome (Hodgins *et al.*, 2014) sont utilisées pour le développement de 80 marqueurs (Cosson *et al.*, données non publiées). 18 de ces marqueurs SSR serviront à caractériser la diversité génétique de 145 génotypes de stévia, comprenant des cultivars et des plants peu domestiqués (Cosson *et al.*, 2019).

Une analyse RNA-Seq a permis l'identification de 10 070 SSR et 44150 SNP, cependant ces marqueurs n'ont pas été validés au niveau biologique et ne sont pas publiés (Chen *et al.*, 2014). Des données de séquençage aurait permis à PureCircle ® d'identifier 7 824 613 marqueurs SNP, ils ne sont cependant pas accessibles (Markosyan *et al.*, 2017). En 2020, 761 marqueurs SNP candidats ont été identifiés sur stévia avec une approche dd-RADseq et une validation bio-informatique. Une validation biologique sur MassArray a permis de valider un set de 436 SNP (données non publiées, Brière *et al.*).

Tableau 6.2.3.3. : Présentation du type de marqueurs développés sur *Stevia rebaudiana*, leur nombre testés et développés.

Type de marqueurs	Nombre de marqueurs testés	Nombre de marqueurs développés	Nombre d'individus testés	Auteurs
RAPD	700	183	100	Yao <i>et al.</i> , 1999
	20	20	11	Chester <i>et al.</i> , 2013
	8	8	19	Abdelsalam <i>et al.</i> , 2016
	27	21	16	Sharma <i>et al.</i> , 2016
ISSR	7	7	6	Heikal <i>et al.</i> , 2008
	26	23	16	Sharma <i>et al.</i> , 2016
	11	11	75	Luz <i>et al.</i> , 2020
SSR	107	52	40	Bhandawat <i>et al.</i> , 2014
	10 070	–	–	Chen <i>et al.</i> , 2014
	168	18	12	Kaur <i>et al.</i> , 2015
	1060	18	145	Cosson <i>et al.</i> , 2019
SNP	44 510	–	–	Chen <i>et al.</i> , 2014
	7 824 613	48	–	Markosyan <i>et al.</i> , 2017
	761	436	11	Bière <i>et al.</i> , données non publiées

6.2.3.4. Une première carte génétique de la stévia incomplète (Yao *et al.*, 1999)

Un groupe de 183 marqueurs RAPD a été utilisé pour construire la première carte génétique sur stévia en 1999 (Yao *et al.*, 1999). Cette carte a été développée sur une population F1 de 100 individus, mais dont les parents ne sont pas caractérisés. Les marqueurs sont identifiés sur 21 groupes de liaisons différents avec une distance moyenne de 7,6 cM entre deux marqueurs adjacents. Cette carte n'est pas saturée et sa résolution ne permet pas une détection de QTL chez *S. rebaudiana*. Aucune évaluation phénotypique n'est présentée dans cette étude, ce qui ne permet pas de connaître le ou les traits qui étaient ciblés par l'analyse.

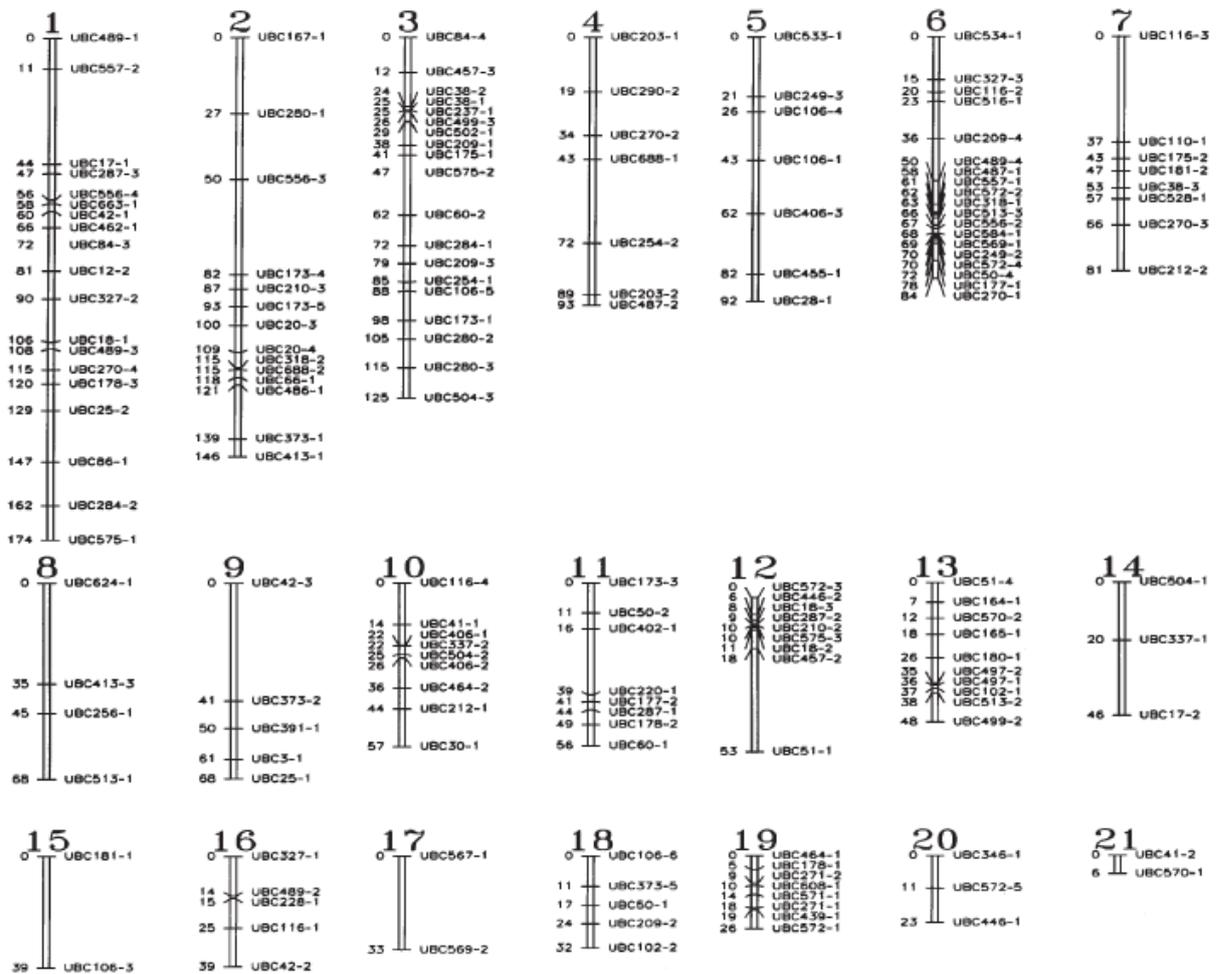


Figure 6.2.3.4. : Première carte génétique développée sur *S. rebaudiana* avec des marqueurs RAPD (Yao *et al.*, 1999).

6.3. Sélectionner la stévia : sur quels caractères ?

6.3.1. Caractères des composants du rendement en glycosides de stéviol : la biomasse foliaire et la production en SG

Dans un contexte de production agricole, l'augmentation du rendement en glycosides de stéviol a été le premier critère de sélection pour l'amélioration de *S. rebaudiana*. Aujourd'hui encore, c'est un objectif majeur de la sélection, et ce sont les différents composants du rendement qui sont ciblés. Tout d'abord, il y a un objectif d'augmentation de la biomasse foliaire, car c'est le facteur principal influant sur la variation du rendement en SG, (paragraphe 4.6), mais des objectifs d'augmentation de la teneur en SG dans les feuilles et de l'amélioration du profil des SG présents sont également affichés.

6.3.1.1. Biomasse foliaire : objectif d'augmentation du rendement

Une sélection sur la biomasse foliaire a été réalisée de façon très précoce sur stévia, sous forme de sélection massale. En effet, la hauteur des tiges à l'état sauvage est comprise entre 30 et 50 cm alors qu'à l'état cultivé les plants peuvent croître jusqu'à 140 cm (Soejarto, 2002), permettant une augmentation de la biomasse foliaire.

Tavarini, (2018) expose les critères de sélection actuels sur la biomasse. Pour l'auteur, l'objectif principal est l'augmentation de la biomasse foliaire produite par unité de surface. Cela doit passer par une architecture du plant qu'il qualifie de compacte, avec des branches ramifiées et dirigées vers le haut. Il suggère également qu'une faible longueur d'entrenœuds va permettre de densifier la production foliaire, avec des feuilles orientées vers le haut. Ces critères vont dans le sens des résultats de Hastoy, (2018), qui a démontré que la hauteur des plants n'est pas un facteur de variabilité de la biomasse.

Dans la littérature, l'amélioration du ratio feuilles/tiges, également décrit comme le Leaf Mass Ratio, est citée à plusieurs reprises comme critère de sélection (Barbet-Massin *et al.*, 2015 ; Tavarini, 2018). Ce critère est principalement lié à la faible teneur en SG présente dans les tiges par rapport à celle des feuilles. Le nombre de tiges n'étant pas corrélé positivement avec le rendement en biomasse (Hastoy, 2018), l'amélioration du ratio feuilles/tiges ne serait pas caractérisée par la sélection d'une architecture de la canopée en particulier. Brandle and Rosa, (1992) avaient identifié une forte héritabilité sur les traits « rendement en biomasse foliaire » et « ratio feuilles / tiges », suggérant un potentiel d'amélioration pour la stévia.

Enfin, ces auteurs proposent de sélectionner des plants produisant beaucoup de chlorophylle pour réaliser une meilleure conversion de l'énergie solaire en biomasse et en SG (Tavarini *et al.*, 2015).

6.3.1.2. Production en SG : teneur et composition

L'augmentation de la teneur en SG dans les feuilles est également un levier d'augmentation du rendement chez stévia. Dans la nature, les individus dont la teneur en SG a été mesurée présentent des teneurs variant de 2 à 3 %w/w (Kohda *et al.*, 1976). Mais dès 1978, début de la production en dehors du Paraguay, on retrouve en Corée des variétés améliorées sur ce caractère (Lee, 1982). Ces premiers efforts de sélection, principalement en sélection massale, ont permis l'augmentation des teneurs en SG jusqu'à 10 %w/w (Yao *et al.*, 1999). Aujourd'hui, ce critère est toujours majeur chez stévia et il y a une très forte sélection réalisée sur ce trait. La plupart des variétés sélectionnées ont des teneurs autour de 20 %w/w (Tavarini *et al.*, 2018), on retrouve même des variétés allant jusqu'à 28 %w/w (Wang, Zhang, *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Brandle and Rosa, (1992) ont montré que la teneur en ST était très héritable chez stévia.

Le type de SG produits, en termes d'intérêt pour la transformation industrielle, est également un critère de sélection, en ciblant des SG à la saveur préférée par les consommateurs. Au début de la sélection réalisée sur stévia, les méthodes de détection et de dosage des SG chez stévia ciblaient uniquement le ST et le RebA, le ratio RebA/ST était alors le seul critère utilisé pour définir la qualité du profil des plants (Hastoy, 2018). Actuellement, les connaissances plus fines de la diversité des SG, présentées paragraphe 3.1.2, et de la saveur des SG, présentées paragraphe 3.5, ont ciblé les objectifs de sélection sur les SG mineurs apportant un goût sucré très prononcé comme le RebD et le RebM (Tavarini *et al.*, 2018). Le critère de ratio RebA/ST est devenu un critère de ratio SG sucrés / SG amers.

6.3.2. Caractères de développement de l'architecture des plants

Comme présentée dans la partie 6.3.1.1, l'architecture des plants de stévia n'est pas corrélée avec la production de biomasse foliaire. Cependant, une hauteur minimale est à respecter pour que le rendement soit satisfaisant. Les caractères liés à l'architecture des plants seront davantage orientés vers l'itinéraire cultural envisagé pour la production. En effet, la mécanisation des étapes de désherbage et de récolte, et les méthodes de collecte des feuilles peuvent exiger des architectures différentes. Actuellement, pour la filière de Nouvelle Aquitaine, la récolteuse de stévia récolte les feuilles directement sur les plants, et nécessite d'avoir des tiges souples et non cassantes. Ces tiges sont ensuite fauchées à l'automne.

La capacité de repousse post-récolte, c'est-à-dire la propension des plants à faire de nouvelles tiges rapidement après une coupe, est également un critère de sélection (Tavarini *et al.*, 2018).

6.3.3. Caractères des stades reproductifs

Chez stévia, la floraison est initiée par une photopériode courte, en septembre / octobre en Europe. Lors de la floraison, la teneur en SG diminue dans les feuilles de stévia et la plante concentre son développement dans les organes reproducteurs, au détriment du développement de la biomasse végétative : tiges et feuilles, comme présenté paragraphe 3.3.2. Barbet-Massin, (2015) suggère de sélectionner des plants à floraison tardive, ce qui permettrait d'allonger le développement végétatif et d'augmenter la biomasse foliaire. Une stratégie de sélection de plants, peu photosensibles est également proposée par Tavarini *et al.*, (2018).

Comme décrit précédemment, la stévia est auto-incompatible et présente un faible taux de germination, ce qui présente un frein à l'amélioration. Un des objectifs d'amélioration sur stévia est d'augmenter ce taux de germination en ciblant des taux de germination supérieur à 75 % (Tavarini *et al.*, 2018), cela permettrait de produire des plants de type « variétés synthétiques » pour la production, diminuant ainsi les coûts de production des plants et de plantation. Dans l'objectif de produire des graines, une floraison précoce sera privilégiée afin d'allonger la durée de maturation des graines.

6.3.4. Caractères face aux stress biotiques et abiotiques

Les caractères liés aux stress biotiques et abiotiques sont assez peu intégrés dans les stratégies d'amélioration décrites dans la littérature. Les réponses de génotypes de stévia et leur variabilité face à ces stress commencent à être étudiées plus en profondeur, ce qui explique aussi le peu d'informations disponibles actuellement.

L'étude des caractères liés à la sensibilité aux stress biotiques est assez peu documentée chez stévia, de même que les agents pathogènes présents sur son territoire d'origine. L'augmentation de l'aire géographique de production de la stévia a confronté cette espèce à de nouveaux agents pathogènes locaux, qui n'étaient pas forcément présents dans l'aire d'origine de la culture.

Dans le même temps, l'augmentation de l'aire géographique de production de la stévia a entraîné la découverte de ravageurs de la culture. Deux agents fongiques impactent particulièrement les rendements et sont identifiés dans les différentes zones de production : *Septoria* sp. et *Sclerotium rolfsii*. Le développement de variétés résistantes ou tolérantes à ces agents fongiques est donc une priorité (Tavarini *et al.*, 2018). Au Japon et en Malaisie, des efforts de sélection sur la résistance à la septoriose et à l'alternariose ont d'ores et déjà été

réalisés et permettraient la production de variétés moins sensibles à ces maladies (Hosono *et al.*, 2003; Britos, 2012, 2013). Au Canada, des essais d'inoculation de septoriose sur stévia avaient permis d'observer une variabilité de réponse (Reeleder, 1999). En France, dans le contexte de la production en agriculture biologique, un test de phénotypage a également montré une variabilité du trait « sensibilité à la septoriose » au sein de la collection de l'INRAE indiquant un potentiel d'amélioration sur ce trait (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Enfin, si ce trait n'a pas été détaillé dans la littérature, la compétitivité aux adventices semble être un critère indispensable dans un contexte d'agriculture biologique.

Lors de son introduction dans des zones tempérées, il est vite apparu que la survie à l'hiver était un caractère indispensable à la pérennité de cette culture (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Tavarini *et al.*, 2018). Ce trait présente également une grande variabilité, sans qu'il soit clairement mis en avant dans les stratégies d'amélioration. La stévia a de faibles besoins en fertilisation, cette propriété est plutôt un atout à maintenir chez les variétés de stévia sélectionnées. Enfin, la tolérance à la sécheresse et au manque d'eau est un critère de sélection cité par Tavarini, (2018). La stévia étant assez sensible à l'excès d'eau, diminuer sa sensibilité à l'eau stagnante est également un critère important en Nouvelle-Aquitaine.

Si jusqu'à présent ces caractères ont été peu décrits et peu pris en compte dans les programmes d'amélioration, dans notre contexte de production française en Agriculture Biologique il semble indispensable de les prendre en considération. Le développement des connaissances plus précises sur ces sujets permettra d'ores et déjà de déterminer les leviers possibles pour l'amélioration de ces caractères chez *S. rebaudiana*.

SYNTHÈSE DES CRITÈRES DE SÉLECTION SUR *STEVIA REBAUDIANA* EN CONDITIONS TEMPÉRÉES

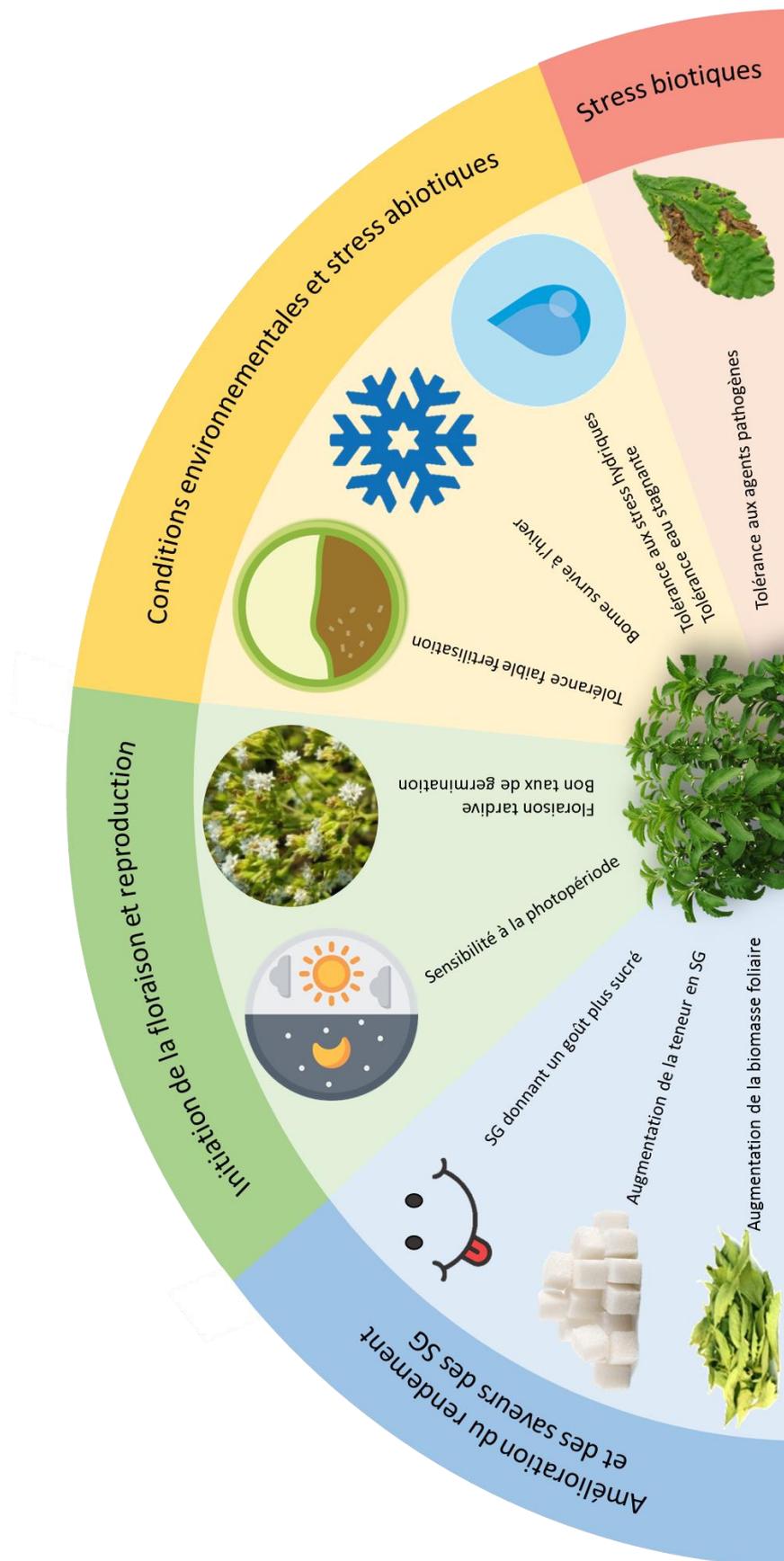


Figure 6.3 : Synthèse des différents critères de sélection sur *Stevia rebaudiana* en conditions de cultures tempérées.

6.4. Stratégies actuelles

Différentes stratégies d'amélioration ont été développées sur stévia ces dernières années, que ce soit par des équipes de recherche ou par des entreprises privées. Chez la stévia, la majorité des stratégies de sélection est fondée uniquement sur des évaluations phénotypiques, avec pour objectif principal d'augmenter la variabilité phénotypique de la stévia. Pour les variétés protégées par un brevet, le mode d'obtention et de propagation de ces variétés est précisé, alors que pour les autres, même commercialisées, ces informations ne sont pas toujours disponibles. Enfin, aucune variété de stévia n'est inscrite sur les catalogues de variétés en Europe ou en France.

6.4.1. Stratégies développées sur *S. rebaudiana*

6.4.1.1. *Sélection massale*

Historiquement, c'est la sélection massale récurrente qui a principalement été mise en œuvre sur la stévia, avec un objectif d'amélioration du rendement en glycosides de stéviol, comme présenté dans le paragraphe 6.3.1. La sélection massale se fonde sur une population hétérogène de géniteurs dans laquelle les croisements ne sont pas toujours contrôlés. Les graines sont collectées et les individus aux phénotypes les plus intéressants sur les caractères étudiés sont conservés. Au cycle suivant, les mêmes étapes sont réalisées, et ainsi de suite. Cela permet d'augmenter la valeur globale de la population, qui reste hétérogène mais bien adaptée à l'environnement dans lequel elle est sélectionnée. Cette stratégie a permis de sélectionner des plants plus adaptés à la production agricole que les plants sauvages, de par leur architecture foliaire et leur production de biomasse. Mais elle a surtout permis d'améliorer la teneur en glycosides de stéviol dans les feuilles en sélectionnant les plants accumulant le plus de SG, passant de 3 à 20 % w/w en une trentaine d'années (Yadav *et al.*, 2011). Aujourd'hui, certaines variétés sélectionnées par cette méthode sont toujours utilisées dans la production agricole, en particulier en Amérique du Sud, avec « Criolla » (Casaccia *et al.*, 2016). Bien qu'elle soit peu coûteuse, cette méthode ne permet pas l'obtention d'un matériel végétal uniformisé, ce qui peut être limitant dans le cadre d'une production agricole mécanisée.

6.4.1.2. *Création de variété clonale*

Chez les plantes pérennes allogames, les stratégies les plus faciles à mettre en œuvre pour sélectionner et propager du matériel végétal performant sont le développement de « variété clonale » *via* la sélection clonale (Kumar *et al.*, 2006). Des individus élites présentant des performances maximales dans l'environnement d'étude vont être sélectionnés et multipliés végétativement, le plus souvent par bouturage. Le choix de la propagation végétative a l'avantage de conserver des phénotypes intéressants pour les traits agronomiques ciblés tout en préservant de forts niveaux d'hétérozygotie (Bisognin *et al.*, 2011). Les « variétés clonales » peuvent être des hybrides, directement issus de croisements entre deux parents, dont la meilleure application est l'hétérosis avec un hybride F1 supérieur à ses parents (Xiong *et al.*, 2015). De nombreux cultivars élites sont toujours propagés par multiplication végétative (McClure *et al.*, 2014). Cela nécessite cependant la possibilité de propager facilement cette culture de façon végétative.

Cette méthode a été déployée assez rapidement sur stévia permettant d'uniformiser et d'améliorer les performances du matériel végétal utilisé en production. L'équipe de Brandle a développé dès 1992 des variétés clonales protégées par un brevet aux Etats-Unis : « RSIT 94-1306 », « RSIT 94-751 » et « RSIT 95-166-13 », qui ont été sélectionnées pour leur forte concentration en SG, et leur composition riche en RebC, RebA et DulA (Brandle, Sys, *et al.*, 1998; Sys *et al.*, 1998). Par la suite, cela a été employé par (Britos, 2012, 2013) pour créer les variétés clonales « AKH L1 » et « AKH L4 ». Ces individus ont été sélectionnés au sein d'une population hybride F1 sur leur phénotype d'intérêt, c'est-à-dire une forte teneur en RebA et la production d'une biomasse importante. « AKH L4 » est considéré comme précoce alors que « AKH L1 » est décrite comme tardive. Ces variétés sont protégées par un brevet déposé par PureCircle. D'autres entreprises ont développé des variétés clonales de stévia, comme par exemple S&W Seed Company avec « SW 107 » et « SW 129 » par exemple (Shock and Parris, 2017b, 2017c). « Eirete » ou « Katupyry » sont également des variétés clonales, développées par le programme d'amélioration du Paraguay et enregistrées au RCNP (Casaccia *et al.*, 2016). Une équipe turque a utilisé cette méthode pour sélectionner parmi une descendance de « Criolla » 40 individus candidats, dont trois se sont avérés adaptés à la production locale et ont été déposés pour enregistrement comme variétés clonales commerciales (Kaplan and Turgut, 2019). Ces individus peuvent aussi être utilisés comme géniteurs et croisés pour produire de nouvelles descendances. Cela a notamment été utilisé en Chine, mais n'indique pas le gain apporté par cette méthode (Haiyan *et al.*, 2008 ; Ping *et al.*, 2015a, b).

L'homogénéité du matériel végétal par rapport à des lots de semences est le principal atout de cette stratégie, en particulier pour la production agricole, (mécanisation etc...) (Forneck, 2005). De nos jours, ce mode de propagation est encore privilégié sur stévia pour obtenir un matériel végétal uniformisé. La limite reste le coût de production de boutures, qui est plus élevé qu'un semis.

6.4.1.3. *Sélection récurrente et cultivars synthétiques*

La sélection récurrente est une succession de cycles de sélection sur descendance. Un cycle de sélection va se diviser en trois étapes : (1) le développement de descendance, (2) l'évaluation et le choix des descendants performants et (3) la recombinaison des parents ou des descendants performants basée sur leur évaluation au champ. La sélection récurrente est employée car elle permet d'améliorer globalement les plants, en conservant les parents ou les descendants les plus performants sur les traits d'intérêt et en les utilisant comme géniteurs pour les populations suivantes (Khan *et al.*, 2020). La valeur générale de la population sera améliorée à chaque génération. Cette technique a été utilisée pour développer la variété « Morita » au Japon (Morita *et al.*, 2006).

L'identification d'individus performants dans le cadre de la sélection récurrente peut également permettre de développer des variétés synthétiques. Une variété synthétique est une population artificielle, issue du croisement entre un nombre limité de parents choisis pour leur valeur propre ou en combinaison (Gallais and Wright, 1980).

Cette stratégie a été employée par Brandle, (2001) pour développer « AC Black Bird ». Quatre individus issus de croisements évalués au champ, ont été sélectionnés sur leur production en glycosides de stéviol et la composition en ces SG, en particulier avec l'augmentation du ratio RebA/ST. Ces quatre individus sont utilisés en croisements, les semences obtenues constituent la variété synthétique « AC Black Bird » qui est la deuxième génération. Morita and Bu, (2000), ont également utilisé cette technique pour développer la variété synthétique « ATCC accession No. PTA-444 ».

6.4.1.4. *Rétrocroisements*

Un rétrocroisement, ou backcross, est un croisement d'un descendant avec un de ses parents, l'objectif de cette technique étant souvent d'intégrer un caractère d'intérêt dans une variété ayant déjà une bonne valeur agronomique (Hill, 1966). Dans le cas de la stévia, les individus performants au niveau agronomique ont été croisés avec un de leurs parents, générant des variétés populations (Li, Bu, *et al.*, 2017a).

6.4.1.5. *Stratégies pour une production en agriculture biologique*

Aujourd'hui, les plants utilisés pour la production de stévia dans le Sud-Ouest de la France sont des clones, issus de boutures sur des plants de quatre génotypes caractérisés par un bon phénotype dans l'environnement de production. L'utilisation de variétés clonales permet de limiter l'hétérogénéité des plants sur les parcelles. Il est possible d'estimer le rendement en SG et en biomasse foliaire qui sera obtenu chaque année, et de connaître le profil en SG des clones. Enfin, cela évite une variabilité d'architecture des plants mais aussi de précocité et permet donc de mécaniser la récolte. En effet, la hauteur de la récolteuse sera ajustée à celle des plants, et à leurs stades phénologiques. Une parcelle avec une grande variabilité sur ce caractère engendrerait la récolte d'un nombre important de plants n'étant pas au maximum de rendement. Les variétés clonales permettent d'obtenir un matériel génétique homogène. Cependant, l'utilisation de cultivars élites propagés par multiplication végétative est considérée comme une «épée à double tranchant » (Myles, 2013). La propagation végétative des cultivars élites sur une très longue période induit une stabilité génétique, en particulier si le nombre de clones utilisé est faible. Ces cultivars élites sont menacés par les pathogènes des cultures, qui présentent une évolution génétique (McClure *et al.*, 2014). Les risques sanitaires sont grands, en particulier si aucune solution alternative n'est possible. De plus, faire le choix de l'homogénéité totale signifie choisir un système dépourvu de résilience. Ce choix a pu se justifier dans un contexte de production conventionnelle dans lequel les intrants rendent l'environnement lui aussi homogène (Desclaux *et al.*, 2009). Mais dans le cadre d'une production en Agriculture Biologique, comme c'est le cas pour la production de stévia, ce schéma n'est pas transposable. Le développement de variétés pour la production de stévia en Agriculture Biologique doit donc passer par d'autres stratégies que la propagation végétative de cultivars élites. Le développement de variétés synthétiques semble être une bonne option à moyen et long terme, car il permet de conserver une diversité génétique nécessaire à la mise en place d'un système résilient, tout en ayant de bonnes performances agronomiques.

6.4.2. Perspectives pour l'amélioration génétique de la stévia

6.4.2.1. Création de lignées homozygotes

En sélection génétique, l'emploi de plants homozygotes peut être intéressant pour l'étude de l'architecture génétique d'un caractère, car l'étude de la ségrégation des gènes / marqueurs moléculaires est plus aisée (Gallais, 1989). La stévia étant une allogame stricte, il est impossible d'obtenir des plants homozygotes par autofécondation. L'haplodiploïdisation consiste à prélever des cellules haploïdes, des gamètes de la plante, et de provoquer leur doublement chromosomique pour produire des plants homozygotes. La culture d'anthère peut permettre de produire des plants haploïdes. Après traitement à la colchicine de ces plants, des doubles haploïdes / homozygotes peuvent être produits. Cette stratégie a été employée sur stévia, (Flachsland *et al.*, 1996) ont mis au point cette technique sur stévia sans développer de variété. Par la suite, en réalisant des cultures *in vitro* à partir d'anthères d'individus « Criolla », (Garnighian, 2012) ont pu créer la variété clonale T60 aux Etats-Unis, avec une teneur en SG améliorée. Enfin, un brevet fait état d'une variété de stévia supportant l'autofécondation (Markosyan and Jing, 2018). Les haploïdes doublés peuvent également être sélectionnés sur leurs performances comme géniteurs pour la production d'hybrides, comme cela est réalisé sur le maïs par exemple (Sserumaga *et al.*, 2018).

6.4.2.2. Augmentation de la ploïdie

L'utilisation d'individus polyploïdes est souvent utilisée chez les plantes d'intérêt agronomique pour leurs rendements et leurs caractéristiques (Sattler *et al.*, 2016). Chez les agrumes par exemple, les individus triploïdes sont favorisés car stériles, ne produisent pas de pépin, et présentant des fruits plus gros (Froelicher, 2010).

Chez stévia, des traitements d'individus à la colchicine au stade de graine permettent l'obtention d'individus tétraploïdes (Oliveira *et al.*, 2004). Une technique équivalente de traitement des méristèmes apicaux à la colchicine a été brevetée en Chine (Hong *et al.*, 2012). Les individus tétraploïdes évalués dans la littérature montrent des rendements en biomasse foliaire supérieurs à ceux des individus diploïdes (Oliveira *et al.*, 2004; Mahdi *et al.*, 2018). L'augmentation de la surface foliaire et de la teneur en ST et RebA a également été observée sur des individus tétraploïdes, produits par application de colchicine sur des graines en germination (Zhang *et al.*, 2018). Des croisements entre individus tétraploïdes et diploïdes permettent la production de plants triploïdes (Ping *et al.*, 2015b; Cheng *et al.*, 2016). Cependant, les individus triploïdes ou tétraploïdes chez stévia ont souvent des problèmes de reproduction avec du pollen « non fonctionnel » (Oliveira *et al.*, 2004).

6.4.2.3. Mutagénèse et plants transgéniques

Ces « variétés clonales » peuvent également être issues de plants qui ont subi des mutations induites leur conférant un meilleur phénotype (Kumar, 2006). En effet, les biotechnologies offrent la possibilité d'augmenter la diversité génétique existante (Moose and Mumm, 2008). Les premiers plants mutants étaient initialement produits par traitement chimique ou physique sur des graines ou des boutures (Kumar, 2006). Cependant, ce processus est aveugle et produit des mutations aléatoires dans le génome, la majorité d'entre elles sont chimériques et il faut réaliser des étapes de purification des chimères avant de conserver les plants avec un trait d'intérêt (Xiong *et al.*, 2015). Il est également possible de développer des plants transgéniques avec les méthodes utilisant *Agrobacterium* ou CRISPR-cas qui sont bien plus précises et permettent l'amélioration d'un génotype élite sans altération de ses performances (Schaart *et al.*, 2016). Cela requiert une bonne description des gènes cibles, chez stévia la voie de biosynthèse des SG est encore mal décrite, ce qui limite l'application de ces méthodes. Ces techniques ont été souvent mises en œuvre chez les cultures horticoles pérennes et hétérozygotes (Xiong *et al.*, 2015) par exemple pour les pommiers ou les pruniers. Le déploiement de ces variétés est limité car la commercialisation de Plantes Génétiquement Modifiées (PGM) est interdite dans de nombreux pays du monde, en particulier la France (Loi n°2008-595 du 25 juin 2008).

Ces techniques ont été étudiées chez stévia, des mutations aléatoires ont été induites par des agents physiques (rayons gamma, rayon X) et des agents chimiques (EMS) et ont permis de développer des mutants accumulant plus de RebD (Brower *et al.*, 2016). (Khan *et al.*, 2016) ont également obtenu des plants plus riches en ST et/ou en RebA du fait d'une sur-expression des UGT74G1 et UGT76G1. Ces techniques sont cependant très peu précises et assez aléatoires, les mutations induites étant réalisées à l'aveugle (Predieri, 2001).

La production de plants de stévia transgéniques a surtout été réalisée via le transfert de gènes par *Agrobacterium tumefaciens*. Khan *et al.*, (2013) ont produit des plants via cette technique pour générer des insertions aléatoires dans le génome, espérant obtenir des mutants sur la teneur en SG. Finalement, cette technique n'a produit que des plants dont le phénotype est proche des plants mères. Sánchez-Cordova *et al.*, (2019) a employé la même méthodologie, obtenant des plants avec une teneur en ST et RebA plus importante par rapport à des plants contrôles. Ces techniques ont surtout été mises en œuvre pour étudier la voie de biosynthèse des SG, via la sur-expression ou le silencing de plusieurs gènes impliqués dans cette voie. Une sur-expression des gènes *SrDXS* et *SrKAH* a amélioré la teneur en SG des plants produits (Zheng *et al.*, 2019).

Guleria and Yadav, (2013) ont réalisé un silencing pour étudier la voie de synthèse spécifique aux SG (cf paragraphe 3.2.2) avec un silencing sur le *SrKA13H* et trois UGT, permettant de mieux comprendre la voie de synthèse de SG.

Enfin, des équipes ont appliqué cette méthode pour induire des résistances aux ravageurs ou aux herbicides. Mubarak *et al.*, (2015), ont introduit un gène de résistance à un herbicide, le bialaphos, chez stévia. Les plants transformés se sont révélés plus résistants que des plants non transformés. Jackson, (2019) a introduit un gène de *Bacillus thuringiensis* permettant de produire une endotoxine chez 8 variétés de stévia, nommée « A01 » à « A08 » et protégées par un brevet (Jackson, 2019).

6.4.2.4. Développement de la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM)

Des stratégies utilisant les connaissances sur la diversité génétique peuvent être employées. La sélection assistée par marqueurs (SAM) utilise des informations sur le pedigree et le phénotype sur des traits d'intérêt agronomique des populations étudiées combinées avec les connaissances de la diversité génétique, comme les marqueurs moléculaires (Kainer *et al.*, 2015). Pour cela il faut réaliser des analyses permettant d'associer certains loci de marqueurs à des phénotypes sur ces traits d'intérêt.

La construction d'une carte génétique est la première étape de ces analyses, permettant une représentation de la répartition et de l'ordre des locus le long des chromosomes, en se basant sur le phénomène de recombinaison entre chromosomes homologues (Zhao and Speed, 1996). Les cartes génétiques se basent sur le génotypage d'une population avec des marqueurs polymorphiques entre les parents (Kumar *et al.*, 2011). La ségrégation des marqueurs dans la descendance permet d'estimer la fréquence d'occurrence des crossing over le long du génome et de calculer le taux de recombinaison entre deux marqueurs moléculaires. Ce taux de recombinaison est utilisé pour calculer la distance génétique entre ces locus en centiMorgan (cM).

Les cartes génétiques et les résultats de phénotypage sont ensuite utilisés pour identifier des Quantitative Trait Locus (QTL). Cette approche de « génétique directe » se base sur la variabilité du phénotype pour détecter des zones chromosomiques impliquées dans le déterminisme de ce phénotype. Le lien entre la variabilité génétique des marqueurs moléculaires et la variabilité phénotypique est testé statistiquement. Cette approche permet de déterminer le nombre, la localisation et l'effet des zones génomiques impliquées dans le déterminisme d'un caractère donné.

Une autre approche peut permettre la détection de QTL sur des traits d'intérêt. Les analyses de Genome Wide Association Study (GWAS) ne nécessitent pas de cartes génétiques, mais la constitution d'une collection d'un grand nombre d'individus (Morris and Cardon, 2019). Cette méthode a déjà été mise en œuvre sur des plantes pérennes et a démontré son efficacité. L'approche GWAS mise en œuvre sur une collection d'abricotiers (*Prunus armeniaca*) a permis de valider des QTL en lien avec la résistance du *Plum Pox Virus* (PPV) et d'identifier des potentiels nouveaux loci de résistance (Mariette *et al.*, 2016). De plus, il existe chez les pérennes des collections vivantes de germplasm. La mise en œuvre d'une approche GWAS sur ces collections est donc tout à fait adaptée dans un contexte d'amélioration génétique (Migicovsky *et al.*, 2019).

La connaissance des QTL offre un moyen de réduire les cycles de sélection, en identifiant de façon précoce dans une population les descendants possédant les allèles des marqueurs moléculaires associés aux phénotypes d'intérêt. La détection de QTL a été réalisée sur de nombreuses plantes pérennes, par exemple sur la vigne pour l'étude de trait du rendement en grappes (Fanizza *et al.*, 2005), sur les mandariniers pour les traits de qualité du fruit (Imai *et al.*, 2017) ou sur les poiriers pour le débourrement (Gabay *et al.*, 2018).

Dans les prochaines années, il est probable que l'amélioration génétique sur plantes pérennes évolue vers la mise en œuvre de sélection génomique comme cela a été le cas pour certaines cultures annuelles, permettant de limiter le coût et d'augmenter l'efficacité de l'amélioration génétique (McClure *et al.*, 2014). Des approches de sélections génomiques ont été mises en œuvre sur quelques plantes pérennes. La sélection génomique consiste à réaliser une sélection en se basant uniquement sur la valeur prédictive des marqueurs génétiques (Meuwissen, 2007). Cette méthode a montré des résultats contrastés dans l'amélioration du pin maritime, permettant une prédiction fiable pour le trait de diamètre des arbres mais pas pour la hauteur des arbres (Isik *et al.*, 2016). A long terme, l'exploration des New Plant Breeding Techniques (NPBT) a montré des potentiels sur d'autres cultures pérennes (Bokszczanin, 2019).

Le développement des informations sur le génome de stévia permet l'accès à de nouveaux outils pour la sélection. La mise à disposition sur les bases de données de la séquence du génome de stévia va permettre d'optimiser les cartes génétiques publiées et en développement. Tout d'abord, cette séquence permettra de valider la distance identifiée entre les marqueurs moléculaires déjà positionnés. Enfin, elle peut servir d'outils de base pour poursuivre le développement de marqueurs moléculaires de type SSR et SNP pour densifier les cartes génétiques. Toutes ces informations pourront permettre le développement de la Sélection

Assistée par Marqueurs (SAM) sur stévia. Dans un premier temps, le développement de la SAM sur stévia sera probablement orienté vers les caractères en lien avec la quantité et la qualité des SG produits.

Aujourd'hui, la mise en œuvre de SAM sur stévia est encore très limitée et a surtout ciblé les traits de production des SG. Morita Kagaku Kogyo Co., l'entreprise la plus ancienne investie dans la culture de la stévia et son amélioration, a publié un brevet sur des marqueurs RAPD utilisés pour sélectionner des plants de stévia produisant une forte teneur en SG (Morita *et al.*, 2009). Plus récemment, (Wang *et al.*, 2017) ont breveté des marqueurs RAPD permettant de sélectionner des plants produisant une forte proportion en RebC. Pure Circle ® a également breveté 8 SNP pour l'identification de plants plus riches en RebM et RebD (Markosyan, 2017). Dans la même entreprise, des nouveaux marqueurs SNP pour la sélection de plants plus productifs en RebM sont également brevetés (Markosyan, 2018). Ces quelques brevets laissent supposer que ces outils sont en cours de développement dans les multinationales investies dans l'amélioration de *S. rebaudiana*.

L'évolution de la sélection de *S. rebaudiana* semble suivre la même évolution que celles des autres pérennes. Van Nocker and Gardiner, (2014) font le constat que depuis 2010 l'amélioration sur plantes pérennes est passée d'une amélioration surtout basée sur l'évaluation du phénotype à une amélioration basée sur un catalogue d'associations trait-locus obtenues par des approches d'étude de la variabilité génétique, permettant un raccourcissement des cycles de sélection. Ce tournant est rendu possible grâce à deux évolutions technologiques et scientifiques. Les avancées majeures sur les technologies de NGS (Next generation sequencing) ont permis la construction d'un génome de référence de qualité sur de nombreuses cultures, et l'utilisation de ces séquences pour développer des outils moléculaires (D'Agostino and Tripodi, 2017). De plus, les stratégies de séquençage de représentation réduite des génomes ont également aidé au développement de ces outils moléculaires à plus faible coût (D'Agostino and Tripodi, 2017). Dans le même temps, les méthodes de phénotypage haut-débit ont commencé à se développer, mais ces innovations progressent plus lentement, générant un « phenotyping bottleneck » (Furbank and Tester, 2011; Araus and Cairns, 2014a). Les méthodes permettant le phénotypage non destructif des cultures ont tout de même permis de fortes avancées dans la sélection des plantes pérennes (Shakoor *et al.*, 2017).

Chapitre 7. Contexte local et objectifs de la thèse

7.1. Contexte local : la filière Aquitaine Stévia Innovation

Mon doctorat s'inscrit dans un contexte de développement d'une filière de production et de transformation de stévia en Agriculture Biologique (AB) dans le Sud-Ouest de la France. Cette filière prend forme dès 2012 par la création d'Aquitaine Stévia Innovation (ASI), ayant pour objectif de regrouper les acteurs impliqués dans la filière de la stévia biologique en Nouvelle Aquitaine. Au sein du projet ASI se trouve SweetVia, l'association de producteurs de stévia du Sud-Ouest de la France, et Oviatis, une entreprise de transformation et commercialisation de la stévia créée en 2013. La production de stévia étant encore très récente en Europe, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur sa production pour proposer à la filière des génotypes adaptés aux conditions environnementales et permettant une production économiquement viable. Des connaissances techniques sur l'itinéraire cultural optimal pour le Sud-Ouest de la France et les équipements nécessaires pour le mettre en œuvre sont également indispensables. Comme le présente Hastoy (2018), quatre grandes thématiques sont alors identifiées. La première est l'identification de ressources génétiques adaptées aux conditions de production, la seconde est l'amélioration des itinéraires culturaux, la troisième doit permettre d'identifier les stress biotiques et abiotiques pouvant impacter la production, enfin la quatrième vise à la mise en place d'un programme d'amélioration de *S. rebaudiana* pour la filière de Nouvelle-Aquitaine.

Suite à ces constats du faible niveau de connaissances sur la culture de stévia en Europe, Oviatis crée des partenariats avec des acteurs locaux de la recherche et du développement en agronomie afin de travailler sur ces thématiques. Les stations expérimentales Fruits et Légumes d'Invenio (Centre d'expérimentation de la filière Fruits et Légumes) sont impliquées dans ASI (pôles du Lot-et-Garonne et des Landes) afin de développer des connaissances sur l'itinéraire cultural de la stévia en AB. Invenio s'est particulièrement investi dans la maîtrise de la septoriose en AB, ainsi que les solutions techniques permettant une meilleure survie à l'hiver. La Chambre d'Agriculture du Lot-et-Garonne soutient également la filière ASI, notamment sur le matériel pouvant être utilisé et partagé entre les agriculteurs, ainsi que sur le suivi de l'itinéraire cultural mis en place sur les différentes parcelles de production. L'UMR Biologie du Fruit et Pathologie (BFP) de l'INRA, devenu INRAE, de Villenave d'Ornon par l'investissement de Valérie Schrudi-Levraud et Dominique Rolin, s'est fixé pour objectif le développement d'outils et de

connaissances pour l'amélioration de *S. rebaudiana* en Nouvelle Aquitaine. Ce partenariat avec l'INRAE débouche sur un projet de doctorat réalisé entre 2015 et 2018 par Cécile Hastoy. Cette thèse a permis le développement d'outils de phénotypage sur des traits de performances agronomiques et de stress biotiques, et l'évaluation des performances de la collection de stévia de l'INRAE. En aval de la production agricole, Rouages est partenaire d'Oviatis pour développer un processus industriel d'extraction des SG compatible avec les critères de l'AB. Le laboratoire Inexios travaille à une purification des SG compatible avec les critères en Agriculture Biologique. Enfin, Oviatis est en partenariat avec le centre RAPSODEE des Mines d'Albi pour développer un processus de cristallisation des infusions de stévia et des SG purifiés.

A ce jour, la filière ASI est en pleine restructuration. Comme présenté dans un dossier soumis à l'Agence Bio en décembre 2019 (Figure 7.1.a), la filière ASI s'organisera à présent autour de deux acteurs : l'association Sweet Via structurant la filière de production agricole de stévia, et l'entreprise Oviatis, axée sur la transformation et la commercialisation de la stévia. Sweet Via fournira les plants aux producteurs, interagira avec les structures de recherche et développement (R&D) en agronomie comme Invenio ou encore la Chambre d'Agriculture (Lot-et-Garonne), afin de proposer des conseils techniques aux producteurs, ou encore d'investir dans du matériel commun. Cette association séchera et regroupera la production des producteurs pour la revendre à Oviatis. A long terme, son objectif est de devenir une organisation de producteurs (OP), pouvant représenter les producteurs de stévia. De son côté, Oviatis continuera à centraliser les activités de transformation des feuilles de stévia et de commercialisation. Plusieurs transformations sont réalisées, un séchage et broyage permet de proposer de la poudre de feuilles à infuser, une extraction des SG permet de proposer une infusion liquide concentrée, enfin des extraits de SG concentrés à 95% représentent le niveau le plus transformé. Ces produits seront distribués directement dans des magasins spécialisés en produits issus de l'AB. Face aux barrières législatives, qui rendent impossible la vente à d'autres entreprises de transformation, Oviatis développe actuellement sa propre gamme de produits pour proposer des sirops « zéro sucre ».

Les acteurs engagés dans le projet

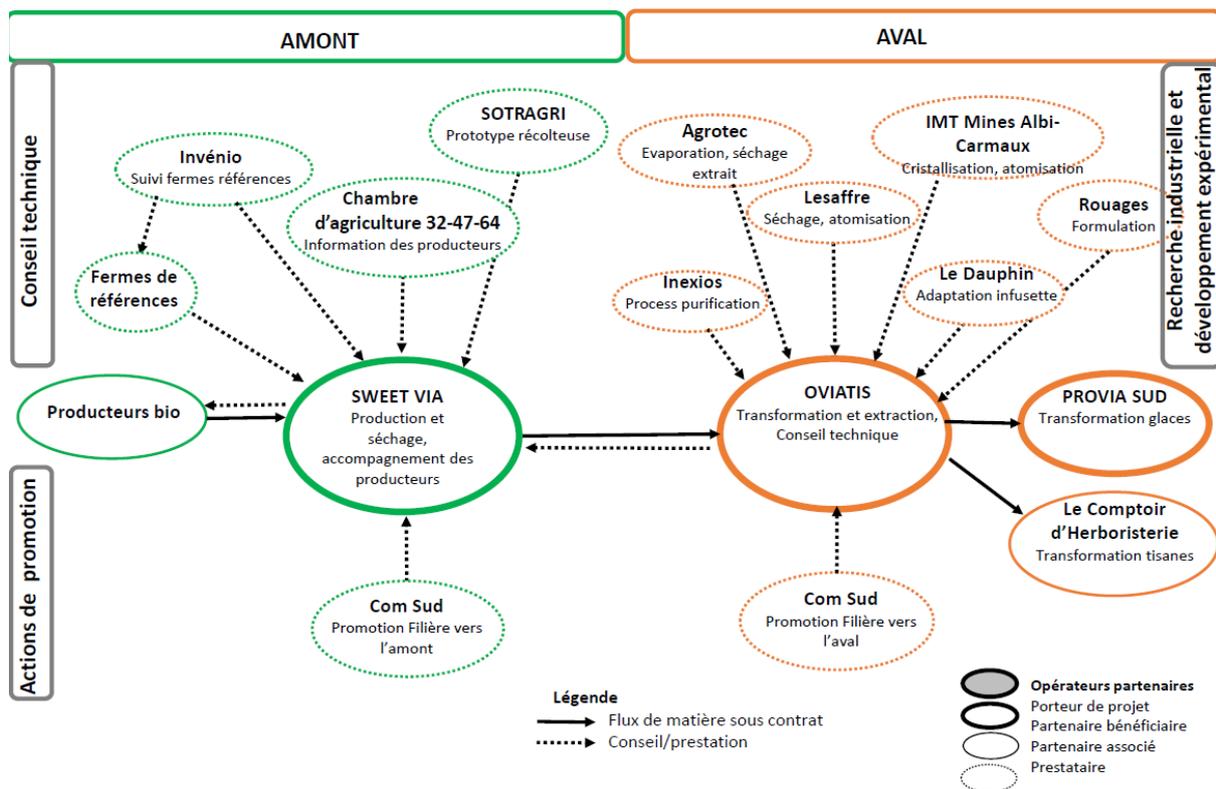


Figure 7.1.a : Présentation des acteurs investis dans le projet ASI, ainsi que leur relation (Source : Oviatis).

Au printemps 2020, la surface plantée de stévia était de 13 ha, avec 13 producteurs localisés dans le Lot-et-Garonne (47), dans le Gers (32) et le Pays Basque (64). Les objectifs de la filière de stévia pour 2022 sont d'avoir 60 ha dans le Sud-Ouest de la France, avec un objectif de conversion en AB de plus de 60% des nouvelles parcelles. Les prévisions de plantations pour 2021 sont actuellement entre 10 et 15 nouveaux hectares. Si les objectifs sont atteints, cela correspondrait à un chiffre d'affaire d'un million d'euros pour SweetVia en 2022, et un chiffre d'affaire multiplié par 10 pour Oviatis. Actuellement les géotypes cultivés sur le territoire sont Cult102_SPA, Cult35_FRA, Cult36_FRA, Cult37_FRA et Cult32_FRA. Les plants sont produits par bouturage chez un pépiniériste. Actuellement, les prévisions de rendements sont fondées sur le travail de recherche de Cécile Hastoy et les travaux de cette thèse. Elles sont présentées Tableau 7.1.b avec un objectif de teneur entre 12 et 20 %w/w selon l'objectif de transformation.

Tableau 7.1.b : Prévision de production de biomasse foliaire pour la filière (Source : Oviatis).

Production de feuilles sèches en g/plant	Plein champ (estimation)	Plein champ (obtenus chez Aurélie)
1 ^{ère} année de production	8	13-16
2 ^{ème} année de production	40	42
3 ^{ème} année de production	44	40 (sur la récolte de juillet) Données sur la récolte de septembre non disponibles à ce jour
4 ^{ème} année de production	46	
5 ^{ème} année de production	46	

7.2. Contexte de la recherche, et objectifs de thèse

Durant sa thèse, Cécile Hastoy a pu mettre en place un protocole d'extraction et de dosage de 10 glycosides de stéviol. Elle a également suivi 15 ressources génétiques en conditions de production sur 2 sites (Lot-et-Garonne et Landes) pendant 2 années de production. Ces mesures de phénotypage ont permis d'évaluer la variabilité phénotypique au sein de la collection de l'INRAE. Le suivi des plants sur une de ces parcelles a également permis de suivre la mise en place des composants du rendement de 5 ressources génétiques, mettant en évidence un maximum de teneur en SG non pas au stade floraison comme cela avait été déterminé dans des études précédentes, mais au stade d'initiation des bourgeons floraux. Une caractérisation de souches de septoriose isolées pendant la thèse a permis de replacer ces souches au sein de la diversité du genre *Septoria* mais aussi d'identifier les liens génétiques entre les souches. Enfin, la mise en place d'un test d'inoculation sur plantes entières a permis le phénotypage de 10 ressources génétiques sur ce trait, indiquant une grande variabilité de réponse, de peu sensible à très sensible.

En parallèle de ce projet de thèse, Patrick Cosson, ingénieur à l'INRAE dans l'équipe de Valérie Schurdi-Levraud, a développé un set de marqueurs microsatellites permettant de caractériser la diversité génétique de stévia rassemblé au sein de l'INRAE, soit 145 ressources génétiques d'origines variées. Il a également participé à un projet en partenariat avec le LABRI (Université de Bordeaux) et BioGeco (INRAE), réalisé entre 2017 et 2018 a permis de développer *de novo* 436 marqueurs SNP sur stévia.

Toutes ces informations ont servi de base pour le choix de parents pour des croisements, ainsi que pour déterminer les plants pouvant être immédiatement utilisés pour la production. Ces résultats ont été valorisés dans le cadre de la publication de trois études (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019; Cosson *et al.*, 2019).

Dans la continuité de ce projet il semblait essentiel de poursuivre le développement d'outils de phénotypage sur *Stevia rebaudiana*, l'apport de connaissances sur la caractérisation phénotypique des ressources génétiques de stévia sur les traits d'intérêt agronomique, mais également d'utiliser ces outils et ces connaissances pour mettre en place une sélection collaborative sur la stévia pour la filière Agriculture Biologique par le suivi de populations de stévia et la construction d'un idéotype.

Les objectifs de ce doctorat étaient :

- (1) La construction d'une échelle de description des stades phénologiques sur *Stevia rebaudiana*.
- (2) L'évaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques cultivée pendant quatre années de production.
- (3) L'étude des stress biotiques impactant la culture de la stévia dans le Sud-Ouest de la France et en particulier *Septoria* sp.
- (4) L'estimation des paramètres génétiques des traits d'intérêt agronomique de la stévia par le suivi phénotypique des descendances de plein-frères implantées en parcelle expérimentale.
- (5) La construction d'un idéotype de stévia pour une culture en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France avec les partenaires de la filière dans une démarche de sélection collaborative.

Ces essais ont été réalisés par le suivi de deux parcelles expérimentales. La première est une parcelle de ressources génétiques localisée à Liposthey (40) et implantée depuis 2016, qui a été suivie en 2018 et 2019 pour ce travail de doctorat. La deuxième parcelle est localisée à Blagon (33) et est implantée depuis 2017, elle regroupe quatre descendances de plein-frères.

La construction de l'échelle de stades phénologiques, en adaptant l'échelle BBCH à la stévia a été réalisé grâce à des observations et des photos des ressources génétiques des parcelles de Liposthey en 2018. En 2019, elle a été validée par le suivi des individus sur la parcelle de descendants de Blagon. Ces travaux ont permis la publication d'un article scientifique et d'un document de synthèse pour la filière, ils seront présentés dans le Chapitre 1 (Partie 2).

Les mesures de phénotypage des ressources génétiques en 2018 et 2019, parcelle de Liposthey, ont été analysées avec les données de phénotype des années précédentes, 2016 et 2017, obtenues par Cécile Hastoy. L'ensemble de ces analyses a permis la soumission d'un article évaluant pendant trois ans, la performance des 15 ressources génétiques dans deux itinéraires techniques, avec ou sans récolte en première année de production. De plus, cet essai ont également permis de suivre les performances des ressources génétiques jusqu'en quatrième année de production. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre 2 (Partie 2).

L'étude des stress biotiques de *Stevia rebaudiana* a été réalisée en collaboration avec l'UMR SAVE (INRAE, Villenave d'Ornon). L'identification d'un nouveau pathogène *Athelia rolfsii* se développant sur la stévia a donné lieu à la publication d'une short-note. La réponse à une

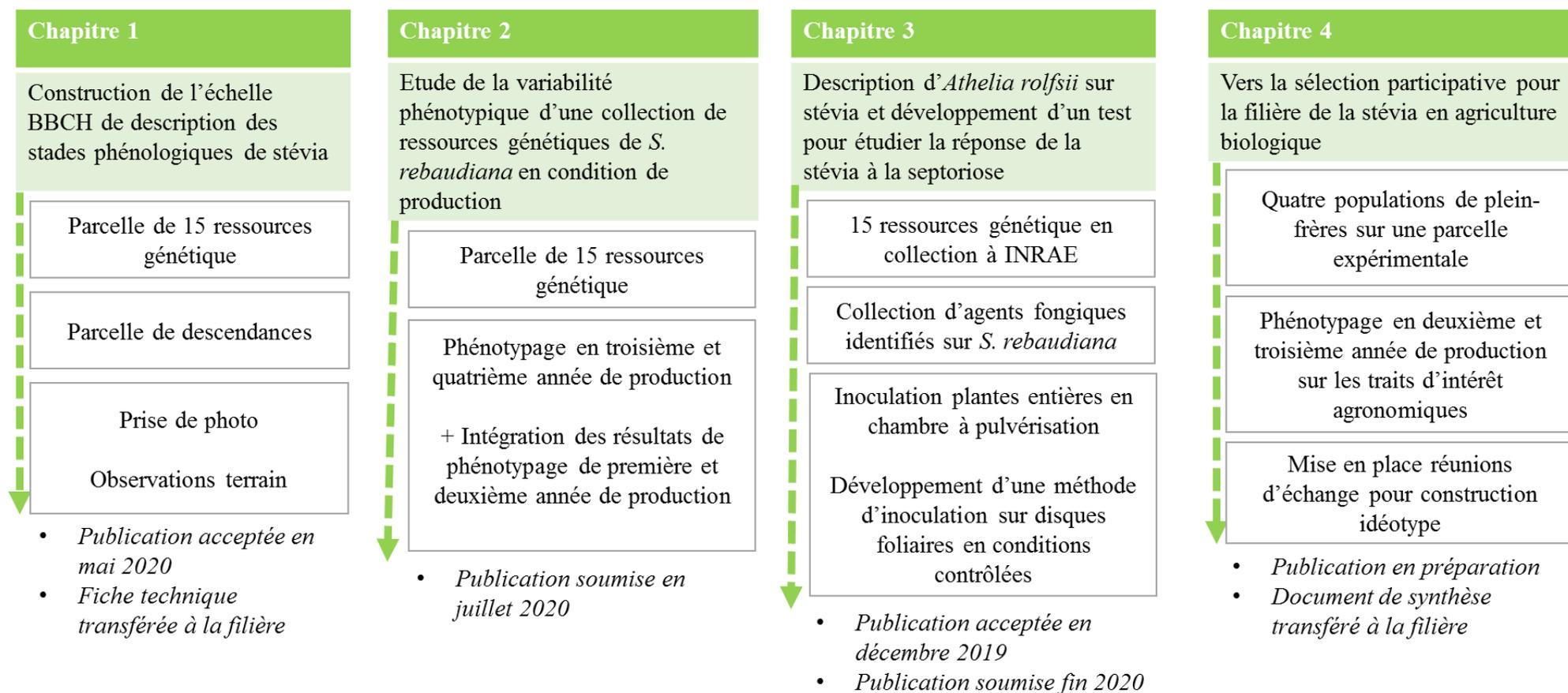
inoculation de *Septoria* sp. en conditions contrôlées sur des boutures de stévia a permis le phénotypage de 8 génotypes en collection à l'INRAE, complétant les résultats obtenus pendant la thèse de Cécile Hastoy. Enfin, un protocole d'inoculation de la septoriose sur disques foliaires a été développé sur stévia et validé. Ces résultats font l'objet du Chapitre 3 (Partie 2).

Enfin, le phénotypage de quatre populations de plein-frères plantées sur une parcelle expérimentale dans le Sud de la Gironde a été réalisé en 2018 et 2019, correspondant à la deuxième et troisième année de production des individus. Les traits agronomiques de ces individus suivis sont relatifs au rendement en SG sucrés et à l'architecture des plants. Cette première analyse a permis d'estimer les paramètres génétiques de ces traits. Enfin, le travail de collaboration entre Oviatis, l'INRAE et les autres acteurs de la filière stévia a permis l'initiation de la construction d'un idéotype pour la production de stévia en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France, posant ainsi les bases d'une sélection participative pour la filière. Le Chapitre 4 (Partie 2) présente ces derniers résultats.

Vers l'architecture génétique des caractères du rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana*

OBJECTIFS :

- Développement d'une échelle de description des stades phénologiques de *Stevia rebaudiana*
- Evaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques
- Etude des stress biotiques impactant la stévia : *Septoria* sp. et *Athelia rolfsii*
- Estimations des paramètres génétiques des traits d'intérêt pour quatre populations de plein-frères
- Développement d'un idéotype de stévia pour une culture dans le Sud-Ouest de la France



Partie 2 – Résultats des travaux de recherche du doctorat

Chapitre 1. Construction de l'échelle BBCH de description des stades phénologiques chez *Stevia rebaudiana*

1.1. Introduction

Ce chapitre regroupe les résultats de développement de nouveaux outils de description de la culture de stévia au cours de son cycle de production. Malgré l'augmentation du nombre de publications sur cette culture et l'intérêt industriel et agronomique qu'elle suscite, les connaissances et les descriptions du développement de cette espèce en culture sont rares. Des outils/aides descriptifs permettant de décrire et d'identifier les stades phénologiques pour la production et le phénotypage sur stévia sont encore trop peu développés, en particulier pour une production en conditions tempérées. Ainsi, la plupart des études d'évaluation phénotypique sur stévia, mesurant le rendement au champ en biomasse foliaire ou en glycosides de stéviol, sont publiées sans précision sur les stades de récolte ou d'observations. Les descriptions sont rédigées avec des termes très génériques, reflétant en réalité toute une gamme de stades phénologiques : stade de floraison, stade de pré-floraison, bourgeons floraux, ou encore des dates de récoltes (Tavarini and Angelini, 2013; Moraes *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2015; Barbet-Massin *et al.*, 2016; Libik-Konieczny *et al.*, 2018). Ce manque de précision est un frein pour la comparaison des résultats entre les études.

Il existe des descriptions des stades phénologiques de stévia. Une première description partielle a été publiée par Tateo *et al.*, (1998). Dans cette étude menée au Paraguay, 13 génotypes, non caractérisés au niveau génétique, sont étudiés. Les descriptions morphologiques sont réalisées uniquement sur les stades de croissance végétative, et une typologie des architectures et des stratégies de croissance sont proposées par les auteurs. Cependant, ni les stades précoces du développement végétatif ni les stades reproductifs ne sont décrits. Plus récemment, une échelle complète des stades phénologiques de stévia est publiée par Carneiro, (2007). Cette échelle identifie les stades végétatifs par la lettre V et les stades reproductifs par la lettre R. Deux numéros permettent ensuite d'identifier le stade précis et son niveau de développement. Par exemple, le code V3.15.8 correspond à un plant avec 15 nœuds sur la tige principale et des tiges secondaires développées sur le huitième nœud. Cette échelle est la première décrivant tous les stades phénologiques de la stévia. Elle a cependant été développée sur des plants cultivés dans des conditions de productions tropicales et non tempérées. De plus, cette échelle est spécifique de la culture de la stévia, ce qui empêche toute comparaison avec les échelles phénologiques et

donc les développements d'autres cultures. Enfin, son utilisation n'est pas triviale et nécessite un apprentissage long et méticuleux. Cela explique probablement pourquoi la communauté scientifique travaillant sur la stévia n'utilise pas cet outil. Finalement, il manque à la filière de la stévia un outil clair, facile à comprendre et utilisable par tous que ce soit les acteurs de la recherche privée ou publique, ceux du suivi technique de la filière et de la production.

L'échelle Biologisch Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) est une échelle standardisée pour la description et la codification des stades phénologiques des cultures (Lancashire *et al.*, 1991; Meier *et al.*, 2009). Elle est constituée d'un code à 2 chiffres décrivant chaque stade. Le premier chiffre décrit un des 10 stades principaux numérotés de 0 à 9. Le deuxième chiffre correspond aux sous-stades, aussi codés de 0 à 9. Depuis la première échelle développée par Zadoks *et al.*, (1974) sur les céréales, de nombreuses cultures ont été décrites grâce à cette échelle. Récemment par exemple, les échelles BBCH du quinoa (Sosa-Zuniga *et al.*, 2017) et du chia (Brandán *et al.*, 2019) ont été publiées. L'utilisation de l'échelle BBCH est simple, facile à prendre en main et universelle pour les cultures agricoles. Ces arguments ont guidé mon choix d'appliquer ce modèle sur la culture de la stévia en conditions tempérées.

La première partie de ce chapitre présente la description des stades phénologiques de *S. rebaudiana* en conditions tempérées grâce à l'échelle standardisée BBCH. Les observations nécessaires à ce travail ont été réalisées pendant les deux premières années de thèse en 2018 et en 2019. Ces résultats ont pu être valorisés sous la forme d'un article scientifique publié en juillet 2020 dans le journal *Annals of Applied Biology*. La deuxième partie de ce chapitre présente l'adaptation des résultats de l'article en outils synthétiques, adaptés à une diffusion destinée à l'ensemble de la filière et, tout particulièrement aux producteurs.

1.2. Article scientifique

Received: 25 February 2020 | Revised: 25 June 2020 | Accepted: 26 June 2020
DOI: 10.1111/aab.12626



PLANT PHENOLOGICAL GROWTH STAGES

Annals of Applied Biology
An international journal of the GSB

WILEY

Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale

Zoé Le Bihan^{1,2} | Patrick Cosson¹ | Dominique Rolin¹ | Valérie Schurdi-Levraud¹

¹Université de Bordeaux, INRAE, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Omon cedex, France

²Oviatis SA, Estillac, France

Correspondence

Valérie Schurdi-Levraud, Université de Bordeaux, INRAE, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, 1332, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Omon cedex, France.
valerie.schurdi-levraud@inrae.fr

Funding information

Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Grant/Award Number: n° 2017/0487; Région Nouvelle Aquitaine, Grant/Award Number: Cifre support

Abstract

Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) is a perennial crop belonging to the Asteraceae family. Its main agronomic and industrial interest is the accumulation in its leaves of steviol glycosides (SG), natural acaloric sweeteners which are 300 times sweeter than sucrose. In order to expand phenotyping knowledge on this emerging crop, researchers and breeders need a universal scale to describe the development of this plant. The objective of this study was to describe the phenological growth stages of stevia through the use of the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale to provide a standard scale for stevia grown under temperate conditions of production and climate. The observation of phenological stages was performed on genetic resources and validated on stevia progenies grown in field conditions. The 10 phenological stages, namely germination, bud development, foliar development, side shoots appearance, stems elongation, development of harvestable part of the crop, inflorescence emergence, flowering, development of fruit, seeds ripening and senescence, were used to describe the stevia, supplemented with pictures. The chronology and duration of each stage were also observed and described according to the accumulation of degree days during the growing season. This study presents the first BBCH scale established for *S. rebaudiana* cultivated in temperate conditions and a chronology of phenological stages based on the accumulation of thermal time, through growing degree day calculation (°C/day). This work provides a tool that can be widely used by farmers, breeders and researchers leading to better agronomic management and scientific communication.

KEYWORDS

Asteraceae, BBCH scale, growth stages, phenology, *Stevia rebaudiana*

1 | INTRODUCTION

Stevia rebaudiana Bertoni (2n = 22) is native to Paraguay. Traditionally, Guaraní Paraguayan Indians used it as a natural sweetener (Lewis, 1992). This plant was discovered and classified by the botanist Moisés Santiago Bertoni in 1888 (Kinghorn, 2002). It is the only species in the genus *Stevia* which has the property of producing steviol glycosides (SG), natural acaloric sweeteners (Ceunen &

Geuns, 2013b) which are a good alternative to synthetic sweeteners such as aspartame, saccharin, neotame, cyclamate, sucralose and acesulfame K (Soffritti et al., 2006; Tandel, 2011). SG are 300 times sweeter than sucrose (Bridel & Lavielle, 1931). Two SG are mostly accumulated in leaves: stevioside (ST) and rebaudioside A (RebA; Ceunen & Geuns, 2013b). The leaves are the harvested part of the crop (Angelini, Martini, Passera, & Tavarini, 2018).

This species has been cultivated and consumed since the 1970s in Japan (Brandle et al., 1998), and most Western countries are now moving towards the use and consumption of SGs as food additives. Currently, China is the largest stevia producer, representing more than 80% of international production, with 81,000 ha (Sun, 2016). Brazil, the United States and Argentina are also counted among important *S. rebaudiana* producers (Gantait et al., 2018). However, some European studies show that it is also possible to cultivate stevia in temperate conditions as a perennial plant in southern countries and as an annual plant in northern countries (Andolfi et al., 2006; Hastoy, Cosson, et al., 2019; Libik-Konieczny et al., 2018; Munz et al., 2018).

Botanically, *S. rebaudiana* is a perennial and self-incompatible plant belonging to the Asteraceae family. In the wild, it presents few ramifications and its size ranges from 30 to 50 cm. As a crop it grows as a dense canopy formed of many stems, and ranges from 70 to 140 cm (Soejarto, 2002). Its leaves are simple, opposite and subsessile. Leaves' shapes and sizes differ according to genotypes (Barbet-Massin, 2015). Its flowers are pentamerous and hermaphrodite and can be classified as tube flowers (Soejarto, 2002). These white flowers are organised in capitulum inflorescences and their corolla present external hair (Ramesh et al., 2006). The seeds are contained in achenes, and their wind dispersion occurs through a hairy corolla, called the pappus (Ramesh et al., 2006). Fertile seeds are black, while unfertile seeds remain light in colour (Raina et al., 2013; Yadav et al., 2011). Stevia is a short-day plant. A long photoperiod, such as 16 hr of sun, will enhance its vegetative development, while a short photoperiod, such as 13 hr of sun, will enhance flowering (Brandle et al., 1998; Ceunen & Geuns, 2013; Metivier & Viana, 1979). Stevia's climate of origin is subtropical with high rainfall (Shock, 1982).

The rising number of studies on this emerging crop shows its scientific interest. Indeed since 2010, the annual number of publications on *S. rebaudiana* has risen continuously (Figure S1, Supporting Information); papers published in the last decade account for more than 70% of the 1,319 total publications on *S. rebaudiana*. Stevia publication topics are mainly related to plant sciences, agronomy and food science technology.

Despite this recent interest, little information is available on stevia crop itineraries and its critical phenological stages in temperate conditions. Most studies are based on phenotypic data, but the lack of a common tool to describe these phenological stages complicates comparison and knowledge transfer. Indeed, in most studies harvest times are described using general terms such as vegetative stage, flower budding stage, flowering stage or just dates, with each term representing a wide range of phenological stages (Barbet-Massin et al., 2016; Libik-Konieczny et al., 2018; Moraes et al., 2013; Reis et al., 2015; Tavarini & Angelini, 2013).

There is therefore an urgent need to strengthen phenotypic diversity studies and link them to genetics for the genetic improvement of this species for temperate conditions. Indeed, it appears essential to increase phenotyping capacities in relation to varietal selection and growing practices in order to improve productivity. To reach this goal, researchers need shared tools to describe this plant and their phenotypic methods in a uniform way.

The description of a crop's phenological stages is the study of the specific growth and development stages in the annual cycle of a plant (Keller, 2010). Knowledge of these different stages is essential for researchers, breeders and agronomists. Phenological scales have been developed to illustrate the visible morphological changes that occur during a vegetative cycle (Zadoks et al., 1974).

A first partial description of the phenological stages of *S. rebaudiana* was published by Tateo et al. (1998). They evaluated stevia plants cultivated in Paraguay. Morphological descriptions were performed on 13 individuals whose genotypes were not specified. The author characterised four different growth habits associated with specific canopy architecture. Reproductive stages were not characterised in this publication. Only Cameiro (2007) published the first complete phenological scale for *S. rebaudiana* cultivated in Brazil with precise phenological stages and illustrations (Cameiro, 2007). Vegetative stages are described using the letter V and reproductive stages using the letter R. Numbers are added to each letter to specify the level of development of the phenological stages, and represent the number of nodes or the percentage of the flowering apex. The code V3.15.8 R1.7 will correspond to plants with 15 nodes and with the first axillary branches developed at node 8; they are in the reproductive phase and the flower buds represent between 65 and 74% of all reproductive structures on the branches. This scale is a first precise description of the phenological stages of stevia, but as it was developed exclusively for stevia, it does not allow a comparison of stages with other crops and requires deep learning.

To obtain a common reference, it is more convenient to choose an international, well-known and widely used scale. The Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) established a standard scale to describe and code the phenological stages of crops (Lancashire et al., 1991; Meier, Bleiholder, Buhr, et al., 2009). Initially developed for cereals by Zadoks et al. (1974), this scale consists of a two-digit code describing each phenological. The first digit corresponds to one of the 10 principal growth stages numbered from 0 to 9 in accordance with the specific phenological stages observed for the crop. The second digit corresponds to the secondary substages, also coded from 0 to 9. Nowadays, this scale is widely used and applied by many authors to diverse crops as shown by a complete review of the BBCH scale adapted to crops before 2007 (Meier, Bleiholder, Buhr, et al., 2009). A complementary review of BBCH scale published from 2007 to 2019 is presented in Table S1.

The objective of this study is to provide a useful standard scale using the BBCH scale to describe the phenological stages of *S. rebaudiana* Bertoni grown in temperate conditions of production and climate.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Plant material and field experiment

Phenological data were collected from two experimental stevia fields, geographically close to each other. The two fields are located in private farms in southwestern France: the first in Liposthey

TABLE 2 Populations of *Stevia rebaudiana* studied in 2019 in field conditions in the southwest of France (Blagon) to confirm the BBCH scale, including their parents and the number of individuals

Name	Number of individuals
Cult76 GER × Cult35 FRA	93
Cult102 SPA × Cult35 FRA	69
Cult36 FRA × Cult103 SPA	119
Cult34 FRA × Cult36 FRA	74

reproductive stages. These stages are divided into substages corresponding to the level of progress in the principal growth stage. Each stage is expressed as a number: the first digit of the scale corresponds to the principal growth stage from 0 to 9, and the second digit identifies the substage, also from 0 to 9. The chronology and duration of phenological growth stages are presented using GDD accumulation (Figure 2). This chronology indicates that some stages are concomitant on stevia plant.

3.1 | Principal growth stages

For the adaptation of the BBCH scale to *S. rebaudiana*, each principal growth stage was described (Table 3). The first stage, stage 0, focuses on seeds and germination, with a description of seed development, as well as bud development which occurs after winter. Stages 1–4 described the vegetative growth of *S. rebaudiana* with stage 1 leaf development on primary stems, stage 2 side shoot development and stage 3 stem elongation. The development of the vegetative harvestable part of *S. rebaudiana* is described in stage 4. In this crop, leaves are harvested without stems in most cases, because the leaves present the highest SG concentration (Ceunen & Geuns, 2013a). That is why for this crop, stage 4 describes total leaf development without stems.

Four stages were used to describe reproductive development: this starts with inflorescence emergence at stage 5, continues at stage 6 for flowering, involves the description of achene development at stage 7 and concludes at stage 8 for seeds ripening, which is characterised by a dark coloration of seeds. Finally, stage 9, describing senescence, is the last stage before winter dormancy.

The description of the principal stages may differ among crops in the Asteraceae family. *Helianthus annuus* is a widely cultivated Asteraceae to produce oil and feed livestock (Grompone, 2020). Its BBCH scale is composed of 8 out of the 10 general stages (Lancashire et al., 1991). Stage 2 and stage 4 are not relevant to describe sunflower stages as this crop does not produce side shoots and the harvestable parts of the crop are the seeds. Safflower (*Carthamus tinctorius*) is an oilseed crop and has been described using the BBCH scale (Flemmer et al., 2014). For this crop, the choice of phenological stage is identical to that for stevia, except for

stage 4: vegetative harvestable part. Indeed, the leaves and stems are not harvested in safflower because the agronomic purpose of this plant is to cultivate oil via seed production (Smith, 1996). *Cynara cardunculus* L. is a cultivated cardoon traditionally consumed as a vegetable; it is also used for biofuel production (Fernández et al., 2006). Archontoulis et al. (2010) described the BBCH scale for this crop as vegetative stages including stages 0, 1, 3 and 4 and reproductive stages 5, 6, 7, 8 and 9. Stage 2 is not included in the scale as *C. cardunculus* does not develop side shoots. The same stage can describe the growth of different vegetal organs, as stage 3 which presents both rosette development in *C. cardunculus* (Archontoulis et al., 2010) and stems elongation on the stevia scale.

3.2 | Substages/secondary stages

The use of substages gives a precise description of the phenological transformation within each principal stage (Table 3). In this study, only some substages will be presented, because of our focus on the important substages, whether on a crucial agronomic level or a pronounced phenological one. The comparison between the BBCH scale and the Carneiro scale will be presented stage by stage and agronomic issues regarding some substages will also be discussed.

3.2.1 | Principal growth stage 0: Seeds and germination, bud development

On stevia, two types of seeds can be distinguished: sterile seeds, which present a light or white coloration and do not reach full size, and fertile seeds, which present a dark coloration and a normal size (Figure 1a). Most of the time, stevia presents a low germination rate because of the ratio between sterile seeds and fertile seeds (Angelini et al., 2018), which is not suitable for direct sowing (Khalil et al., 2014; Yadav et al., 2011). It can also be an obstacle high plantlet production. A similar description of this stage was performed by Carneiro, with stages V0 and V1.i which are the beginning of seeds imbibition and first developmental stages of plantlets (Carneiro, 2007). In *S. rebaudiana* seeds, the radicle is the first organ to emerge from the endosperm at stage 05 (Figure 1c). The germination growth stage ends with the emergence of cotyledons at stage 09 (Figure 1d).

Under European conditions, bud development indicates the end of plant dormancy after the winter season (Figure 1b). It finishes with the appearance of a fresh pair of leaves on the stem (Figure 1e). Most of the time, several buds swell at the same moment. In southwest France bud development occurs in March or April depending on the genetic resources. It is a critical stage because an early bud swell will increase the risk of frost damage (Angelini et al., 2018).

Carneiro, 2007 briefly defined the regrowth stage in V4.jk as regrowth after a cutting and not as the end of plant dormancy, as it

(44°17'56.9"N 0°53'14.7"W) planted in June 2016 (Hastoy, Cosson, et al., 2019), and the second in Blagon (44°46'30.6"N 0°55'16.6"W) planted in July 2017. Liposthey's crop itinerary has already been described in a previous study by Hastoy, Cosson, et al. (2019). The Blagon field was monitored identically with a density of four plants per square metre. The climate at the sites is oceanic, with mild winters. Monthly rainfall can vary greatly between years (Figure S2). However, a water supply is provided to the plants each year. Mean monthly temperatures range from 3.7°C in January 2017 to 21.7°C in August 2018, as presented in Figure S3. Daily temperatures as well as rainfalls were measured with AquaFox Sentek (Agralis) equipment.

In the Liposthey field, four genetic resources (Table 1) of different origins studied in Hastoy, Cosson, et al. (2019) were chosen. In the Blagon field, four populations from crosses between genetic resources presented in Cosson et al. (2019), namely Cult76 GER × Cult35 FRA, Cult102 SPA × Cult35 FRA, Cult36 FRA × Cult103 SPA and Cult34 FRA × Cult36 FRA, were analysed (Table 2).

2.2 | Measurements and observations of phenological stages

In both cases, the stevia plants were observed in the second year of production after the regrowth period. For the stevia plants in the Liposthey genetic resources' field, the second year of production of stevia occurred in 2018. Observations of vegetative and reproductive development were performed every month, from regrowth time in March until senescence in November. The observations consisted of a precise report on the four genotypes identified: Cult63 FRA, Cult102 SPA, Cult32 FRA and Cult51 FRA. They were selected in order to study different canopy architectures (Hastoy, Cosson, et al., 2019). For every observation, eight plants were randomly selected among the four blocks of the field for each of the four genotypes studied, corresponding in total to 32 plants observed per date of notations. The plants observed were different for each observation date. A description of the phenological stages was performed during each observation as well as the height of each plant, and pictures were taken to illustrate those stages with a Nikon D5300 and a Tamron lens SP AF 17-50mmF/2.8 XR Di II VC at 24 megapixels. The pictures were cropped and scaled using the ImageJ software. On each time occasion, global observations were also made on the rest of the genotypes to check whether the phenological stage observed was suited to other genetic resources. We constructed a first BBCH scale

adapted to *S. rebaudiana* based on these different measurements and pictures. In 2019, the third year of production for plants grown in the Liposthey genetic resources' field, the phenological stages were described again for the genetic resources in order to confirm that they were identical in the third year of production for *S. rebaudiana*.

In 2019, the second year of production of progenies, the BBCH stevia scale was tested on the Blagon progenies' field. From May until November, observations and scorings were performed each week on each individual plant in the stevia populations. This served to correct the BBCH scale and specify certain descriptions. Pictures were also taken during the progeny scorings.

The duration of each phase of development was calculated using accumulated thermal time (°C/day). The growing degree day (GDD) was calculated daily according to the equation presented by McMaster and Wilhelm (1997),

$$\text{GDD} = \left[\frac{T_{\max} + T_{\min}}{2} \right] - T_{\text{base}}$$

where T_{\max} is the daily maximal air temperature, T_{\min} is the daily minimal air temperature and T_{base} is 10°C for stevia (Munz et al., 2018).

Accumulated thermal time was calculated as the sum of daily GDD from regrowth time (achieved at 50% of regrowth of the plants at crop level) until senescence time (achieved at 50% of senescent plants at crop level). Additionally, accumulated thermal time was used to obtain a uniform time scale between years. This provided an overview of the chronology of the phenological stages of stevia. The thermal time scale also allowed us to describe the variability of each phenological stage in terms of duration. The stage duration was calculated from the start of the earliest genotype to the end of the latest one in the stage.

To observe seed development, seeds from a Cult76 GER × Cult75 GER cross were placed on moistened filter paper in Petri dishes and were incubated at 25°C with a 12-hr photoperiod in a growth chamber. Two millilitre of water were added every 4 days. The first seed germination was observed after 8 days. Pictures were taken with a colour Nikon DS-Fi3 camera mounted on a Nikon SMZ12270 binocular and visualised on the Nikon NIS-Elements D software.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The original BBCH scale is divided into 10 principal growth stages (Lancashire et al., 1991) which cover the vegetative and

TABLE 1 Genetic resources of *Stevia rebaudiana* studied in 2018 in field conditions in the southwest of France (Liposthey) to build the BBCH scale, including their names, origin before selection, providers and country of providers

Name	Origin before selection	Providers	Country of providers
Cult63 GER	Paraguay	EUSTAS gene bank	Germany
Cult102 SPA	Spain	Oviatis	France
Cult32 FRA	Argentina	Oviatis	France
Cult51 FRA	Paraguay	Stevia store	Paraguay

TABLE 3 Description of the phenological stages of *Stevia rebaudiana* based on the BBCH universal scale

BBCH scale	Phenological stage description	
Principal growth stage 0	Seeds and germination	Bud development
00	Dry seeds (achene), fertile seeds have a dark colour while sterile seeds present a light colour	Plant dormancy: leaf buds are closed
01	Beginning of imbibition of seed	
05	Radicle emerges from seed	Swelling of leaf buds: buds that are located on last year's stem and collar start swelling
07	Cotyledons and hypocotyl emerge through soil surface and radicle continues to expand	Beginning of bud break/burst: leaf tips are visible
09	Cotyledons are fully unfolded and the first leaf pair is developing Primary radicle shows a hairy surface and secondary radicles are developing	Bud break: new stems tips are visible
Principal growth stage 1	Leaf development on main stems and development of main stems	
11	First leaf pair is completely developed	
19	Nine or more leaf pairs are visible on primary stems	
Principal growth stage 2	Side shoot appearance	
20	No side shoot is developed	
21	A pair of side shoots starts to develop at leaf petioles	
25	Five pairs of side shoots are developing	
29	Nine or more pairs of side shoots are completely developed	
Principal growth stage 3	Stem elongation	
30	Beginning of elongation of stems	
31	Axes of developing stems are visible and are about 10% of the final length	
32	Stem length is about 20% of final length	
39	Stem length is about 90% of final length	
Principal growth stage 4	Development of harvestable vegetative part of the crop	
41	Beginning of leaf biomass development: about 10% of final leaf biomass is developed	
49	Ending of leaf biomass development: about 90% of final leaf biomass is developed	
Principal growth stage 5	Inflorescence emergence	
50	Apex leaves differentiation, becoming smaller with sharp tips. This is a prior structure to flower buds development	
51	Apparition of the first inflorescence	
55	50% of apex leaves are differentiated and present inflorescence, but flower buds are still closed	
59	90% of apex present inflorescence, and first white petals are visible	
Principal growth stage 6	Flowering	
60	Opening of first flowers on stem's inflorescence	
61	10% of flower buds are open/10% plants are flowering	
65	50% of flower buds are open/50% plants are flowering	
67	Flowers start fading, most of flowers' petals are drying out	
69	End of flowering, flowers no longer have white petals	
Principal growth stage 7	Development of fruit	
70	First fruits are visible. Tiny dry fruits containing seeds are achenes. At the beginning of their development achenes are green and small, and the pappus (hairy crown) starts to form	
75	50% of fruits have reached final size	
79	Nearly all fruits have reached final size, pappus is fully developed	
Principal growth stage 8	Seed ripening	
81	10% of seeds are ripened, with a black coloration of achenes. <i>Stevia</i> is auto incompatible and some flowers may not be fertile, seeds obtained this way will never turn black and stay brownish	
85	50% of seeds are ripened	
89	90% of seeds are ripened, a large percentage of mature seeds are already dispersed by wind	

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

BBCH scale	Phenological stage description
Principal growth stage 0	Seeds and germination
Principal growth stage 9	Bud development
91	Senescence
91	Stem development is normal, foliage is green but reproductive organs are turning brownish, because of seed drying
93	Leaf colour starts turning brownish and to leaves fall
95	50% of leaf biomass is dried or fallen, stems are drying
97	The entire plant is dried, in winter dormancy

Abbreviations: BBCH, Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry.

occurs in a perennial system of production. The first steps of bud development are missing from his phenological scale.

3.2.2 | Principal growth stage 1: Leaf development on main stems

This stage starts with the first pairs of leaves completely developed on several main stems. This development will continue throughout the vegetative development of this crop. In *S. rebaudiana*'s stage 13, leaves appear in pairs along stems (Figure 1f). Young leaves take on a light green colour while older leaves will present a dark green colour. Stevia leaves are simple, lanceolate, with a complete limb presenting saw tooth edges. Petioles are short but visible, and have are arranged opposite each other on stevia stems.

The number of principal stems can vary according to genotype, years of production, agronomic conditions or climate conditions, from 1 in the first year of production, to more than 100 main stems after 3 years of cultivation (Hastoy, 2018).

In a context of open field stevia production, this phase is very critical as it occurs simultaneously with the development of weeds. Late weed control interventions can have a negative impact on the development of the main stems. Stages 11–15 in the BBCH scale correspond to stage V2.i described by Carneiro.

3.2.3 | Principal growth stage 2: Side shoot development

This stage 2 starts with the appearance of side shoots, stage 21, and lasts until the complete formation of the last pairs of secondary stems, stage 29 (Figure 1g). Side shoots develop in pairs at the leaf pair's petioles. The development of side shoots occurs on the oldest leaf pairs on the main stems, several months after the development of the main stems. This phenomenon contributes to a significant increase in canopy density. The development of the first side shoots starts when the main stems reach half of their final height, around 640–720°/day. The appearance and development of the side shoots continue through to the end of vegetative growth.

In Carneiro's phenological scale (2007), this stage would correspond to stage V3.j.k., with k allowing a count of the first nodes where

secondary stems appear, except that this stage is only for single-stem plants. In the event of several main stems, Carneiro describes the plant development with stage V4.l.k. Here, using the BBCH scale serves to simplify and facilitate this stage's description and its understanding.

3.2.4 | Principal growth stage 3: Stem elongation

Stem elongation occurs throughout the vegetative development of stevia, that is, from March–April until the reproductive stage in September, when plants reach stage 39. This elongation will allow an increase in leaf biomass production. Indeed, it consists in an increase of the number of nodes, which leads to an increase in the number of leaf pairs. The length of internodes is highly variable according to genotype, and this variability explains canopy architecture diversity among stevia genotypes (Hastoy, Cosson, et al., 2019). The height measured at harvest time can vary according to genotype and year of production. On the stevia, the plant maximum height reached is not synonymous with maximum yield, as leaf biomass can continue to increase with the development of side shoots and the increase in foliar surface.

In Carneiro's scale, the number of nodes is used to describe stem elongation in stages V3 and V4. This choice seems less appropriate to describe a crop than to the percentage of final height used in the BBCH scale.

3.2.5 | Principal growth stage 4: Development of harvestable vegetative part of the crop

The development of the harvestable part of the crop refers to the leaf biomass development for *S. rebaudiana* (Figure 1h). This development is dependent on stem elongation. For stevia production, the harvest will start at the end of the vegetative development, just when the apex starts to differentiate between bract and flower bud development. This stage was not described by Carneiro's scale.

The increase in leaf biomass development is a critical stage for *S. rebaudiana* cropping. Foliar density increases, as does humidity inside the stevia canopy, during the warmest months—July and August for France. These conditions are ideal for the development of fungi, such as *Alternaria alternata* (Maiti et al., 2007), *Septoria* spp. (Hastoy, Le Bihan, et al., 2019) or *Athelia rolfsii* (Le Bihan et al., 2019), already described on stevia in Europe.



FIGURE 1 Phenological growth stages of *Stevia rebaudiana* based on BBCH scale. (a) Stage 00 (seeds and germination) – dry seed (achene). (b) Stage 00 (bud development) – plant dormancy. (c) Stage 05 – radicles emerge from the seed. (d) Stage 09 – development of first leaf pair. (e) Stage 11 – first leaf pair is completely developed. (f) Stage 13 – three leaf pairs developed per main stem. (g) Stage 29 – development of secondary stems. (h) Stage 43 – 30% of harvested part of the plant is developed. (i) Stage 49 – 90% of the harvested part of the plant is developed. (j) Stage 50 – inflorescence emergence. (k) Stage 55 – 50% of apex presents inflorescence. (l) Stage 60 – beginning of flowering. (m) Stage 65 – 50% of open flower buds. (n) Stage 67 – beginning of fading. (o) Stage 75 – 50% of fruits have reached final size. (p) Stage 85 – 50% of seeds ripened. (q) Stage 99 – fully senescence. BBCH, Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (Pictures: Zoé Le Bihan and Solenne Boutet)

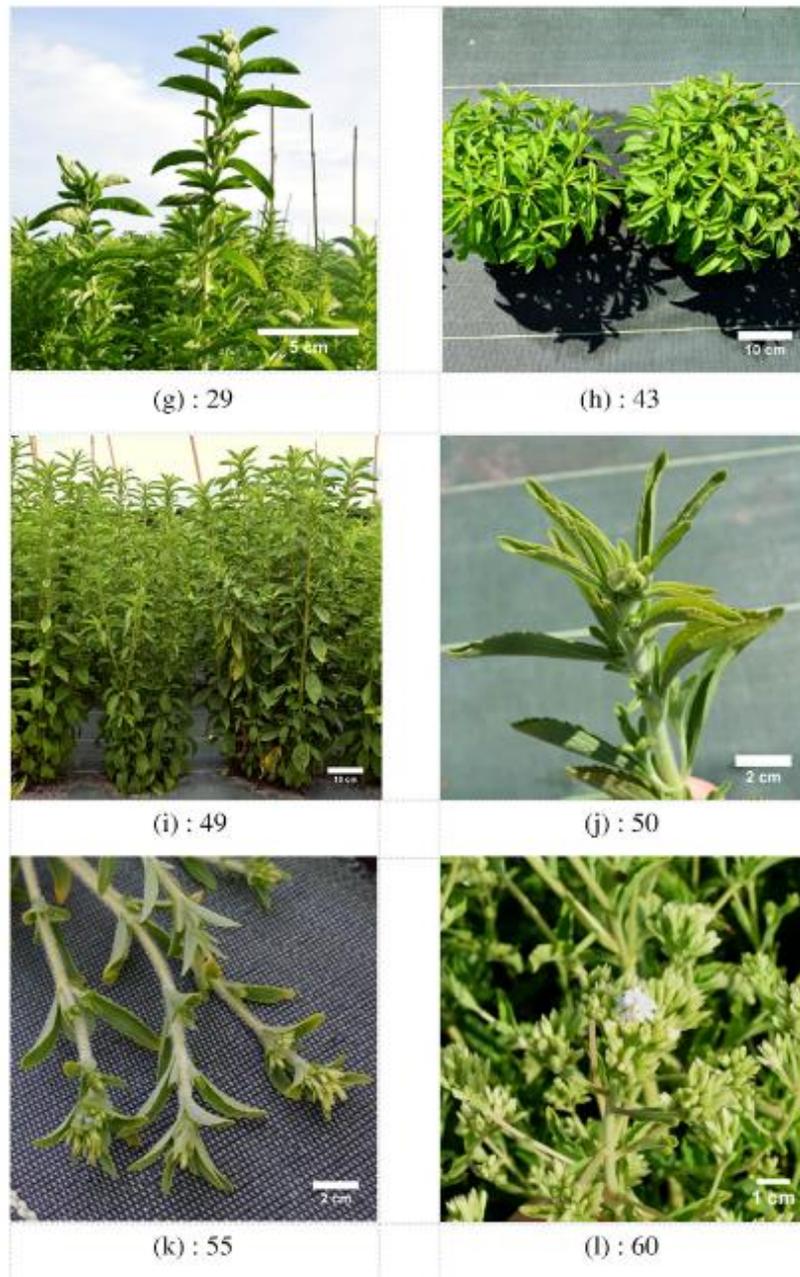


FIGURE 1 (Continued)

In the present study, we described a crop itinerary with a single harvest at the end of vegetative growth to observe the complete vegetative development of stevia. However, some studies present two harvests, one during vegetative development, and one at the flowering stage (Moraes et al., 2013; Reis et al., 2015).

3.2.6 | Principal growth stage 5: Inflorescence emergence

This stage describes the emergence of inflorescence, which begins with the apex leaf differentiation, becoming smaller with sharp tips, stage 50 (Figure 1). Next, the first inflorescence will appear at stage

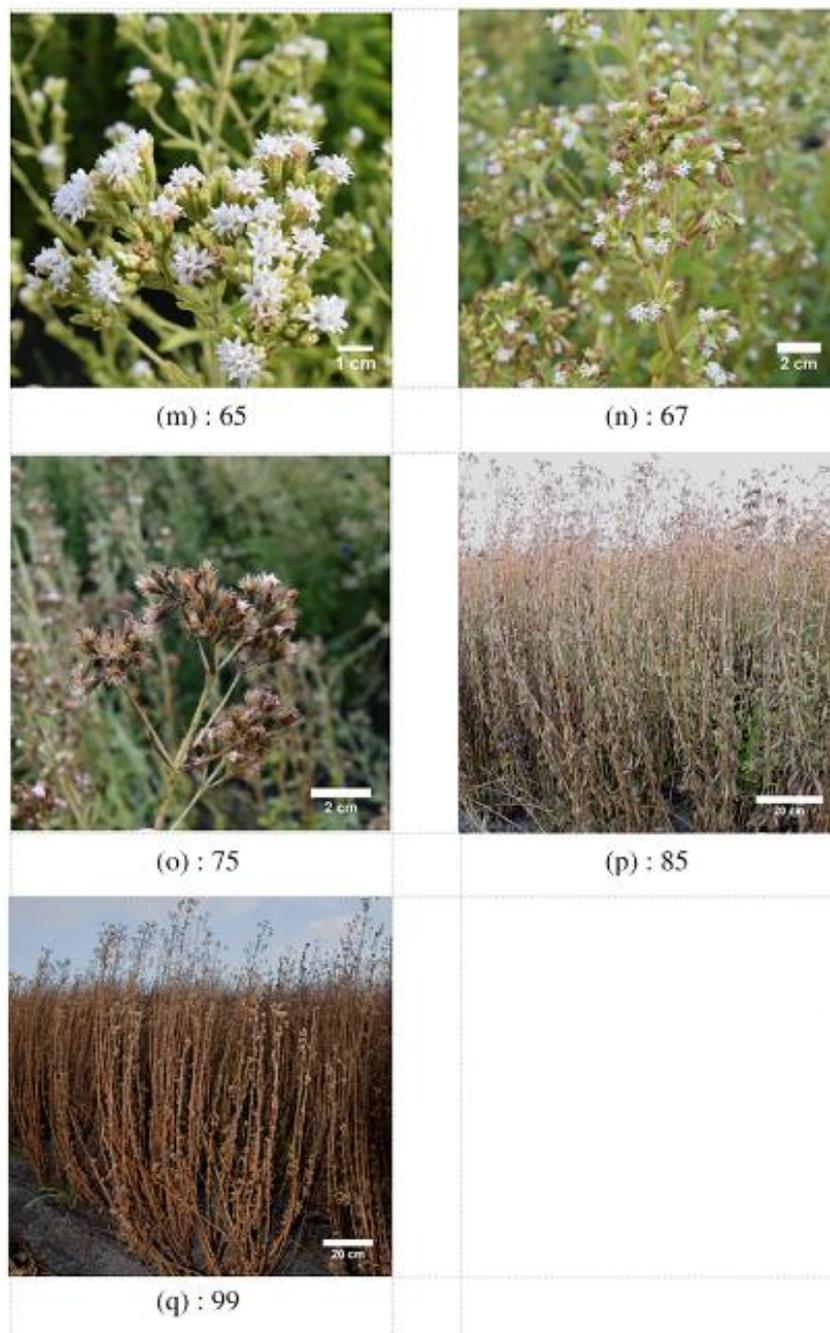


FIGURE 1 (Continued)

51. *Stevia*'s inflorescence is a corymb composed of peduncles starting on the stem and ending with a flower head, the capitulum, with several grouped flowers. Inflorescence presents a light green colour during this stage. Stage 55 corresponds to 50% of the apex leaves differentiated, but with flower buds still closed (Figure 1k).

The stage finishes at stage 59 when 90% of the plant's stems are differentiated into inflorescence and the first flower petals are already visible.

Stevia rebaudiana is a short-day plant and, in long photoperiods (16 hr), reproductive development is postponed (Ceunen &

Geuns, 2013c; Metivier & Viana, 1979). This stage is linked to a decrease in the duration of the day at the end of summer. In temperate climates, inflorescence emergences occur from the beginning of September until the end of October. As flowering leads to a diminution of SG content in leaves (Barbet-Massin, 2015; Ceunen & Geuns, 2013c), the harvest is performed at the beginning of this stage, for leaf production. Monitoring the crop during this stage is crucial to obtain the best possible yield.

R1.i is the first reproductive stage of Carneiro's scale and describes the emergence of flower buds. In the stevia BBCH scale, an intermediary stage was added to present apex leaf differentiation just before the emergence of flower buds, allowing a more precise description of this specific trait.

3.2.7 | Principal growth stage 6: Flowering

The flowering stage starts with the opening of the first flowers on the stem's inflorescence. The first white petals are clearly visible on the inflorescence structure at stage 60 (Figure 1l). A capitulum is composed of several receptacles supporting five flowers each. The flowers are surrounded by a green involucre, have a tubular form and are hermaphrodites. These observations confirm the biological description by Soejarto, in 2002. Next, full flowering will occur at stage 65, when most flowers are open (Figure 1m). Flowering is quite inhomogeneous on a stevia plant, and some flowers start fading while other are still flowering, stage 67 (Figure 1n). The flowering growth stage ends with stage 69, when the flowers no longer have petals.

The flowering stages were described by Carneiro, 2007. The stevia BBCH stage 65 corresponds to stage R2.i, describing the full flowering time and pollination. The beginning of stage R3.j in Carneiro scale fits with stages 67–69 in the BBCH scale.

3.2.8 | Principal growth stage 7: Fruit development

For *S. rebaudiana*, the fruit development stage corresponds to the development of achenes, from a small green tube to its final size and brownish coloration, topped by a hairy crown called the pappus which contributes to the seeds' aerial dispersion (Figure 1o). During the first steps of fruit maturation, the fruits develop under flower tubes. The petals will turn brown.

In Carneiro's scale, fruit development is briefly described in stage R3.i, presenting the development of fruit and wilting of flowers.

3.2.9 | Principal growth stage 8: Seed ripening

The seed ripening stage occurs with the main morphological changes to the stevia. Inflorescences are fading, and on brownish stems, stevia seeds are visible. Seed ripening is characterised by a dark brown to black coloration. Seeds can be at different ripening levels on a plant.

Carneiro also described this stage through R3.j, which presents fruit development and ripening of seeds. He then explains the aerial dispersion of stevia seeds in stage R4.l of his scale. It corresponds to stage 87 of the BBCH scale, where most of the seeds are ripened and can be wind-dispersed.

3.2.10 | Principal growth stage 9: Senescence

Senescence is a quite obvious stage, with highly visual changes. The first reproductive organs are turning brownish, because of the wilting of flowers and drying of seeds (stage 91). Next, the leaf colour turns from green to brownish, and the oldest leaves fall (stage 95; Figure 1p). At the end of this stage the entire plant is dried (stage 99; Figure 1q).

In Carneiro's stevia scale, senescence is described in stage R5.i when the plants are completely dry and brownish, corresponding to the last stage of the BBCH scale, stage 99.

In general, this stage does not occur into a stevia production field, as the plants are either harvested at stage 49 in the case of stevia leaf production or cut down after a seed harvest, stage 85–87, in the case of stevia seed production.

3.2.11 | Chronology of principal growth stage

The chronology and duration of the phenological stages of stevia described in this study are presented in Figure 2. The advantage of using accumulated thermal time is that it provides a uniform scale from year to year. This indicator has to be carefully considered on day-length-sensitive crops because they can present interaction between day length and temperature requirement to achieve a phenological stage, such as budburst (Heide, 1993). As far as we know, no model has been published on the correlation between thermal time accumulation and the occurrence of phenological stages in stevia. However, in a different location under temperate climate conditions, different results regarding thermal time accumulation needs may be observed. Furthermore, the use of thermal time accumulation in crop growth modelling can hide confounding effects, creating biased results on day-night effects for example (Parent, Millet, & Tardieu, 2019). For this study, as both field trials are located in the same geographical area and at the same latitudes, day length should not impact our observations.

As shown in Figure 2, the chronology of vegetative stages does not correspond to an ascending order on the BBCH scale. As presented in Figure 2, side shoots (stage 2) developed a few months after elongation of the main stems (stage 3). Stage 4 corresponds to the development of the harvestable part of the stevia. As it leads to the development of leaves on both side shoots and main stems, it is the longest stage in vegetative development. For the reproductive stages, the order of the phenological stages corresponds to the structure of BBCH scale. However, the occurrence of reproductive stages is quite inhomogeneous on stevia; the same plant can present developing

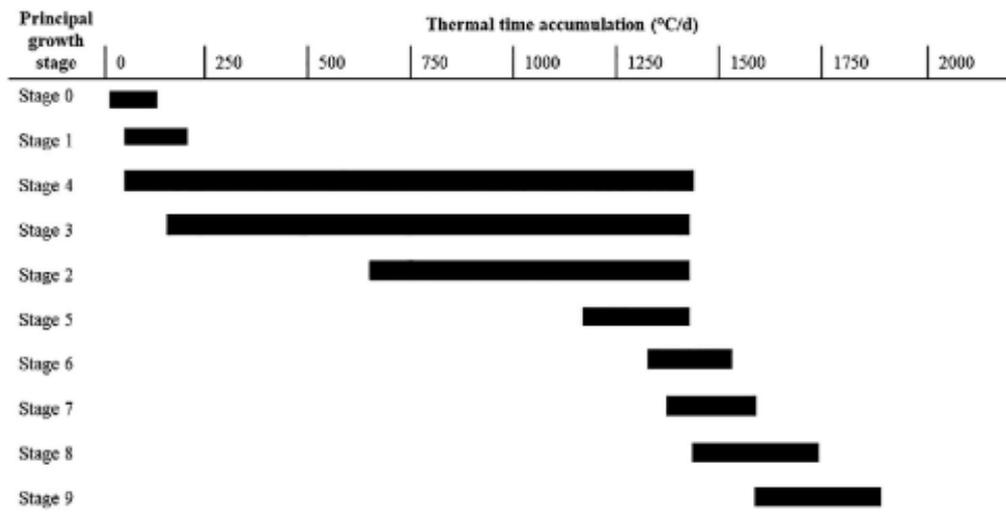


FIGURE 2 Duration and chronology of principal growth stages for *Stevia rebaudiana* in temperate conditions according to thermal time accumulation ($^{\circ}\text{C}/\text{day}$). Variability observed in the duration of each stage is represented in the figure by a black rectangle showing the range of phenotypes observed on tested plants, genetic resources and progenies, from the most precocious to the latest

inflorescences as well as flowering ones. The duration of each stage corresponds to the observations in the field trial and takes into account the variability in our genetic diversity in the field trial. Indeed, each stage was represented in order to express all the variability, from the most precocious to the latest phenotype observed on the tested plants. On the Blagon progeny field, some plants were noted as being later than the genetic resources for every stage. This result was taken into account in our description of the duration (Figure 2). This variability of flowering time has already been described for genotypes (Hastoy, 2018).

4 | CONCLUSION

In this study, the vegetative growth and reproductive stages of *S. rebaudiana* were described for the first time using the universal BBCH scale. Phenological observations were performed over 2 years of production on both genetic resources and progenies. This repetition of scoring led to precise and detailed phenological descriptions, providing a strong foundation for the scale comprising 10 development stages. Duration and chronology of the BBCH stages were also determined in field cultivation conditions, contributing to improved knowledge of stevia cropping under a temperate climate.

This uniform digit-coded scale responds to a scientific and agronomic need. Through BBCH description, researchers, breeders and stevia producers can use a shared, precise, easily learned description of the phenological stages of stevia, as well as a common vocabulary. For agronomic management of stevia, knowledge of these phenological stages will help to improve the cropping itinerary. Indeed, the

efficiency of farm inputs (fertilisers or water supply for example) is deeply linked to the phenological stages of applications (Wise et al., 2011). For researchers, the BBCH scale is a powerful tool to compare studies into the stevia community, but also other crops. This two-digit scale could also be used with automated phenotyping, as nondestructive technologies are becoming more and more developed to accelerate breeding programs (Fiorani & Schurr, 2013).

ACKNOWLEDGEMENTS

Z.L.B. was supported by ANRT grant no. 2017/0487 and Oviatis SA. This project was funded by the Nouvelle-Aquitaine Region. The authors thank the company Oviatis (Estillac, France) and INVENIO (Ychoux experimental sites, France) for the plant production and experimental site management, and Solenne Boutet who took pictures of the seeds during her internship for the first year of her master's degree.

ORCID

Valérie Schurdi-Levraud  <https://orcid.org/0000-0001-5519-5800>

REFERENCES

- Acosta-Quezada, P. G., Riofrío-Cuenca, T., Rojas, J., Vilanova, S., Plazas, M., & Prohens, J. (2016). Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*, 199, 216–223.
- Andolfi, L., Macchia, M., & Ceccarini, L. (2006). Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 1, 257–262.
- Angelini, L. G., Martini, A., Passera, B., & Tavarini, S. (2018). Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and associated challenges. In J.-M. Mérillon &

- K. G. Ramawat (Eds.), *Sweeteners* (pp. 35–85). Cham, Switzerland: Springer.
- Archontoulis, S. V., Struik, P. C., Vos, J., & Danalatos, N. G. (2010). Phenological growth stages of *Cynara cardunculus*: Codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 156, 253–270.
- 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 steviol* (PhD dissertation). Toulouse, France: INP-EI Purpan. Retrieved from <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00003080/>
- 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. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63, 685–694.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N., & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 527–536.
- Bridel, M., & Lavielle, R. (1931). The sweet principle in Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*, Bertoni). II. Hydrolysis of stevioside by enzymes. III. Steviol by enzymic hydrolysis and isosteviol by acid hydrolysis. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 13, 781–796.
- Carneiro, J. W. (2007). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. *Canadian Journal of Plant Science*, 87, 861–865.
- Ceunen, S., & Geuns, J. M. C. (2013a). Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Biologia Plantarum*, 57, 390–394.
- Ceunen, S., & Geuns, J. M. C. (2013b). Steviol glycosides: Chemical diversity, metabolism, and function. *Journal of Natural Products*, 76, 1201–1228.
- Ceunen, S., & Geuns, J. M. C. (2013c). Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198, 72–82.
- Cosson, P., Hastoy, C., Errazu, L. E., Budeguer, C. J., Boutié, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Genetic diversity and population structure of the sweet leaf herb, *Stevia rebaudiana* B., cultivated and landraces germplasm assessed by EST-SSRs genotyping and steviol glycosides phenotyping. *BMC Plant Biology*, 19, 436.
- Fernández, J., Curt, M. D., & Aguado, P. L. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 222–229.
- Fiorani, F., & Schurr, U. (2013). Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 267–291.
- Flemmer, A. C., Franchini, M. C., & Lindström, L. I. (2014). Description of safflower (*Carthamus tinctorius*) phenological growth stages according to the extended BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 166, 331–339.
- Gantait, S., Das, A., & Banerjee, J. (2018). Geographical distribution, botanical description and self-incompatibility mechanism of genus *stevia*. *Sugar Tech*, 20, 1–10.
- Grompone, M. A. (2020). Sunflower and high-oleic sunflower oils. In *Bailey's industrial oil and fat products* (pp. 1–54). Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Ltd. American Cancer Society.
- Hastoy, C. (2018). *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* (MS thesis). Bordeaux, France: INRAE, Villenave d'Ornon. Retrieved from <http://www.theses.fr/2018BORD0118>
- Hastoy, C., Cosson, P., Cavaignac, S., Boutié, P., Waffo-Teguo, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128, 607–619.
- Hastoy, C., Le Bihan, Z., Gaudin, J., Cosson, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). First report of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* in France and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance. *Plant Disease*, 103(7), 1544–1550.
- Heide, O. M. (1993). Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. *Physiologia Plantarum*, 88, 531–540.
- Keller, M. (2010). Chapter 2: Phenology and growth cycle. In M. Keller (Ed.), *The science of grapevines* (pp. 49–83). San Diego, CA: Academic Press.
- Khalil, S. A., 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.
- Kinghorn, A. D. (2002). *Stevia: The genus Stevia*. London, England: Taylor & Francis.
- Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Boom, T. V. D., Langelüddeke, P., Stauss, R., Weber, E., & Witzinger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology*, 119, 561–601.
- Le Bihan, Z., Gaudin, J., Robledo-García, F., Cosson, P., Hastoy, C., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). First report of *Sclerotium stem rot* caused by *Sclerotium rolfsii* on *Stevia rebaudiana* in southwestern France. *Plant Disease*, 103(2), 584. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-04-19-0696-PDN>
- Lewis, W. (1992). Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, 46, 336–337.
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kąkol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimak, A., Sliwiska, E., & Pistelli, L. (2018). Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae*, 234, 10–18.
- McMaster, G., & Wilhelm, W. (1997). Growing degree-days: One equation, two interpretations. *Agricultural and Forest Meteorology*, 87, 291–300.
- Maiti, C. K., Sen, S., Acharya, R., & Acharya, K. (2007). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology*, 56, 723–723.
- Meier, U., Bleiholder, H., Brumme, H., Bruns, E., Mehring, B., Proll, T., & Wiegand, J. (2009). Phenological growth stages of roses (*Rosa* sp.): Codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 154, 231–238.
- Meier, U., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Heß, M., ... Van Den Boom, T. (2009). The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—History and publications. *Journal für Kulturpflanzen*, 61, 41–52.
- 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. *Journal of Experimental Botany*, 30, 1211–1222.
- Moraes, R. M., Donega, M. A., Cantrell, C. L., Mello, S. C., & McChesney, J. D. (2013). Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Industrial Crops and Products*, 51, 385–389.
- Munz, S., Präger, A., Merkl, 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.
- Parent, B., Millet, E. J., & Tardieu, F. (2019). The use of thermal time in plant studies has a sound theoretical basis provided that confounding effects are avoided. *Journal of Experimental Botany*, 70, 2359–2370.
- Raina, R., Bhandari, S. K., 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, N. W. (2006). Cultivation of *stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. In *Advances in agronomy* (pp. 137–177). San Diego: Elsevier Academic Press.

- Reis, M., Coelho, L., Santos, G., Kienle, U., & Beltrão, J. (2015). Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. *Agricultural Water Management*, 152, 217–221.
- Shock, C. C. (1982). Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California (Report No. 122). In *Agronomy progress report*. Davis, CA: University of California.
- Smith, J. R. (1996). *Safflower*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Soejarto, D. (2002). Botany of stevia and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia: The genus stevia* (pp. 18–39). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Esposti, D. 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.
- Sun, J. (2016). Development of stevia and steviol glycosides industry in China. In *Proceedings of the 9th Stevia symposium 2016* (pp. 145–150). Gothenburg, Sweden: Jan M.C. Geuns.
- Tandel, K. (2011). Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2, 236–243.
- 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 [sweeteners]. *Italian Journal of Food Science*, 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2121–2129.
- Wise, K., Johnson, B., Mansfield, C. W., & Krupke, C. H. (2011). Managing wheat by growth stage. *Purdue Agriculture*, 422, 6.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91, 1–27.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415–421.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Le Bihan Z, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V. Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale. *Ann Appl Biol*. 2020;1–13. <https://doi.org/10.1111/aab.12626>

1.3. Transfert des connaissances vers la filière

Le travail de construction de cette échelle BBCH de stévia a pu être valorisé sous la forme d'un article scientifique, et offre un premier outil accessible à la communauté scientifique travaillant sur *S. rebaudiana*. Cependant, ce format n'est pas adapté pour une communication aux acteurs de la filière, moins coutumiers de la lecture d'articles scientifiques, en particulier en anglais. Il était donc nécessaire d'utiliser un un format fiche technique dont la lecture est rapide, comme celles qui peuvent être produites par les instituts techniques, sur les grandes cultures par exemple. C'est pourquoi une version synthétique de l'échelle BBCH de la stévia a été développée. Cette échelle a été soumise à la validation d'Aurélie Barrada, productrice de stévia en Lot-et-Garonne et présidente de l'association SweetVia et de Cécile Hastoy, responsable R&D filière amont chez Oviatis. Au printemps 2020, Oviatis a communiqué cette fiche de synthèse aux nouveaux producteurs de stévia, localisés dans le Lot-et-Garonne, le Gers et le Pays Basque.

Comprendre la culture de la Stévia

Fiche technique : L'échelle BBCH



L'échelle BBCH est une échelle universelle permettant de décrire les stades phénologiques des cultures. Chaque stade de développement peut être identifié par un code décimal.



Stades du développement végétatif



Stade principal 0: de 00 à 09
Développement des bourgeons
 Les premières feuilles commencent à apparaître au collet et à la base des tiges de l'année précédente



Stade principal 1: de 10 à 19
Développement des tiges principales
 Les tiges principales et leurs feuilles se développent. Le deuxième chiffre correspond au nombre de paires de feuilles développées sur les tiges



Stade principal 2: de 20 à 29
Apparition des tiges secondaires
 Les tiges secondaires se développent au niveau du pétiole des feuilles des tiges principales



Stades principaux 3 et 4: de 30 à 49
Elongation des tiges (3) et développement de la biomasse foliaire (4)
 La notation de l'élongation des tiges se fait en fonction de la longueur finale
 → Stade 32 = longueur des tiges est à 20% de la longueur finale
 La notation du développement de la biomasse foliaire se fait selon la biomasse finale
 → Stade 45 = 50% de la biomasse foliaire s'est développée



Stades du développement reproductif



Stade principal 5: de 50 à 59
Développement des bourgeons floraux
 Le stade 50 marque la transition entre les stades végétatifs et les stades reproductifs. C'est à partir de ce stade qu'il est conseillé de récolter.



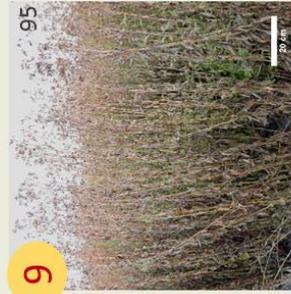
Stade principal 6: de 60 à 69
Floraison
 Les fleurs de la stévia poussent en inflorescence. Les dates de floraison varient beaucoup selon les génotypes



Stades principaux 7 et 8: de 70 à 89
Développement (7) et maturation des fruits - akènes (8)



Stade principal 9: de 90 à 99
Senescence
 La senescence commence au niveau des feuilles proches de l'apex pour descendre vers les feuilles plus âgées



Auteurs : Zoé Le Bihan / Cécile Hasloy

Figure 1.3 : Fiche technique de communication de l'échelle BBCH pour la filière de la stévia

1.4. Perspectives et conclusions

Ce chapitre a permis la présentation des stades phénologiques de stévia décrits pour la première fois d'après l'échelle standardisée BBCH. La publication de cette échelle répond à un besoin de la communauté scientifique et agronomique travaillant sur la culture de la stévia. Ces descriptions vont permettre aux acteurs de la filière comme les chercheurs, sélectionneurs, et producteurs de stévia de faire référence à des descriptions et à un vocabulaire facile d'apprentissage, précis et commun. Les chercheurs pourront référer plus précisément les stades auxquels les plants de stévia ont été étudiés, mesurés, ou récoltés. Dans un contexte d'amélioration génétique, la disponibilité d'un outil uniformisé pour décrire les stades de mesures est indispensable pour réaliser une comparaison des études entre elles et utiliser des protocoles partagés. De plus, l'avantage de l'échelle BBCH est la comparaison possible avec d'autres cultures, par exemple d'autres Astéracées comme la carthame des teinturiers (*Carthamus tinctorius*), comme cela a été fait dans l'article (Le Bihan *et al.*, 2020), partie 1.2.

La construction de cette échelle BBCH sur stévia présente cependant certaines limites. En effet, l'utilisation du pourcentage de stade final de la hauteur pour le stade 3 et de la biomasse pour le stade 4 n'est pas complètement satisfaisante car elle nécessite une première connaissance de la plante par les utilisateurs. La construction du stade 3 aurait pu passer par la description du nombre d'entrenœuds, par exemple : 31 = un entrenœud visible, 36 = six entrenœuds visibles, 39 = neuf entrenœuds et plus. Cette description est adaptée et utilisée dans certaines échelles BBCH comme pour le carthame (Flemmer *et al.*, 2015) ou encore le café (Arcila-Pulgarín *et al.*, 2002). Cependant, pour stévia, cette description manque de précisions car le stade 39 serait vite atteint et représenterait une grande diversité de stades phénologiques. De plus, la description par le pourcentage de hauteur final pour la description du stade 3 a été largement utilisée dans la littérature (Archontoulis *et al.*, 2010; Martinelli and Galasso, 2011; Martinez-Nicolas *et al.*, 2016; Kishore, 2018), ce qui conforte notre choix. A notre connaissance, il n'existe pas pour le stade 4 de la stévia de méthode ou d'indicateur permettant de décrire en temps réel le développement de la biomasse foliaire. A l'avenir, une amélioration de cette description devrait être possible si les connaissances sur la stévia sont plus amplement développées.

L'emploi de cette échelle BBCH est également utile dans le suivi technique et agronomique de la culture de stévia et la connaissance des stades phénologiques de la stévia va permettre

d'améliorer l'itinéraire cultural. L'efficacité des intrants (irrigation, fertilisation) est fortement dépendante du stade phénologique d'application (Wise *et al.*, 2011).

La démocratisation de cet outil est passée par la construction d'une « fiche technique » et validée par Cécile Hastoy et Aurélie Barrada, deux intervenantes majeures d'Oviatis et SweetVia. Cette fiche a ensuite été transmise à tous les acteurs de la filière stévia en Nouvelle Aquitaine, c'est-à-dire les différents producteurs, les ingénieurs agronomes travaillant sur le projet stévia à Invenio, et l'équipe impliquée dans le projet stévia de l'INRAE de Villenave d'Ornon.

Chapitre 2. Etude de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques de *S. rebaudiana* en conditions de production

2.1. Introduction

La production de stévia en Europe est plutôt récente, limitée, et localisée majoritairement au Sud de la France, en Grèce et en Italie. Nous avons peu de recul sur l'itinéraire cultural le plus adapté à cette culture. Les performances agronomiques des différentes ressources génétiques dans ces environnements de culture sont peu décrites. De nombreuses questions se posent alors, notamment sur l'établissement de la culture et sa rentabilité économique à long terme.

L'évaluation de la production d'une culture de la stévia se fait grâce au calcul du rendement en SG, présenté en g/plant en recherche et en kg/ha pour la production agricole. Ce rendement se divise en deux composantes qui sont la biomasse foliaire produite (g/plant) et la teneur en SG contenue dans ces plants (%w/w). L'évaluation du rendement en SG a montré une grande variabilité selon les génotypes étudiés (Parris *et al.*, 2016; Munz *et al.*, 2018; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019) et leur environnement de culture. Les études menées spécifiquement en Europe confirment cette forte variabilité mais elles présentent cependant des limites. La plupart des études portent sur un faible nombre de ressources génétiques (Andolfi *et al.*, 2006; Libik-Konieczny *et al.*, 2018; Munz *et al.*, 2018) non identifiées au sein de la diversité mondiale de stévia. De nombreuses études sont réalisées sur une période de culture courte pour la stévia, entre une à deux années (Vouillamoz *et al.*, 2016; Munz *et al.*, 2018; Libik-Konieczny *et al.*, 2018).

Les études sur la production de biomasse foliaire de stévia témoignent d'une grande variabilité. En première année de production, Hastoy (2018) observe une variabilité comprise entre 20 g/plant et 91 g/plant selon les génotypes étudiés. Barbet-Massin (2015) a mesuré des rendements allant jusqu'à 190 g/plant. Une étude de l'évolution de la production de biomasse foliaire chez stévia a montré une augmentation jusqu'à 5 ou 6 années de production (Andolfi *et al.*, 2006), mais en évaluant uniquement deux génotypes de stévia. D'autres études, portant sur les deux premières années de culture, ont observé des augmentations de la production de biomasse foliaire (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Hastoy, 2018), chez tous les génotypes étudiés. De plus, des descriptions plus fines de la biomasse peuvent être réalisées à travers l'étude des traits liés à l'architecture de la canopée, comme dans l'étude de Hastoy, Cosson, *et al.*, (2019).

La description de ces traits et l'identification de trois types d'architecture sur une collection de stévia ont également apporté des éléments pour la sélection de ressources génétiques adaptées à la production agricole, et la mécanisation des étapes de culture, comme la récolte.

La deuxième composante du rendement en SG est la teneur en SG. Ce trait présente une grande variabilité et est très dépendant du génotype considéré. Une étude italienne a, par exemple, observé des teneurs allant de 9 %w/w jusqu'à 27 %w/w (Montoro *et al.*, 2013). Ce trait semble aussi dépendant des années de production, et deux études ont montré une augmentation de la teneur en SG entre la première et la deuxième année de culture, pour la majorité des RG évalués (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Hastoy, 2018). A notre connaissance, il n'existe pas d'études ayant mesuré la teneur en SG sur une période de plus de deux ans.

Si la teneur en SG est un élément majeur pour évaluer le rendement, le profil gustatif des SG produits par la plante est également très important pour la consommation. L'objectif sur la qualité des SG produits est de sélectionner et cultiver des ressources génétiques produisant surtout des SG au goût sucré (RebA, RebD, RebM, RebB). L'évolution de ces traits au cours du développement végétatif de stévia est peu décrite. Des études menées en conditions contrôlées indiquent que la teneur maximale en SG est atteinte lors des stades reproductifs de la stévia, pendant la floraison plus particulièrement (Ceunen and Geuns, 2013a; Barbet-Massin, 2015). Cependant, des travaux récents indiqueraient que le rendement maximal est atteint à la fin des stades de développement végétatif, juste avant la mise à fleur (Hastoy, 2018).

Aujourd'hui, la stévia européenne est plutôt cultivée comme une culture pérenne (Barbet-Massin, 2015). Ce mode de culture nécessite d'avoir des variétés capables de survivre aux hivers européens, plus rigoureux que ceux de la zone d'origine de la stévia (Sumida, 1980). En Europe, le trait de survie à l'hiver devient un facteur limitant de la production de stévia. La variabilité de reprise après la période hivernale de ressources génétiques de stévia a été assez peu décrite dans la littérature (Mizukami *et al.*, 1983; Moraes *et al.*, 2013). Il y a donc un fort intérêt à suivre ce trait sur une longue période de culture sur une collection de RG.

Enfin, bien que la durée d'implantation avant la première récolte soit un facteur important à prendre en compte dans l'itinéraire cultural d'une pérenne, comme pour la myrtille par exemple, une récolte pendant l'implantation des plants impacte négativement la production des années suivantes (Strik and Buller, 2005). Cela n'a jamais été étudié chez stévia.

Aujourd'hui la sélection sur stévia est surtout focalisée sur l'augmentation du rendement en SG, ce qui passe par des objectifs de maximisation de la biomasse foliaire et la sélection

d'individus avec de fortes teneurs en SG (%w/w). Cependant, dans le cadre du développement de la filière stévia dans le Sud-Ouest de la France, les contraintes agronomiques ont conduit à s'intéresser à l'architecture des plants. Dans l'article de Hastoy *et al.*, (2019), trois types d'architecture de plants sont identifiés chez *S. rebaudiana* : la première architecture regroupe les individus avec de larges feuilles et une structure compacte, la deuxième architecture regroupe les individus avec une large aire de canopée, plutôt qualifiée d'étalée, enfin la troisième architecture regroupe des individus avec une architecture intermédiaire. Cette étude a également montré que l'architecture des plants n'était pas corrélée au rendement en biomasse foliaire. C'est donc un critère d'intérêt pour la sélection, directement lié à la possibilité de mécaniser la production, en particulier pour les étapes du désherbage.

Les constats précédents mettent en lumière la nécessité de poursuivre le développement des connaissances sur les traits d'intérêts agronomiques et de l'architecture sur un plus grand nombre de ressources génétiques. Ces résultats pourront être directement utilisés dans le cadre de la mise en place d'un programme d'amélioration, mais également transmis à la filière de la stévia, en particulier en agriculture biologique dans le Sud-Ouest de la France.

Dans le contexte de la thèse de Cécile Hastoy, 15 ressources génétiques en collection à l'INRAE de Villenave d'Ornon ont été plantées sur deux parcelles expérimentales en 2016. La première est localisée sur la commune de Sainte-Livrade (47) et la deuxième à Liposthey (40). Cécile Hastoy a décrit de façon détaillée et quantitative les phénotypes des génotypes sur ces deux parcelles en 2016 et 2017. Ces études lui ont permis d'évaluer la variabilité phénotypique d'une collection de *S. rebaudiana* sur les traits liés au rendement sur les deux premières années de production, et d'identifier les caractères d'intérêt pour le programme d'amélioration de la stévia en Nouvelle Aquitaine.

La stévia étant une culture pérenne, pouvant être cultivée pendant 5 à 6 ans en Europe (Andolfi *et al.*, 2006), il était intéressant de poursuivre le phénotypage sur plusieurs années pour compléter les connaissances sur ces ressources génétiques. En 2018, le taux de survie après l'hiver des plants de la parcelle localisée à Sainte-Livrade s'est avéré très faible (seul un bloc avait partiellement repris), les efforts de phénotypage se sont donc concentrés sur la parcelle de Liposthey lors des récoltes en 2018 et en 2019.

La première partie de ce chapitre présente sous forme d'un article en anglais (soumis en juillet 2020 à Industrial Crops and Products) l'évaluation des 15 ressources génétiques, pendant trois années de production avec deux modalités de récolte en première année, avec une partie des

individus récoltés et d'autres non. La deuxième partie de ce chapitre présente sur une période de quatre ans l'évaluation phénotypique de plants non récoltés en première année de production.

2.2. To cut or not to cut? That is the question in *Stevia rebaudiana* Bertoni production for first year harvest

Résumé:

Stevia rebaudiana (Bertoni) est une culture pérenne appartenant à la famille des *Asteraceae* et originaire du Nord du Paraguay (climat humide et subtropical). Cette plante accumule dans ses feuilles des glycosides de stéviol (SG), des édulcorants naturels au pouvoir sucrant 300 fois supérieur à celui du saccharose. Cette propriété fait de la stévia une culture d'intérêt agronomique et industriel. En Europe, cette culture est émergente et de récentes études ont démontré qu'il était possible de cultiver la stévia en conditions de climat tempéré de façon pérenne et viable économiquement. Cependant, le manque de connaissances sur l'itinéraire cultural est un frein à l'expansion de cette culture en particulier sur les traits spécifiques aux plantes pérennes, comme la durée de culture, l'hivernage, et l'impact d'une récolte pendant l'année d'implantation. Dans cet article, l'impact d'une récolte pendant la première année de production sur les traits agronomiques a été étudiée pendant trois années de production, pour 15 ressources génétiques de stévia cultivées dans le Sud-Ouest de la France. Les performances des génotypes y sont évaluées sur les traits d'intérêts agronomiques pour la stévia : le rendement en SG (g/plant) et ses deux composantes, la teneur en SG dans les feuilles (%w/w) et la production de biomasse foliaire sèche (g/plant), ainsi que le profil en SG. Deux variables cumulatives, le rendement en SG cumulé (kg/ha) et le rendement en biomasse foliaire cumulé (kg/ha), ont également été intégrées à l'étude pour avoir une vision d'ensemble des performances des génotypes dans les deux modalités de récolte en première année sur toute la durée de l'étude. Les résultats sur le rendement en SG et la biomasse foliaire présentent une grande variabilité au sein des génotypes étudiés. Ces traits sont également impactés par la modalité de récolte en première année de production. Une diminution du rendement en SG et de la production de biomasse foliaire sèche est observée pour les plants récoltés en première année de production. Aucune tendance claire n'est observée pour la teneur ou le profil en SG. Les variables cumulatives confirment les résultats précédents en montrant une diminution du rendement en SG et de la production de biomasse foliaire pour les plants récoltés en première année de production. Finalement, nos résultats offrent de nouvelles connaissances pour sélectionner au sein des 15 ressources génétiques évaluées, des plants adaptés à un environnement tempéré dans les deux itinéraires techniques culturaux testés.

Mots clés : *Stevia rebaudiana*, rendement en SG, biomasse foliaire, modalité de récolte, implantation d'une culture

To cut or not to cut? That is the question in first year harvest of *Stevia rebaudiana*

Bertoni production

Zoé Le Bihan^{a,b}, Cécile Hastoy^b, Patrick Cosson^a, Philippe Boutié^b, Dominique Rolin^a,

Valérie Schurdi-Levraud^a

a. Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, F-33140 Villenave d'Ornon, France

b. Oviatis SA, 3 chemin de Perroudis, 47310 Estillac, France

Corresponding author: V. Schurdi-Levraud

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

Abstract:

Stevia rebaudiana (Bertoni) is a perennial crop from north Paraguay (humid subtropical climate), belonging to the *Asteraceae* family. Stevia is an emerging crop in Europe (mild climate), cultivated for its steviol glycosides (SG), natural sweeteners that are 300 times sweeter than sucrose which is the main agronomical and industrial interest of stevia. Recent studies showed that it is possible to cultivate stevia in mild climates as a perennial and economically viable crop. However, lack of knowledge on cropping system specific to perennial plants, the duration of cultivation, the overwintering and the impact of first-year crop establishment act as a disincentive to crop expansion. Harvest management through the impact of harvesting in the first year of establishment was investigated for agronomic traits over three years of production for 15 stevia genotypes cultivated in the south-west of France. Two harvest modalities were compared: 2H when the plant is not harvested in the first year of establishment and 3H when the plant is harvested in the first year. The genotypes performance was assessed based on: regrowth rate after winter, SG yield (g/plant) through its two components of SG content (%w/w)

and dry leaf biomass (g/plant), and the SG profile. Two cumulative variables, cumulated SG yield and cumulated dry leaf biomass, were also added to the study to obtain an overview of genotype performance during cultivation time and in both harvest modalities. The tested genotypes showed a wide range of response for overwintering, but with a significant decrease of 30% survival rate for plants harvested in first year (3H). SG yield and dry leaf biomass results presented high variability among the different genotypes. These traits were also significantly impacted by the harvest modality, and a decrease in SG yield and dry leaf biomass was identified for plants harvested in first year (3H). No clear tendency was revealed for SG content or SG profile. Cumulative variables confirmed previous results showing a better SG yield and leaf biomass production for plants non-harvested during the first year (2H), at crop-life scale. Our results, on a wide range of genotypes, shed light on the agronomic management of *Stevia rebaudiana* in temperate conditions. They suggest the interest of a first year without harvest, allowing a better establishment of the crop, a better overwintering and a better cumulative yield.

Key words: stevia, overwintering, steviol glycosides yield, harvest management, crop establishment

Abbreviations: SG: steviol glycosides; SGDD: Sum of Growing Degree Days; ST: stevioside; RebA: rebaudioside A; RebC: rebaudioside C; DulA: dulcoside A; RebF: rebaudioside F; Rub: rubudioside; RebD: rebaudioside D; RebM: rebaudioside M; RebB: Rebaudioside B; SB: steviolbioside

1. Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni, a native plant from Paraguay, is a perennial *Asteraceae* whose leaves are traditionally used by the Guarani Indians as a natural sweetener (Soejarto et al., 1983). The sweet taste comes from steviol glycosides (SG), that accumulate in the leaves (Angelini et al., 2018). Stevioside (ST) was the first SG identified and are 250 to 300 times sweeter than sucrose (Bridel and Lavieille, 1931). Others SG more recently identified, presenting a sweetening power varying from 50 up to 400 sweeter than sucrose (Ceunen and Geuns, 2013a; Chaturvedula et al., 2011; Chaturvedula and Meneni, 2017; Ibrahim et al., 2016; Mao et al., 2017; Perera et al., 2019, 2017; Prakash et al., 2014; Prakash and Chaturvedula, 2014). These glycosylated diterpenes compounds have been consumed in Japan as a natural alternative to synthetic sweeteners since the 1970s. More recently, western consumers have also begun using these natural sweeteners, as illustrated by the increase in product launches, with more than 14,000 food products now sweetened with stevia, on the market (Mintel Global New Products Database, 2017). This industrial sector requires a large supply of stevia leaves. Today, China is the main stevia leaf supplier (Gantait et al., 2018), accounting for 80% of global production in 2016, corresponding to 50,000 – 60,000 tons of dry leaves a year (Sun, 2016). However production is growing in many other parts of the world, including Europe.

For 15 years now, numerous experiments have been carried out in Europe with the aim of validating the crop's establishment and implementing improvement strategies. European experiments in Portugal (Coelho et al., 2019; Lankes and Grosser, 2015; Reis et al., 2015), Germany (Lankes and Zabala, 2011; Munz et al., 2018; Woelwer-Rieck et al., 2010), Denmark (Grevsen et al., 2015), Italy (Andolfi et al., 2006; Tavarini and Angelini, 2013), Greece (Zachokostas, 2016), Spain (Labrador et al., 2014), Switzerland (Vouillamoz et al., 2016), France (Barbet-Massin, 2015; Hastoy et al., 2019), Poland (Libik-Konieczny et al., 2018), Hungary (Takács-Hájos et al., 2019), Bulgaria (Denev et al., 2017), have confirmed the

possibility of *Stevia rebaudiana* cultivation as a perennial plant in mild climate conditions (Andolfi et al., 2006), with sufficient yield to make the production economically viable (Ferrazzano et al., 2016).

S. rebaudiana's yield can be characterized through different key indicators: total SG yield, expressed in kg/ha and t/ha for agronomic production, SG yield, expressed in g/plant for research purpose and SG profil. Total SG yield (kg/ha or t/ha) and SG yield (g/plant) are defined by two measures: the dry leaf biomass, weighted per for SG yield (g/plant) or weighted per hectare for total SG yield (kg/ha or t/ha), and leaf SG content (%w/w dry leaves). Those variables were measured on fifteen stevia genotypes cultivated in an experimental field for two years in southwestern France (Hastoy, 2018). In the conditions of Hastoy's study the total leaf SG content explains 20% of SG yield variance whereas dry leaf biomass explains 75% of SG yield variance.

Stevia's SG profiles are characterized by the diversity of SG present in its leaves and the proportion of each SG from total SG. So far, 46 SG have been identified in *Stevia rebaudiana* (Ceunen and Geuns, 2013a; Chaturvedula and Meneni, 2017; Ibrahim et al., 2016; Mao et al., 2017; Perera et al., 2017). However, in most studies the number of SG analyzed is limited by analytical capacities, ten of these SG are often used to characterized SG profile accumulated in highest content in stevia leaves : stevioside (ST), rebaudioside A (RebA), rebaudioside M (RebM), rebaudioside D (RebD), rebaudioside C (RebC), dulcoside A (DulA), rebaudioside F (RebF), rubudioside (Rub), rebaudioside B (RebB) and steviolbioside (SB), such as in Barbet-Massin et al., (2016) and Hastoy et al., (2019) studies. Among these ten, the two SG accumulated in higher quantities in leaves are ST and RebA (Ceunen and Geuns, 2013b). Each SG has a specific flavour: RebA, RebM and RebD have a sweet taste while ST, RebC and DulA elicit a bitter aftertaste (Hellfritsch et al., 2012).

SG yield and SG profile are significantly dependent on the genotype cultivated (Hastoy et al., 2019; Parris et al., 2016). However, while the SG profiles are relatively stable per genotype with respect to production years and environment (Barbet-Massin et al., 2016; Hastoy, 2018), SG yield is not, and is particularly susceptible to environmental and growing conditions. This interplay is all the more important as *S. rebaudiana* is a perennial plant.

Stevia leaf biomass production, a key yield variability factor, can vary according to environmental conditions such as climate, cropping system, years of production, genetic diversity, and interaction with environmental factors. The trait presents high variability, and ranges from 37.6 to 190 g dry matter/plant in temperate climates depending on the genotype (Barbet-Massin et al., 2015). Foliar biomass production can be considered a key driver of growth in improving stevia yield.

Total leaf SG content depends on the genotypes' interaction with environmental factors. In the literature, a wide range of SG content has been described from 4.6 to 27.3 %w/w dry leaves according to genotype and environment (Barbet-Massin et al., 2016; Montoro et al., 2013). SG content increases significantly with years of production (Barbet-Massin, 2015; Hastoy, 2018).

Among the various environmental factors that can play a key role in stevia performance, response to water availability and nutrients has been widely described (Angelini et al., 2018; Barbet-Massin et al., 2015; Lavini et al., 2008; Pordel et al., 2015). *S. rebaudiana* also responds sharply to photoperiod variations. A short photoperiod with 12h of light, leads to early flowering (Ceunen and Geuns, 2013b; Metivier and Viana, 1979). However a long-day photoperiod, with 16h of light, increases the SG content in leaves up to 30%, as it contributes to extending vegetative growth and increases biomass yield (Ceunen and Geuns, 2013b). In temperate growing conditions, flowering occurs at the beginning of autumn as the day length declines. Vegetative phenological stages of stevia are characterized by an increase in SG content, reaching a maximum at flower budding stage (Barbet-Massin, 2015; Ceunen and

Geuns, 2013b) followed by a decrease in SG content after the beginning of flowering (Barbet-Massin et al., 2016). Another study, investigating the kinetics of SG accumulation on five stevia genotypes during vegetative growth, shows that maximum SG content was reached a month before the stage previously identified (Hastoy, 2018). These studies have improved the definition of the harvest period for this species grown in mild climate conditions.

Stevia yield, especially biomass production is also influenced by traits specific to perennial crops such as first-year crop establishment, age of the stevia plant on the field and overwintering. Plantation time in temperate climate conditions is between March and May as there is less risk of frost than in winter (Angelini et al., 2018; Serfaty et al., 2013). The harvested stevia plants' age impacts biomass production, with a major increase in yield from the first to the fifth year of cultivation (Andolfi et al., 2006). Under mild climate conditions, the number of potential harvests per year was tested, with the result that a single harvest at the end of cultivation time leads to a higher yield than two or three harvests performed over the same cultivation time (Moraes et al., 2013; Serfaty et al., 2013). In a context of agronomic production in southwestern France, farmers generally harvest stevia in the first year of production up until the time of reduced yield.

To cultivate stevia as a perennial crop under temperate conditions, we need to take susceptibility to overwintering into account. This is linked to stevia resistance to low temperatures and is studied through stevia post-winter regrowth rate. The crop can bear a temperature range from 0-2°C to 35°C (Sumida, 1980), but is susceptible to winter frost, with leaf injury below 0°C (Moraes et al., 2013). For stevia to survive low winter temperatures, a plastic or straw mulch provides a solution, making it possible to cultivate the plant as a perennial crop (Moraes et al., 2013). However, in Germany, winter temperatures are too low for a satisfactory post-winter regrowth rate (Lankes and Zabala, 2011).

Overall, most European environments and climate conditions suit stevia cultivation as a perennial crop, but its cropping system in such conditions has still not yet been fully elucidating. In Europe, studies investigated stevia production as perennial, it was either harvested in the first or the second year of production, but no study to date has investigated the impact of a first year harvest on stevia establishment, biomass production, SG content and yield over several years of production. However, in perennial crops, the impact of harvesting during crop establishment is known to potentially reduce future yield (Leyshon and Campbell, 1992; Strik and Buller, 2005).

The goal of this study is to investigate stevia harvest management in temperate conditions. Most studies on stevia have been conducted with a very limited number of genotypes, often misidentified, with generic names such as “Rebaudiana”, “Sugar Love”, “AX” and “Candy” (Libik-Konieczny et al., 2018; Munz et al., 2018; Parris et al., 2016). Our study was conducted on 15 genotypes of various origins that were listed and genetically characterized (Cosson et al., 2019). The impact of harvesting in the first year of production on agronomic traits over three years of production in south-west France was evaluated for these 15 stevia genotypes. Genotype performances is assessed based on usual stevia production agronomic traits: regrowth rate, SG yield through its two components, SG content and leaf biomass, and SG profile. Cumulative variables such as SG cumulated yield and cumulated dry leaf biomass have also been measured as indicators to study the impact of a first-year harvest on stevia genotype performance during cultivation.

2. Material & methods

2.1.Plant material:

Fifteen genotypes were selected from the INRAE collection to be planted in the field trial (Table 1). The genotypes, which originally come from Argentina, Paraguay, Spain and Israel, were obtained from different providers: EUSTAS gene bank (Hortilab, Telgte, Germany), SteviaStore (Paraguay) and Oviatis' collection (Lacaussade, France).

Table 1: List of the 15 genetic resources of *Stevia rebaudiana* in field conditions in the south-western of France (Cosson et al., 2019)

Name	Providers	Country
Cult75_GER	EUSTAS gene bank	Germany
Cult76_GER	EUSTAS gene bank	Germany
Cult63_GER	EUSTAS gene bank	Germany
Cult33_FRA	Oviatis	France
Cult34_FRA	Oviatis	France
Cult102_SPA	Oviatis	France
Cult103_SPA	Oviatis	France
Cult135_FRA	Oviatis	France
Cult29_FRA	Oviatis	France
Cult12_CAN	Oviatis	France
Cult36_FRA	Oviatis	France
Cult37_FRA	Oviatis	France
Cult31_FRA	Oviatis	France
Cult32_FRA	Oviatis	France
Cult51_FRA	Stevia store	Paraguay

2.2.Experimental design:

Each genotype was produced as a clone through *in vitro* cuttings from the parental plant of each genetic resource. *In vitro* cuttings were produced and grown under regulated greenhouse conditions for seven weeks (22°C – 18°C). Acclimatization begun with 10 days with saturated hygrometry level, followed by two weeks of gradual aeration. Cuttings from 10 to 15 cm high (3 to 5 nodes) were transplanted into a Jiffy®7 pellet (42 mm diameter, Jiffy, France). The plantlets were planted on a private farm in Liposhtey (44°17'56.9''N 0°53'14.7''W). Plantation was performed at the end of June 2016 with plantlets aged 7 weeks old after acclimatization. The planting process and the conditions were previously described in Hastoy et al., (2019).

The field trial consisted of 4 randomized complete blocks design (RCBD). Each block was composed of 3 rows. In a block, plant spacing was 33 cm x 60 cm. Distance between two successive blocks was 1 m. The field trial density was 3.75 plants / m². The fifteen genotypes were planted in each block. It consisted of 21 clones per genotype (7 plants x 3 rows). 64 clones per genotypes were planted in total.

Each winter, all the plants were cut down at 5 cm above the soil in December and covered with a wintering veil (30 g/m²). In 2017 and 2018, this crop protection was removed in March. In summer, irrigation of 1 L/h per drip was applied to each plant for 1 hour every day, while in autumn the water supply was limited to 30 minutes. Irrigation was the same over the 3 years of the study. The drop-by-drop irrigation system was used for fertilization in July 2017 with a supply of NovaTec® Solub 14-8-30 (Compo Expert), at 40 kg nitrate/ha, and in July 2018 a solution of UNIVERSOL® Blue 18-11-18-2,5 (N, P, K, MgO) (ICL Specialty Fertilizers) was applied. Weeds were removed by hand at the plant collar. In order to control Septoria Leaf Spot disease in 2016, 2017 and 2018, Score® 250EC or Ortiva®25SC fungicides (Syngenta) at 0.5 L/ha were applied 3 times (May, July, August). Harvesting was in September at phenological stage 50, corresponding to the emergence of inflorescence (Le Bihan et al., 2020). Every

genotype was harvested at this phenological stage, corresponding to different date in September according to phenological precocity.

2.3.Measured plant traits

32 plants were selected per genotype, equally distributed in the four block, corresponding to 8 plants per genotype per block. In the first year of production on September 23, 2016, 20 clones were harvested from 32 per genotype. These plants come under the “Harvested in the first, second and third year of production” modality, hereafter called the 3H modality (Figure 1). The plants of the 3H modality were all located in the middle of the block side-by-side. Of the rest of the plants, 12 clones from 32 per genotype were cut down in December 2016. These plants are considered as the “Harvested in the second and third years of production” modality, hereafter called the 2H modality (Figure 1). The plants of the 2H modality were separated from 3H modality plants by separated plants, not harvested in second and third years of production. In December 2016, plants of the 3H modality were cut back, in order to install the wintering veil on the all experimental field.

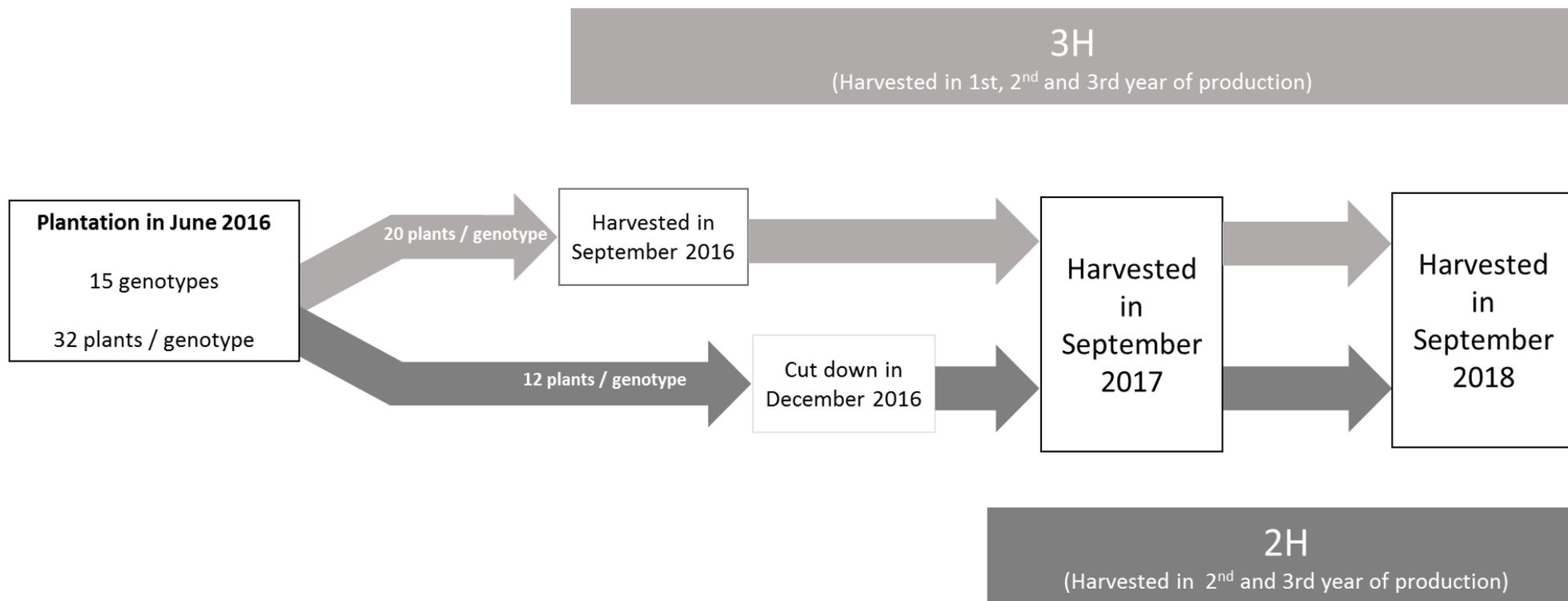


Figure 1: Experimental design performed in a field trial in Liposthey (40). For every 15 genotypes planted in the field trial, 20 plants were harvested in the first, second and third years of production and correspond to the 3H modality, and 12 plants were cut down in December 2016 and harvested in the second and third years of production, corresponding to the 2H modality.

Genotype performance was studied over three years of production. For each year, plant regrowth was recorded for two months after the first signs of regrowth, generally occurring in March. This involved scoring the presence (1) or the absence (0) of each plant planted in 2016. To evaluate the stevia plant performance at harvest stage, dry leaf biomass (g/plant) and SG content (%w/w) were measured, providing the plant SG yield calculation according to the formula:

$$\text{Plant SG yield (g/plant)} = \text{SG content (\% w/w}_{DWleaf}) \times \text{Dry leaf biomass (g/plant)}$$

The sampling procedure to measure dry leaf biomass (g/plant) was similar to the protocol described by Hastoy et al., (2019). Briefly, the whole plant was cut at 10 cm above the ground to collect aerial biomass. Plant samplings were dried at 40°C for 60 hours in a heat chamber (UF750 MEMMERT). The leaves were separated from the stems in order to weight the dry leaf biomass separately from the dry stem biomass.

The SG extraction and quantification protocol was developed by Hastoy et al., (2019). In a few words, SG extraction is performed on 20 mg of dried leaves mixed in 2 mL of ultra-pure water. Samples are maintained at 80°C for 2h in water bath (Isotemp, GPD10, Fischer Scientific). 5µL of supernatant is filtered through a 0.45 µm pore size filter (Agilent), and injected for quantification into a C18 column (Agilent) with the guard column on a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) system. SG elution and detection were identical to the one described in Hastoy et al., (2019), parameters of the quantification are presented Table A.1. This method detects 10 SG: RebD, RebM, ST, RebA, RebC, RebF, DulA, Rub, RebB, SB. The results were expressed as content per unit of dry leaf biomass (%w/w dryleaf) for each SG and total SG, and as a proportion (%) of the content of each SG to total SG content.

To calculate total SG yield (kg/ha) corresponding to field production, the plant SG yield (g/plant) was multiplied by genotype density. The use of density takes the changes due to winter plant losses into account in both harvest modalities and for each genotype. This means that the total SG yield (kg/ha) will be measured by the post-winter regrowth rate.

$$\text{Total SG yield (kg/ha)} = \text{plant SG yield (g/plant)} \times \text{density}$$

Cumulated dry leaf biomass and cumulated total SG yield were also calculated to compare them for both harvest modalities. The mean per block was calculated for each genotype per harvest condition. 2016, 2017 and 2018 values were then calculated to obtain the final cumulated yield value.

2.4.Evaluation of environmental parameters

The environmental parameters recorded in this study are daily temperature, maximum and minimum value, and daily rainfall. These data were collected from plantation time in the first year of production until the end of the experiment using AquaFox Sentek equipment (Agralis). Temperature statements were used to calculate daily GDD (Growing Degree Day). Calculations began from regrowth time (achieved at 50% of regrowth of the plants at crop level), corresponding to 26 March 2017 and 16 April 2018. In 2016, it was calculated from plantation time, in other words, 24 June.

GDD was calculated daily according to the equation and first method presented by McMaster and Wilhelm, 1997:

$$GDD = \left[\frac{T_{max} + T_{min}}{2} \right] - T_{base}$$

With T_{max} = Daily maximum air temperature

T_{min} T_{base} = Temperature below which vegetative growth is considered to stop. For stevia, we used 10°C as the T_{base} according to Guerrero et al., (2015) and Munz et al., (2018).

To obtain SGDD (Sum Growing Degree Day), everyday GDDs were cumulated from the 50% regrowth day until harvest time. = Daily minimum air temperature

2.5. Statistical analysis :

Statistical analysis was performed with R software version 1.1.463.0 (R Core Team, 2018).

Outliers were deleted from the complete final dataframe, using the “car” package (Fox and Weisberg, 2011).

Regrowth rate trait was analyzed through a generalized linear model, performing via the “glm” function from the “stats” package:

$$(1) \text{glm} (y \sim A \times B + \frac{1}{C})$$

With y= regrowth scoring; A = genotype factor; B = first year harvest factor; C = block random factor

Mixed linear models were performed on quantitative variables, performing by “lmer” function from the “lme4” package (Bates et al., 2014):

$$(2) \text{lm}(y \sim A \times B \times C + \frac{1}{D})$$

With y= quantitative variable studied; A = genotype fixed factor; B = first year harvest fixed factor; C = year fixed factor; D = block random factor

Variance analysis were performed on mixed linear models and generalized linear models using the “car” package, “Anova” function (Fox and Weisberg, 2011).

Marginal means and standard error on linear models with the “emmeans” function were calculated from the “emmeans” package (Russel, 2018). This package was also used to calculate significant differences between genotypes and first year harvest modality with Tukey’s Honestly Significant Difference (HSD) test on marginal means. A heatmap on

evaluated traits was created on the standardized marginal means with the “heatmap.2” function from the “gplots” package (Warnes et al., 2016).

Graphics were created using the “ggplot2” package (Wickham et al., 2016).

3. Results

3.1. Temperature accumulation is similar between the 3 years of monitoring according to the SGDD

Sum of Growing Degree Day (SGDD) expresses the accumulated thermal time received by plants during growing time. SGDD appeared to be lower in 2016 compared to 2017 and 2018, as it was calculated from plantation time (Figure 2A). The regrowth date was earlier in 2017, on 26 March, compared to 2018, on 16 April, explaining the SGDD difference between the second and third year of production.

Linear regressions performed on SGDD evolution of each year for the study provided a comparison of SGDD evolution (Figure 2B). Monthly SGDD evolution follows the same regression slopes between years. This result was validated with the calculation of the regression slopes' director coefficient, which was not significantly different between years (Table A3). The increase in temperature during crop growth is similar each year, while significant differences can be shown between months and years (Figure A1 and Table A2). An SGDD calculation was also performed from the beginning of March, independent of the stevia regrowth rate, as represented in Figure A3. In this Figure, the 2016 and 2018 curves are very similar, while the 2017 curve presents a slightly higher increase. The difference between the 2016 and 2018 curves and the 2017 curve starts in March, indicating that the temperature was warmer at the beginning of 2017.

For rainfall, minimum rainfall occurred in April 2018, with just 8.2 mm, while maximum rainfall occurred in January 2018, at 156.4 mm (Figure A2). A variance analysis enabled us to observe a major monthly effect (Table A2). However, as the crop was irrigated, we decided not to focus on this record.

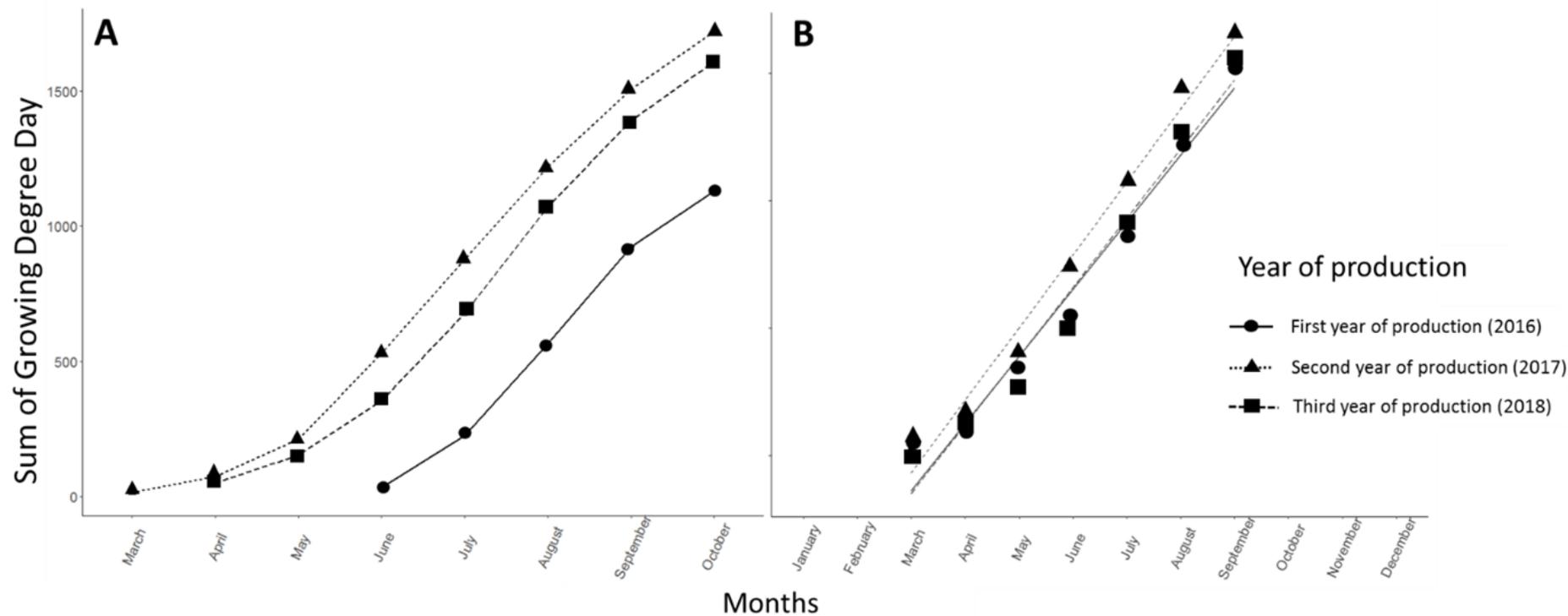


Figure 2: Evolution of Sum of Growing Degree Days (SGDD) for three years of production 2016, 2018 and 2017 in the experimental field in Liposthey (40). (A), SGDD was calculated from the plantation date for 2016 and from the regrowth point for 2017 and 2018. (B) represents linear regression between SGDD and Julian days.

3.2. Regrowth rate is significantly impacted by harvest modality

Regrowth rates (%) were recorded in the 2nd and 3rd year of production for 15 genetic resources of *S. rebaudiana* in order to show whether harvesting modalities (3H or 2H) and genotypes have an impact on winter survival capacity over 3 years (Figure 3).

The regrowth rate trait presents high variability among genotypes from 0% for the “Cult33_FRA” genotype to 100% for the “Cult51_FRA” genotype in the third year at 3H modality. Whatever the 2H or 3H modality, major plant loss occurred during the 2016-2017 winter. For 3H modality, 144 plants died from a total of 300, while a less significant decrease was observed during the 2017-2018 winter, with 33 plants dying from a total of 156 plants (Figure 3). For the 2H modality, 26 from a total of 180 plants died in winter 2016-2017, and 14 from a total of 154 plants died in winter 2017-2018.

Overall, the regrowth rate at 3H modality was lower than the regrowth rate at 2H modality, which represents a difference of 30% of the total planted population in 2018. At 2H modality, the lowest regrowth rate group ranged from 23 to 60.9% of planted stevia, while the highest regrowth rate group ranged from 85 to 99%. At 3H modality, the group with the lowest regrowth rate of 0% to 25% comprised of the four genotypes already found at 2H modality plus “Cult29_FRA”, “Cult12_CAN”, and “Cult31_FRA”, while the group with the highest regrowth rate ranging from 60 to 100% comprised of “Cult76_GER”, “Cult37_FRA”, “Cult103_SPA”, “Cult32_FRA”, and “Cult51_FRA” also included at 2H modality. These groups were confirmed by multiple comparison analyses (Table A4). For most genotypes, the same trend was observed with respect to harvest modality, where a genotype showing a low regrowth rate at 3H modality also showed a low regrowth rate at 2H modality, and respectively. A variance analysis between harvest modalities and genotypes reveals a significant harvest modality effect for most of the genotypes and a significant interaction between genotypes and the harvest modality factor for the trait regrowth rate (Table A4), confirming the previous observations.

Furthermore, some genotypes (“Cult29_FRA”, “Cult31_FRA”, “Cult102_SPA”) present a high regrowth rate decrease between 2H modality and 3H modality, indicating that a first-year harvest strongly impacts their ability to regrow after the winter. However, three exceptions were identified: the “Cult37_FRA”, “Cult51_FRA” and “Cult103_SPA” genotypes presented a regrowth rate that was not significantly different in either modality.

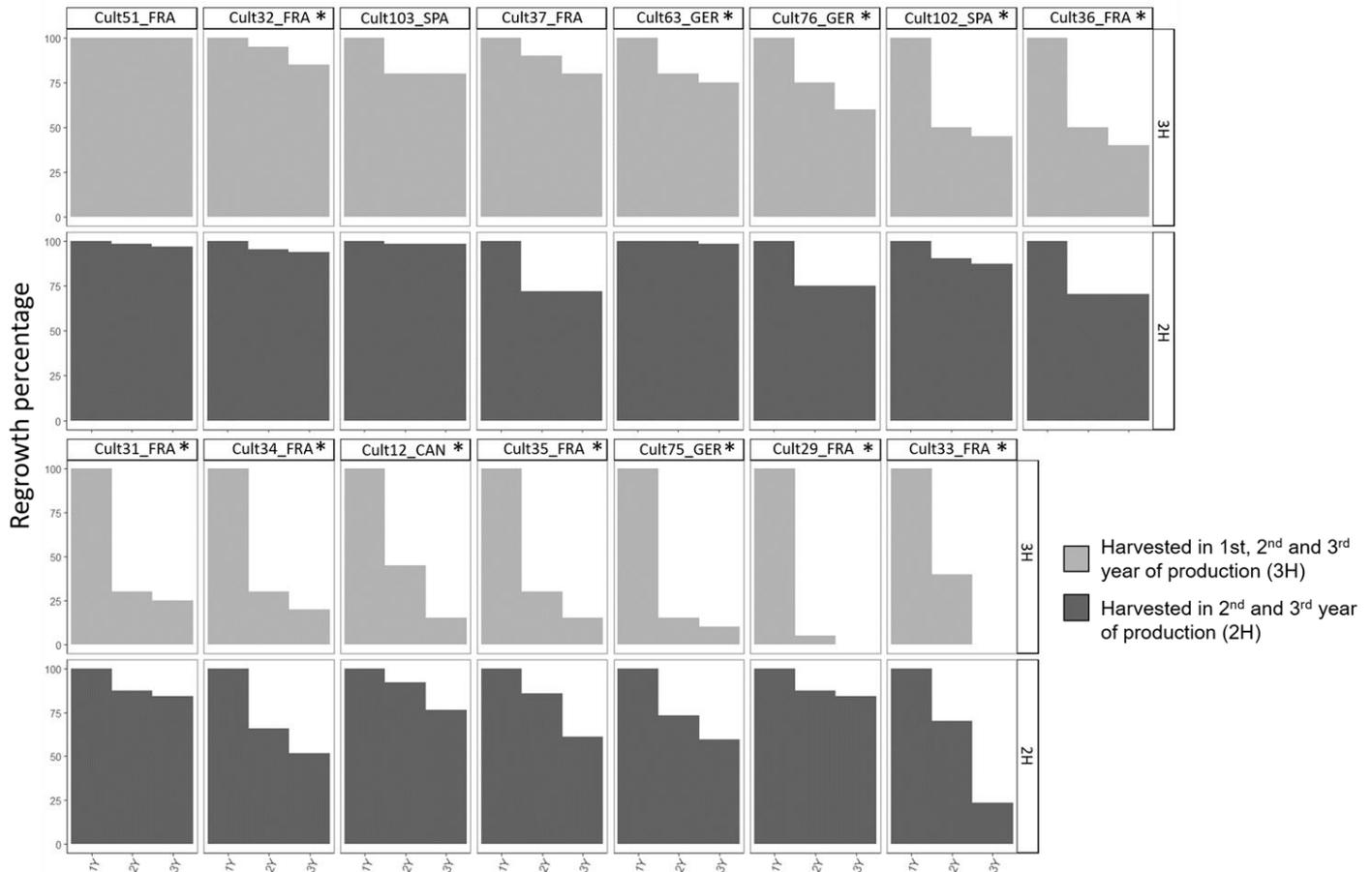


Figure 3: Regrowth rate (%) in the 2nd and 3rd year of production for 15 genetic resources of *S. rebaudiana* planted in the experimental field located in Liposthey (40), south-west France, depending on the harvest modality in the first year of production (harvested or not harvested). The results show the regrowth rate measured on July 11, 2017 and June 6, 2018. Genetic resources are classified according to the regrowth rate in the first-year harvest modality. The results of the Tuckey HSD test for a specific genotype according to its regrowth rate in both modalities are shown by the asterisk next to the genotype's names. Genotypes represented with an asterisk have significantly different regrowth rate according to the harvesting modality, $p=0.05$.

3.3. SG content and dry leaf biomass are differentially impacted by harvest modality in the third year of production

To evaluate the most productive harvest management in stevia, dry leaf biomass (g/plant) and leaf SG content (%w/w) was followed during a 3-year period in order to measure plant SG yield (g/plant).

Depending on the harvest modality (2H or 3H), plant SG yield (g/plant) of the 15 genotypes is presented in Figure 4 for the third year of production, except for four genotypes (“Cult33_FRA”, “Cult75_GER”, “Cult12_CAN” and “Cult29_FRA”) which presented a very high mortality rate making it impossible to evaluate them. For most genotypes, higher plant SG yield was observed for the 2H modality compared with the 3H modality, with a significant plant SG yield decrease for some genotypes (“Cult102_SPA”, “Cult35_FRA”). However, contrasting groups can be identified for both harvest modalities. “Cult103_SPA” and “Cult36_FRA” are high SG producers in both modalities, while some other genotypes are specific to each modality, such as “Cult102_SPA” for the 2H modality and “Cult37_FRA” for the 3H modality. The genotypes with the lower plant SG yield are “Cult51_FRA” and “Cult32_FRA” in both modalities.

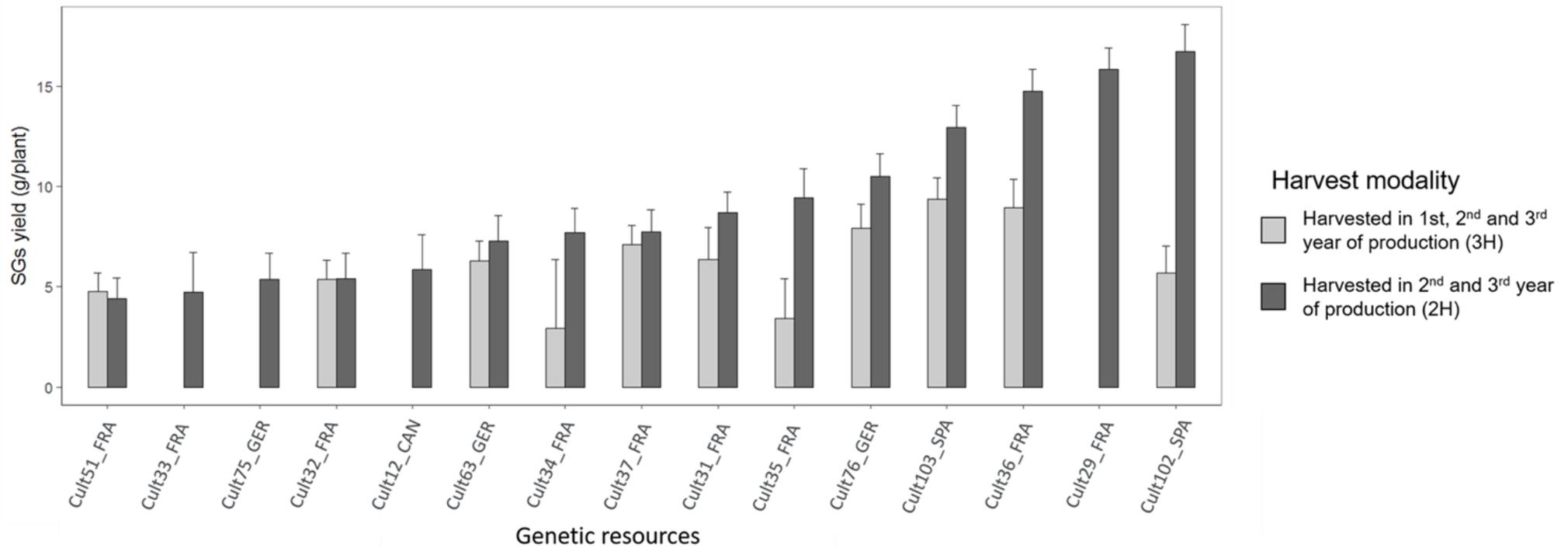


Figure 4: Representation of SG yield (g/plant) for 15 genetic resources of *Stevia rebaudiana* planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France, for the third year of production according to the harvest modality. The 3H modality corresponds to plants harvested in the first, second and third years of production, while the 2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production. The barplots represent the Least-Squares Mean of 4 randomized blocks, corresponding to a total of 3 to 20 plants per genetic resource, with standard deviation.

For dry leaf biomass traits, extreme behaviours were identified among our tested genotypes, showing a wide variability range (Figure A4.A). Globally, genotypes at 2H modality produced more leaf biomass than genotypes at 3H modality. In the third year of production, 2H and 3H modalities both beget some of the best leaf biomass producers (“Cult103_SPA”, “Cult31_FRA”, “Cult36_FRA”) while some genotypes pertain to the 2H modality, or only to the 3H modality as shown on the heatmap (Figure 5). Regarding the poorest leaf biomass producers among the genotypes tested, each modality shows different genotypes apart from “Cult51_FRA” which is common to the 2H modality and the 3H modality (Figure 5). Only “Cult102_SPA” and “Cult35_FRA” have completely different performances, depending on whether they were harvested in the first year of production or not.

On the other hand, the SG content trait (%w/w) does not show significant variability compared to previously presented traits (Figure A4.B). The higher SG accumulators at 3H modality are the same at 2H modality, apart from “Cult35_FRA” (Figure 5). Genotypes with low SG content (%w/w) are “Cult63_GER”, “Cult31_FRA” and “Cult51_FRA” in both modalities with “Cult32_FRA” and “Cult33_FRA” at 3H and 2H modality, respectively. However, the observation of this trait does not indicate a clear trend in harvest modality, and most genotypes have a similar SG content in both modalities. Some exceptions were identified however: “Cult102_SPA”, “Cult36_FRA”, “Cult35_FRA” and “Cult51_FRA” presented a clearly higher SG content (% w/w) at 2H modality (Figure A4.B).

Therefore, classification of the fifteen genotypes performed with the heatmap (Figure 5) reveals three groups. Group 1 includes genotypes with higher SG yield and regrowth rate performances than the agronomic performances of the rest of the evaluated genotypes, as shown through the predominance of a warm color. Group 2 includes genotypes with performances close to the mean performances of the evaluated genotypes. Finally, group 3 includes genotypes displaying

the lowest performances among this genetic collection, identified on the heatmap by the cold color.

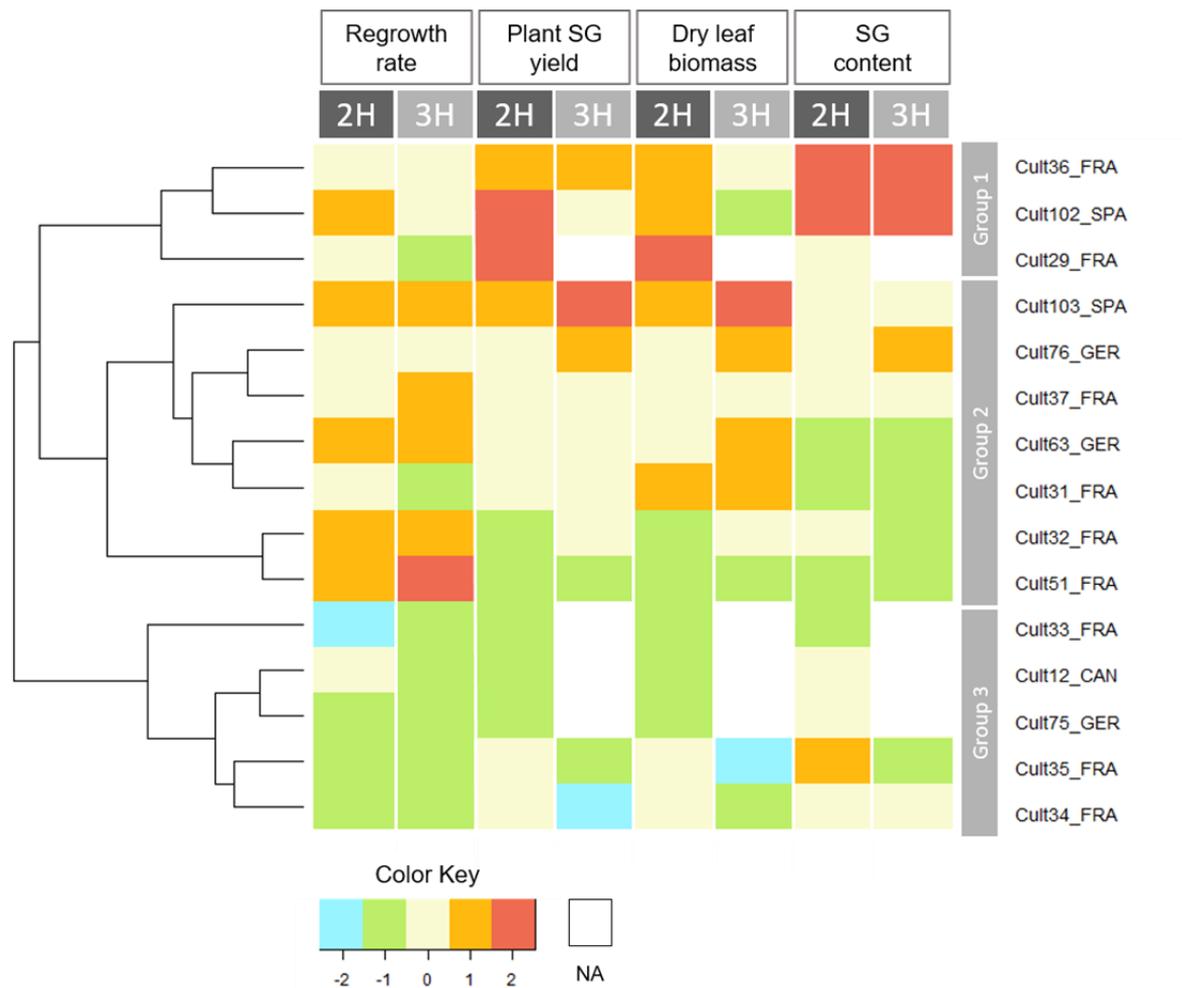


Figure 5: Classification of 15 *S. rebaudiana* genetic resources according to the stevia production traits: SG yield components and winter survival rate, according to the harvest modality. Heatmap was built based on a standardized matrix calculated on marginal means of the third-year of measure. For each variable in column, the color gradient represents the result for genetic resources in row: the cold colors (green and blue) indicates the lowest performances compared to the rest of genotypes while the warm color (orange and red) represents the highest performances compared to the rest of genotypes. 3H modality corresponds to plants harvested in first, second and third years of production while 2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production.

3.4. Dry leaf biomass is impacted by harvest modality over the three years of production

Production traits, according to the harvest modality, are presented in Figure 6. For most genotypes tested, plant SG yield is lower at 3H than at 2H. Most low performance genotypes at 2H are identified in 3H as well, and respectively for high performance genotypes. However, for a few genotypes, such as “Cult102_SPA” (Figure 6 – A,B), the 3H modality appears to have considerable impact showing as significant decrease in plant SG yield compared to the 2H modality. A significant effect of genotypes was found, with variance analysis appearing to be the most important effect, followed closely by the harvest modality effect (Table A5).

An increase in plant SG yield was also observed between the year of production, whatever the harvest condition considered (Figure 6 – A,B). Indeed, a significant year effect was found in variance analysis, but this effect explains variability less than genotype or harvest modality (Table A5). Plant SG yield ranges from 2.9 g/plant for the “Cult63_GER” genotype at 3H modality in the second year of production, to 16.7 g/plant for the “Cult102_SPA” genotype at 2H modality in the third year of production. Maximum plant SG yield is five times higher than minimum plant SG yield (Figure 6 – A,B).

Based on plant SG yield results over the 3-year period, the genotypes studied can be classified in different pool of genotypes. The first pool consists of genotypes that are ill-adapted to temperate production conditions as their regrowth rate is equal to zero at 3H condition (“Cult33_FRA”, “Cult75_GER”, “Cult12_CAN” and “Cult29_FRA”). The second pool of genotypes (“Cult51_FRA”, “Cult32_FRA”, “Cult63_GER”, “Cult37_FRA” and “Cult31_FRA”) are adapted to both harvest modalities, and no plant SG yield difference is observed between the 3H and 2H modalities. The last pool presents a higher plant SG yield at 2H than at 3H (“Cult34_FRA”, “Cult35_FRA”, “Cult76_GER”, “Cult103_SPA”, “Cult36_FRA” and “Cult102_SPA”). These genotypes give a better performance in 2H condition.

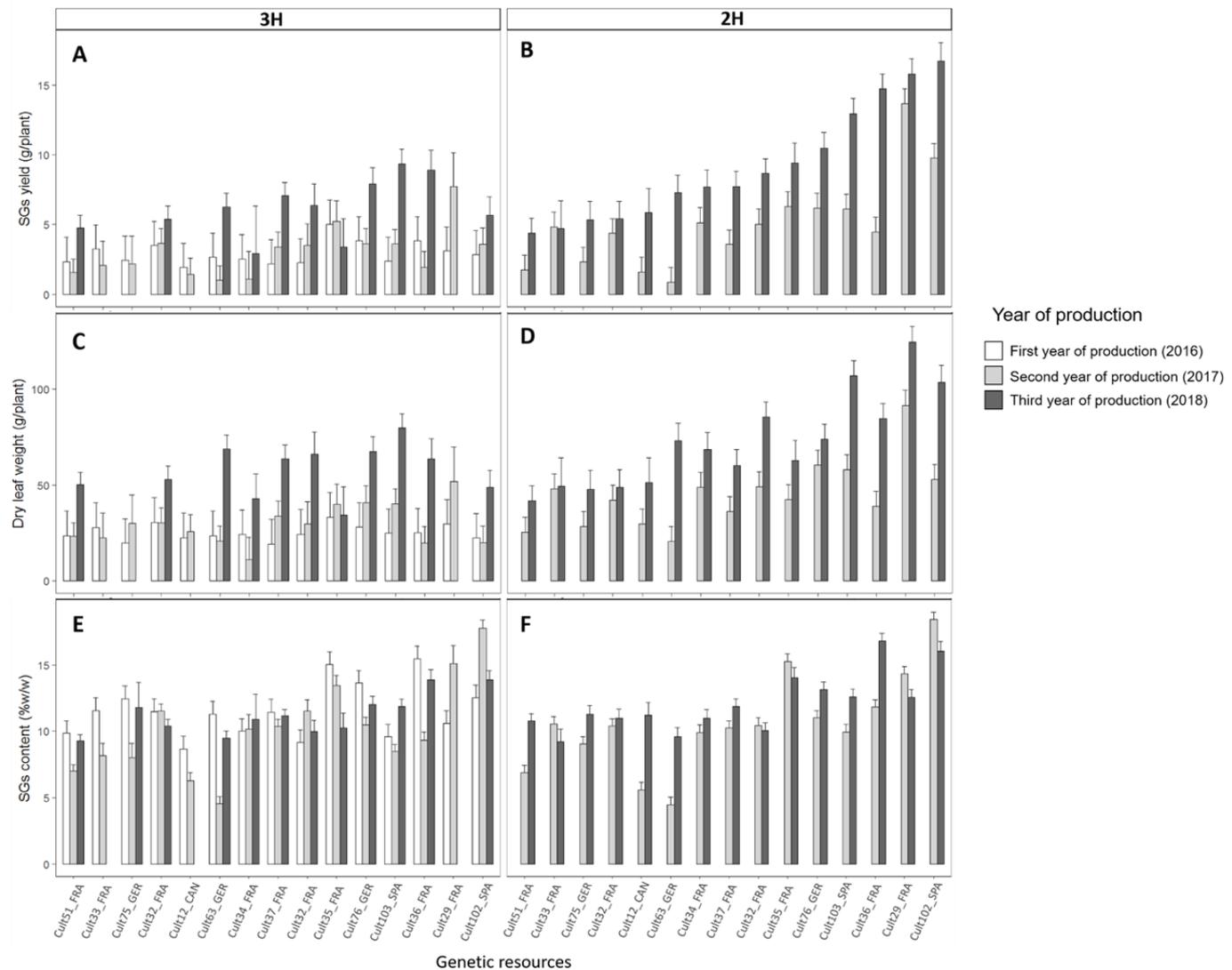


Figure 6: Representation of yield components of *S. rebaudiana* : SG yield (A-B), dry leaf biomass (C – D), SG content (E – F) of genetic resources planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France, for three years of production according to the harvest modality. The_3H modality corresponds to plants harvested in the first, second and third years of production, while the_2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production. The barplots represent the Least-Squares Mean of 4 randomized blocks, corresponding to a total of 3 to 20 plants per genetic resource, with standard deviation.

Dry leaf biomass also presents high variability. It varies between 11 g/plant for the “Cult34_FRA” genotype in the second year of production for the 3H modality to 124.7 g/plant in the third year of production for the “Cult29_FRA” genotype (Figure 6 – C,D). For most genotypes, a dry leaf weight increase was measured between the year of production, the older the plant is, the more leaf biomass it produces. Significant effects of years, harvest modality and genotype on dry leaf weight were detected by variance analyses (Table A5).

The variability of SG content (%w/w) among tested genotypes is also critical. The lowest SG content was 4.5%w/w for the “Cult63_FRA” genotype in the second year of production at 2H modality, while the maximum content reached 18%w/w for the “Cult102_SPA” genotype in the second year of production for 3H modality (Figure 6 – E,F). For most genotypes, a year effect is observed. At 2H modality, there is a global SG content increase between the second and third year with the exception of the “Cult102_SPA”, “Cult36_FRA” and “Cult35_FRA” genotypes, while there is no clear trend for SG content variation for 3H (Figure 6 – E,F). Variance analysis validates these observations, showing a significant and major effect of harvest modality on SG content (%w/w) as well as year of production and genotype effects (Table A5).

No impact of harvest treatment was observed in the first year of production on SG composition between tested genotypes and years (Table A6).

3.5. Negative impact on yield for the 3H modality until 3 years after plantation revealed by cumulated yield

Total SG yield (kg/ha), corresponding to field production, is obtained by multiplying plant SG yield (g/plant) by genotype density, which takes into account winter losses for each genotype and first-year harvest conditions (Table A7).

Comparing the different genotypes, the variability range of cumulative SG yield (230 kg/ha to 1039 kg/ha) is very large, as observed in the individual year study but with an increase in the variability range caused by density balancing. At 2H modality, cumulated total SG yield ranged from 242 kg/ha for “Cult12_CAN” to 1039 kg/ha for “Cult29_FRA”, whereas at 3H modality, cumulated SG yield variability started at 230 kg/ha for “Cult12_CAN” and ended at 602 kg/ha for “Cult103_SPA” (Figure 7 – A). A significant effect of harvest modality on this trait is shown in Table A8. Cumulated dry leaf yield ranged from 2482 kg/ha for “Cult12_CAN” to 7591 kg/ha for “Cult29_FRA” at 2H modality, while it ranged from 1940 kg/ha for “Cult75_GER” to 5486 kg/ha for “Cult103_SPA” at 3H modality (Figure 7 – B). Therefore, a significant effect of harvest modality on dry leaf biomass was also validated (Table A8).

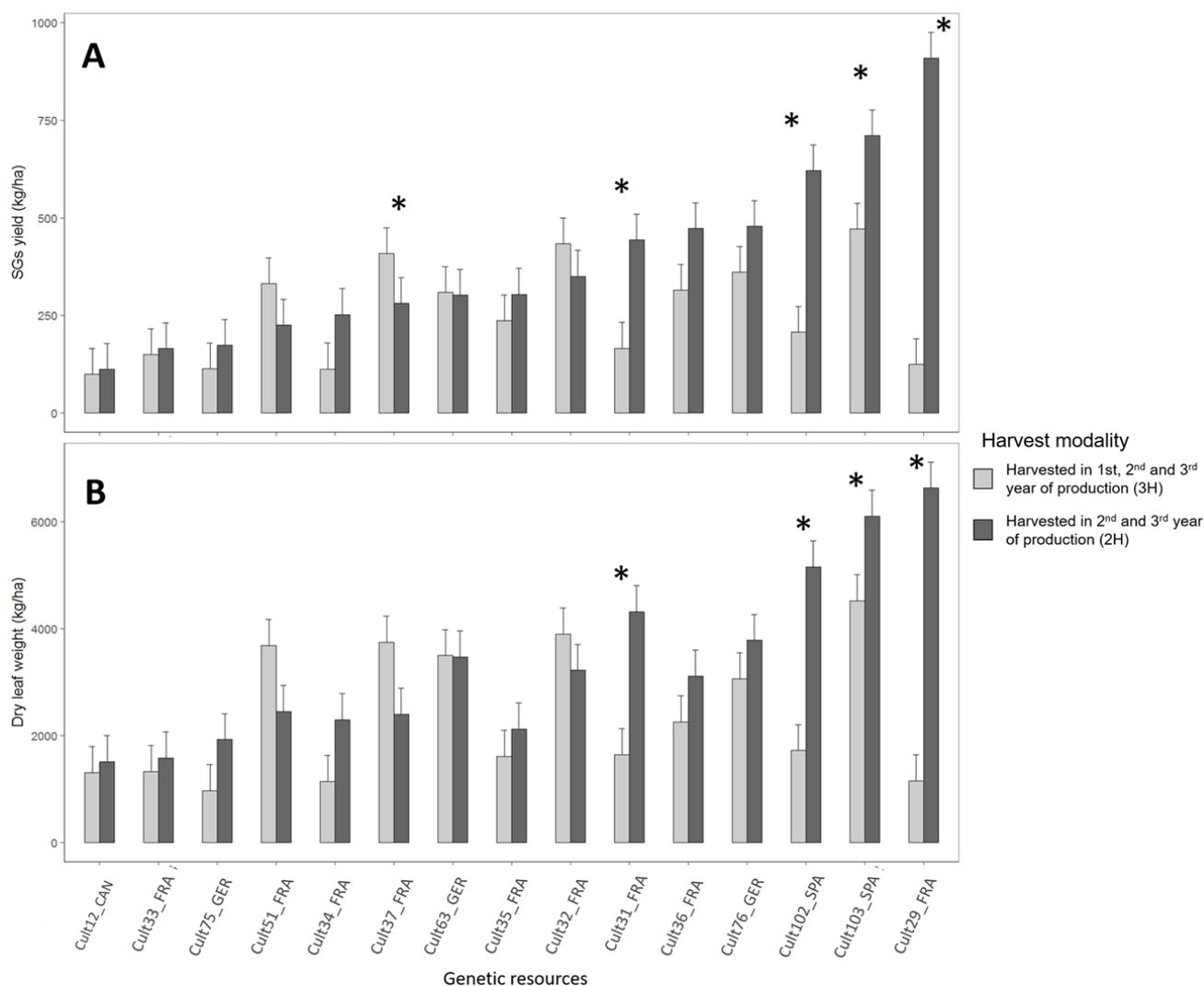


Figure 7: Representation of *Stevia rebaudiana* cumulated yield components over three years of production: SG yield (A), dry leaf biomass (B) of genetic resources planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France, according to the harvest modality. The 3H modality corresponds to plants harvested in the first, second and third years of production, while the 2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production. The barplots represent the Least-Squares Mean of 4 randomized blocks, corresponding to a total of 3 to 20 plants per genetic resource, with standard deviation. The results of multiple comparisons by Tukey’s Honestly Significantly Difference are indicated by an asterisk, which shows a significant difference at $p = 0.05$ level.

Multiple comparison analyses allowed us to determine some significant differences for harvest modality among the genotypes studied. This can be observed a few genotypes that are the best SG producers, namely “Cult31_FRA”, “Cult102_SPA”, “Cult103_SPA” and “Cult29_FRA”, which all have a better SG yield at 2H condition than at 3H. These genotypes are characterized by a high regrowth rate at 2H but not at 3H, which could explain the significant difference. For cumulated dry leaf weight, we observed the same situation for the same genotypes with the exception of “Cult37_FRA” genotype which has a better cumulated dry leaf weight at 3H modality. This genotype regrowth was not impacted by first-year harvest modality, explaining why the cumulated yield over three years is higher than in two years of production. For some other genotypes, gaps between the modalities can be visually identified, but are not confirmed by statistical analyses. For eleven genotypes, cumulated yield at the 3H modality is lower than at the 2H modality. This allows us to consider each genotype for its economic potential and performance as summarized in Figure 8.

Cumulated SG yield (kg/ha)		ID
2H	3H	
		Cult51_FRA
		Cult37_FRA
		Cult32_FRA
		Cult12_CAN
		Cult33_FRA
		Cult63_GER
		Cult75_GER
		Cult34_FRA
		Cult35_FRA
		Cult31_FRA
		Cult36_FRA
		Cult76_GER
		Cult102_SPA
		Cult103_SPA
		Cult29_FRA

Figure 8: Classification of 15 *S. rebaudiana* genetic resources on their cumulated SG yield (kg/ha) according to the harvest modality.

3H modality corresponds to plants harvested in the first, second and third years of production while 2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production. For each variable in column, the color gradient represents the result for genetic resources in row: the green color indicates a lower performances compared to the other modality, while the red color represents a higher performance compared to the other modality. The color orange indicates that genotype performance is similar in both harvesting modality.

4. Discussion

Under mild weather conditions, as observed in Europe, stevia cultivation as perennial crop is submitted to specific constraints. Indeed, cultivation over several years is possible if the crop can tolerate low winter temperatures that are less frequently encountered in its native environment in Paraguay (Soejarto, 2002). Moreover, little is known about stevia behaviour under temperate conditions, and nothing is known about favorable cropping system. This study therefore examined, the impact on the main yield-related traits of a harvest in the first year of production, evaluated through fifteen genotypes planted in southwest France over three years.

The fifteen genotypes tested in our study belong to the 145 genotypes, including cultivars and landraces studied for their genetic diversity in Cosson et al., (2019). The 15 genotypes belong to one of the 3 genetic clusters defined in this study. As shown in the 2019 study, these 3 genetic clusters each reveal a very high variability in the SG composition and content trait. This is also observed in our harvest management study. For each of the genetic clusters, a very high variability of response is also observed for traits related to post-winter regrowth, leaf biomass, SG content and SG yield.

In addition to genetic diversity, as we can conclude from our results, the year of cultivation is a key factor that can explain the variability of SG yield. In both harvest modalities, an increase over time in SG yield (g/plant) and leaf biomass is observed between the years of production. This finding is supported by previous studies (Andolfi et al., 2006). In the latter study, stevia biomass production from two genotypes over 8 years in Italy showed an increase in leaf biomass and SG yield up to 5 or 6 years. For the SG content trait, no clear trend was identified for genotypes tested. In a previous study performed over two years (Barbet-Massin et al., 2016), SG content (%w/w) in stevia leaves increased with one additional year of production. In our study, the stability of SG profiles and content was confirmed. The increase in SG yield (g/plant) observed over the years of production is mainly linked to the increase in biomass production.

This result confirms the importance of foliar biomass in SG yield, as the variability of foliar biomass explains up to 75% of SG yield in stevia.

A wide range of regrowth rates is also observed, with winter tolerant genotypes presenting a regrowth rate ranging from 85% to 99% in the third year of production, to more susceptible ones presenting a regrowth rate from 0 to 25% in the third year of production. However, cold tolerant genotypes at 3H modality had a lower regrowth rate compared to the 2H modality. A few studies in the literature have presented findings on the regrowth trait. A 17% regrowth rate on a Criola population of 96 individuals, without winter coverage was observed by Barbet-Massin et al., (2016). An evaluation of winter hardiness was performed on stevia plants from Ritchers Herbs (Canada) by Moraes et al., (2013) without showing any effect. A Chinese study, conducted in the Hebei region (northeastern China), indicated a regrowth rate of 80% in field conditions with a mulch during the winter period, without specifying the genotypes evaluated (Qingfu and Aihua, 1998).

The wide variability between genotypes is also observed in yield component traits. In particular, significant differences are observed for the fifteen genotypes with respect to SG yield components between the harvest modalities. In the same year, leaf biomass yield and SG yield (g/plant) are higher at 2H treatment. This is particularly visible in the third year of production with a SG yield significantly higher in 2H treatment compared to 3H treatment. It is possible to link plant loss due to winter hardiness with climate between the first and the second year. Indeed, temperatures were colder in the first winter (December 2016 and January 2017) compared to the following winter (Figure A1) and could explain the plant loss rate. However, annual climate variability does not explain differences between the two harvest modalities. Indeed, harvesting in the first year of production had a significant impact on the plants' capacity to support winter temperatures for most of the genotypes tested, leading to a decrease in the

regrowth rate in the 2nd and 3rd year of production compared to plants not harvested in the first year (Figure 3).

One explanation could be linked to stevia's capacity to build up the dormancy period. In general, plants can adapt their physiology by endodormancy before winter when the photoperiod and temperatures decrease (Lang et al., 1987). These plants are characterized by arrested bud development, as well as an increase in ABA and ethylene leading to plant senescence (Fedoroff, 2002). In winter, plants that are in ecodormancy display growth inhibition through temporary unfavorable environmental conditions (Horvath et al., 2003). For perennials, like stevia, which do not retain the aerial part of the plant in winter, storage molecules can be relocated in the roots. These molecules vary depending on the plant: e.g., sucrose, amino acids, soluble proteins (Volenec et al., 1996) with increasing content as temperatures decrease (Shen et al., 2017). To date, no study has fully defined the nature of the storage molecules in stevia. In stevia, SG are accumulated in leaves with up to 12% of the DW in leaves and up to 0.25% in roots (Ceunen and Geuns, 2013b). The physiological role of SG production in plants is still under discussion. However their role as storage for SG molecules has been investigated in earlier research (Bondarev et al., 2003; Ceunen and Geuns, 2013c; De Guzman et al., 2018). The hypothesis of a short-term storage molecule seems unlikely. Indeed, SG content remains stable both day and night while sucrose and glucose fluctuated (Ceunen and Geuns, 2013c; De Guzman, 2010). However, SG may act as long-term storage molecules and seem to be involved in flowering and seed ripening, with a decrease of up to 35% in SG content in leaves, but an increase in roots at flower budding from 0.05 to 0.35% w/w (Ceunen and Geuns, 2013b). In the first year of production in our study, flowering only occurs at 2H modality, probably leading to higher SG content in roots.

Therefore, the post-winter regrowth rate of stevia could depend on the mobilization of storage molecules from the roots to the newly formed shoots as in all perennial plants (Cooke et al., 2012). In alfalfa, the genetic resources accumulating more vegetative storage proteins in the roots have enhanced winter hardiness (Cunningham et al., 2001). These storage components can also be used by plants for regrowth after harvest (Hendershot and Volenec, 1993). Even a partial harvest can impact the sink/source relationship in plants. Indeed, in forage plants, a defoliation event modifies the plant's carbon allocation, which is driven to the leaves rather than the roots in order to reestablish leaf biomass (Cullen et al., 2006). In a study on the blueberry, Strik and Buller, (2005), identified a negative impact of harvesting during establishment on the following year's production compared to no harvest modality, leading to a reduction in vegetative growth, aerial and root biomass production, as well as a decrease in fruit yield the following year (from between 19% and 44% depending on the genotypes). Identically, for asparagus (Wilson et al., 1999), a harvest performed just before winter led to a decrease in yield the following years, with fewer and lighter of spears. This seems due to the low amount of stored soluble carbohydrate.

At 3H modality, following the first year harvest, stevia carbon fixation is limited by the small remaining canopy and the small amount of fixed carbon is devoted to new shoot development, with no possibility of reallocating carbon to the roots. On the other hand, the 2H modality plants can pursue photosynthesis activity and the accumulation of storage molecules in roots until canopy senescence in late fall. 3H modality plants should present a lower storage molecule content in the roots than 2H modality plants, leading to higher winter mortality.

In mild growth conditions, this crop may need a complete first year of production to generate a fully functional plant ready to face winter conditions. To our knowledge, no study to date has looked at stevia's establishment duration or conditions. Our findings suggest that a four-month establishment duration (from June to September) is too short for some stevia genotypes. A

precocious harvest could create stress in the potential non-mature plant, leading to lower tolerance to cold winter temperatures. A precocious harvest could also prevent regular stevia root development and impact the roots' resistance to frost tolerance. In plants, fine roots are less tolerant than lignified roots (Ambroise et al., 2020). Stevia roots are described as fibrous, filiform and perennial by Angelini et al., (2018) with a dense root system remaining in the superficial soil layers. Another study showed that at regrowth time, shoots appear on the previous year's stems where roots are attached (Moraes et al., 2013). The root architecture of the different genotypes and the capacity to survive through winter could explain the difference in regrowth rates observed between our two harvest modalities. Root architecture and its role in maintaining culture overtime are still largely unknown in stevia.

To evaluate the most productive itinerary, cumulated SG yield (kg/ha) offers an interesting study avenue. It allows us to compare production in both treatments over three years of production. This variable provides information closely linked to the agronomic and economic point of view. The evaluation of this trait clearly allows us to conclude that for most of the genotypes studied, a harvest in the first year has a negative impact that is not compensated in the following production years. Harvesting in the first year of production, which is the year of the crop's establishment, has a negative consequence on plant yield performance in the following years.

5. Conclusion

The results obtained in the field conditions evaluation of two cropping systems for fifteen stevia genotypes over a three-year period show that harvesting in the first year of production negatively impacted genotype performances. Our study indicates that the regrowth rate, plant SG yield and leaf biomass yield decrease in the situation of harvesting in the first year of production for most of the genotypes evaluated. No pronounced tendency was observed for SG content. This study allowed us to identify the genotypes adapted to the southwestern environment in France, namely, “Cult103_SPA” and “Cult36_FRA” which present the best SG yield in both cropping systems. This information could be directly integrated into a breeding program. In the future, it would be interesting to perform further investigations on the long-term impact on stevia yield of an early harvest, such as 6 to 7 years. It would also be very interesting to study the impact of a partial harvest of the upper third of the crop, allowing both an income for the producer and the maintenance of the reserve capacity for the plant before winter. This study highlighted the lack of knowledges on the stevia roots mechanisms and stevia overwintering strategies in temperate conditions. Indeed, studies on the development of roots after plantation, the sink-source relationships between aerial and ground biomass during the life cycle of stevia, and the nature of stevia storage molecules would help to understand the tendencies observed between the two harvest modalities. More broadly, this study provides information on possible cropping system strategies for the development of stevia production in mild climate zones.

Acknowledgements:

The authors would like to thank the Oviatis company (Estillac, France), INVENIO (Ychoux experimental sites, France) for plant production and the experimental sites management and MIB laboratory, Bordeaux ISVV, France) for access to the HPLC chain.

English has been revised by the Maison de la Traduction, Bordeaux, France.

Funding:

Z. Le Bihan was supported by an ANRT grant n° 2017/0487 and Oviatis SA. This project was funded by the “Région Nouvelle-Aquitaine” (France).

References:

- Ambroise, V., Legay, S., Guerriero, G., Hausman, J.-F., Cuypers, A., Sergeant, K., 2020. The Roots of Plant Frost Hardiness and Tolerance. *Plant Cell Physiol* 61, 3–20. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz196>
- Andolfi, L., Macchia, M., Ceccarini, L., 2006. Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Ital. J. of Agron.* 1, 257–262.
- Angelini, L.G., Martini, A., Passera, B., Tavarini, S., 2018. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges, in: Méryllon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Sweeteners*. Springer International Publishing, Cham, pp. 35–85. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_8
- 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 steviol (PhD).
- 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* 63, 685–694. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0276-9>
- 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, e0133067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133067>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *arXiv:1406.5823 [stat]*.
- Bondarev, N.I., Sukhanova, M.A., Reshetnyak, O.V., Nosov, A.M., 2003. Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. *Biologia Plantarum* 47, 261–264. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f>
- Bridel, M., Lavieille, R., 1931. The sweet principle in Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*. Bertoni). II. Hydrolysis of stevioside by enzymes. III. Steviol by enzymic hydrolysis and isosteviol by acid hydrolysis. *Bull. Soc. Chim. Biol* 13, 781–96.
- Ceunen, Geuns, 2013a. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products* 76, 1201–1228. <https://doi.org/10.1021/np400203b>

- Ceunen, Geuns, 2013b. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.003>
- Ceunen, Geuns, 2013c. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Biol Plant* 57, 390–394. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0289-6>
- Chaturvedula, V.S.P., Meneni, S.R., 2017. A New Penta β -D-Glucopyranosyl Diterpene from *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Organic Chemistry* 07, 91–98. <https://doi.org/10.4236/ijoc.2017.72008>
- Chaturvedula, V.S.P., Upreti, M., Prakash, I., 2011. Structures of the novel α -glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Carbohydrate Research* 346, 2034–2038. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.06.023>
- Coelho, L., Osório, J., Beltrão, J., Reis, M., 2019. Efeito da aplicação de compostos orgânicos no controlo de infestantes na cultura de *Stevia rebaudiana* e nas propriedades do um solo na região do Mediterrâneo. *Revista de Ciências Agrárias* 42, 111–120. <https://doi.org/10.19084/RCA18281>
- Cooke, J.E.K., Eriksson, M.E., Junttila, O., 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant, Cell & Environment* 35, 1707–1728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x>
- Cosson, P., Hastoy, C., Errazu, L.E., Budeguer, C.J., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2019. Genetic diversity and population structure of the sweet leaf herb, *Stevia rebaudiana* B., cultivated and landraces germplasm assessed by EST-SSRs genotyping and steviol glycosides phenotyping. *BMC Plant Biol* 19, 436. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2061-y>
- Cullen, B.R., Chapman, D.F., Quigley, P.E., 2006. Comparative defoliation tolerance of temperate perennial grasses. *Grass and Forage Science* 61, 405–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2006.00548.x>
- Cunningham, S.M., Gana, J.A., Volenec, J.J., Teuber, L.R., 2001. Winter Hardiness, Root Physiology, and Gene Expression in Successive Fall Dormancy Selections from ‘Mesilla’ and ‘CUF 101’ Alfalfa. *Crop Science* 41, 1091–1098. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4141091x>

De Guzman, R., 2010. Autoecological role of steviol glycosides in *Stevia Rebaudiana* Bertoni. Faculty of Sciences, Engineering and Health CQUniversity Australia.

De Guzman, R., Midmore, D.J., Walsh, K.B., 2018. Do Steviol Glycosides Act Either as a Carbon Storage Pool or in Osmoregulation within Leaves of *Stevia rebaudiana* ? J. Nat. Prod. 81, 2357–2363. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00196>

Denev, P.N., Uchkunov, I., Uchkunov, V., Kratchanova, M.G., 2017. Content of steviol glycosides in stevia (*Stevia Rebaudiana* B .) genotypes cultivated in Bulgaria. Bulgarian Chemical Communications 49, 121–125.

Fedoroff, N.V., 2002. Cross-Talk in Abscisic Acid Signaling. Sci. STKE 2002, re10–re10. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.140.re10>

Ferrazzano, G.F., Cantile, T., Alcidi, B., Coda, M., Ingenito, A., Zarrelli, A., Di Fabio, G., Pollio, A., 2016. Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review. Molecules 21, 38. <https://doi.org/10.3390/molecules21010038>

Fox, J., Weisberg, S., 2011. Multivariate Linear Models in R 31.

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., Clausen, M.R., Henriksen, M.B., Jensen, I., Kyed, S., 2015. A Danish research project for the development of 'Green Stevia'-a natural sweetener for organic food products. Proceedings of the 8th Stevia Symposium.

Guerrero, D.R., Bär, A., Kryvenki, M., Domínguez, M., 2015. Phenological and morphological evaluation of 10 clones of *Stevia rebaudiana* as the thermal time. RIA, Revista de Investigaciones Agropecuarias 41, 317–324.

Hastoy, C., 2018. 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 (thesis). Bordeaux.

Hastoy, C., Cosson, P., Cavaignac, S., Boutié, P., Waffo-Teguo, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2019. Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. Industrial Crops and Products 128, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.053>

- Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Stähler, 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>
- Hendershot, K.L., Volenec, J.J., 1993. Taproot nitrogen accumulation and use in overwintering alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* 141, 68–74. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80853-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80853-9)
- Horvath, D.P., Anderson, J.V., Chao, W.S., Foley, M.E., 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* 8, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.013>
- Ibrahim, M.A., Rodenburg, D.L., Alves, K., Perera, W.H., Fronczek, F.R., Bowling, J., McChesney, J.D., 2016. Rebaudiosides R and S, Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *J. Nat. Prod.* 79, 1468–1472. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00048>
- Labrador, J., Colmenares, R., Sánchez, E., Creus, J., García, N., Blázquez, J., Moreno, M.M., 2014. Soil response to biodynamic farming practices in estevia -*Stevia Rebaudiana*- (Extremadura, Spain) 16, 1118.
- Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., Darnell, R.L., 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22, 371–377.
- Lankes, G., Grosser, P., 2015. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. *Proceedings of the 8th Stevia Symposium* 167–176.
- Lankes, G., Zabala, U.M., 2011. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *Proceedings of the 5th Stevia Symposium* 75–87.
- Lavini, A., Riccardi, M., Pulvento, C., Luca, S.D., Scamosci, M., d'Andria, R., 2008. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy* 3, 135–143.
- Le Bihan, Z., Cosson, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2020. Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale. *Annals of Applied Biology* n/a. <https://doi.org/10.1111/aab.12626>

Leyshon, A.J., Campbell, C.A., 1992. Effect of timing and intensity of first defoliation on subsequent production of 4 pasture species. *Rangeland Ecology & Management / Journal of Range Management Archives* 45, 379–384.

Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kąkol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimciak, A., Sliwinska, E., Pistelli, L., 2018. Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae* 234, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.015>

Mao, G., Chaturvedula, V.S.P., Vick, J.E., 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. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.83030>

McMaster, G., Wilhelm, W., 1997. Growing degree-days: one equation, two interpretations. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty.

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. *Journal of Experimental Botany* 30, 1211–1222. <https://doi.org/10.1093/jxb/30.6.1211>

Mintel Global New Products Database, 2017. Global Food and Beverage Products with Stevia: 2011–2016 Data. (2017).

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.041>

Moraes, R.M., Donega, M.A., Cantrell, C.L., Mello, S.C., McChesney, J.D., 2013. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Industrial Crops and Products* 51, 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.025>

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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.021>

- 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>
- Perera, W.H., Ghiviriga, I., Rodenburg, D.L., Alves, K., Bowling, J.J., Avula, B., Khan, I.A., McChesney, J.D., 2017. Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Phytochemistry* 135, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.001>
- Perera, W.H., Ramsaroop, T., Carvalho, R., Rodenburg, D.L., McChesney, J.D., 2019. A silica gel orthogonal high-performance liquid chromatography method for the analyses of steviol glycosides: novel tetra-glucoopyranosyl steviol. *Natural Product Research* 33, 1876–1884. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1478826>
- Pordel, R., Esfahani, M., Kafi, M., Nezami, A., 2015. Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni root system to waterlogging and terminal drought stress. *J. Bio & Env. Sci.* 6, 238–247.
- Prakash, I., Chaturvedula, V.S.P., 2014. Structures of Some Novel α -Glucosyl Diterpene Glycosides from the Glycosylation of Steviol Glycosides. *Molecules* 19, 20280–20294. <https://doi.org/10.3390/molecules191220280>
- Prakash, I., Markosyan, A., Bunders, C., 2014. Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods* 3, 162–175. <https://doi.org/10.3390/foods3010162>
- Qingfu, M., Aihua, M., 1998. Studies on overwintering of *Stevia rebaudiana* Bertoni perennial root. *Journal of Hebei Agricultural Sciences* 01.
- Reis, M., Coelho, L., Santos, G., Kienle, U., Beltrão, J., 2015. Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. *Agricultural Water Management* 152, 217–221. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.01.017>
- Russel, L., 2018. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.063>
- Shen, X., Li, J., Feng, P., Jiang, C., Li, R., Zhang, H., Jia, H., Zheng, H., Zhu, B., 2017. Root physiological traits and cold hardiness of alfalfa grown alone or mix-sowed with meadow

fescue. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 67, 235–244. <https://doi.org/10.1080/09064710.2016.1249940>

Soejarto, D., 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*, in: *Stevia: The Genus Stevia, Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. CRC Press, pp. 18–39. <https://doi.org/10.1201/9780203165942.ch2>

Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., Kinghorn, A.D., 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Econ Bot* 37, 71–79. <https://doi.org/10.1007/BF02859308>

Strik, B., Buller, G., 2005. The Impact of Early Cropping on Subsequent Growth and Yield of Highbush Blueberry in the Establishment Years at Two Planting Densities is Cultivar Dependant. *HortScience* 40, 1998–2001. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.7.1998>

Sumida, T., 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan. *Kenkyu hokoku. = Journal of the Central Agricultural Experiment Station-Japan, Nogyo Shikenjo, Konosu*.

Sun, J., 2016. Development of stevia and steviol glycosides industry in China, in: *Proceedings of the 9th Stevia Symposium 2016*. Presented at the From field to fork, Jan M.C. Geuns, Gothenburg, Sweden, pp. 145–150.

Takács-Hájos, M., Rubóczki, T., Szabó, F.M., Kiss, A., 2019. Effect of Environmentally Friendly Nutrition Supply on *Stevia (Stevia rebaudiana B.)* Production. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47, 201–206. <https://doi.org/10.15835/nbha47111232>

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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 2121–2129. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6016>

Volenec, J.J., Ourry, A., Joern, B.C., 1996. A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiologia Plantarum* 97, 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00496.x>

Vouillamoz, J.F., Wolfram-Schilling, E., Carron, C.A., Baroffio, C.A., 2016. Agronomical and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *Julius-Kühn-Archiv* 86–88.

Warnes, G., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentelman, R., Liaw, H.A., Lumley, T., Maechler, M., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., 2016. Package “gplots.”

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Lin Pederson, T., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., 2016. Ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York.

Wilson, D.R., Sinton, S.M., Wright, C.E., 1999. Influence of time of spear harvest on root system resources during the annual growth cycle of asparagus. *Acta Hort.* 313–320. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.479.43>

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Wüst, M., 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur Food Res Technol* 231, 581–588. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1309-4>

Zachokostas, P., 2016. Effects of Agricultural Techniques on the Quantitative and Qualitative Characteristics of *Stevia Rebaudiana* Bertoni, under Mediterranean Conditions (Karditsa, Thessaly, Greece). *APAR* 3. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.03.00105>

Appendices:

Table A1: Parameters of the quantification of 10 SG according to the tested linear regression between the detected area and concentrations of pure SG. SG = steviol glycosides, LOD_{min} = Limit of detection, LOQ_{min} = Limit of quantification minimal, LOQ_{max} = Limit of quantification maximal

SG	LOD (ng/ μ L)	LOQ _{min} (ng/ μ L)	LOQ _{max} (ng/ μ L)	SG content min (% w/w)	SG content max (% w/w)
RebD	5.0	5.7	500	0.06	10
RebM	5.0	7.5	500	0.07	5
RebA	5.0	6.1	1000	0.06	10
ST	5.0	11.7	1000	0.12	10
RebF	5.0	6.4	500	0.06	5
RebC	5.0	5	250	0.05	2.5
DulA	5.0	5	250	0.05	2.5
Rub	5.0	5.4	50	0.05	0.5
RebB	5.0	5	250	0.05	2.5
SB	5.0	5	100	0.05	1

Table A2: ANOVA table over the generalized linear model of weather forecast temperatures (°C), rainfall (mm) and Sum of Growing Degree Days (SGDD) (°C/d)

	Temperature (°C)		Rainfalls (mm)		SGDD (°C/d)	
	Probability	Significance	Probability	Significance	Probability	Significance
Months	2.2 E-16	$p < 0.001$	1.83 E-05	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Year	0.3	<i>NS</i>	0.07	<i>NS</i>	2.2 E-16	$p < 0.001$
Months : Year	2.2 E-16	$p < 0.001$	4.15 E-05	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$

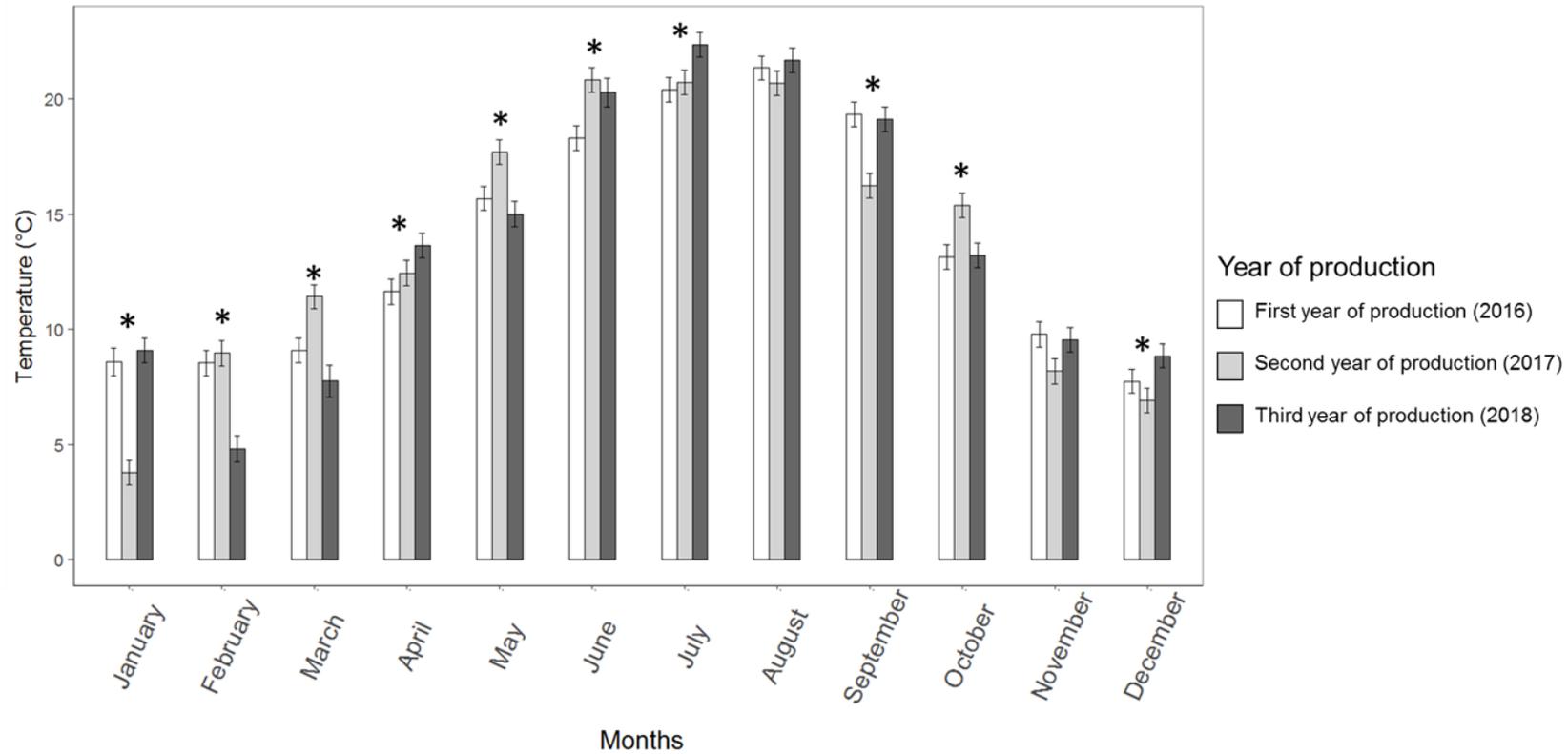


Figure A1 (see separate file): Monthly temperatures for the three years of production of *Stevia rebaudiana* in the experimental field in Liposthey (40). The barplots represent Least-squares means of daily temperature per month, with standard deviation. The results of the Tukey HSD test for a specific month are shown by an asterisk, which corresponds to a significant difference $p=0.05$

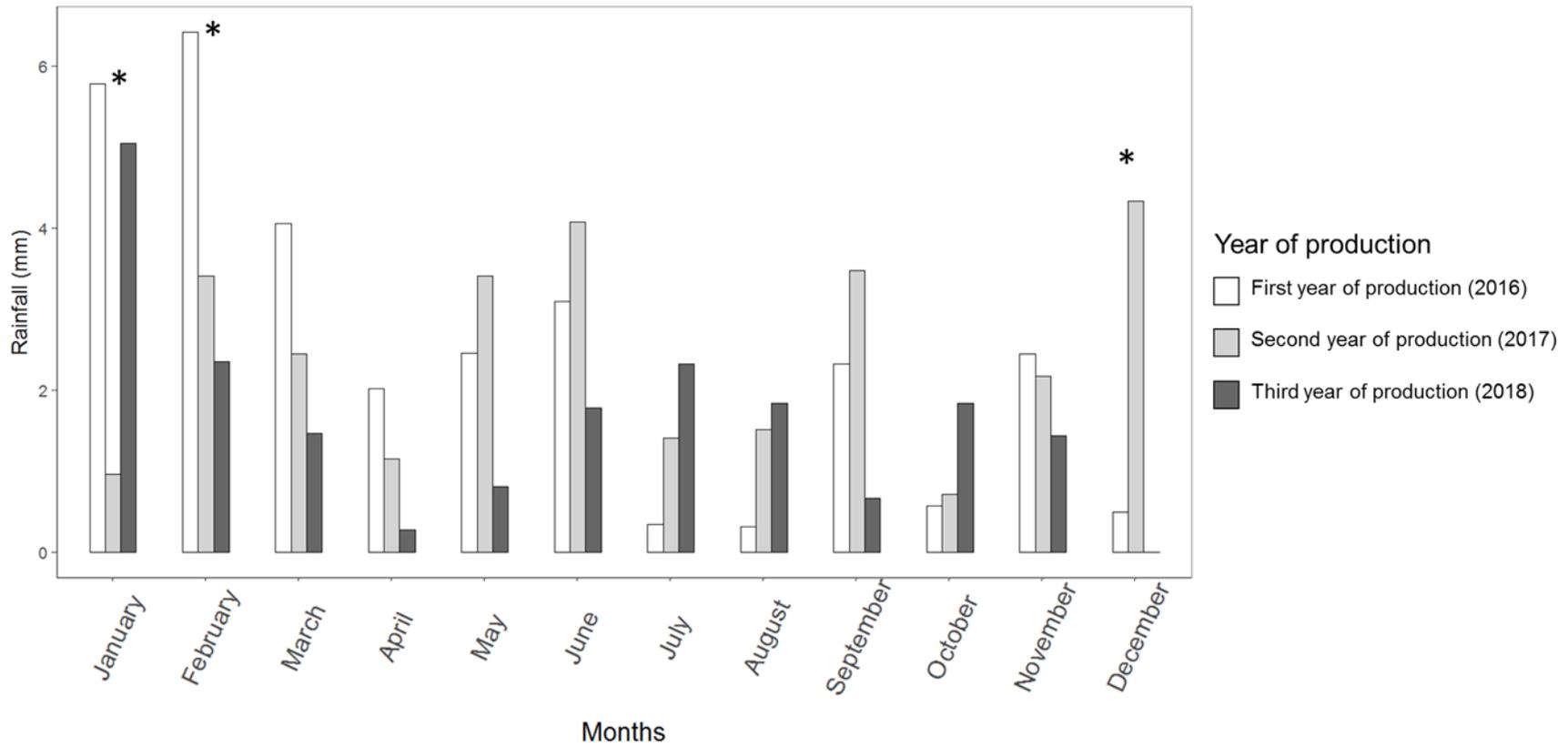


Figure A2: Monthly rainfall for the three years of production of *Stevia rebaudiana* in the experimental field in Liposthey (40).

The barplots represent cumulated rainfalls per month. The results of the Tuckey HSD test for a specific month are shown by an asterisk, which corresponds to a significant difference $p=0.05$

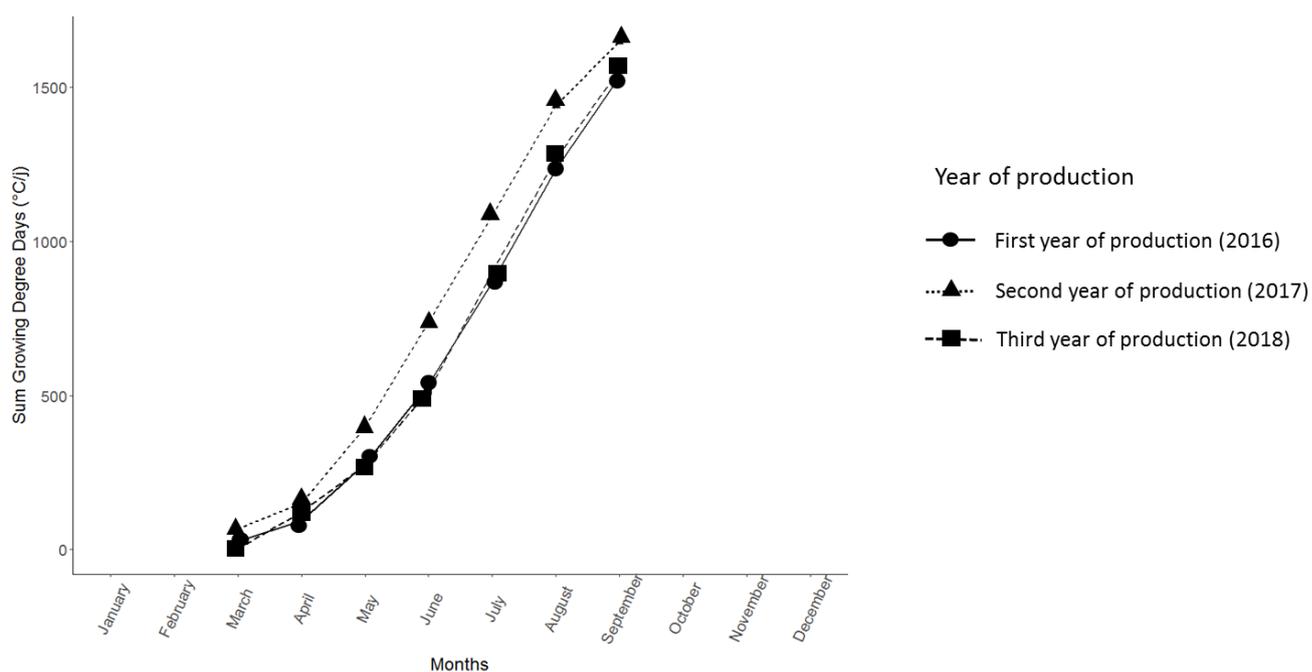


Figure A3: Sum of Growing Degree Day (SGDD) (°C/d) for three years of production in a field trial in Liposthey (40). Each year was calculated independently from regrowth year, from the beginning of March until the end of September.

Table A3: Director coefficient for each year on linear regression between SGDD and days

Year	Regression director coefficient	R ²
2016	9.68	0.987
2017	10.2	0.99
2018	9.80	0.98

Table A4: ANOVA table over the generalized linear model of regrowth rate in 2018

	Probability	Significance
Genotype	2.2 E-16	$p < 0.001$
Harvest modality	2.2 E-16	$p < 0.001$
Genotype : Harvest modality	1.59 E-14	$p < 0.001$

Table A5: ANOVA on mixed linear models over yield components on genetic resources planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France

Factors	SG yield (g/plant)		Dry leaf biomass (g/plant)		SG content (%w/w)	
	Probability	Significance	Probability	Significance	Probability	Significance
Genotype	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Harvest modality	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Year	6.52 E-11	$p < 0.001$	2.8 E-08	$p < 0.001$	4.59 E-05	$p < 0.001$
Genotype: Year	6.5 E-06	$p < 0.05$	0.003	$p < 0.01$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Genotype: Harvest modality	1.525 E-07	$p < 0.001$	0.0001	$p < 0.001$	0.0027	$p < 0.01$
Harvest modality: Year	0.15	NS	0.63	NS	0.03	$p < 0.05$
Harvest modality: Genotype: Year	0.24	NS	0.47	NS	0.89	NS

Table A6: ANOVA on mixed linear models over SG composition on genetic resources planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France

	Sweet SG		Bitter SG	
	Probability	Significance	Probability	Significance
Genotype	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Year	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
First year harvest	0.5	NS	0.8	NS
Genotype : Year	1.31 E-05	$p < 0.001$	5.98 E-06	$p < 0.001$
Genotype : First year harvest	0.9	NS	0.9	NS
Year : First year harvest	0.5	NS	0.7	NS
Genotype : First year harvest : Year	0.9	NS	0.9	NS

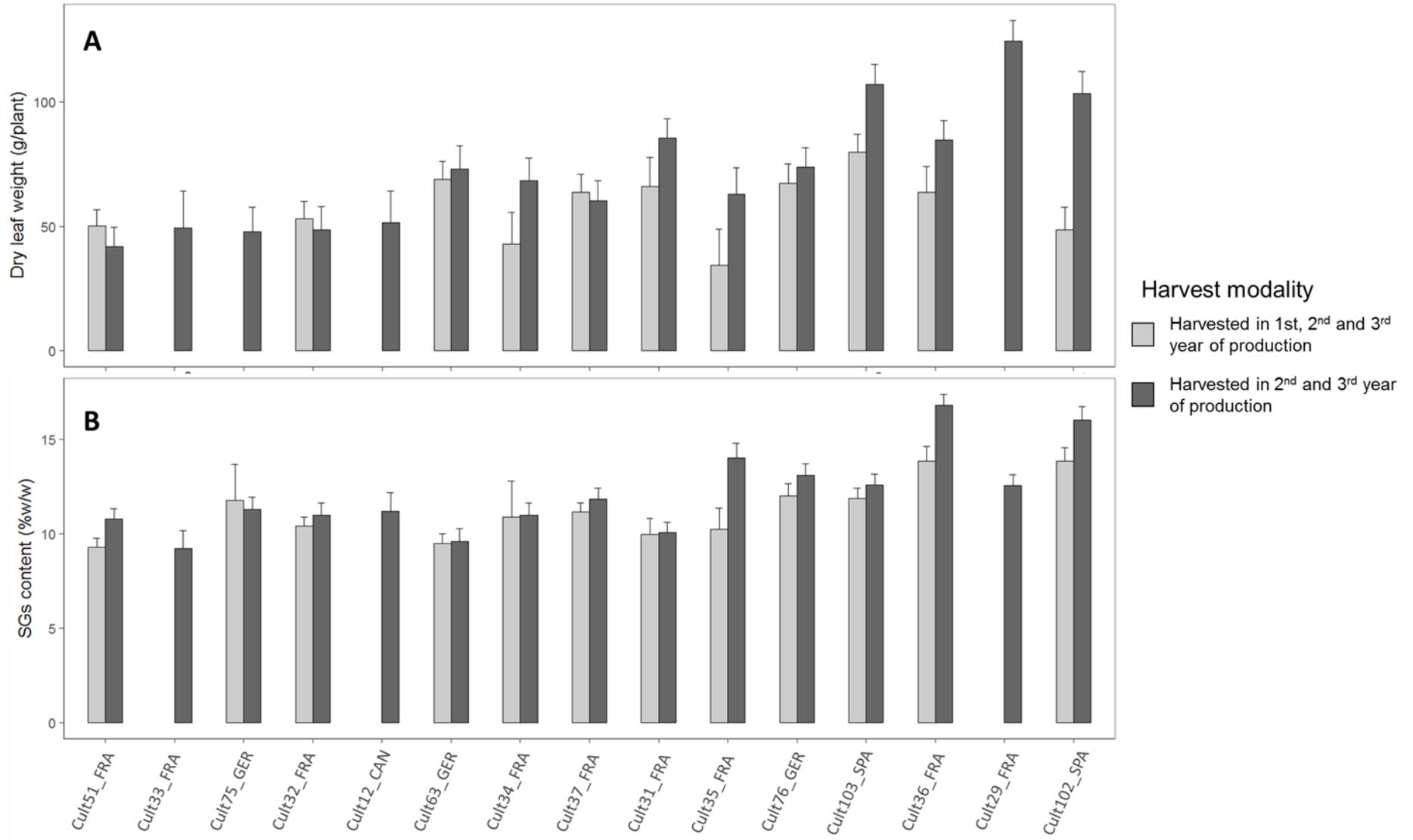


Figure A4: Representation of (A) dry leaf biomass (g/plant) and (B) SG content (% w/w) for 15 genetic resources planted in a field trial in Liposthey (40), south-west France, for the third year of production according to the harvest modality. 3H modality corresponds to plants harvested in the first, second and third years of production while 2H modality corresponds to plants harvested only in the second and third year of production. The barplots represent the Least-Squares Mean of 4 randomized blocks, corresponding to a total of 3 to 20 plants per genetic resource, with standard deviation.

Table A7: Second and third year densities, calculated for each type and each harvest conditions according to the regrowth rate

Genotypes	Second year of production		Third year of production	
	3H	2H	3H	2H
Cult51_FRA	37500	36937.5	37500	36328
Cult32_FRA	35625	35812.5	31875	35156
Cult103_SPA	30000	36937.5	30000	36914
Cult37_FRA	33750	27000	30000	25195
Cult63_GER	30000	37500	28125	36914
Cult76_GER	28125	28125	22500	28125
Cult102_SPA	18750	34125	16875	32812
Cult36_FRA	18750	26437.5	15000	24609
Cult31_FRA	11250	32812.5	9375	31640
Cult34_FRA	11250	24656.25	7500	15820
Cult12_CAN	16875	34687.5	5625	28710
Cult35_FRA	11250	32343.75	5625	22851
Cult75_GER	5625	27562.5	3750	19921
Cult29_FRA	1875	32906.25	0	31640
Cult33_FRA	15000	26437.5	0	8789

Table A8: ANOVA table on mixed linear models over cumulated SG yield and cumulated dry leaf biomass on genetic resources planted on the field trial in Liposthey (40) with two harvests modalities, in south-west France.

	SG yield (g/plant)		Dry leaf biomass (g/plant)	
	Probability	Significance	Probability	Significance
Genotype	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$
Harvest modality	4.62 E-11	$p < 0.001$	7.94 E-12	$p < 0.001$
Genotype : Harvest modality	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$

2.3. Phénotypage des ressources génétiques en 2H sur 5 années de production

Comme présenté dans la partie précédente, les plants ayant été récoltés en première année (2016) ont des performances plus faibles sur les différents traits d'étude par rapport aux plants n'ayant pas été récoltés pour la majorité des génotypes. Le taux de reprise des individus récoltés en première année a été plus faible que celui des individus non récoltés en première année. En effet, à partir du printemps 2019 le nombre de plants récoltés en première année et ayant repris est très faible et il est insuffisant pour être utilisé dans une analyse agronomique. En 2019, nous avons donc décidé de ne récolter que les plants non récoltés en première année et dont le meilleur taux de reprise a permis de maintenir les effectifs.

Les résultats présentés dans cette partie 2.3 complètent les résultats de l'article précédent (partie 2.2). Les premières données présentées, concernent le taux de reprise après les périodes hivernales de tous les génotypes dans les deux modalités de récolte sur les 5 années de culture (2016 à 2020). La suite des résultats porte uniquement sur les plants non récoltés en première année de production. Ces parties permettent de détailler la variabilité des traits agronomiques des 15 génotypes jusqu'à leur quatrième année de culture (de 2016 à 2019). Elles présentent l'évolution du rendement en SG et de ses composantes, la teneur en SG, la biomasse foliaire et le profil en SG. Enfin, les traits décrivant l'architecture de la canopée seront étudiés.

2.3.1. Matériels et méthodes

Le design expérimental correspond en tous points à celui de l'article présenté dans la partie 1.2. Seules les informations non présentées dans la partie « matériels et méthodes » de l'article sont ajoutées ici.

2.3.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est identique à celui utilisé dans l'article précédent (partie 2.2. de l'article Le Bihan *et al.*, (soumis).

2.3.1.2. Design expérimental

Le design expérimental décrit dans la partie 2.2 de l'article Le Bihan *et al.*, (soumis) va du printemps 2016 (implantation de la parcelle) à l'automne 2018. Le suivi des plants de l'automne 2018 au printemps 2020 est identique. Le même voile d'hivernage (30g/m²) a été utilisé pour protéger les plants de décembre à mars. Le système d'irrigation goutte à goutte a été maintenu quotidiennement pendant une heure, avec un débit de 1 L/h par trou. La fertilisation employée en juillet 2019 et juillet 2020 est identique à celle de juillet 2018. La gestion des adventices s'est également faite par arrachage manuel tout au long du cycle de culture. Enfin, les mêmes traitements fongicides ont été réalisés en mai, juillet et août de l'année 2019.

2.3.1.3. Traits mesurés

Le suivi phénotypique réalisé en 2017 et 2018 est déjà détaillé dans l'article Le Bihan *et al.*, (soumis). Les notations de reprise de 2019 et 2020 ont été réalisées de la même façon qu'en 2017 et 2018 sur tous les génotypes et pour les deux modalités de récolte en première année.

Concernant les prélèvements au stade récolte, seuls les plants non récoltés en première année de production (2016) ont été suivis jusqu'en 2019, comme présenté dans la figure 1.3.1.3.



Figure 2.3.1.3 : Suivi expérimental réalisé sur les plants non récoltés en première année de production.

En 2019, les prélèvements de récolte ont aussi été réalisés au stade 50 de l'échelle BBCH de stévia (Le Bihan *et al.*, 2020). L'évaluation du rendement des différents génotypes au stade de récolte a été réalisée en utilisant les mêmes indicateurs. En effet, le rendement est décrit par ses deux composantes : la biomasse foliaire (g/plant) et la teneur en SG (% w/w). Le rendement est ensuite calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Rendement en SG par plant (g/plant)} = \text{teneur en SG (\% w/w)} \times \text{biomasse foliaire (g/plant)}$$

Les protocoles de phénotypage de la biomasse foliaire (g/plant) et de teneur en SG sont décrits dans la partie 2.3 de l'article.

Le rendement total en SG (kg/ha) est calculé d'après la formule suivante :

$$\text{Rendement en SG total (kg/ha)} = \text{rendement en SG par plant (g/plant)} \times \text{densité}$$

Les rendements totaux de chaque année sont additionnés par génotype pour calculer le rendement cumulé sur les trois années de production. La formule adaptée à la biomasse foliaire est également appliquée afin d'obtenir le rendement total en biomasse et la biomasse cumulée sur les trois années de production.

L'architecture des plants de stévia est étudiée grâce aux mesures effectuées au moment de la récolte : le nombre de tiges principales, la hauteur (cm) et le diamètre nord-sud et est-ouest du plant (cm). Les plants sont ensuite coupés et traités comme présenté dans le paragraphe 2.3 de l'article Le Bihan *et al.*, (soumis), séchés en étuve, puis effeuillés et pesés pour obtenir la biomasse foliaire (g/plant) et la biomasse en tiges (g/plant). Ces mesures sont ensuite utilisées pour calculer les variables d'aire et de volume de la canopée, de densité de tiges et le Harvest Index comme détaillé dans le tableau 1.3.1.3.

Tableau 2.3.1.3 : Présentation des variables de description de l'architecture des plants

Variables	Unité	Description / formule
h	m	Hauteur du plant
ϕ_{NS}	m	Diamètre Nord-Sud
ϕ_{EO}	m	Diamètre Est-Ouest
Nombre de tiges principales	nb	–
Aire canopée	m ²	$\pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2}$
Volume canopée	m ³	$\frac{4}{3} \pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \frac{h}{2}$
Densité de tiges	nb/m ²	$\frac{\text{Nombre de tiges}}{\text{Aire canopée}}$
Harvest Index	%	$\frac{\text{Rendement économique (feuilles)}}{\text{Rendement biologique (feuilles + tiges)}}$

2.3.1.4. Evaluation des paramètres de l'environnement

Les paramètres environnementaux de 2019 et 2020 étudiés sont la température journalière, maximale et minimale, et la pluviométrie journalière. Les outils de collecte de ces données sont les mêmes que pour les années précédentes (cf partie 2.4).

Le calcul de l'accumulation de degré jour SGDD est identique à celui détaillé dans la partie 2.4 de l'article. La date de début de calcul en 2019 est le 6 avril, correspondant à une reprise de 50% des plants.

2.3.1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur la version 1.1.463.0 du logiciel R (R Core Team, 2018).

Les analyses de variance des variables analysées ont été réalisées grâce à la fonction « anova » du package « car » (Fox and Weisberg, 2011) appliquée au modèle linéaire mixte (1) calculée avec la fonction « lmer » du package « lme4 » (Bates *et al.*, 2015).

$$(1) y \sim A \times B + \frac{1}{C}$$

Avec y = variable mesurée ; A = facteur fixe génotype ; B = facteur fixe année ; C = facteur aléatoire bloc.

Ce modèle est également utilisé pour calculer les moyennes marginales et leurs erreurs standards associées des variables mesurées avec la fonction « emmeans » du package « emmeans » (Russell, 2018). La fonction « cld » du package emmeans a été choisie (Russell, 2018) pour réaliser une comparaison multiple avec un test HSD de Tuckey des ressources génétiques par année de production.

L'analyse de variance du trait reprise après l'hiver a été étudiée par la fonction « anova » du package « car » sur un modèle linéaire généralisé (2), calculé grâce à la fonction « glm » du package « stats ».

$$(2) y \sim A \times B \times C + \frac{1}{D}$$

Avec y = notations de reprise (1) ou (0) ; A = facteur fixe génotype ; B = facteur fixe récolte en première année ; C = facteur fixe année ; D = facteur aléatoire bloc.

L'analyse de variance du trait de proportion en SG en pourcentage par rapport aux SG totaux, a été étudiée par la fonction « anova » du package « car » sur un modèle linéaire généralisé (3), calculé grâce à la fonction « glm » du package « stats »

$$(3) y \sim A \times B \times D + \frac{1}{C}$$

Avec y = proportion étudiée ; A = facteur fixe génotype ; B = facteur fixe année ; C = facteur aléatoire bloc.

■ Calcul de corrélations

Les matrices de corrélations entre variables quantitatives ont été calculées en utilisant la méthode Spearman, grâce à la fonction « cor » du package « stats » (R Core Team, 2015), permettant d'obtenir les coefficients de corrélation entre chaque paire de variables. Les tests de significativité des corrélations ont été calculés grâce à la fonction « cor.test » provenant du même package pour chaque paire de variables testées. La fonction « corrplot » a été utilisée pour la représentation graphique des matrices de corrélations.

■ Analyse en composante principale

Le profil en SG des individus a été décrit par Analyse en Composante Principale (ACP) sur les moyennes par génotype, par bloc, par année, en utilisant la fonction « PCA » du package « FactoMineR » (Le *et al.*, 2008).

Une Analyse en Composante Principale (ACP) sur les moyennes par génotype, par année, des résultats des caractères agronomiques et biochimiques a permis de décrire le positionnement des génotypes les uns par rapport aux autres, et d'analyser les relations entre les variables.

2.3.2. Résultats

2.3.2.1. Accumulation de températures avec le SGDD

L'évolution du SGDD pour chaque année de culture est présentée sur la graphique (A) de la Figure 2.3.2.1.a. La courbe de l'année 2019 se confond avec celle de l'année 2018, les accumulations des températures sont similaires entre les années au fil des mois. Une régression linéaire réalisée sur la courbe de SGDD selon les jours juliens est représentée dans le graphique (B) de la Figure 2.3.2.1.a. Visuellement, les pentes des régressions semblent similaires entre les années, cette observation est confirmée par la comparaison des coefficients directeurs des droites, dans le Tableau 2.3.2.1.a. Cela signifie que l'accumulation des températures entre les années suit la même évolution. Le coefficient directeur le plus élevé est celui de l'année 2017, qui est effectivement l'année dont les températures étaient plus élevées, et pendant laquelle les plants ont repris le plus précocement. Les régressions linéaires des années 2018 et 2019 présentent des coefficients directeurs similaires, les dates de reprise des deux années sont proches, une semaine d'écart, ainsi que les valeurs de températures. Enfin, l'accumulation de SGDD plus importante lors de l'année 2017 est confirmée par l'analyse de variance sur le SGDD, qui met en évidence un effet significatif de l'année sur le SGDD.

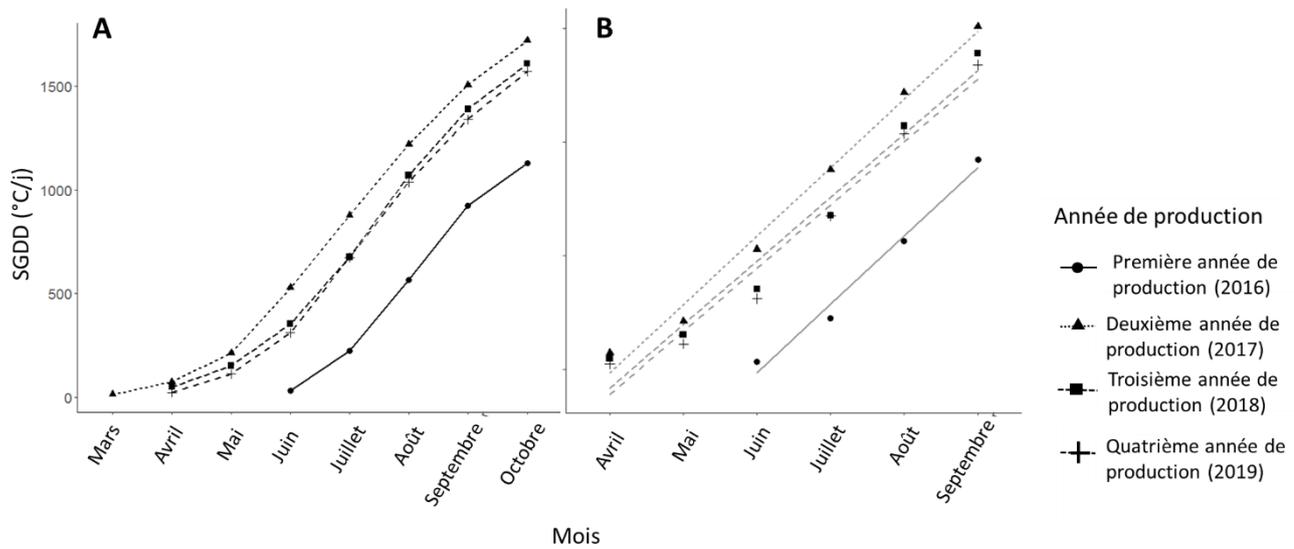


Figure 2.3.2.1.a : Evolution du Sum of Growing Degree Day (SGDD) pour les quatre années de production (2016, 2017, 2018 et 2019) de *S. rebaudiana* sur une parcelle expérimentale localisée à Lipsothey (40). La figure (A) présente les valeurs de SGDD calculées à partir de la plantation pour l'année 2016 et à partir de 50% de reprise pour les années 2017, 2018 et 2019. La figure (B) représente une régression linéaire entre le SGDD et les jours juliens réalisée pour chaque année.

Tableau 2.3.2.1.a : Coefficient directeur de la régression linéaire entre les jours et le SGDD pour chaque année d'étude

Année	Coefficient directeur de régression	R ²
2016	9.68	0.987
2017	10.2	0.99
2018	9.80	0.98
2019	9.85	0.97

Tableau 2.3.2.1.b : Table d'ANOVA sur les modèles linéaires appliqués aux paramètres environnementaux : températures (°C), pluviométrie (mm) et Sum of Growing Degree Day (SGDD) (°C/j), selon le facteur année.

	Températures (°C)		Pluviométrie (mm)		SGDD (°C/j)	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Mois	2.2 E-16	p < 0.001	0.006	p < 0.01	2.2 E-16	p < 0.001
Année	0.002	p < 0.01	0.0002	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001
Mois : Année	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001

Les moyennes des températures mensuelles sont présentées dans la Figure 2.3.2.1.b. Les températures observées varient de 3.5°C en janvier 2017 à 23°C en juillet 2019. Ce maximum peut sembler faible pour le département des Landes, mais il correspond aux enregistrements de températures réalisées sur 24h et prend donc en compte les températures nocturnes. Les écarts de températures entre années sont plutôt faibles, bien que certains événements climatiques plus extrêmes soient identifiables avec ce graphique. L'hiver 2017 se distingue par des températures particulièrement faibles en janvier, de même pour les mois de février et mars 2018. Ces variations inter-année sont confirmées par l'analyse de variances sur les moyennes de températures, indiquant un effet significatif du facteur année (Tableau 2.3.2.1.b).

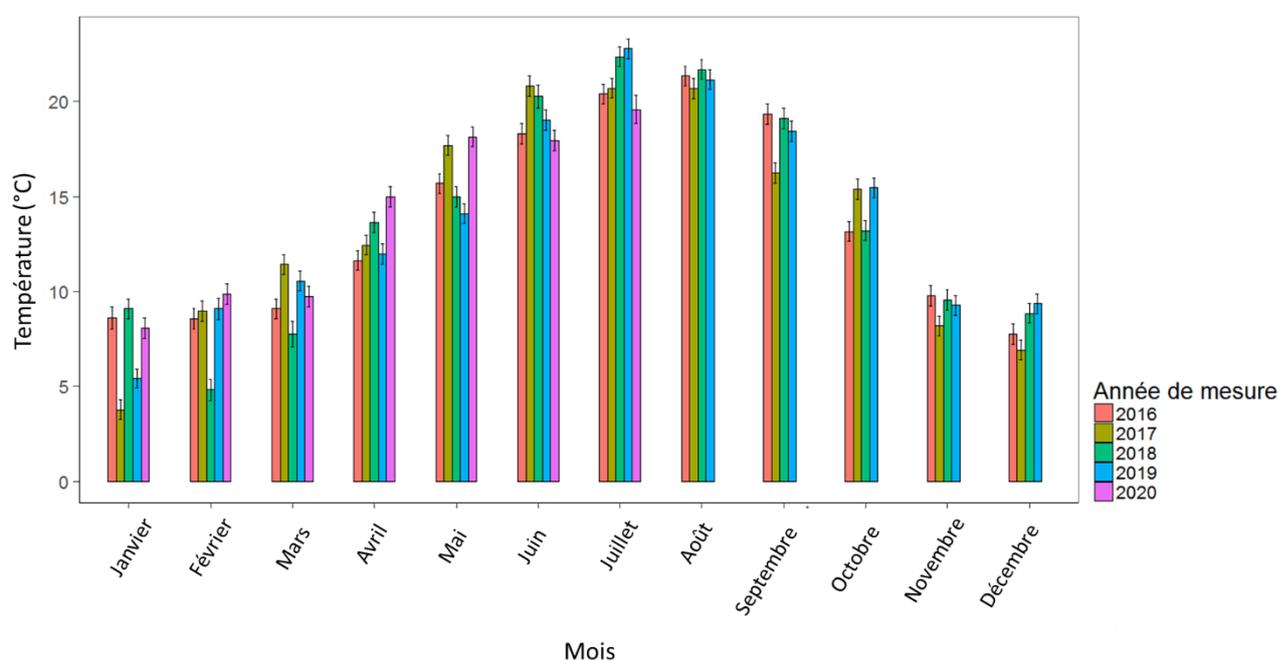


Figure 2.3.2.1.b : Températures (°C) mensuelles pour les cinq années d'étude de la production de *S. rebaudiana* sur une parcelle expérimentale de Liposthey (40). Les histogrammes représentent les Least-square means de la température moyenne journalière par mois.

Les enregistrements de pluviométrie sont présentés dans la Figure 2.3.2.1.c. Une très grande variabilité est observée et confirmée par l'analyse de variances, mettant en évidence un effet significatif de l'année. Cependant, la parcelle étant irriguée pendant toute la période de culture, cette information est uniquement indicative. Enfin, les mesures s'arrêtent en juillet 2020, ce qui explique que les données pour les mois d'août à décembre 2020 ne sont pas présentées ici.

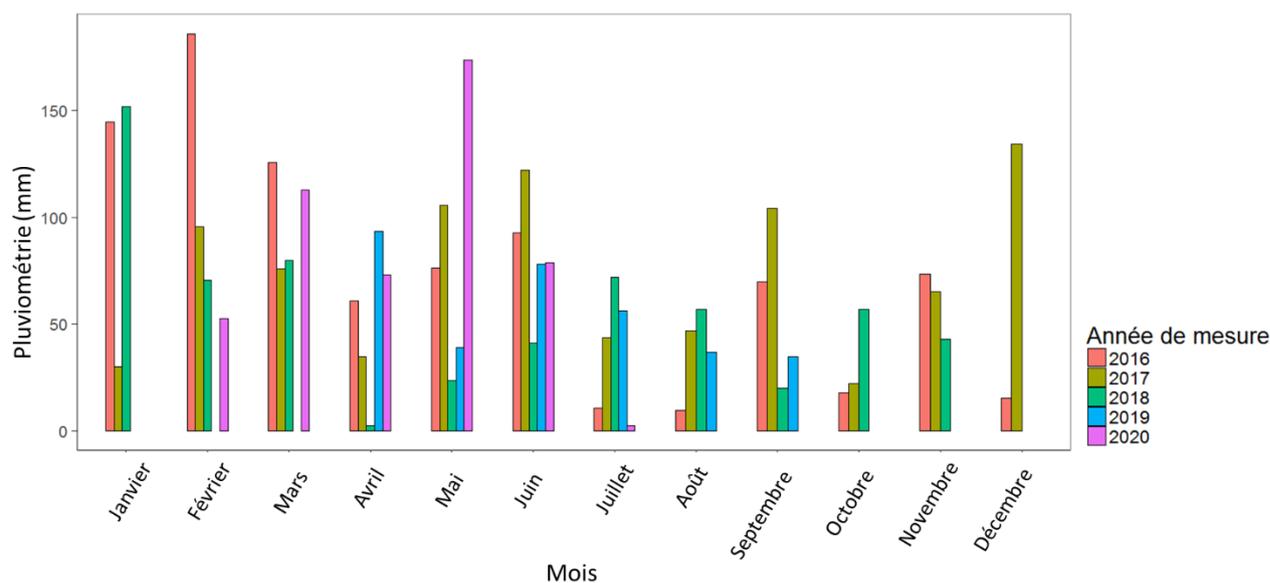


Figure 2.3.2.1.c : Pluviométries (mm) mensuelles pour les cinq années d'étude de la production de *S. rebaudiana* sur une parcelle expérimentale de Liposthey (40). Les histogrammes représentent les Least-square means de la température moyenne journalière par mois.

2.3.2.2. *Etude du taux de reprise sur 5 années de production*

Le taux de reprise après l'hiver a été mesuré au printemps de la deuxième, troisième, quatrième et cinquième année de production des plants afin de mieux connaître la variabilité phénotypique sur ce trait au sein de la collection évaluée. Pour ce paragraphe, tous les itinéraires culturaux ont été évalués, c'est-à-dire les plants récoltés dès la première année ainsi que les plants récoltés à partir de la deuxième année.

Les résultats de reprise de la quatrième et cinquième année, 2019 et 2020, sont présentés dans la Figure 2.3.2.2 et confirment les résultats détaillés des années précédentes et communiqués dans l'article de la partie 1.2. Pour la plupart des génotypes quel que soit le mode de récolte en première année, les pertes de plants se poursuivent jusqu'à la cinquième année de production. Cet effet année est d'ailleurs validé par l'analyse de variance présentée dans le Tableau 2.3.2.2. Cette observation est valable pour les deux modalités de récolte.

L'effet de la modalité de récolte est toujours marqué pour la majorité des génotypes évalués. Les pourcentages de pertes sont plus importants chez les individus ayant été récoltés en première année par rapport aux autres. Cela est confirmé par une analyse de variance sur ce trait, qui indique un effet significatif de la modalité de récolte sur le taux de reprise (Tableau 2.3.2.2).

La variabilité de ce trait est très importante au sein de la collection testée. En cinquième année, le génotype Cult33_FRA est à 0% de reprise pour les deux modalités, alors que d'autres comme Cult51_FRA présentent une reprise à 98% dans la modalité des plants récoltés en première année de production. L'analyse de variance va également dans ce sens en révélant un effet génotype très significatif (Tableau 2.3.2.2). Les génotypes peuvent être séparés selon leur comportement de reprise en cinquième année. Le premier groupe rassemble les génotypes ayant un bon pourcentage de reprise (supérieur à 65%) dans les deux modalités de récolte : Cult51_FRA, Cult32_FRA, Cult103_SPA, Cult37_FRA, Cult76_GER et Cult37_FRA. Ces individus semblent avoir une bonne adaptation à l'environnement d'étude. Le deuxième groupe présente les individus dont le taux de reprise est intermédiaire. Ces génotypes indiquent des grands écarts entre les deux modalités, la reprise lors de la modalité récolte en première année est inférieure à 25% mais celle des plants non récoltés en première année est supérieure à 50%. Cult102_SPA, Cult36_FRA, Cult31_FRA et Cult34_FRA font partie de ce groupe. L'emploi de ces génotypes serait donc plus intéressant dans un itinéraire cultural sans récolte en première année. Enfin, le dernier groupe est constitué des génotypes ayant les taux de reprise les plus faibles dans les deux modalités de récolte, avec une reprise comprise entre 0 et 10% pour les

plants récoltés en première année, de 0% pour les plants non récoltés en première année. Ces géotypes sont à déconseiller pour une conduite culturale de la stévia en tant que culture pérenne. Leur utilisation pourrait cependant être envisagée pour une production courte, ou en serre.

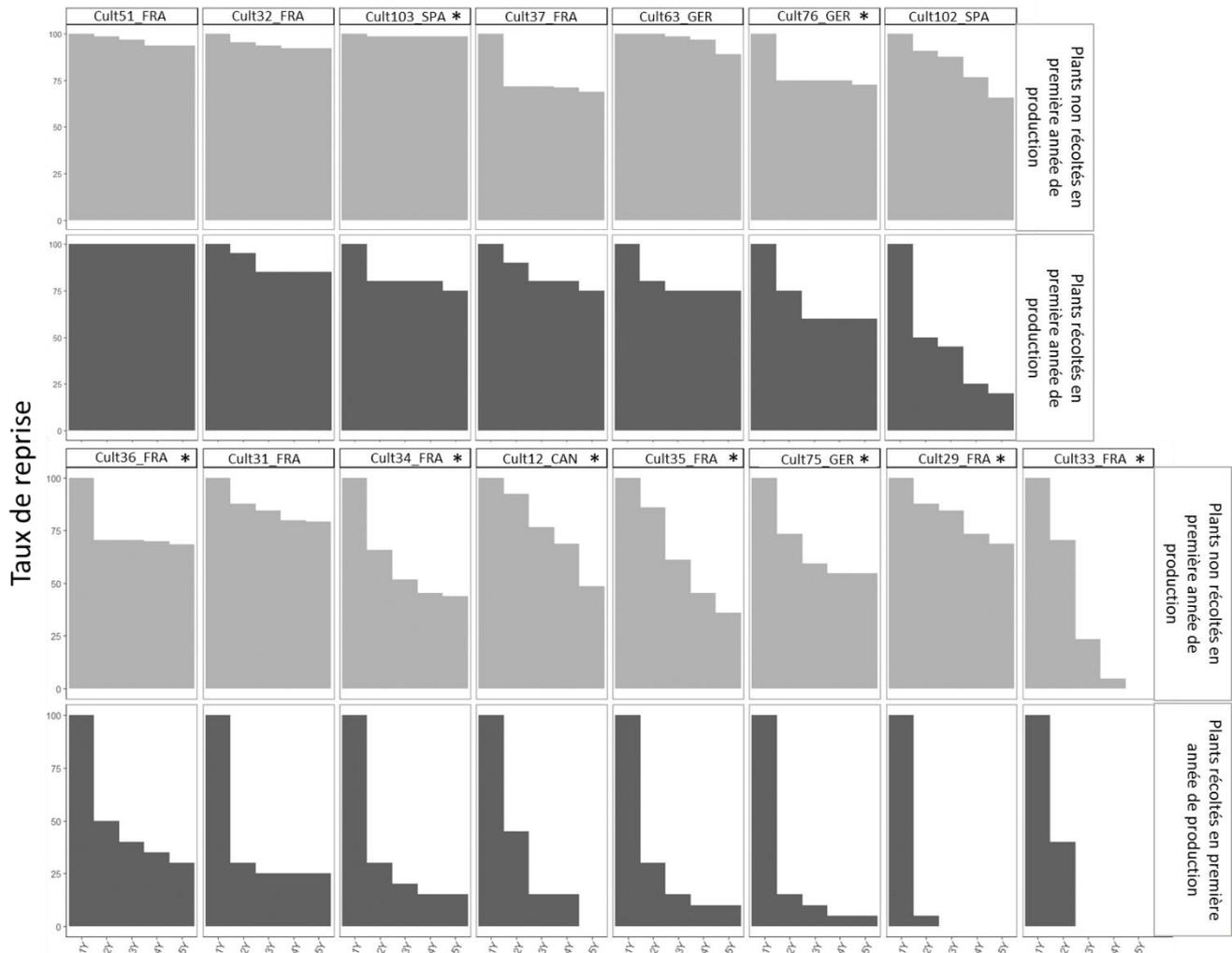


Figure 2.3.2.2 : Taux de reprise en deuxième, troisième, quatrième et cinquième année de production pour les 15 ressources génétiques de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale localisée à Liposthey (40), Sud-Ouest de la France, d'après deux modalités de récolte en première année de production. Le graphique montre le taux de reprise observé au printemps 2017, 2018, 2019 et 2020. Les ressources génétiques sont classées selon leur taux de reprise dans la modalité « récolté en première année ». Les résultats d'un test de Tuckey HSD pour chaque géotype sur le taux de reprise selon la modalité de récolte en première année sont indiqués par un astérisque à côté du nom des géotypes. Les géotypes représentés avec un astérisque ont un taux de reprise significativement différent selon la modalité de récolte en première année, $p=0.05$.

Table 2.3.2.2 : Table d'ANOVA sur le modèle linéaire généralisé appliqué à la reprise selon la modalité de reprise et l'année

	Probabilité	Significativité
Génotype	2.2 E-16	p < 0.001
Modalité de récolte	2.2 E-16	p < 0.001
Année	2.2 E-16	p < 0.001
Génotype : Modalité de récolte	2.2 E-16	p < 0.001
Génotype : Année	0.008	p < 0.01

2.3.2.3. Etude du rendement sur 4 années de production en implantation longue

2.3.2.3.1. Descriptions des composantes du rendement en glycosides de stéviol

Les résultats présentés dans cette partie permettent de compléter ceux présentés dans l'article précédent et portent sur le rendement en SG et ses composantes des 15 ressources génétiques évaluées dans la modalité des plants non récoltés en première année de production. Ces ressources génétiques ont toutes été récoltées de la deuxième à la quatrième année de production (2017, 2018, 2019).

La Figure 2.3.2.3.1.a. représente l'évolution du rendement et de ses composantes mesurées chez les 15 génotypes. Ces génotypes ont tous été suivis jusqu'en quatrième année de production, sauf Cult33_FRA car son taux de reprise est trop faible.

L'année 2019 est caractérisée par une grande variabilité pour le trait de rendement en SG (g/plant), comme cela était le cas pour les années précédentes. Cult12_CAN est le génotype présentant le plus faible rendement à 4.4 g/plant et Cult36_FRA est le génotype dont le rendement est le plus important à 21.2 g/plant. Ce trait est caractérisé par une augmentation entre chaque année de production pour la majorité des génotypes testés, sauf Cult12_CAN, Cult29_FRA et Cult35_FRA dont le rendement augmente entre la deuxième et troisième année mais diminue entre la troisième et quatrième année. L'analyse de variance confirme cette variabilité, et les deux facteurs utilisés, années de production et ressources génétiques, expliquent de façon équivalente la variabilité observée.

Les génotypes peuvent se distinguer par groupes selon leurs performances agronomiques. Cult36_FRA, Cult102_SPA, Cult103_SPA, Cult75_GER, Cult76_GER ainsi que Cult29_FRA ont des rendements très élevés en quatrième année. Tous se caractérisent par une forte augmentation entre la troisième et la quatrième année, sauf Cult29_FRA dont le rendement stagne. Les génotypes dont le rendement en SG est intermédiaire sont Cult37_FRA, Cult63_GER, Cult34_FRA, Cult31_FRA. Enfin, Cult12_CAN, Cult22_FRA, Cult35_FRA, Cult51_FRA, Cult32_FRA sont les moins bons producteurs de SG, avec des rendements en dessous de 10 g/plant.

La biomasse foliaire présente également une grande variabilité en quatrième année de production, variant de 40 g/plant pour Cult12_CAN à 144 g/plant pour Cult103_SPA (Figure 2.3.2.3.1.a (B)). L'augmentation de la biomasse foliaire au fil des années est similaire à celle décrite pour le rendement en SG, ce qui n'est pas étonnant car la biomasse foliaire explique la plus grande part de la variabilité phénotypique du rendement en SG. Cependant, lors de l'analyse de variance réalisée sur la biomasse foliaire (Tableau 2.3.2.3.1.a), c'est le facteur

année qui explique la plus grande part de la variabilité de ce trait, avant le facteur ressource génétique.

L'évolution de la teneur en SG de 2017 à 2019 ne présente pas de tendance claire, elle est croissante pour certains génotypes comme Cult34_FRA et Cult76_GER, décroissante pour Cult102_SPA. La variabilité entre années est plutôt faible pour ce trait, mais également entre les ressources génétiques, avec des écarts bien moins marqués que pour les deux traits précédemment détaillés. L'analyse de variance confirme ces observations en indiquant que le facteur génétique explique la plus grande part de la variabilité de ce trait. Le facteur année explique ensuite une assez faible part de cette variabilité.

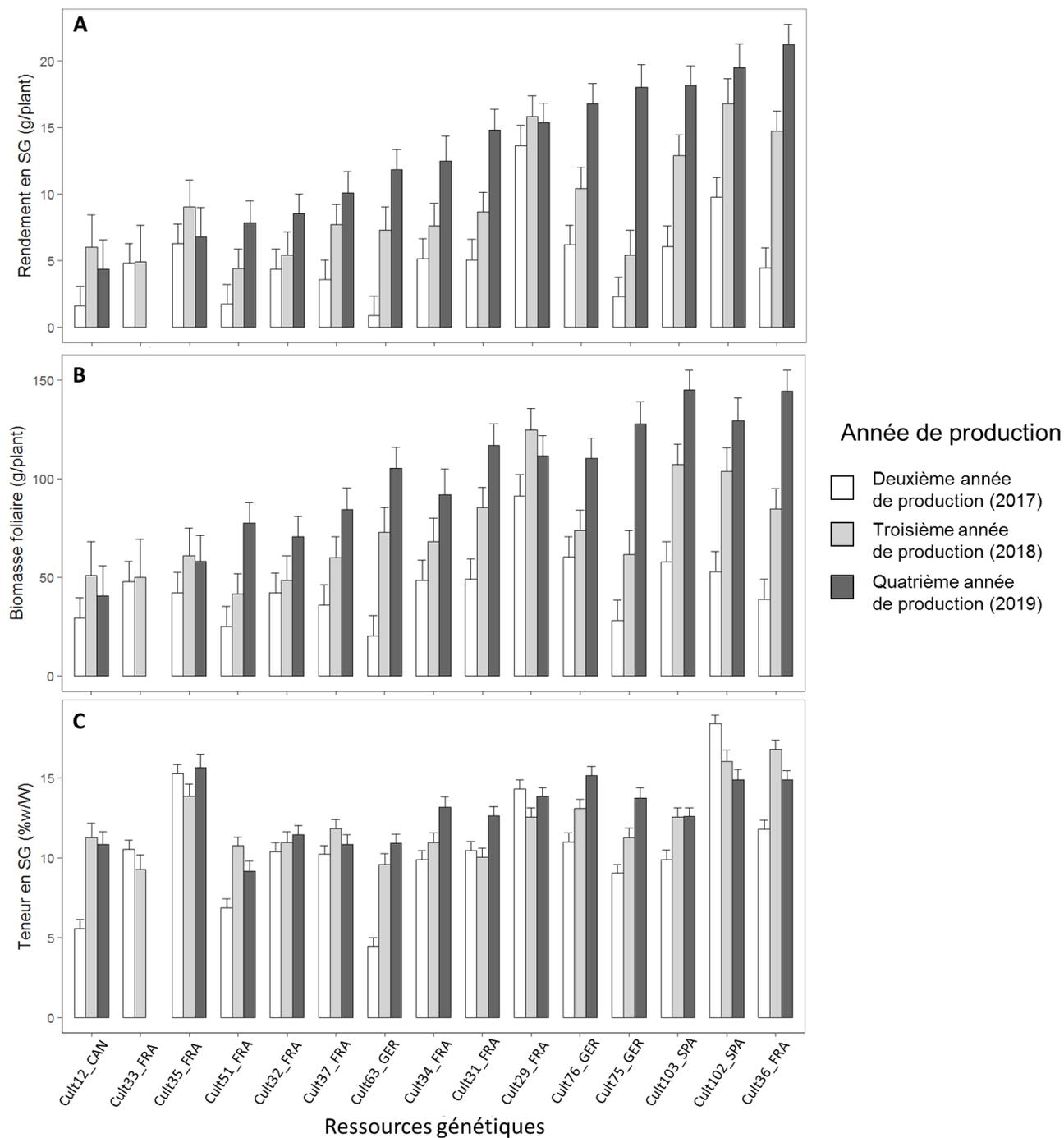


Figure 2.3.2.3.1.a: Présentation du rendement en glycosides de stéviol et de ses composants pour 15 ressources génétiques de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale à Liposthey (40), dans le Sud-Ouest de la France et évaluées jusqu'en quatrième année de production. Le graphique (A) présente le rendement en glycosides de stéviol (g/plant), le graphique (B) présente la biomasse foliaire (g/plant), le graphique (C) présente les teneurs en SG (%w/w). Les histogrammes correspondent aux Least-Square Means des quatre blocs randomisés.

Tableau 2.3.2.3.1.a: Table d'ANOVA sur les analyses de variance des composants du rendement

Facteurs	Rendement en SG (g/plant)		Biomasse foliaire (g/plant)		Teneur en SG (%w/w)	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Génotype	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001
Année	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001
Génotype : Année	1.45 E-09	p < 0.001	9.17 E-07	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001

Les corrélations entre les composantes du rendement ont été calculées sur les résultats de la quatrième année de production et sont présentées dans la Figure 2.3.2.3.1.b. Une très forte corrélation positive est calculée entre le rendement en SG et la biomasse foliaire à 0.95 ($p < 0.001$). De même, une forte corrélation positive est calculée entre le rendement en SG et la teneur en SG (%w/w) à 0.62 ($p < 0.001$). Enfin, les traits de biomasse foliaire et de teneur en SG sont faiblement corrélés à 0.38 ($p < 0.001$). Ces résultats confirment que la variabilité du rendement en SG est principalement expliquée par la variabilité de production de biomasse foliaire.

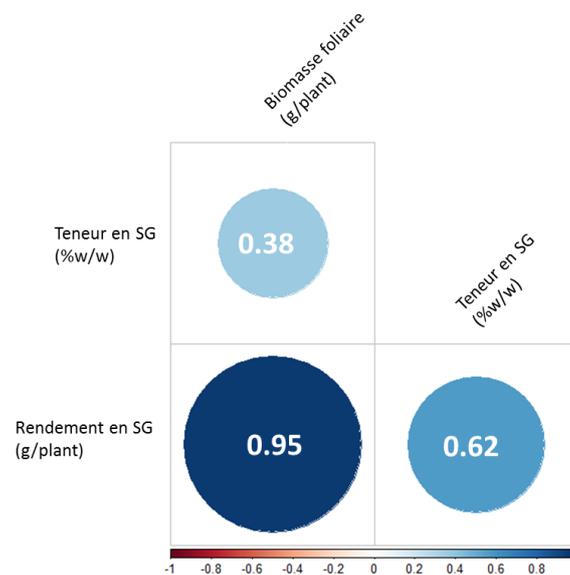


Figure 2.3.2.3.1.b : Matrice de corrélations de Pearson pour les composants du rendement, les corrélations positives sont en bleu, et les corrélations négatives en rouge. La taille des cercles est proportionnelle au coefficient de Pearson indiqué dans le cercle.

L'analyse de variance appliquée au modèle du rendement en SG indique que 76% de la variance est expliquée par la variation de la biomasse foliaire et 23% par la teneur en SG, enfin 6% par l'interaction des deux composantes du rendement.

2.3.2.3.2. Descriptions du rendement cumulé (kg/ha)

Les résultats de rendements cumulés en glycosides de stéviol et en biomasse foliaire permettent d'estimer la production des génotypes pendant la durée de vie de la parcelle. Les résultats de rendements à l'hectare ont été calculés pour chaque année. La densité utilisée pour les calculer prend en compte la mortalité de chacun des génotypes, afin de ne pas surestimer le rendement.

La variabilité du rendement en SG cumulé inter-génotype est encore plus importante que celle observée pour le rendement en g/plant. Cela est lié à l'intégration de la densité dans le calcul du rendement, qui pénalise les plants avec une mauvaise reprise. Le rendement en SG le plus faible est mesuré pour Cult33_FRA avec 165 kg/ha de SG et le rendement le plus élevé est mesuré pour Cult103_SPA avec 1380 kg/ha. Cette analyse permet d'identifier les génotypes produisant le plus de SG à l'échelle de la durée de vie de la parcelle : Cult76_GER, Cult102_SPA, Cult103_SPA, Cult29_FRA et Cult36_FRA. Une variabilité similaire caractérise la production de biomasse foliaire, la plus faible production est également mesurée pour Cult33_FRA avec 1 584 kg/ha, et la plus forte production pour Cult103_SPA avec 11 446 kg/ha. L'analyse de variance effectuée sur les modèles linéaires des deux variables confirme l'effet très significatif des génotypes (Tableau 2.3.2.3.2.b).

Cette figure est particulièrement intéressante pour la filière, car elle témoigne de la productivité sur l'ensemble de la période de suivi des génotypes implantés sur cette parcelle expérimentale, en prenant en compte la mortalité. Cela permet de se placer au plus proche des calculs réels du rendement en conditions de production, et ainsi de mieux orienter les choix des génotypes pour la production. Les génotypes avec une forte mortalité sont très pénalisés et se retrouvent dans les performances les plus basses. C'est d'ailleurs pour cela que Cult33_FRA est le dernier sur les deux traits étudiés : son taux de survie est nul en quatrième année de production.

Le classement des génotypes varie d'ailleurs entre celui basé sur le rendement en SG (g/plant) et le rendement cumulé en SG (kg/ha). Certains génotypes comme Cult75_GER sont fortement pénalisés par leur taux de reprise et l'unique considération du rendement en g/plant surestime leurs performances.

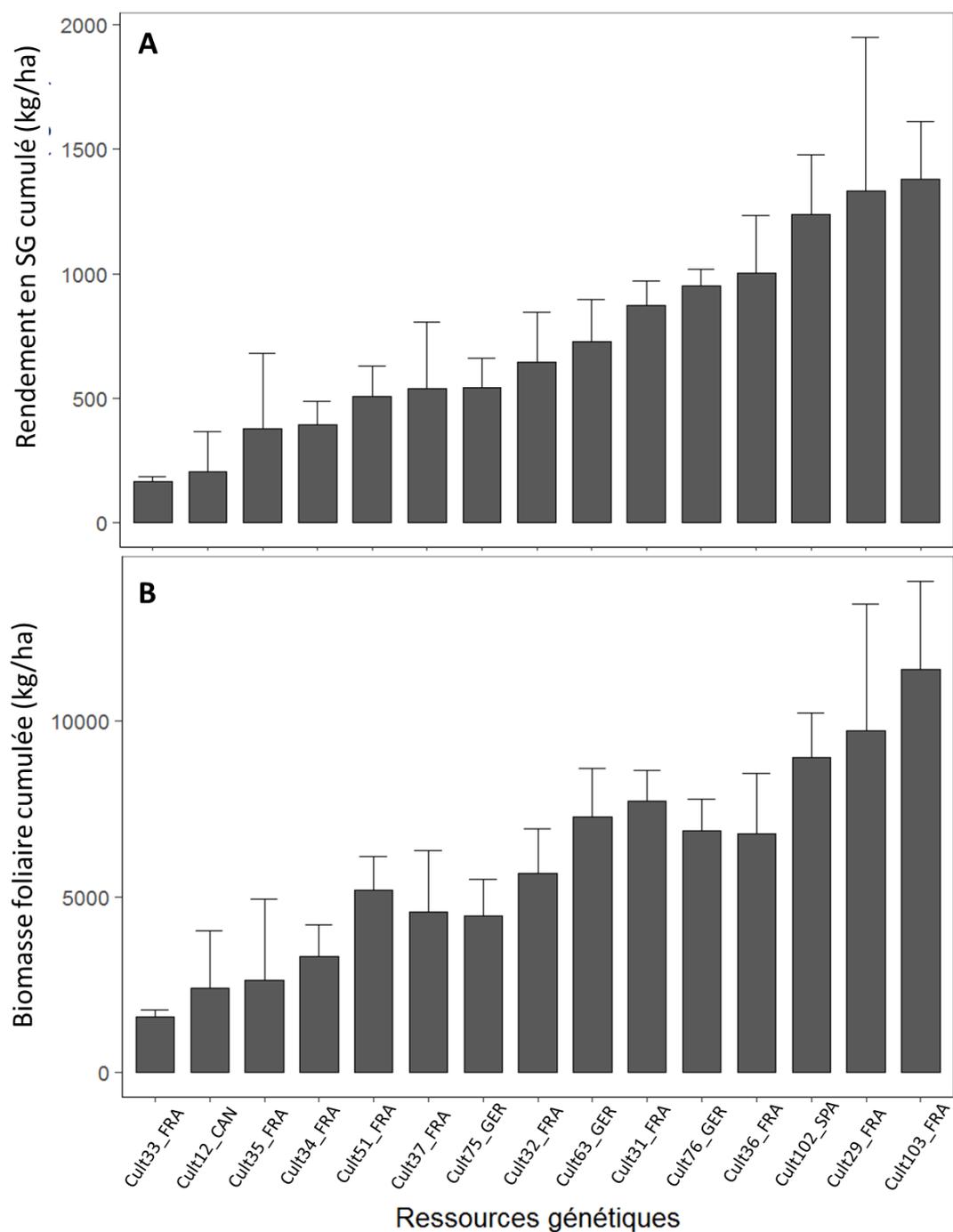


Figure 2.3.2.3.2.c : Présentation du rendement cumulé en glycosides de stéviol (A) et en biomasse foliaire (B) pour 15 ressources génétiques de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale à Liposthey (40), dans le Sud-Ouest de la France et évaluées jusqu'en quatrième année de production. Les histogrammes correspondent aux Least-Square Means des quatre blocs randomisés.

Tableau 2.3.2.3.2.b: Table d'ANOVA sur les analyses de variance des composants du rendement: rendement en SG cumulé sur les trois années de production (kg/ha) et biomasse foliaire cumulée sur les trois années de production (kg/ha)

	Rendement en SG (kg/ha)		Biomasse foliaire (kg/ha)	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Génotype	2.2 E-16	$p < 0.001$	2.2 E-16	$p < 0.001$

2.3.2.3.3. Description des profils en glycosides de stéviol

Le dernier trait à prendre en compte pour comparer les rendements des génotypes est leur profil en SG, c'est-à-dire les proportions de chaque SG par rapport à la totalité des SG produits. Les SG peuvent être classés en deux catégories, ceux qui élicitent un goût sucré, RebA, RebM, RebD et RebE et ceux qui élicitent plutôt un goût amer, ST, DulA, RebC, Rub et SB.

Le trait du profil en SG présente une grande variabilité, comme on peut le voir dans la Figure 2.3.2.3.3.a, dans laquelle les génotypes sont classés selon la proportion en SG au goût sucré dans leur profil. Cult75_GER est le génotype le plus riche en SG sucrés, principalement du fait de sa forte proportion en RebA. A l'opposé, Cult12_CAN et Cult34_FRA ont le profil le plus amer, ne produisant pas de RebA. L'analyse de variance réalisée sur le trait proportion en SG sucrés indique un effet très significatif du génotype (Tableau 2.3.2.3.3.a). Un effet significatif de l'année est également mesuré. Cela est en contradiction avec les résultats précédemment observés par Cécile Hastoy (2018), avec une légère diminution des SG sucrés en troisième et quatrième année, par rapport à la deuxième année. Barbet-Massin *et al.*, (2016) observent une variation du profil sur les SG mineurs entre deux années de production. Cette variation intra-génotype n'impacte pas le classement inter-génotype, un génotype présentant un profil riche en SG sucrés au début de la vie de la parcelle va conserver ce type de profil les années suivantes, et réciproquement. Cette information est très intéressante car elle permet assez rapidement dans la vie de la culture d'obtenir une information fiable sur le profil en SG.

Ces résultats sont confirmés par une Analyse en Composantes Principales réalisée sur les proportions des 5 SG majoritaires dans le profil: ST, RebA, RebC, DulA et RebF. L'analyse de ces SG sur les composantes 1 et 2 permet d'expliquer 79% de la variabilité du profil biochimique des ressources génétiques étudiées (Figure 2.3.2.3.3.b (A)). Les génotypes se classent principalement le long de l'axe des variables ST et RebA, à l'exception du génotype Cult51_FRA qui se caractérise par une forte proportion en RebC, et se positionne le long de l'axe de ce SG. La variabilité entre les années d'étude est peu marquée, en effet la variable qualitative d'illustration « année » indique que la deuxième année de production est légèrement décalée de la troisième et quatrième année.

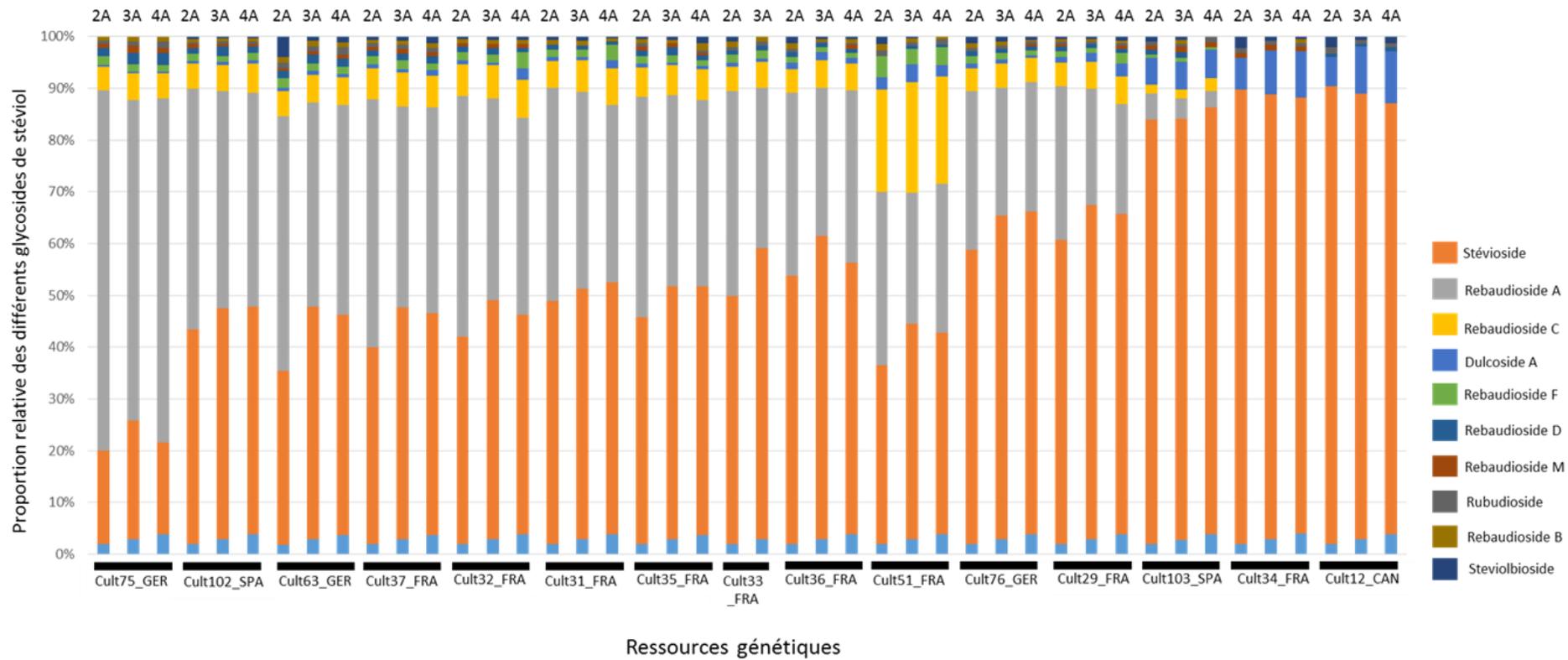


Figure 2.3.2.3.3.a : Présentation des profils en glycosides de stéviol pour les 15 génotypes étudiés sur les trois années de mesure.

Tableau 2.3.2.3.3.a : Table d'ANOVA de l'analyse de variance des proportions en glycosides de stéviol sucrés.

	Probabilité	Significativité
Génotype	2.2 E-16	p < 0.001
Année	2.2 E-16	p < 0.001
Génotype : Année	2.2 E-16	p < 0.001

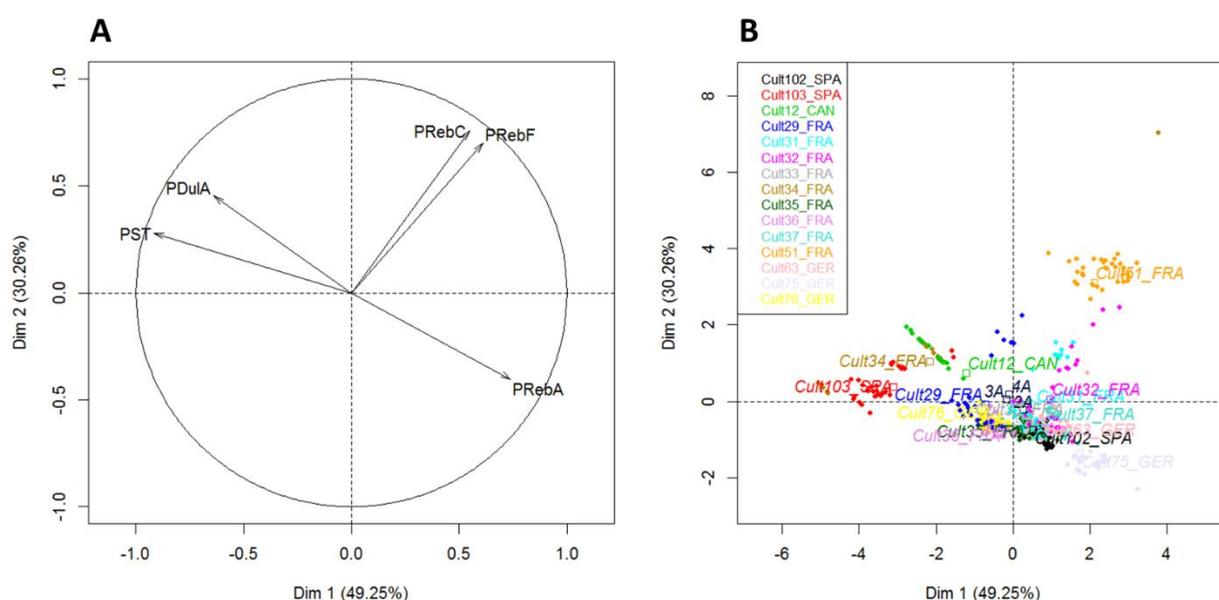


Figure 2.3.2.3.3.b : Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les proportions des 5 SG majeurs (DulA : Dulcoside A, RebA = Rebaudioside A, RebC = Rebaudioside C, RebF = Rebaudioside F, ST= Stevioside) pour les 15 ressources génétiques étudiées sur 3 années de production. La figure (A) présente le graphique des variables, la figure (B) représente le graphique des individus, chaque couleur représente un même génotype.

L'étude des corrélations entre les différents SG dosés dans cette étude, sont en accord avec la voie métabolique des SG. Par exemple, il existe une forte corrélation négative entre le RebA et le ST. Cette réaction est bien connue dans la voie des SG, avec l'intervention de l'UGT76G1 qui transforme le ST en RebA.

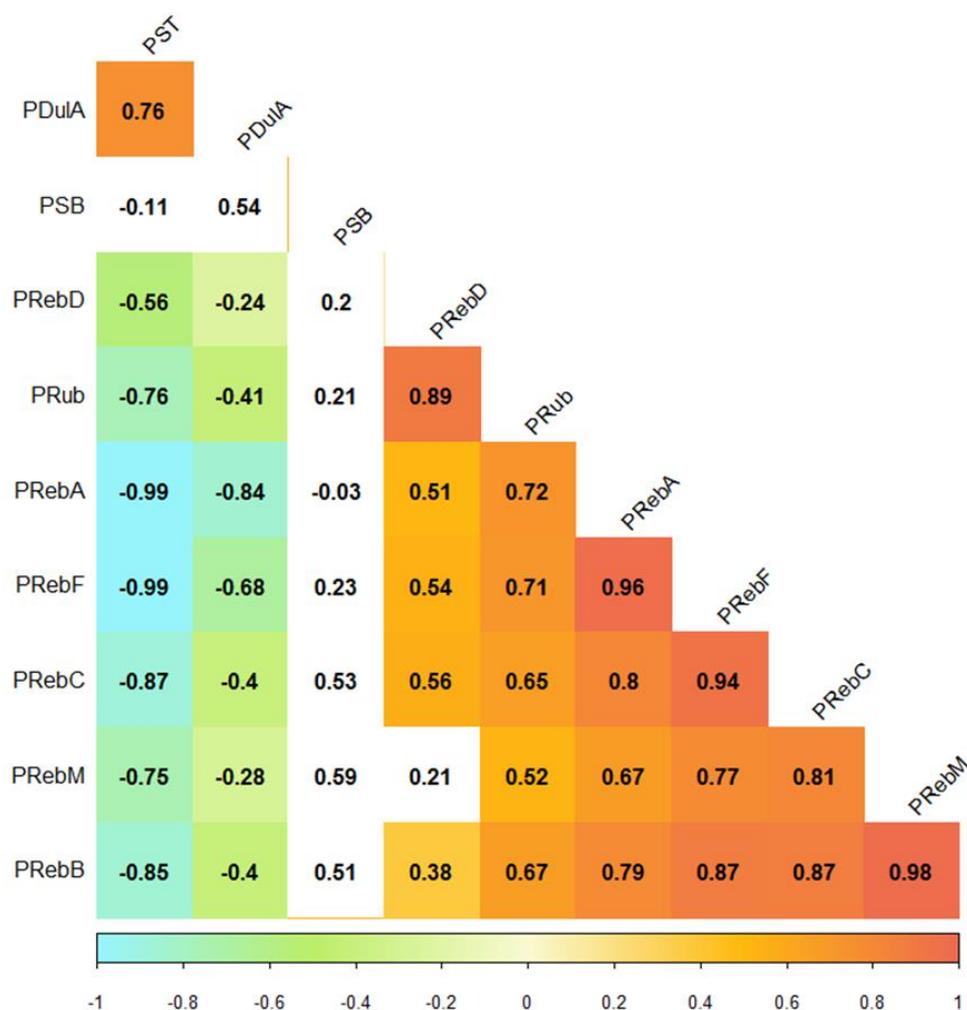


Figure 2.3.2.3.3.c : Matrice de corrélation de Pearson des proportions de 10 SG. Les corrélations positives sont représentées par les couleurs chaudes, rouge – orange, et les corrélations négatives sont représentées par les couleurs froides, bleu – vert. Le coefficient de Pearson est indiqué pour chaque corrélation. Les corrélations non significatives sont représentées par une case non colorée ($p > 0.05$).

2.3.2.4. Suivi des variables de l'architecture des plants de stévia

Les variables permettant de décrire l'architecture des plants sont présentées dans ce paragraphe. Elles apportent d'autres éléments pour la caractérisation des ressources génétiques de la collection en complétant les résultats sur le rendement en SG. Une sélection sur l'architecture peut être appropriée pour améliorer la mécanisation de la récolte de stévia. Les variables présentées ici sont le Harvest Index (%), le volume de la canopée (m³) et la densité de tiges (nb/m²).

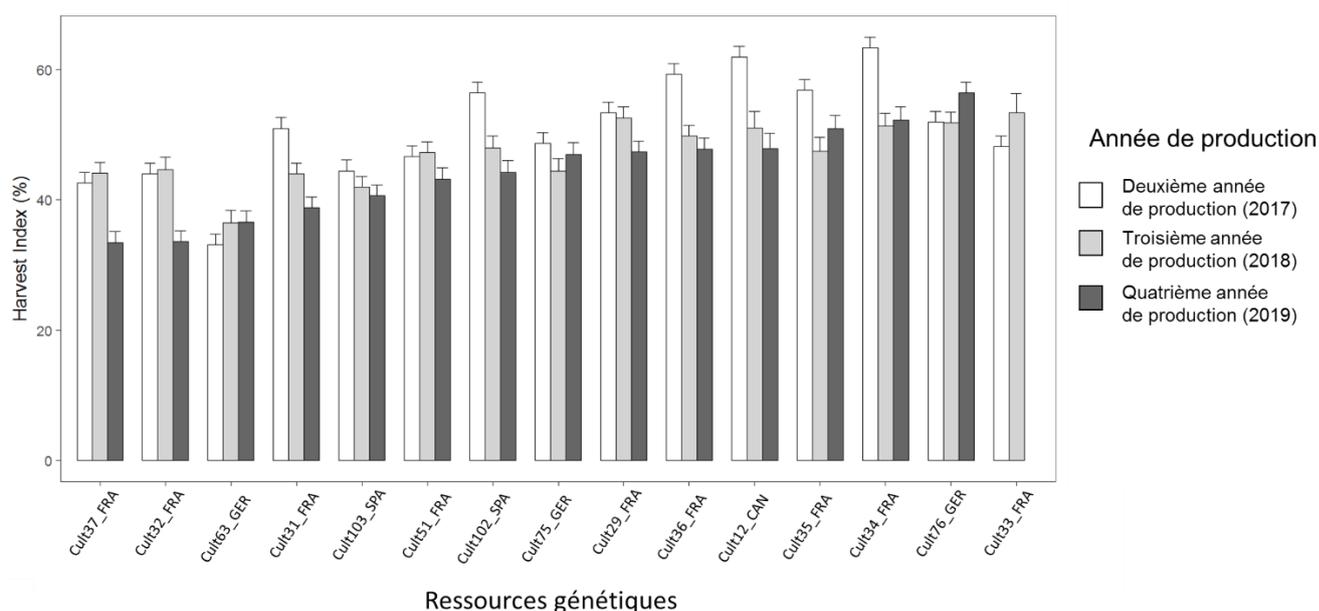


Figure 2.3.2.4.a : Présentation du Harvest Index (%) pour les 15 ressources génétiques de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40), dans le Sud-Ouest de la France, évaluées jusqu'en quatrième année de production. Les histogrammes correspondent aux Least-Square Means des quatre blocs randomisés.

Le Harvest Index (HI) est communément utilisé en agronomie pour évaluer le ratio entre le rendement économique et le rendement biologique. Dans le cas de la stévia, le rendement biologique est composé de toute la biomasse aérienne et c'est uniquement la biomasse foliaire qui constitue le rendement économique. L'évolution du HI sur les trois années de production est présentée dans la Figure, 2.3.2.4.a. Le HI minimum de 33,4 %, est calculé pour le génotype Cult37_FRA en quatrième année de production, le HI maximal de 63,4% est calculé pour le génotype Cult34_FRA en deuxième année de production. Une diminution du HI entre les années de production pour la plupart des génotypes est observable. Cela signifie que la part des feuilles dans la biomasse totale diminue avec l'augmentation de l'âge des plants. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, une augmentation de biomasse foliaire est tout de

même observée au cours des années d'étude pour la majorité des génotypes (partie 2.3.2.3). Cela signifie que la forte augmentation de biomasse foliaire est associée à une plus forte augmentation de la biomasse en tiges. Le HI de la majorité des génotypes est compris entre 40 et 50% pour l'année 2017 et l'année 2018, indiquant que les feuilles représentent environ la moitié de la biomasse produite. En revanche pour l'année 2019, de nombreux HI calculés sont inférieurs à 40%.

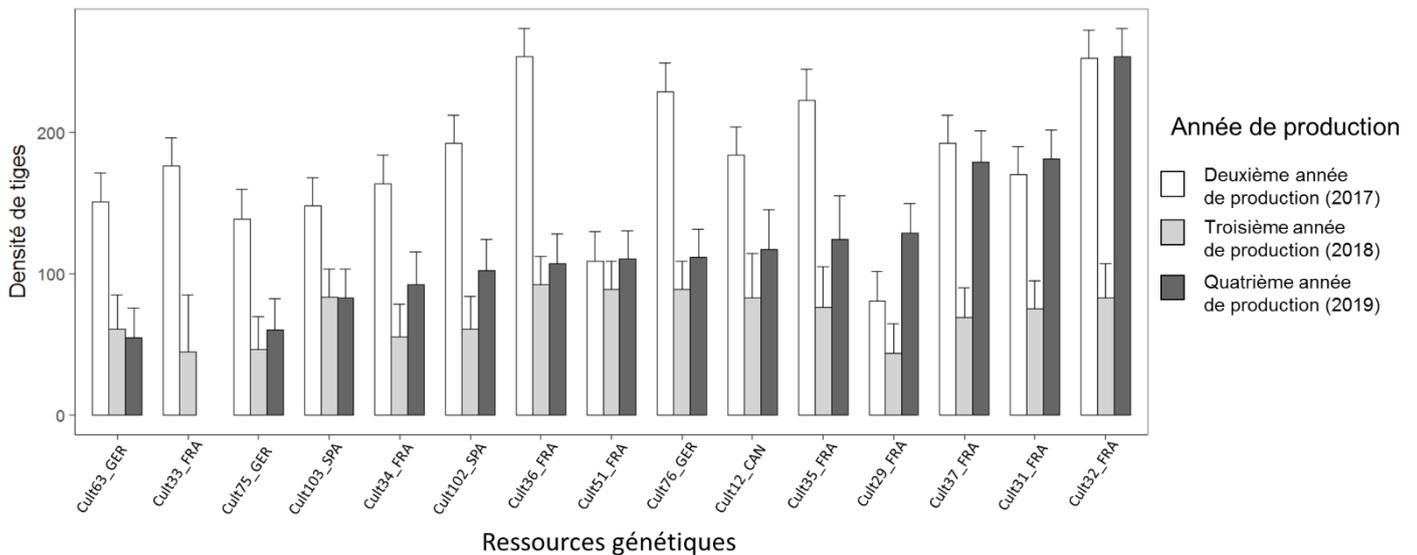


Figure 2.3.2.4.b : Présentation de la densité de tiges (nb tiges / m² de canopée) pour les 15 ressources génétique de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40), dans le Sud-Ouest de la France, évaluées jusqu'en quatrième année de production. Les histogrammes correspondent aux Least-Square Means des quatre blocs randomisés.

La densité de tiges est une variable clé pour la description de l'architecture des plants de stévia. En effet, la densité de tiges est à prendre en compte pour la sélection de plants adaptés à la mécanisation de la culture de la stévia. Les variations de ce trait entre les génotypes et les années sont très importantes, elles vont de 44 tiges / m² pour le génotype Cult29_FRA en troisième année de production à 254 tiges /m² pour le génotype Cult32_FRA en quatrième année de production. Une forte diminution de cette variable entre l'année 2017 et l'année 2018 est observée chez tous les génotypes. L'aire de la canopée augmente, ainsi que le nombre de tiges, cependant l'augmentation de la première variable est bien plus importante par rapport à la deuxième variable, ce qui a pour effet de diminuer la densité de tiges. Dans le même temps, les tiges produites vont être un peu plus nombreuses, mais surtout plus hautes et plus épaisses. Entre 2019 et 2018, une légère augmentation de la densité en tiges est mesurée, témoignant d'une aire de la canopée toujours importante mais avec plus de tiges principales qu'en 2018. Quatre génotypes présentent une évolution différente en quatrième année de production :

Cult37_FRA, Cult31_FRA, Cult29_FRA et Cult32_FRA. Ces génotypes ont une densité de tiges aussi élevée en 2019 qu'en 2017. Ces résultats sont la conséquence d'une augmentation commune de l'aire de la canopée et du nombre de tiges. Enfin, les grandes densités de tiges ne sont pas associées à une forte biomasse foliaire, par exemple Cult32_FRA a une très grande densité de tiges mais fait partie des petits producteurs de biomasse au sein de cette collection. Cult31_FRA, ayant également une forte densité de tiges est plutôt un producteur de biomasse intermédiaire au sein de la collection. De même, les génotypes produisant le plus de biomasse foliaire, Cult36_FRA, Cult102_SPA, Cult103_SPA, Cult75_GER et Cult76_GER font plutôt partie des individus avec une densité de tiges allant de faible à moyenne.

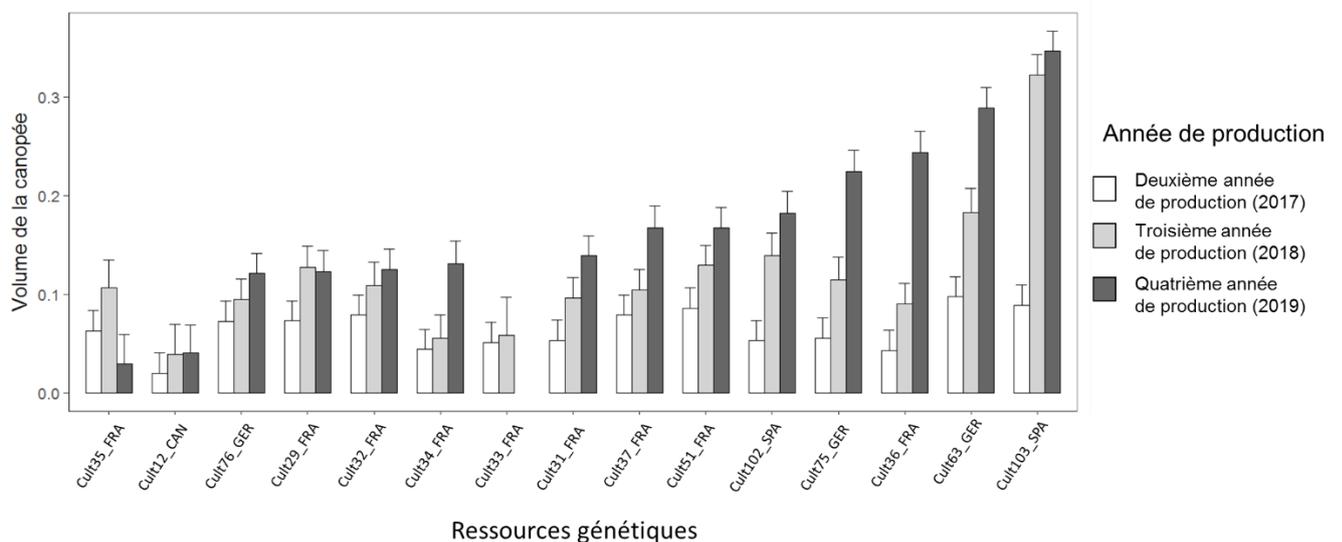


Figure 2.3.2.4.c : Présentation de l'évolution du volume de la canopée (m^3) pour les 15 ressources génétiques de *S. rebaudiana* implantées sur une parcelle expérimentale à Lipsothey (40), dans le Sud-Ouest de la France, évaluées jusqu'en quatrième année de production. Les histogrammes correspondent aux Least-Square Means des quatre blocs randomisés.

La dernière variable liée à l'architecture des plants de stévia est le volume de la canopée. L'évolution de l'architecture de la canopée est présentée Figure 2.3.2.4.c. Ce trait varie beaucoup au sein de la collection de ressources génétiques et entre les années, allant de $0.02 m^3$ pour Cult12_CAN en deuxième année de production à $0.35 m^3$ pour Cult103_SPA en quatrième année de production. Pour la plupart des génotypes étudiés, le volume de la canopée présente une augmentation entre les années de production, sauf pour Cult35_FRA. Cette augmentation peut être très marquée, comme c'est le cas pour les génotypes Cult103_SPA, Cult63_GER, Cult36_FRA ou Cult75_GER. L'augmentation du volume de la canopée résulte de deux évolutions sur les plants. La hauteur maximale atteinte par les plants augmente chaque année,

ensuite, l'étalement du plant c'est-à-dire l'aire du plant au sol, augmente également. Cela est principalement lié à un plus grand développement des tiges secondaires en troisième et quatrième année de production.

2.3.2.5. Synthèse des résultats des ressources génétiques étudiées sur les traits d'intérêt agronomique

Cette Analyse en Composantes Principales permet une synthèse des résultats agronomiques de la collection de ressources génétiques. Les deux premières dimensions contiennent 67% de l'inertie totale. La biomasse foliaire et le rendement en SG sont bien représentés dans la dimension 1 et sont très fortement corrélés. Ce résultat va dans le sens des mesures présentées dans la partie 2.3.2.3. Les variables du volume de la canopée et de la teneur en SG se positionnent également sur le même axe. De plus, ces variables du rendement sont corrélées négativement à la densité de tiges. Un deuxième axe oppose les génotypes selon leur proportion en SG au goût amer ou sucré, avec des génotypes dont le profil est très riche en SG amers, comme Cult12_CAN ou Cult34_FRA, et génotypes dont le profil est riche en SG sucrés, comme Cult75_GER.

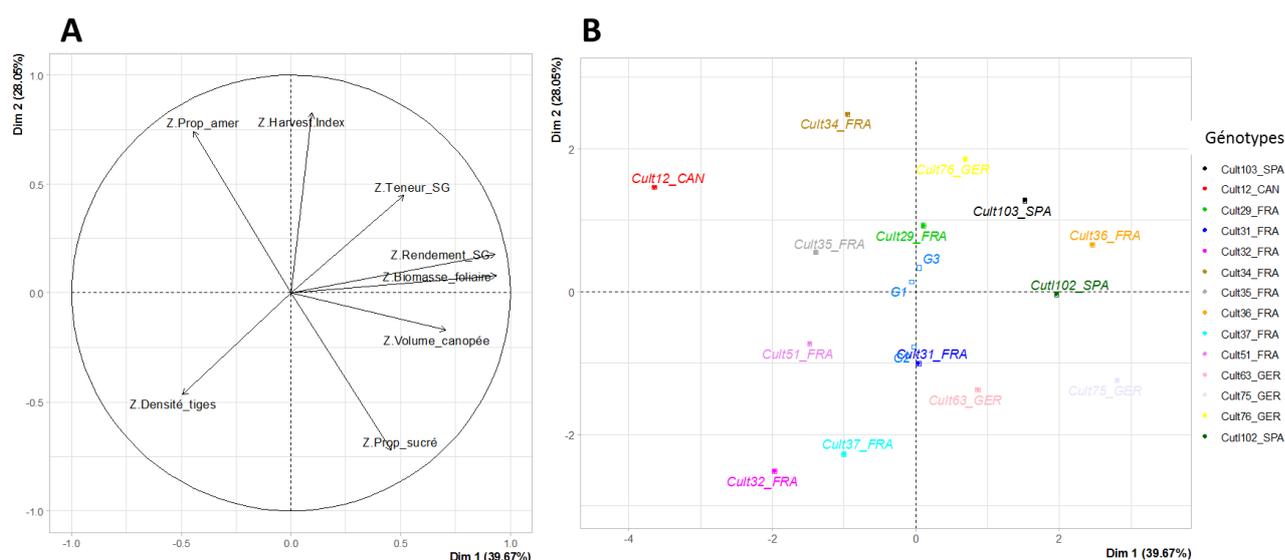


Figure 2.3.2.5 : Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les traits d'intérêt agronomiques de *S. rebaudiana*, (Harvest Index, Biomasse foliaire, Rendement en SG, Volume canopée, Densité tiges, Prop_amer = Proportion en SG amers, Prop_sucré = Proportion en SG sucrés, Teneur_SG = Teneur en SG) des ressources génétiques étudiées en quatrième année de production (2019). La figure (A) présente le graphique des variables, la figure (B) représente le graphique des individus, chaque couleur représente une ressource génétique. L'architecture a été ajoutée comme variable explicative.

L'analyse de cette ACP indique que les génotypes présentant les performances agronomiques les plus intéressantes sont localisés dans la partie droite du graphique des individus, et sont caractérisés par un rendement en SG élevé, et un profil riche en SG sucré, comme Cult36_FRA ou Cult102_SPA. Cependant, dans le contexte du programme d'amélioration de la stévia, il est intéressant d'avoir une diversité au sein des ressources génétiques de la collection. Cette figure pourrait permettre d'identifier des parents au phénotype contrasté, pour étudier la distribution de ces traits au sein de populations.

2.3.2.6. Discussion

Les résultats présentant le taux de reprise après l'hiver des ressources génétiques évaluées permettent de compléter les résultats présentés dans l'article présenté partie 1.2. Ces observations confirment les constats précédemment réalisés et améliorent les connaissances sur une durée d'étude de 5 années, soit proche de celle envisagée pour conserver les parcelles de stévia en France. C'est la première étude observant l'évolution de la reprise pendant une période aussi longue en prenant en considération deux itinéraires culturaux. En effet, les quelques études sur stévia qui se sont intéressées à la survie à l'hiver, n'ont porté que sur quelques génotypes et uniquement sur une ou deux saisons hivernales, comme c'est le cas dans les études de Moraes *et al.*, (2013) et de Qingfu and Aihua, (1998).

Des hypothèses pouvant expliquer cette variabilité entre les itinéraires culturaux ont été détaillées dans la discussion de l'article partie 1.2, elles ne seront pas étudiées de nouveau ici. Cependant, une discussion plus orientée vers l'utilisation de ces résultats pour la production locale et les modalités de culture dans le Sud-Ouest sera développée.

En effet, ces résultats permettent d'orienter le choix des ressources génétiques les plus adaptées pour une production dans ce contexte environnemental. Une première stratégie serait de choisir plutôt des plants adaptés à un itinéraire technique avec coupe en première année, car c'est la stratégie mise en œuvre actuellement au sein des producteurs de SweetVia du Sud-Ouest de la France. C'est le cas des génotypes Cult51_FRA, Cult32_FRA, Cult103_SPA et Cul31_FRA, Cult63_GER. Une deuxième stratégie, pourrait être de sélectionner plutôt des plants adaptés aux deux itinéraires techniques, avec une implantation courte ou longue, comme Cult51_FRA, Cult32_FRA, Cult103_SPA, Cult37_FRA, Cult76_GER et Cult37_FRA permettant une plus grande flexibilité pour les producteurs quant au choix de l'itinéraire cultural. Enfin, la dernière stratégie serait d'orienter la production vers un itinéraire technique sans récolte ou avec une récolte partielle pendant la période d'implantation de la culture. C'est le cas dans la culture de nombreuses pérennes, l'asperge par exemple (Siomos, 2018). Dans le cas de cet itinéraire cultural, les ressources génétiques adaptées seraient les mêmes que celles convenant aux deux itinéraires ainsi que Cult29_FRA, Cult31_FRA, Cult102_SPA.

Cependant, le taux de reprise n'est pas le seul caractère d'intérêt agronomique permettant d'évaluer la variabilité au sein de la collection de ressources génétiques. Les résultats des caractères du rendement agronomique, c'est-à-dire le rendement en glycosides de stéviol lui-même, la production de biomasse foliaire ainsi que la teneur et le profil en SG, doivent

nécessairement être prises en compte pour la sélection de ressources génétiques avec de bonnes performances agronomiques.

La grande limite de l'itinéraire cultural avec une récolte en première année, est que le taux de reprise est si faible à partir de la quatrième année qu'il n'a pas permis de poursuivre l'évaluation de ces ressources génétiques. Les efforts de phénotypage se sont donc concentrés sur les individus n'ayant pas été récoltés en première année (année 2016). L'évaluation en 2019, c'est-à-dire la quatrième année de production, confirme les résultats observés sur les trois premières années de production (présentés dans l'article partie 1.2). Une très grande variabilité est toujours observée au sein de la diversité génétique pour le rendement en SG et ses deux composantes. Cette grande variabilité avait déjà été observée dans d'autres études portant sur des collections des ressources génétiques, comme dans les études de Barbet-Massin *et al.*, (2016), de Parris *et al.*, (2016) et de Libik-Konieczny *et al.*, (2018). Cependant, la majorité de ces études suit les ressources génétiques pendant une ou deux années de production, ce qui limite les possibilités de comparaison avec nos résultats. Au sein de la collection INRAE/Oviatis, la forte variabilité observée pour le rendement en biomasse foliaire et en SG suggère un potentiel d'amélioration au sein de notre collection. La variabilité observée pour le trait de teneur en SG est moins importante que pour les autres variables de rendement mais correspond à ce qui est décrit dans la littérature. Parris *et al.*, (2016) observent des teneurs comprises entre 8.27 et 14.22 %w/w sur 6 cultivars et Denev *et al.*, (2017) des teneurs allant de 9 %w/w à 22 %w/w au sein d'une collection de 24 génotypes.

Les résultats de rendement en SG (g/plant) et la production de biomasse foliaire (g/plant) continuent d'augmenter entre la troisième et la quatrième année pour la majorité des ressources génétiques évaluées. Ces résultats confirment ceux observés par Andolfi *et al.*, (2006) pour la production de biomasse foliaire. En revanche, c'est la première fois en Europe que le rendement en SG et la teneur en SG sont mesurés sur une parcelle expérimentale de ressources génétiques pendant cette durée. La variation de la teneur en SG (%w/w) ne présente pas de tendance nette entre les années de mesure de ce trait. Chez la majorité des génotypes étudiés, une augmentation de la teneur est mesurée entre la deuxième et la troisième année de production, mais les évolutions sont bien plus diverses entre la troisième et la quatrième année. Barbet-Massin *et al.*, (2016) ont mesuré une teneur plus élevée de 40% en moyenne sur des plants de deuxième année par rapport à la première année de production. Cependant, son étude s'arrête à la deuxième année de production, ne permettant pas de mettre en parallèle les résultats obtenus.

Les résultats de cette étude permettent d'identifier les ressources génétiques les plus performantes pour l'itinéraire technique sans récolte en première année. Les géotypes Cult29_FRA, Cult76_GER, Cult75_GER, Cult102_SPA, Cult103_SPA et Cult36_FRA sont les meilleurs producteurs de SG en quatrième année de production.

La présentation du rendement en SG cumulé ainsi que du rendement en biomasse foliaire cumulé sur les trois années d'étude est un indicateur de productivité plus proche des évaluations agronomiques, car le rendement est ici pondéré par les taux de reprise après l'hiver pour chaque ressource génétique. Cette pondération permet d'estimer les performances de nos différents individus au plus près des résultats obtenus dans un contexte de production agricole. Les meilleurs producteurs pour la durée de vie de la parcelle sont les mêmes géotypes que ceux obtenus pour la production en quatrième année à l'exception de Cult75_GER.

Enfin, le dernier caractère mesuré pour évaluer le rendement des ressources génétiques de stévia de la collection est le profil en SG, c'est-à-dire la proportion de chacun des 10 SG mesurés par rapport aux SG totaux. Ces résultats permettent d'identifier les individus avec le meilleur profil, ceux qui produisent le plus gros ratio de SG au goût sucré : RebA, RebD, RebM, RebB. La mesure de ces profils pendant trois années de production indique une variabilité du profil en SG qui n'avait pas été décrite précédemment. En effet Hastoy, (2018) et Barbet-Massin *et al.*, (2016) avaient décrit une stabilité du profil, ce qui n'est pas le cas dans les résultats mesurés ici. Pour ces deux études la comparaison porte sur les deux premières années de production, alors que cette recherche décrit jusqu'à la quatrième année de production, ce qui pourrait expliquer pourquoi les résultats obtenus sont différents. Cependant ici, la variabilité reste très faible et ne modifie pas le classement entre les ressources génétiques étudiées. Les ressources avec le meilleur profil sont Cult75_GER, Cult102_SPA, Cult63_GER, Cult37_FRA, Cult32_FRA et Cult31_FRA.

L'analyse des corrélations phénotypiques entre les proportions des SG du profil permet de cibler les profils pouvant être sélectionnés. Les corrélations observées sont en accord avec la voie de synthèse des SG. En effet, le ST est très négativement corrélé avec le RebA, ce qui a déjà été largement observé dans la littérature (Brandle, 1999 ; Petit, 2019), car le ST est le précurseur du RebA. De même, le ST est négativement corrélé au RebM, ce qui est cohérent puisque le RebM est issu de la transformation du RebA.

La description de l'architecture des plants a été très peu développée dans la littérature pour *S. rebaudiana*. En 1998, Tateo *et al.*, (1998) et son équipe publient une description partielle du développement végétatif de la stévia, en identifiant quatre modes de croissance, qu'ils associent chacun à des architectures des plants. D'après leurs descriptions, le premier mode de croissance est le développement d'une tige principale avec des bourgeons secondaires peu développés, le deuxième regroupe les plants avec une tige principale et des branches secondaires faiblement développées et le troisième décrit les plants possédant une tige principale avec de nombreuses tiges secondaires, elles-mêmes ramifiées. Enfin, le dernier mode de croissance présente les plants ramifiés au collet, avec plusieurs tiges principales. Si ces descriptions permettent une première approche de la diversité d'architecture au sein d'une collection de stévia, elles représentent assez peu ce qui est observé en contexte de production agricole, où les plants de stévia possèdent toujours plusieurs tiges principales ramifiées. En 2019, l'équipe de Hastoy publie une nouvelle description de types d'architecture des plants de stévia en identifiant trois architectures : très compacte, intermédiaire, et étalée (Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019). Cette étude a été réalisée sur des plants en deuxième année de production, cultivés sur une parcelle expérimentale dans le Sud-Ouest de la France. Parmi la collection de ressources génétiques étudiées dans l'étude présentée ici, Cult35_FRA, Cult36_FRA, Cult32_FRA et Cult76_GER ont une architecture décrite comme une architecture compacte. Cult37_FRA, Cult103_SPA, Cult63_GER et Cult51_FRA ont une architecture décrite comme intermédiaire. Enfin Cult12_CAN, Cult75_GER, Cult34_FRA, Cult102_SPA, Cult33_FRA et Cult31_FRA développent une architecture étalée. Le deuxième résultat majeur de l'étude de Hastoy *et al.*, (2019) est le développement de variables pour décrire et évaluer l'architecture des plants de stévia.

Dans notre étude, ces quinze génotypes ont été suivis de la deuxième année de production à la quatrième année de production sur trois traits de description de l'architecture des plants : le Harvest Index, le volume de la canopée et la densité de tiges. L'étude de ces traits sur une collection de stévia pendant trois années de production n'a jamais été décrite dans la littérature. Ces connaissances sont très intéressantes pour évaluer la diversité au sein de la collection mais aussi pour identifier l'évolution d'architecture correspondant le mieux aux attentes de la production agricole.

Le Harvest Index est largement utilisé en agronomie pour décrire la répartition de la biomasse produite et pour quantifier le rendement économique d'une culture (Hay, 1995). Cet indicateur est largement utilisé depuis les années 1960 sur de nombreuses cultures, comme le blé (Richards

and Townley-Smith, 1987), le riz (Yang and Zhang, 2010), le maïs (Li *et al.*, 2015), mais aussi le pois (Assefa *et al.*, 2013). Il permet une comparaison entre les années et entre les cultures (Hay, 1995). Dans notre étude, nous observons une augmentation de la biomasse foliaire entre les années de production (Figure 1.3.2.4.a) mais cette augmentation du rendement économique ne se traduit pas par une augmentation du HI, qui décroît entre l'année 2017 et 2019. L'évolution du HI s'explique par la forte croissance de la biomasse de tiges entre les années. En effet, elles sont plus nombreuses sur la parcelle, mais aussi plus larges et plus hautes. Une étude sur *P. mendocina* décrit la même évolution du HI, avec une diminution du HI mesuré entre la première année de production et les deux années suivantes, en particulier chez les cultivars très sélectionnés, par rapport aux ressources génétiques sauvages (González-Paleo *et al.*, 2016). Le HI est largement utilisé en sélection, pour décrire la variabilité entre des plants et les évaluer, comme dans cette étude sur le pois, dans laquelle la sensibilité à la sécheresse est évaluée par le calcul du HI (Assefa *et al.*, 2013). Chez stévia, l'utilisation du HI comme indicateur pour la sélection peut-être appropriée pour compléter l'analyse basée uniquement sur la biomasse foliaire pour la comparaison entre les ressources génétiques. En revanche, son utilisation doit s'accompagner des résultats sur d'autres variables relatives à l'architecture de la plante comme la densité des tiges.

L'étude de la densité de tiges principales permet de mesurer l'organisation de l'architecture chez les ressources génétiques étudiées en termes de nombre de tiges par rapport à l'aire de la canopée. La variabilité observée sur ce trait entre les années, avec une diminution très marquée entre la deuxième année de production et les autres années, se traduit par la forte augmentation de l'aire de la canopée, plutôt qu'une diminution du nombre de tiges produites. L'aire de la canopée augmente car les tiges sont plus hautes et surtout plus étalées en troisième et quatrième année de production. Finalement, ce trait est à considérer avec le trait du volume de la canopée. En effet, ce dernier augmente de la deuxième à la quatrième année pour la majorité des génotypes étudiés. Plusieurs facteurs expliquent cette augmentation, on observe une augmentation de la hauteur des plants, ainsi qu'une augmentation de l'aire de la canopée, principalement liée à l'étalement des tiges principales, comme nous l'avons vu pour la densité de tiges. Ces tendances vont dans le sens de l'augmentation du rendement que nous avons mesuré. Les tiges plus hautes portent plus de biomasse foliaire créant un volume plus important. La prise en compte du volume de la canopée est fondamentale dans la sélection, car les traits liés à l'architecture sont directement liés à la mécanisation de la production. Le volume de la

canopée de stévia va impacter le choix de la densité de plantation et les méthodes de désherbage mécanique pouvant être employées.

Afin d'affiner la description de l'architecture des plants de stévia, il serait intéressant de mesurer d'autres traits, comme cela a été fait dans cette étude sur les noyers de macadamia (Toft *et al.*, 2019). Bien que les noyers n'aient pas la même architecture que les plants de stévia, les mesures réalisées pour la décrire pourraient être transposées à notre système d'étude. Toft et son équipe ont décrit la ramification des branches principales, l'angle des branches dans la canopée mais aussi la longueur des entre-nœuds. L'évaluation de ces variables leur permet de proposer des stratégies sur les pratiques agronomiques ou pour la sélection afin d'obtenir des arbres à la canopée plus compacte. Dans notre étude, le calcul de densité de tiges prend uniquement en compte les tiges principales, or les tiges secondaires se développent chez stévia pendant la période de croissance végétative (comme décrit dans l'article BBCH présenté dans ce manuscrit). Ces tiges secondaires portent une partie de la biomasse foliaire et jouent un rôle dans la prise de volume de la canopée. La date du début de développement de ces ramifications peut également être prise en compte, dans le cas où plusieurs récoltes seraient réalisées dans l'année de production. L'angle de développement des branches, qui serait pour la stévia celui des tiges secondaires, apporte également des éléments expliquant l'architecture. Enfin la densité / porosité de la canopée pourrait être décrite par notation visuelle comme cela a été réalisé sur des framboisiers (Graham *et al.*, 2014), ou par analyse d'images comme cela a été développé sur la vigne (Diago *et al.*, 2019). Enfin, des approches de modélisation en 2D ou 3D de la canopée, ont permis des améliorations sur l'estimation du volume de la canopée, chez l'eucalyptus (Verma *et al.*, 2016), comme sur l'oranger (Colaço *et al.*, 2017), suggérant des adaptations possibles sur stévia.

L'architecture des plants de stévia fait partie des traits à prendre en compte en sélection pour répondre aux spécificités et aux contraintes de l'itinéraire cultural. La mécanisation de la production de stévia en particulier peut orienter les traits à sélectionner sur l'architecture des plants. Dans le contexte de la production agricole de stévia en Nouvelle Aquitaine, les plants ciblés doivent développer rapidement une aire de canopée couvrant le sol, afin de rentrer rapidement en compétition avec les adventices. L'architecture est également un bon levier pour limiter la production de l'inoculum et la propagation de l'épidémie (Tivoli *et al.*, 2013). Ce trait peut d'ailleurs être pris en considération dans le design d'idéotypes pour limiter le développement des agents pathogènes, mais les traits à sélectionner varient selon l'agent fongique considéré et son mode de propagation (Andrivon *et al.*, 2013). La mécanisation des

traitements phytosanitaires peut également être améliorée grâce à la connaissance de l'architecture qui permet une meilleure application du produit sur les feuilles, diminue la pollution de l'environnement car limite les pertes du produit (Carbre *et al.*, 2017). Chez stévia, la récolte est mécanisée et deux modes opératoires sont employés selon la transformation prévue des plants. Le premier consiste à ne récolter que les feuilles, en laissant les tiges nues sur le plant, et nécessite des tiges souples, non cassantes lors du passage dans la récolteuse. Ce trait n'a pas été analysé jusqu'à présent, mais il serait intéressant de l'intégrer dans la suite du phénotypage des ressources génétiques. Le deuxième mode opératoire consiste en la récolte de toute la biomasse aérienne pour un séchage des tiges et des feuilles. Les plants avec des tiges de faibles diamètres sont intéressants car le séchage se fera plus rapidement. Enfin, les deux modes de récolte requièrent des architectures dont les tiges sont assez robustes pour porter le poids de la biomasse foliaire sans contact au sol.

Finalement, ce chapitre a permis de décrire la variabilité des composantes du rendement en glycosides de stéviol : la production en biomasse foliaire, la teneur en glycosides de stéviol et le profil des SG produits au sein de la collection de ressources génétiques de l'INRAE de Villenave d'Ornon. L'impact d'une récolte lors de l'année d'implantation sur le rendement et sur le taux de survie à l'hiver a été étudié. Elle a révélé qu'une récolte en première année entraînait des pertes de plants et de rendement par rapport à une culture non récoltée lors de cette première année. Cette étude montre que la longueur de la durée d'implantation chez les plantes pérennes lors de la première année de production est déterminante pour le maintien des plants sur la parcelle et la production de biomasse sur les années suivantes. Cette variabilité a également pu être décrite pendant quatre années de production et a permis d'identifier des génotypes aux performances prometteuses pour une production dans le Sud-Ouest de la France.

Ces nouveaux résultats apportent des éléments sur les ressources génétiques de stévia, et en particulier sur les rendements en biomasse foliaire et en SG pouvant être espérés jusqu'en quatrième année de production. Cependant, le rendement en biomasse foliaire peut fortement varier selon les stress abiotiques et biotiques rencontrés par la culture. Dans le contexte de la culture de stévia en Agriculture Biologique, les stress biotiques et en particulier les infections fongiques, peuvent entraîner de fortes pertes de biomasse foliaire. Chez stévia deux pathogènes ont été décrits en France : *Athelia roflsii* et *Septoria* sp., comme cela est présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre 3. Description d'*Athelia rolfsii* sur stévia et développement d'un test pour étudier la réponse de *Stevia rebaudiana* à la septoriose

La stévia est une culture dont la production s'est étendue récemment à l'échelle mondiale (Gantait *et al.*, 2018). Cette récente expansion, mais aussi l'intérêt croissant pour cette espèce et sa culture, peut expliquer le nombre croissant d'agents pathogènes et ravageurs très variés décrits sur cette plante dans de nombreuses régions du monde, comme présenté dans l'introduction. En effet, les agents pathogènes et les ravageurs des productions agricoles se disséminent très rapidement et à très large échelle, du fait des activités humaines, ainsi que du changement climatique (Anderson *et al.*, 2004). Ils peuvent avoir une grande capacité à élargir leur gamme d'hôtes, par mutation, hybridation ou encore recombinaison sexuelle (Corredor-Moreno and Saunders, 2020). La stévia est introduite dans de nouveaux environnements très variés et possédant une diversité d'agents pathogènes. Il existe un risque que ces agents pathogènes peu spécifiques s'adaptent pour infecter la stévia. Les prochaines années pourraient révéler le développement de nouveaux agents pathogènes sur *Stevia rebaudiana*. De plus, il est très probable que le nombre d'agents pathogènes non encore décrits affectant *Stevia rebaudiana* soit élevé. En 2019, l'étude de Bebbler *et al.*, (2019) a prédit, en se fondant sur des modèles statistiques, la probabilité de présence d'agents pathogènes dans le monde non encore identifiés, à hauteur de plus de 2000 agents pathogènes dans la catégorie des agents fongiques.

Les symptômes causés par ces agents fongiques sont souvent qualifiés de maladies fongiques, comme la rouille, le mildiou, la tavelure et la septoriose. Or ces maladies fongiques sont responsables de pertes de rendements très importantes, et donc de revenus. Les pertes économiques annuelles engendrées par des maladies fongiques sont estimées à 200 milliards de dollars aux Etats-Unis (Horbach *et al.*, 2011; Shuping and Eloff, 2017).

Dans ce contexte, l'identification et la description des maladies fongiques émergentes sur stévia, ainsi que l'étude de la réponse de la plante à des infections, sont des connaissances nécessaires pour permettre le développement de la production de stévia.

Des agents fongiques ont d'ores et déjà été identifiés sur stévia : *Septoria* sp. et *Alternaria alternata* sont particulièrement décrits (Ishiba, Yokoyama, *et al.*, 1982; Lovering, 1996; Reeleder, 1999; Bhandari and Harsh, 2006; Maiti *et al.*, 2007; Arturo *et al.*, 2009; Sanabria and Fuente, 2013; Uchkunov *et al.*, 2015; Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Aujourd'hui, des

méthodes de lutte chimique se développent pour limiter l'impact des maladies fongiques sur stévia avec l'utilisation de certaines molécules actives comme l'azoxystrobine, le tébuconazole ou encore le difénoconazole (Koehler and Shew, 2017a, 2018), dont l'efficacité a été testée au Etats-Unis et leur utilisation est autorisée dans l'Union Européenne. Des méthodes alternatives de lutte biologique peuvent également être envisagées. Sen *et al.*, en 2012 ont montré des résultats prometteurs avec l'utilisation d'une bactérie antagoniste d'*Alternaria alternata*.

En agriculture biologique en France, les produits phytosanitaires de synthèse sont prohibés (Chambre d'Agriculture PACA, 2019). Les fongicides autorisés, comme le cuivre ou le soufre, permettent une protection préventive mais peuvent engendrer des phytotoxicités par accumulation dans les sols des parcelles traitées (Melendez *et al.*, 2020). Dans ce contexte la lutte génétique est un levier efficace pour lutter contre la septoriose, comme cela a été montré sur le blé (Ghaffary *et al.*, 2018) et elle est compatible avec l'agriculture biologique. Sa mise en place nécessite au préalable d'identifier les agents pathogènes présents sur la culture et occasionnant des pertes, de connaître les phénotypes de réponse des ressources génétiques vis-à-vis des agents pathogènes et la variabilité de ces réponses, et de développer des tests robustes et rapides permettant de mesurer cette réponse.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont : (1) l'identification et la description d'un nouvel agent pathogène sur *Stevia rebaudiana* : *Athelia rolfsii* dans le Sud-Ouest de la France (2) la réponse de ressources génétiques de stévia à une infection de *Septoria* sp., (3) le développement d'un test *in vitro* de phénotypage du trait « sensibilité à la septoriose ».

3.1. Détection et identification de *Athelia rolfsii* sur *Stevia rebaudiana*

3.1.1. *Athelia rolfsii* infectant *Stevia rebaudiana*

En France, les premiers symptômes caractéristiques d'*Athelia rolfsii* ont été observés en 2017 sur des parcelles de production localisées à Sainte-Livrade (47) pendant la saison de culture de la stévia. A cette occasion, un prélèvement a été réalisé sur les plants infectés et le champignon a été mis en collection. Pendant les saisons de production suivantes, de nouveaux foyers d'infection ont été observés sur différents lieux de production, sur des parcelles de production mais aussi sur des parcelles expérimentales. En 2019 et 2020, une parcelle expérimentale conduite par Invenio à Blagon (33) sur un précédent cultural de poivrons et aubergines, a particulièrement été touchée, engendrant 30% de pertes de plants sur ces deux années. L'impact très conséquent de cet agent pathogène sur les cultures a conduit les équipes d'Oviatis et de l'INRAE à s'y intéresser de près.

Athelia rolfsii (ex *Sclerotium rolfsii*) fait partie de la famille des *Atheliceae* (Punja, 1988). C'est un champignon de type basidiomycète et tellurique (Ephytia, 2017). Ce champignon saprophyte se développe au niveau des racines et du collet, entraînant un flétrissement du plant entier, voire son dépérissement total. Il est reconnaissable au mycélium blanc qui apparaît sur les collets des plants infectés, et envahit les racines. De nouveaux sclérotés sphériques se développent ensuite. Ces formes de conservation ont une grande capacité de survie et serviront par la suite d'inoculum primaire (Willetts, 1971). Ce champignon se développe particulièrement bien dans les zones tropicales car les conditions chaudes et humides, de 27 à 30°C, sont très favorables à sa croissance (Punja, 1985). *Athelia rolfsii* présente une gamme d'hôtes très large de plus de 600 espèces (Xu *et al.*, 2008). Les pertes occasionnées par *Athelia rolfsii* sont très importantes, avec des pertes de rendement allant jusqu'à 60% sur des cultures de tomates et d'arachides aux Etats-Unis (Kator *et al.*, 2015).

En France, ce champignon se retrouve surtout en Guyane ou à la Réunion sur des cultures maraichères (Bulletin de Santé du Végétal n° 31, 2017), mais depuis une dizaine d'années il se développe en France métropolitaine sur des cultures maraichères conduites sous serre ou en plein champ si les conditions météorologiques lui sont favorables (Blancard, 2013).

Athelia rolfsii a été identifié sur la stévia dans différents lieux de production, en Inde (Kamalakaran *et al.*, 2007), en Caroline du Nord, USA (Koehler and Shew, 2014a), en Italie (Carrieri *et al.*, 2015), en Grèce (Chatzivassiliou *et al.*, 2015) et plus récemment en Turquie (Erper *et al.*, 2020).

Aujourd'hui, ce pathogène est présent sur plusieurs parcelles de production de stévia. Les caractérisations morphologique et moléculaire ont confirmé l'identité de cet agent fongique sur stévia. Cette description a fait l'objet de la publication d'une short-note dans Plant Disease qui est présentée dans le paragraphe suivant.

3.1.2. Short-note

First Report of Sclerotium stem rot caused by *Athelium rolfsii* on *Stevia rebaudiana* in southwestern France

Z. Le Bihan, INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France and Oviatis SA, Lacaussade, France; **J. Gaudin**, INRA, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, Villenave d'Ornon, France; **F. Robledo-Garcia**, INRA, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, Villenave d'Ornon, France ; **P. Cosson**, INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France; **C. Hastoy**, Oviatis SA, Lacaussade, France; **D. Rolin** INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie 1332, Villenave d'Ornon, France and **V. Schurdi-Levraud**, INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie 1332, Villenave d'Ornon, France.

Stevia rebaudiana is a perennial species that accumulates steviol glycosides in its leaves. These natural compounds produce an intense sweet taste but are non-caloric and are hence in demand by consumers to reduce daily sugar consumption. The cultivation of *S. rebaudiana* has recently become popular in France. In August 2017, disease symptoms similar to a sudden wilting were observed in a *S. rebaudiana* 0.5 ha commercial field in Sainte-Livrade (N44° 23' 48''; E0°35'13''), France. Symptoms first appeared on the aerial parts, resulting in wilting and drying of the entire plant. Additional symptoms included lesions on the stem at the collar base with abundant white mycelium and round-white to dark-brown small globoid sclerotia were observed on diseased plants. These symptoms were also observed on nearby pepper crops. The outbreaks of infection were increasing with time. Disease incidence was estimated at approximately 17%. To isolate the pathogen, the collar of one diseased plant was collected and incubated in moist chamber for 2 days at 24°C. Mycelia was removed from the diseased plant parts and placed on MAC (malt extract agar amended with 50 mg/liter chloramphenicol) and incubated at 22°C in a growth chamber with a 12 h photoperiod. After 7 days, immature sclerotia were abundantly formed, and after ten days small globoid, white sclerotia were approximately 1 to 3 mm diam. and became dark brown with age. The freshly isolated pathogenic fungus was examined microscopically. The white mycelia had clamp connection typical of that described for *A. rolfsii* (Mordue 1974). No sexual reproductive structures were observed. Genomic DNA of one isolate (17SCL_STEV1) was extracted as described (Hastoy et al. 2019). The Large ribosomal subunit locus (LSU rRNA) was amplified and sequenced with primers LROR / LR5 (Stielow et al. 2015). The length of the amplicon was 884 bp (GenBank

accession MK680087). Phylogenetic analysis was done with the neighbor-joining method in MEGA7. Isolate 17SCL_STEV1 was identified as *A. rolfsii* and presented 99% sequence similarity with *A. rolfsii* isolate DGADY14 from *Capsicum annuum*. To conduct pathogenicity testing, mycelium was cultivated on MA (Malt-Agar) medium incubated at 22°C for 6 days in the growth chamber. Colonized MA plugs (0.5 diam.) were removed and four were applied to the stems of 5 two-month-old *S. rebaudiana* cv. Shoutian III plants following injury by a scalpel. For the control, stems were wounded and inoculated with sterile MA plugs with the same method. Plants were kept in a growth chamber at 22°C with a 12-h photoperiod and 85% humidity. After 2 days, lesions appeared on the collar. White mycelium and incipient sclerotia were observed on the lesion and soil surface and turned into typical brownish sclerotia. Inoculated plants wilted and died after 5 days. Three re-isolation were performed once by sampling mycelium from symptomatic plants. Isolates were confirmed as *A. rolfsii* based on morphological and molecular characteristics. Although there are previous reports of *A. rolfsii* on *S. rebaudiana* in India (Kamalakkannan et al. 2007), in the USA (Koehler and Shew 2014), Italy (Carrieri et al. 2015) and Greece (Chatzivassiliou et al. 2015), to the best of our knowledge, this is the first report of *A. rolfsii* causing Sclerotium stem rot of *S. rebaudiana* in France. This is of primary importance given the damage to yield and the difficulty of controlling *A. rolfsii* (Punja 1985).

References

- Carrieri, R., Cozzolino, E., Tarantino, P., Cerrato, D., Lahoz, E., 2015. First Report of Southern Blight on Candyleaf (*Stevia rebaudiana*) Caused by *Sclerotium rolfsii* in Italy. *Plant Disease* 100, 220. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0324-PDN>
- Chatzivassiliou, E.K., Giakountis, A., Testa, A., Kienle, U., Jungbluth, T., 2015. Natural Infection of *Stevia rebaudiana* by Cucumber mosaic virus in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. *Plant Disease* 100, 1029–1029. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1149-PDN>
- Hastoy, C., Le Bihan, Z., Gaudin, J., Cosson, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2019. First report of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* in France and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1747-RE>
- Kamalakannan, A., Valluvaparidasan, 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.
- Koehler, A., Shew, H., 2014. First Report of Stem and Root Rot of Stevia Caused by *Sclerotium rolfsii* in North Carolina. *Plant Disease* 98, 1005–1005. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1238-PDN>
- Mordue, E. 1974. Page 1 in: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 410. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K.
- Punja, Z.K., 1985. The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium Rolfsii*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23, 97–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000525>
- Stielow, J.B., Lévesque, C.A., Seifert, K.A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G.J.M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A.M.S., Damm, U., Yilmaz, N., Houburken, J., Lombard, L., Quaedvlieg, W., Binder, M., Vaas, L.A.I., Vu, D., Yurkov, A., Begerow, D., Roehl, O., Guerreiro, M., Fonseca, A., Samerpitak, K., van Diepeningen, A.D., Dolatabadi, S., Moreno, L.F., Casaregola, S., Mallet, S., Jacques, N., Roscini, L., Egidi, E., Bizet, C., Garcia-Hermoso, D., Martín, M.P., Deng, S., Groenewald, J.Z., Boekhout, T., de Beer, Z.W., Barnes, I., Duong, T.A., Wingfield, M.J., de Hoog, G.S., Crous, P.W., Lewis, C.T., Hambleton, S., Moussa, T.A.A., Al-Zahrani, H.S., Almaghrabi, O.A., Louis-Seize, G., Assabgui, R., McCormick, W., Omer, G., Dukik, K., Cardinali, G., Eberhardt, U., de Vries, M., Robert, V., 2015. One

fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Pers - Int Mycol J* 35, 242–263.

<https://doi.org/10.3767/003158515X689135>

e-Xtra 1

Corresponding author: valerie.schurdi-levraud@inra.fr

e-Xtra 2

Z. Le Bihan and C. Hastoy were supported by ANRT n°2017/0489 and ANRT n°2014/0915 funding and Oviatis SA, France. The Nouvelle-Aquitaine Region supported the work through specific CIFRE funding. Work was partly supported by the Research Federation on Integrative Biology and Ecology (Bordeaux University, France).

e-Xtra 3



Figure S1. Sclerotium rot on *Stevia rebaudiana* and mycological characteristics of the pathogenic fungus, *Athelia rolfsii*. A and B typical symptoms of plant wilting and drying in the field; C white mycelium formed on the collar of infected plant from the field after 1 day of incubation in a moist chamber; D colony of *A. rolfsii* with mycelial mat and sclerotia grown on MAC medium after 12 days of incubation; E clamp connections structure formed on the fungus hyphae (arrow); F symptoms (wilt) and signs (white mycelium on the stem and near the soil line) appeared 2 days after artificial inoculation (left; control on the right).

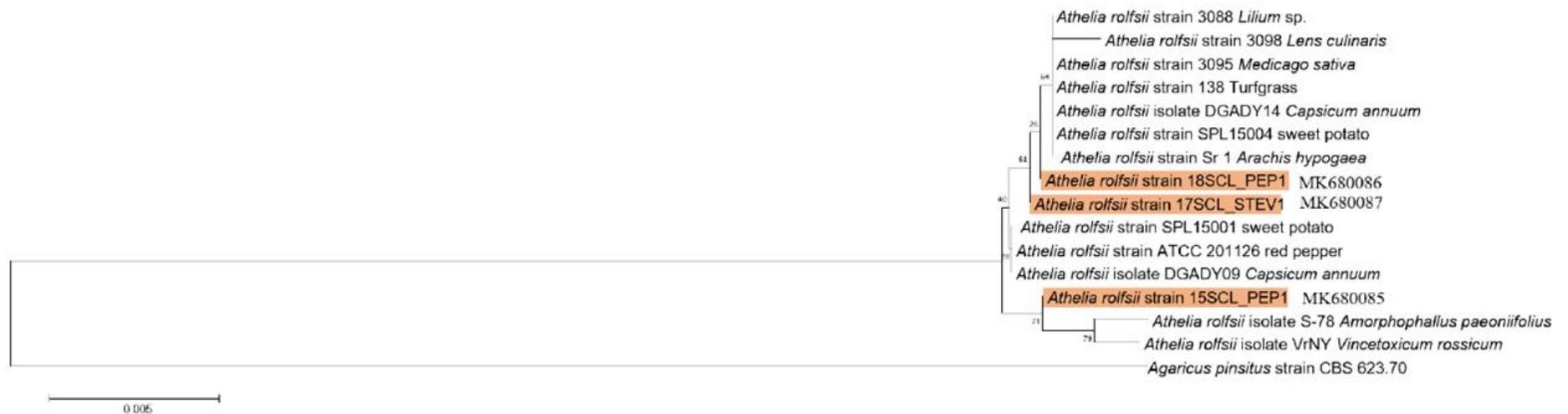


Figure S2. Phylogenetic tree of isolate 17SCL_STEV1 and related sequences from pepper and from NCBI were constructed by MEGA7. Branch stability was estimated by bootstrapping with 1000 replicates, support values are shown at the branch points. The analysis involved 16 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 446 positions in the final dataset.

3.2. Variabilité phénotypique de la réponse de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* à une infection par *Septoria* sp.

3.2.1. Etude de la variabilité de réponse de plantes entières de *Stevia rebaudiana* à une infection de *Septoria* sp.

3.2.1.1. Introduction

Une des maladies les plus décrites dans le monde chez *Stevia rebaudiana* est la septoriose, causée par l'agent fongique *Septoria* sp. (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019), comme présenté dans l'introduction. Les nécroses et chloroses foliaires provoquées par ce pathogène entraînent d'importantes pertes de rendement, estimées jusqu'à 50% au Canada (Reeleder, 1999).

Dans le Sud-Ouest de la France, des symptômes typiques de la septoriose sont observés dès 2014 sur des essais culturaux dans la station expérimentale d'Invenio du Lot-et-Garonne. Les surfaces de production de la stévia se sont beaucoup étendues depuis, cela s'est fait simultanément avec le développement de la septoriose, qui se retrouve aujourd'hui sur la plupart des parcelles de production. Cet agent fongique est rapidement devenu un des principaux freins au développement de la culture de la stévia en agriculture biologique en France.

L'étude présentée dans ce chapitre fait suite à un test réalisé en 2017 dans le cadre du projet de thèse de Cécile Hastoy (Hastoy, 2018). Cet axe du projet de recherche avait permis la caractérisation macroscopique et moléculaire de 5 isolats de *Septoria* sp. prélevés sur des parcelles de production de stévia dans le Sud-Ouest de la France. Il avait également permis le développement d'un test de phénotypage de la sensibilité à une infection de *Septoria* sp. sur plants de stévia en conditions contrôlées. Ce test de phénotypage a été mis en œuvre sur 10 génotypes de *Stevia rebaudiana*, et a permis d'évaluer la variabilité de réponses de ces génotypes en conditions d'infection (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019).

Afin de poursuivre le travail de description des ressources génétiques présentes dans la collection de l'INRAE de Villenave d'Ornon, le phénotypage de la sensibilité à la septoriose a été poursuivi en 2018 et 2019 dans le cadre de la thèse présentée dans ce manuscrit, permettant de tester par inoculation 8 nouveaux génotypes. Les résultats présentés dans ce chapitre de thèse correspondent à la synthèse de tous les génotypes testés entre 2017 et 2019.

3.2.1.2. Matériel et méthodes

3.2.1.2.1. Matériels

3.2.1.2.1.1. Matériel végétal

Pour cette évaluation phénotypique 18 génotypes ont été sélectionnés au sein de la collection de ressources génétiques de l'INRAE, Villenave d'Ornon (Tableau 3.2.1.2.1.1.). Les génotypes Cult33_FRA et Cult102_SPA, déjà testés en 2017, ont été utilisés dans les essais de 2018 et 2019 comme références très sensible et peu sensible respectivement.

Tableau 3.2.1.3.1.1.: Ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* testées pour évaluer leur réponse à une inoculation de *Septoria sp.* Ce tableau indique le code d'identification du génotype, le fournisseur et son pays d'origine, l'origine avant sélection, la date d'obtention et l'année d'inoculation.

Génotypes	Fournisseur	Pays	Origine avant sélection	Date d'obtention	Année(s) de test
Cult75_GER	EUSTAS gene bank	Allemagne	Colombie	2016	2017
Cult76_GER	-	-	Inconnue	-	2017
Cult63_GER	-	-	Paraguay	-	2018-2019
Cult33_FRA	Collection Oviatis	France	Argentine	2011	2017 – 2018 - 2019
Cult34_FRA	-	-	-	-	2017
Cult51_FRA	-	-	Paraguay	2015	2017
Cult102_SPA	-	-	Espagne	2013	2017 – 2018 - 2019
Cult103_SPA	-	-	Espagne	2013	2018-2019
Cult104_SPA	-	-	Espagne	2013	2018-2019
Cult35_FRA	-	-	Argentine	2011	2017
Cult29_FRA	-	-	-	2014	2018-2019
Cult12_CAN	-	-	Israël	2015	2017
Cult36_FRA	-	-	Argentine	2013	2017
Cult37_FRA	-	-	-	-	2017
Cult31_FRA	-	-	-	2014	2018-2019
Cult32_FRA	-	-	-	-	2018-2019
Cult04_CAN	Richter	Canada	Angleterre	2017	2018-2019
Cult67_GER	Jelitto	Allemagne	-	2017	2018-2019

3.2.1.2.1.2. Matériel fongique

Le matériel fongique utilisé pour cette étude a été isolé dans la parcelle expérimentale de Liposthey (40). La souche utilisée correspond à la souche Sep-15-LIP et a été caractérisée lors d'une précédente étude (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). La figure 3.2.1.2.1.2 présente en (A) une culture d'isolat de septoriose sur milieu OAC, en (B) la structure des pycnides matures exsudant et en (C) ainsi que la forme des conidies.



Figure 3.2.1.2.1.2.: Présentation de la morphologie de *Septoria* sp., avec une colonie cultivée sur milieu OAC (A), des pycnides (formes sphériques noires) matures exsudant des cirrhes blanchâtres contenant les conidies (B), des conidies de l'isolat Sep-15-LIP (C).

3.2.1.2.2. Méthodes mises en œuvre pour l'inoculation

3.2.1.2.2.1. Design expérimental

Les expérimentations de cette étude ont été réalisées entre 2017 et 2019 (Figure 3.2.1.2.2.1.). En 2017, 10 génotypes de stévia ont été testés pour la première fois. Trois inoculations ont été réalisées et ont permis d'obtenir un premier résultat sur la variabilité de réponse au sein des ressources génétiques (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Puis en 2018 et 2019, une nouvelle série d'inoculations a été réalisée permettant de tester 10 génotypes : 8 n'ayant jamais été évalués sur ce trait et 2 déjà évalués en 2017, servant de comparaison entre les séries.

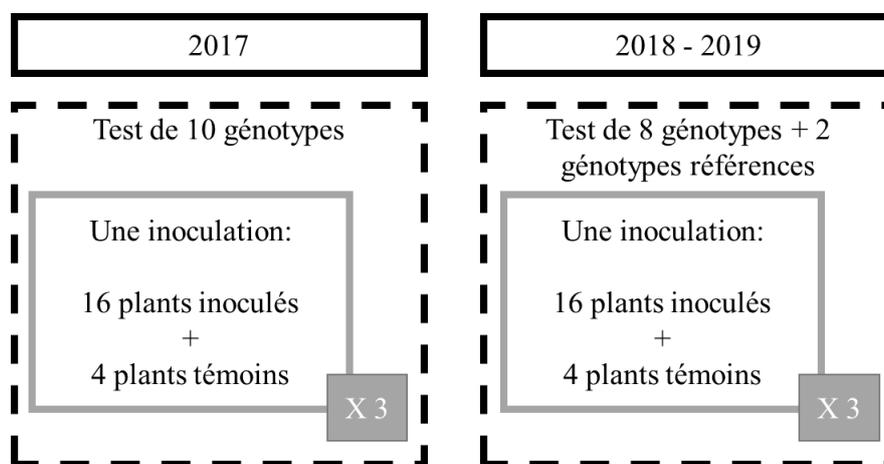


Figure 3.2.1.2.2.1. : Présentation du design expérimental des inoculations pour les 18 génotypes de *Stevia rebaudiana* testés sur la sensibilité à la septoriose entre 2017 et 2019.

3.2.1.2.2.2. Maintien et production de l'inoculum

La souche sélectionnée « 15-LIP-04 » a été conservée dans la collection de l'INRAE sur milieu MAC à 4°C. Afin de produire le matériel fongique nécessaire à l'inoculation, des conidies de pycnides sporulantes sont prélevées depuis la souche mère en conservation et repiquées sur milieu solide OAC (Oat-Agar-Chloramphenicol). Les souches filles sont ensuite incubées en chambre de culture pendant 3 semaines (température de 22°C et photopériode de 12h). Après trois semaines, les souches filles ont produit des pycnides matures remplies de conidies. Ces conidies sont récoltées en les mettant en suspension dans de l'eau stérile avec du Tween 20 à 0.01%, en grattant la surface des milieux. La suspension de conidies est filtrée (filtres à 450µm) afin de supprimer les pycnides. Le calcul de la concentration de conidies se fait par cellule de Malassez, afin d'ajuster l'inoculum à 10⁵ conidies/mL. L'inoculation en chambre à

pulvérisation nécessite une quantité d'inoculum très conséquente, environ 3L sont produits à l'aide d'une trentaine de boîtes de souches filles pour 200 plants inoculés.

3.2.1.2.2.3. *Production des plants*

La production de plants pour l'inoculation se fait par bouturage à partir de pieds mères, cultivés en serre. Les tiges sont coupées trois à quatre nœuds sous l'apex, les feuilles sont retirées, et les boutures sont plantées dans un plateau à cellules contenant du terreau Peltracom (Greenyard Horticulture France SAS). Les boutures sont placées sous des mini-serres pendant trois semaines puis simplement dans la serre, avec une photopériode de 15 h et des températures variant pendant la journée (Tableau 3.2.1.2.2.3).

Tableau 3.2.1.2.2.3. : Variation du réglage de la température en serre selon les heures de la journée

Heures de la journée	Températures serre
6h-9h	18°C
9h-18h	22°C
18h-21h	20°C
21h-6h	16°C

Après cinq semaines, les jeunes plants sont repotés dans des pots de 10 x 10 cm et transférés dans une serre à température non régulée. Les plants âgés de 6 semaines seront utilisés pour l'inoculation.

3.2.1.2.2.4. *Inoculation en chambre à pulvérisation*

L'inoculation a été réalisée grâce à une chambre à pulvérisation (Euro-pulvé, Aspach, France), équipée de 5 buses de pulvérisation à jets plats permettant une pulvérisation homogène sur les plants (Figure 3.2.1.2.2.4(A)). La pulvérisation de l'inoculum dure 4 secondes à un débit de 1.8L/min sous pression de 3 bars, permettant d'atteindre le point de ruissellement. Chaque pulvérisation permet d'inoculer dix plants à la fois (Figure 3.2.1.2.2.4(B)). Les plants témoins sont inoculés au préalable avec une solution d'eau stérile contenant de Tween 20 à 0.01%. A chaque inoculation, 16 plants par génotype sont inoculés et 4 plants subissent le traitement témoin. Après un séchage à l'air, les plants sont transportés en chambre de culture. Après chaque inoculation, la chambre à pulvérisation est nettoyée à l'éthanol à 70%.

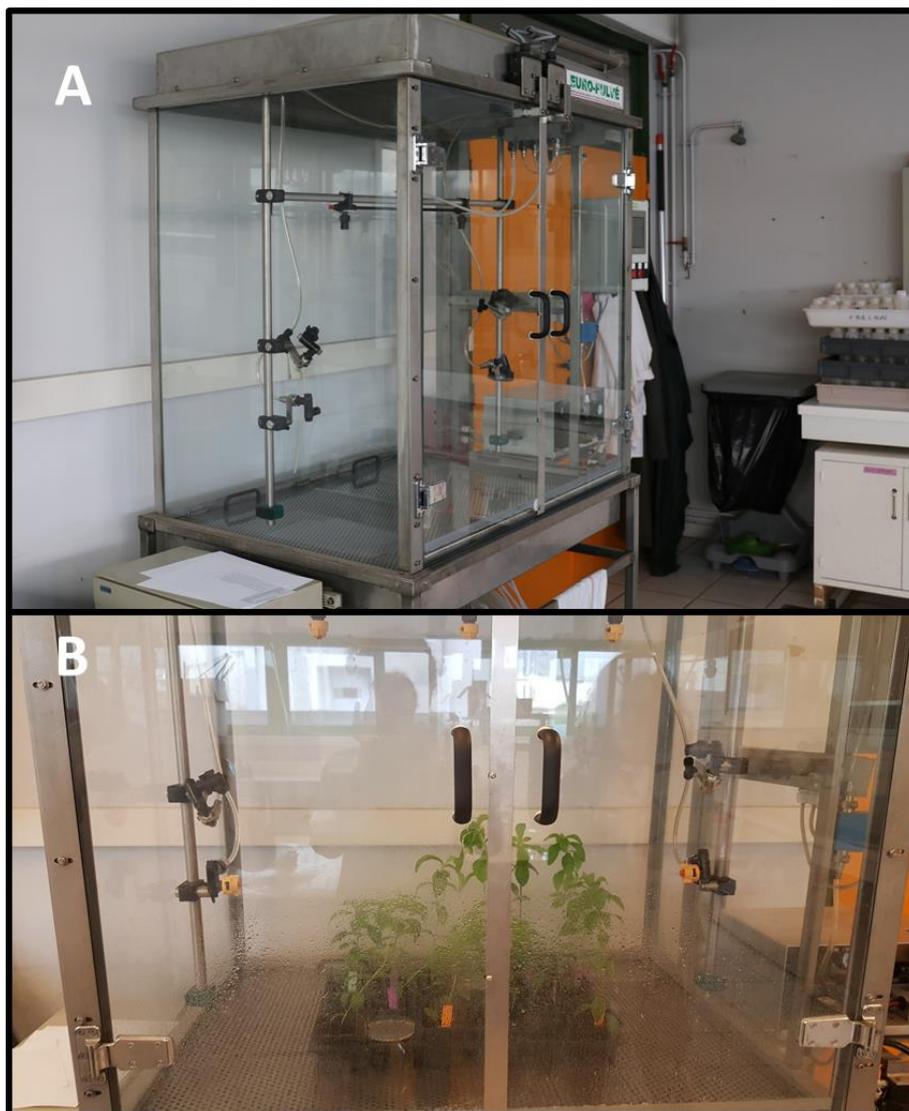


Figure 3.2.1.2.2.5 : (A) Chambre à pulvérisation Euro-pulvé équipée de buses à jet plats. (B) Inoculation sur 10 plants de stévia

3.2.1.2.2.5. Design expérimental en chambre de culture

Les plants sont placés dans une chambre de culture pendant 21 jours. Des lampes à sodium 400W sont programmées pour maintenir une photopériode de 16h. La température est contrôlée à 24°C entre 8h et 20h et 22°C le reste du temps. Les plants sont répartis de façon aléatoire dans 5 blocs, correspondant à des cages de plexiglass à fond plein. De l'eau stérile est pulvérisée sur les parois des cages avant de positionner les plants à l'intérieur. Un bloc est réservé aux plants témoins, positionnés immédiatement après leur inoculation à l'eau stérile. L'irrigation des plants se fait par sub-irrigation, tous les 5 jours environ.

3.2.1.2.2.6. *Evaluation de la réponse des génotypes testés*

Un suivi de l'évolution des symptômes est réalisé 12, 15, 18 et 21 jours après inoculation. Il se traduit par une évaluation visuelle du pourcentage de surface symptomatique, chlorose et nécrose foliaires, par rapport à la surface foliaire totale. Cette variable de notation est le score de symptômes.

Les quatre dates de notations visuelles permettent de calculer l'AUDPC (Area Under Disease Progressive Curve), d'après la formule utilisée par Das *et al.*, (1992) :

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

Avec n = nombre de notations effectuées ; t_i = date au moment de la $i^{\text{ème}}$ mesure ; x_i = mesure de la sévérité de la $i^{\text{ème}}$ mesure.

Après 21 jours, chaque plant est effeuillé et les feuilles sont scannées sur un scanner Epson Expression 1640 XL, en couleur à 300 dpi. Chaque image est ensuite analysée sur le logiciel ImageJ (version 1.51). La surface foliaire totale est mesurée en transformant les images en noir et blanc et en détectant les feuilles présentes sur l'image. La surface symptomatique est mesurée en appliquant un filtre aux images en couleur ; la teinte est comprise entre 0 et 47 ; la saturation est comprise entre 37 et 255 ; la brillance entre 0 et 204. Ces réglages permettent de sélectionner les zones nécrotiques et chlorotiques. La proportion de surface foliaire atteinte (PLSA) correspond au pourcentage de la surface foliaire atteinte sur la surface totale.

3.2.1.2.2.7. *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R version 3.6.3. (R Core Team 2018). Un nettoyage du jeu de données complet a été réalisé en identifiant et en supprimant les points atypiques grâce à un test de Bonferroni sur les résidus du modèle linéaire, en utilisant le package « car » (Fox and Weisberg, 2011). Les analyses de variance de type II ont été réalisées par la fonction Anova du package « car » (Fox and Weisberg, 2011) sur les modèles linéaires mixtes, construits avec la fonction lmer du package lme4 (Bates *et al.*, 2014).

Un premier modèle linéaire a été construit afin de tester la reproductibilité des résultats obtenus sur les génotypes de référence entre toutes les inoculations :

$$(1) X_{ijk} = \mu + \alpha_i \times \beta_j + \gamma_k + \varepsilon$$

Avec X = variable testée; μ = valeur phénotypique moyenne; α_i = effet fixe du génotype i ; β_j = effet fixe de l'inoculation j ; γ_k = effet aléatoire du bloc k ; ε = effet résiduel.

Un deuxième modèle a été construit afin d'analyser l'effet des différents facteurs sur le score de symptômes :

$$(2) X_{ijk} = \mu + \alpha_i \times \beta_j + \gamma_k \times \delta_l + \varepsilon$$

Avec X = variable testée; μ = valeur phénotypique moyenne; α_i = effet fixe du génotype i ; β_j = effet fixe de la date de notation j ; γ_k = effet aléatoire du bloc k ; δ_l = effet aléatoire de l'inoculation l ; ε = effet résiduel.

Les variables AUDPC et PLSA n'étant mesurées qu'à 21 JAI, le modèle appliqué pour les étudier est une version simplifiée du modèle (2), sans le facteur fixe de la date de notation.

Les modèles ont permis d'estimer les moyennes marginales et les erreurs standards leur étant associées grâce à la fonction `emmeans` du package « `emmeans` » (Russel, 2018). Pour la variable score de symptômes, une comparaison multiple a été réalisée entre les génotypes à chaque date de notation par le test HSD de Tuckey grâce à la fonction `clm` du package « `emmeans` ». Pour les variables AUDPC et PLSA une comparaison multiple a été réalisée entre les génotypes avec la même méthode.

Les pentes de régressions linéaires de l'évolution du score de symptômes en fonction du temps et pour chaque génotype ont été obtenues avec la fonction `lstm` du package « `emmeans` ». La comparaison multiple de l'évolution des symptômes pendant les 21 jours de test est réalisée par la fonction `clm` sur les pentes de régressions linéaires.

La corrélation entre les deux variables numériques score de symptômes à 21 JAI et PLSA a été calculée grâce à la fonction `cor.test` du package « `stats` » (R Core Team, 2015).

Les représentations graphiques ont été réalisées avec l'utilisation des packages « `ggplot2` » et « `cowplot` » (Wickham *et al.*, 2016).

3.2.1.3. Résultats

3.2.1.3.1. Vérification de la reproductibilité du test d'inoculation grâce aux génotypes référents

Afin d'analyser l'ensemble des observations des séries d'inoculations réalisées entre 2017 et 2019, un test préliminaire sur les génotypes de référence a été effectué. Ce test a pour objectif de vérifier la reproductibilité de l'inoculation entre les années, c'est-à-dire d'identifier un éventuel effet du facteur inoculation sur le score de symptômes. Une analyse de variance réalisée sur le modèle (1) a mis en évidence un effet significatif du génotype sur le score de symptômes (Tableau 3). Ce résultat n'est pas surprenant puisque les deux génotypes référents ont des phénotypes extrêmes : l'un très sensible et l'autre très peu sensible. L'analyse de variance ne démontre pas d'effet significatif de l'inoculation sur le résultat (Tableau 3), ce qui signifie que le test est bien reproductible.

Tableau 3.2.1.3.1. : Table d'ANOVA de type II sur des modèles linéaires mixtes sur le score de symptômes (t=21 JAI)

Facteurs	Scores de symptômes	
	Probabilité	Significativité
Génotype	2.2 E-16	p < 0.001
Inoculation	0.1148	NS
Génotype : Inoculation	0.6397	NS

3.2.1.3.2. Evolution du score de symptômes sur 21 jours après inoculation

L'évaluation de la réponse à une infection de septoriose des 18 génotypes de cette étude, a été réalisée par le suivi de l'évolution des symptômes pendant les premiers jours d'une infection. Pour cela des notations visuelles des symptômes de chacun des plants notés ont été réalisées à 12, 15, 18 et 21 Jours Après l'Inoculation (JAI).

Lors des différentes inoculations effectuées, les plants témoins n'ont jamais présenté de symptômes caractéristiques d'une infection à la septoriose. Cette observation permet de valider le rôle de l'agent fongique inoculé dans l'apparition des nécroses et chloroses foliaires. De plus, dès 12 JAI, tous les génotypes présentent un score de symptômes non nul. Cette première observation confirme qu'il n'y a pas de résistance totale parmi la collection de l'INRAE, Villenave d'Ornon (Figure 3.2.1.3.2.). On observe cependant une grande variabilité dans la réponse à la septoriose chez les génotypes testés. A 12 JAI, Cult104_SPA, Cult102_SPA et

Cult76_GER présentent les plus faibles scores de symptômes autour de 5% alors que Cult33_FRA et Cult63_GER présentent les plus forts taux de symptômes autour de 10% (Figure 4). A 21 JAI, les géotypes les moins symptomatiques sont Cult104_SPA, Cult76_GER, Cult31_FRA et Cult102_SPA avec un score de symptômes atteignant 10 à 15%. Les géotypes les plus touchés sont Cult75_GER et Cult 33_FRA avec environ 35% de scores de symptômes. Une analyse de variance réalisée sur les scores de symptômes confirme un effet géotype significatif (Tableau 3.2.1.3.2.a). La variabilité observée entre les scores de symptômes aux quatre dates de notation est confortée par l'analyse de variance démontrant un effet significatif de la date de notation sur le score de symptômes (Tableau 3.2.1.3.2.a).

Tableau 3.2.1.3.2.a : Table d'ANOVA de type II sur des modèles linéaires mixtes sur les variables de la sévérité de maladie (Scores de proportion de symptômes, Area Under Disease Progress Curve, Proportion de Surface Atteinte) en conditions contrôlées.

Facteurs	Scores de symptômes		AUDPC		PLSA	
	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité	Probabilité	Significativité
Géotype	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001
Jours après inoculation	2.2 E-16	p < 0.001	–	–	–	–
Géotype : Jours après inoculation	2.2 E-16	p < 0.001	–	–	–	–

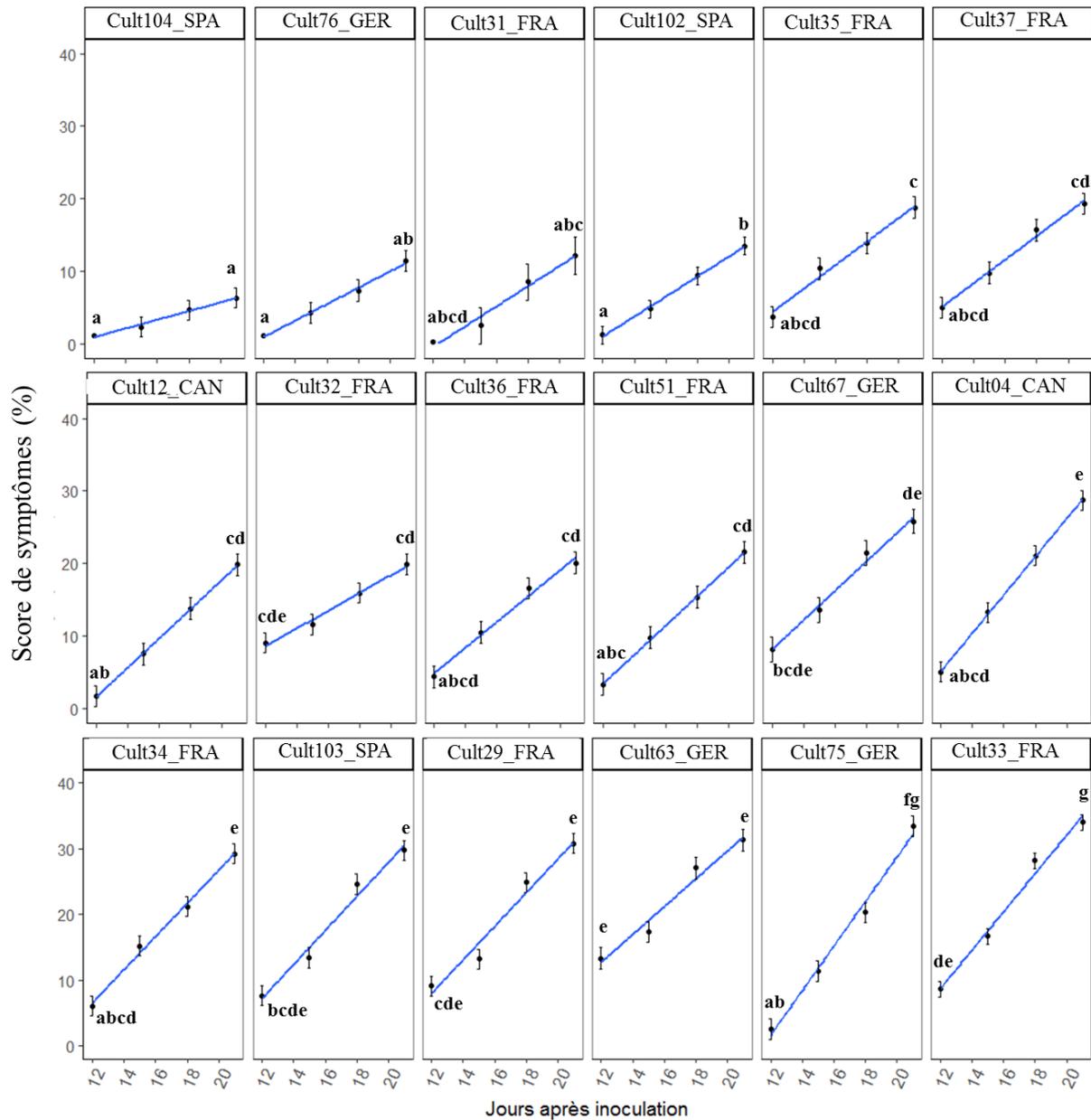


Figure 3.2.1.3.2.: Evolution de la maladie de Septoriose entre 12 et 21 jours après inoculation sur 18 génotypes de *Stevia rebaudiana* inoculés en conditions contrôlées. Des évaluations visuelles de la proportion symptomatique du plant ont été réalisées. Les résultats montrent le Least Square Means de 16 plants, répétés 3 fois, avec l'erreur standard, selon les jours après inoculation. Les lignes bleues sont les régressions du modèle linéaire mixte. Les lettres indiquent le résultat d'une comparaison multiple par test HSD de Tuckey à 12 JAI puis à 21 JAI. Les scores de symptômes avec la même lettre ne sont pas significativement différents à P=0.05.

La progression du score de symptômes sur 21 jours peut être modélisée par une régression linéaire (ligne représentée en bleu sur la Figure 3.2.1.3.2.). Cette évolution de symptômes est plus ou moins rapide selon les génotypes et se traduit par une variabilité du coefficient de pente de régression (Tableau 3.2.1.3.2.b). Une comparaison multiple sur les coefficients de pente permet de classer les génotypes. Les génotypes Cult104_SPA, Cult31_FRA, Cult76_GER, Cult32_FRA et Cult102_SPA présentent la plus faible pente, c'est-à-dire que ce sont les génotypes dont les symptômes évoluent le moins entre 12 JAI et 21 JAI. Au contraire les génotypes Cult33_FRA et Cult75_GER, dont le coefficient de pente est très fort, ont une très forte évolution de symptômes entre 12 JAI et 21 JAI.

Tableau 3.2.1.3.2.b : Coefficients de pentes de régression linéaire du score de symptômes selon la date de notation pour les 18 génotypes de *Stevia rebaudiana* testés. Les lettres indiquent le résultat d'une comparaison multiple par test HSD de Tuckey, les coefficients de pentes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents à P=0.05. Les génotypes sur fond gris sont ceux testés lors de la deuxième série d'inoculation.

Génotypes	Pente de la régression	
Cult104_SPA	0.55 ± 0.20	a
Cult31_FRA	0.81 ± 0.4	ab
Cult76_GER	1.13 ± 0.24	ab
Cult32_FRA	1.15 ± 0.21	ab
Cult102_SPA	1.30 ± 0.18	ab
Cult35_FRA	1.63 ± 0.24	bc
Cult37_FRA	1.63 ± 0.24	bc
Cult36_FRA	1.78 ± 0.24	bc
Cult63_GER	1.85 ± 0.25	bc
Cult51_FRA	2.02 ± 0.24	bcd
Cult12_CAN	2.03 ± 0.24	bcd
Cult67_GER	2.12 ± 0.27	bcd
Cult29_FRA	2.38 ± 0.23	cde
Cult103_SPA	2.48 ± 0.24	cde
Cult04_CAN	2.48 ± 0.20	cde
Cult34_FRA	2.53 ± 0.24	cde
Cult33_FRA	2.84 ± 0.18	de
Cult75_GER	3.47 ± 0.24	e

3.2.1.3.3. *Area Under Disease Progress Curve (AUDPC)*

La variable AUDPC permet de traduire la variabilité de l'évolution des symptômes, en prenant en compte leur sévérité. La variabilité est très importante sur ce trait (Figure 5).

Les génotypes avec de faibles scores d'AUDPC, entre 35 et 75, sont Cult104_SPA, Cult76_GER, Cult31_FRA et Cult102_SPA. Les génotypes avec de forts scores d'AUDPC, entre 180 et 200, sont Cult33_FRA et Cult63_GER (Figure 3.2.1.3.3.). L'analyse de variances sur ce trait confirme, une fois encore, un effet significatif du facteur génotype (Table 3.2.1.3.2.a). Une comparaison multiple a été réalisée sur les scores d'AUDPC. Le classement des génotypes qui en résulte est différent de celui obtenu par comparaisons multiples des pentes de régressions linéaires. Ce résultat peut surprendre à premier abord, mais il est plutôt cohérent car ces deux variables ne mesurent pas la même chose. En effet, l'AUDPC prend en compte le score de symptômes, on a donc une évolution des symptômes qui est pondérée par le score à chaque date. De son côté, le coefficient de pente de régression linéaire exprime uniquement la différence entre les symptômes à 12 JAI et 21 JAI quel que soit le niveau de ces symptômes à ces dates. Par exemple le génotype Cult32_FRA a un coefficient de pente très faible car l'évolution du score de symptômes est très faible pendant les 21 jours d'observation. Cependant son AUDPC est plus élevée car le score de symptômes est plutôt important dès 12 JAI.

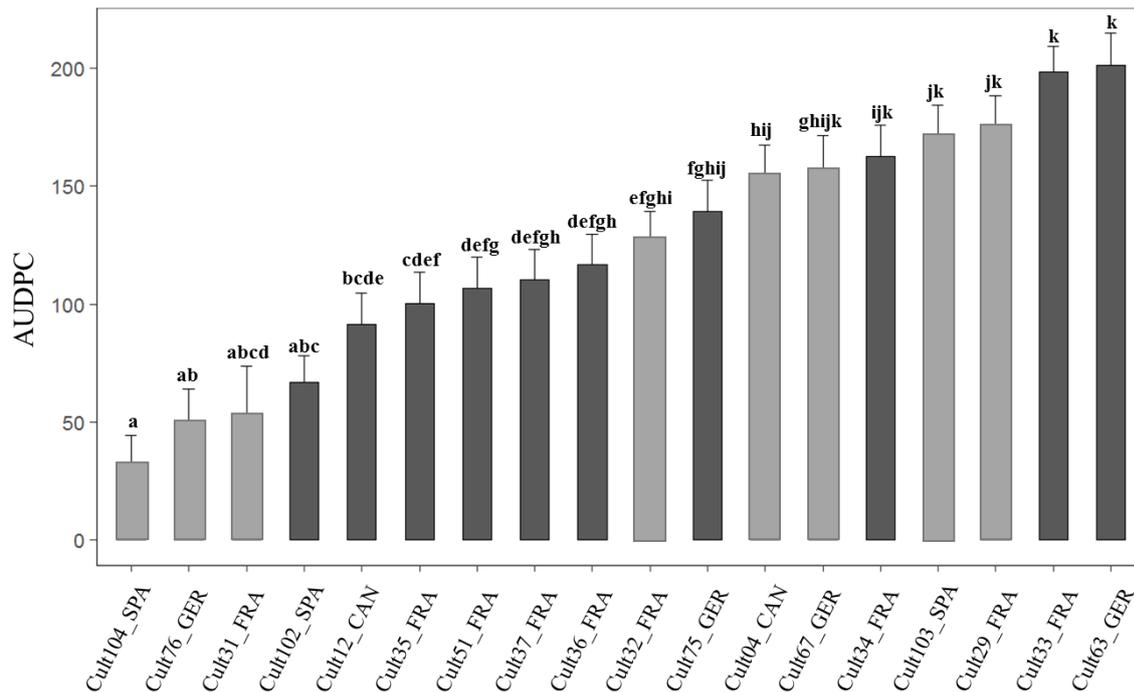


Figure 3.2.1.3.3. : Score d’AUDPC pour les 18 génotypes de *Stevia rebaudiana* inoculés par *Septoria* sp. Les résultats montrent le Least Square Means de 16 plants, répétés 3 fois, avec l’erreur standard. Les génotypes en gris sont ceux testés lors de la deuxième série d’inoculations. Les lettres indiquent le résultat d’une comparaison multiple par test HSD de Tuckey, les scores de symptômes avec la même lettre ne sont pas significativement différents à P=0.05.

3.2.1.3.4. Score de maladie à 21 JAI avec analyses sur ImageJ

La variable pourcentage de surface foliaire atteinte (PLSA) exprimée en pourcentage a été développée afin de s’affranchir du score de symptômes basé sur une évaluation visuelle, et donc évaluateur-dépendante. L’utilisation de cette variable, qui est une notation basée sur une évaluation d’image, permet une validation des résultats précédemment obtenus par évaluations visuelles, score de symptômes et AUDPC.

Comme présenté dans la figure 3.2.1.3.4., les génotypes les moins symptomatiques, Cult104_SPA, Cult76_GER et Cult102_SPA présentent des taux de symptômes inférieurs à 5%. Les génotypes les plus symptomatiques, Cult103_SPA, Cult33_FRA et Cult29_FRA présentent des taux de symptômes proches des 15%. L’analyse de variance effectuée sur cette variable valide ces observations et indique un effet significatif du génotype (Tableau 3.2.1.3.1.a). La comparaison multiple entre les différents génotypes sur ce trait permet de distinguer trois grands groupes : (1) en vert, les génotypes considérés comme peu sensibles

avec un PLSA à 5% maximum, Cult104_SPA, Cult76_GER, Cult102_SPA, Cult31_FRA et Cult32_FRA, (2) en jaune, les génotypes considérés comme moyennement sensibles avec un PLSA autour de 7%, Cult12_CAN, Cult51_FRA, Cult37_FRA, Cult35_FRA, Cult36_FRA, Cult63_GER, (3) enfin en bleu, un groupe de génotypes pouvant être considéré comme très sensibles, dont le PLSA est compris entre 10 et 15%, Cult34_FRA, Cult67_GER, Cult75_GER, Cult04_CAN, Cult103_SPA, Cult33_FRA et Cult29_FRA. Cette répartition est identique à celle que l'on obtient avec les scores de symptômes obtenus par notations visuelles. Enfin, ce résultat est appuyé par la forte corrélation positive calculée entre ces deux variables, score de symptômes et PLSA, qui est de 0.91 ± 0.05 .

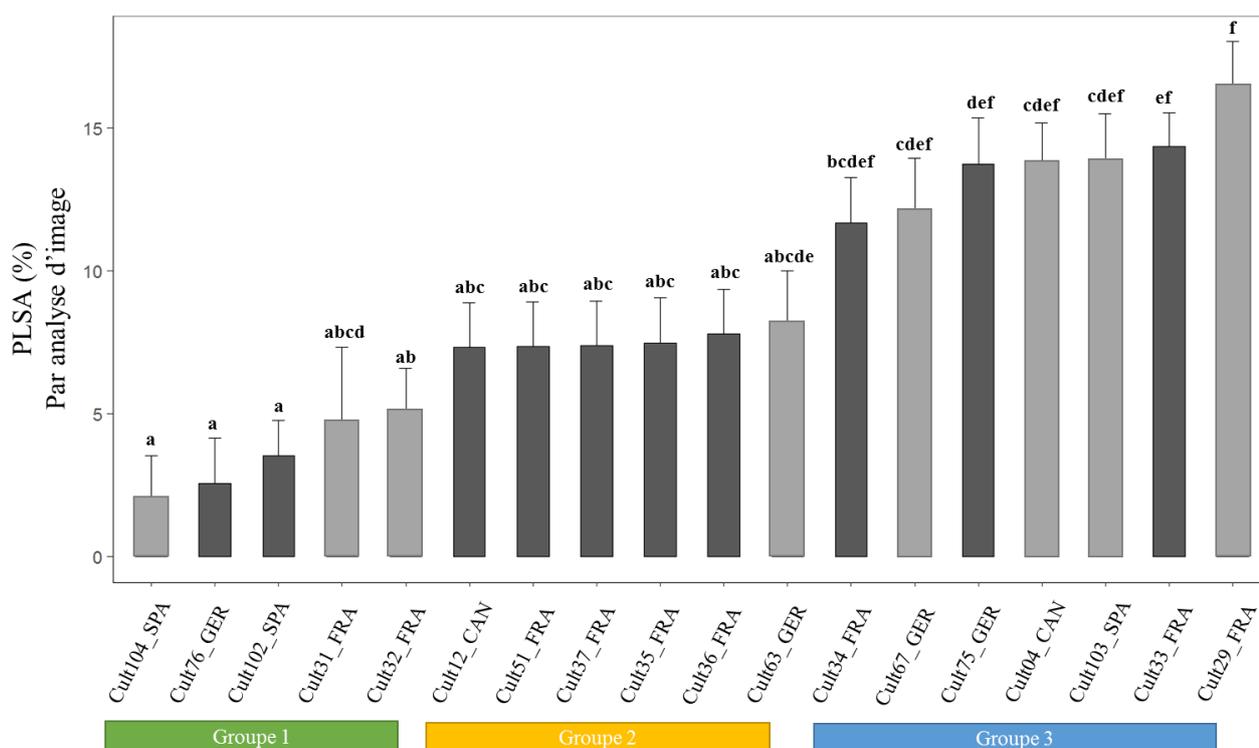


Figure 3.2.1.3.4. : Pourcentage de surface foliaire atteinte (PLSA) pour les 18 génotypes de *Stevia rebaudiana* inoculés par *Septoria* sp. Les résultats montrent le Least Square Means de 16 plants, répétés 3 fois, avec l'erreur standard. Les génotypes représentés en gris ont été testés lors de la deuxième série d'inoculation. Les lettres indiquent le résultat d'une comparaison multiple par test HSD de Tuckey à 21 JAI, les scores de symptômes avec la même lettre ne sont pas significativement différents à $P=0.05$.

3.2.1.4. *Discussion et perspectives*

En premier lieu, cette étude valide la reproductibilité de ce test de phénotypage par inoculation sur plants entiers. Les résultats obtenus sur les deux génotypes référents, Cult33_FRA un génotype très sensible et Cult102_SPA un génotype peu sensible, et inoculés à chaque test, indiquent que le niveau de symptômes pour ces deux génotypes n'est pas significativement différent quel que soit l'événement d'inoculation. Les 8 nouveaux génotypes testés lors des inoculations en 2018-2019 ont donc pu être analysés avec les génotypes testés en 2017. Cette comparaison a également permis de positionner les réponses des nouveaux génotypes au sein de la diversité déjà évaluée sur ce trait.

Lors des résultats de 2017, le score de symptômes (par évaluations visuelles) minimal à 21 JAI est obtenu par Cult76_GER et Cult102_SPA avec moins de 5% de symptômes et le score maximal par Cult33_FRA et Cult75_GER autour de 35% (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Dans cette étude, les résultats sur la variable de score de symptômes, mettent en évidence des génotypes avec des réponses à l'infection plus extrêmes que celles préalablement identifiées. Cult104_SPA présente un score de symptômes plus faible que tous les génotypes testés en 2017 et Cult31_FRA un score équivalent à ceux de Cult76_GER et Cult102_SPA. Concernant les scores très élevés, aucun génotype nouvellement testé ne dépasse les extrêmes du premier test, cependant il permet de rajouter trois génotypes dans la catégorie des « très sensibles » : Cult63_GER, Cult29_FRA et Cult103_SPA, avec des score de symptômes supérieurs à 30%. Ce résultat est particulièrement prometteur puisqu'il permet d'augmenter et d'affiner la gamme de variabilité phénotypique sur ce trait.

La modélisation par régression linéaire de l'évolution des symptômes et le calcul du coefficient directeur de la pente de régression donnent l'accès à un nouvel indicateur de variation de la réponse à une infection de septoriose. L'utilisation de cet indicateur pour comparer les génotypes doit cependant être nuancée. Il permet uniquement de classer les génotypes selon la rapidité d'évolution des symptômes : un faible coefficient directeur témoigne d'un score de symptômes augmentant peu et un fort coefficient directeur se traduit biologiquement par une évolution rapide des symptômes. Cependant, un coefficient directeur faible ne traduit pas forcément une réponse à la septoriose intéressante pour la production : un plant aura peut-être déjà développé des symptômes importants avant la première notation et évoluant peu par la suite. C'est le cas par exemple de Cult32_FRA dont la pente de régression de 1.15 est proche de celles des génotypes très peu sensibles comme Cult76_GER à 1.13 (Tableau 3.2.1.3.2.b), pourtant Cult76_GER obtient un score de symptômes de 10% à 21 JAI alors que Cult32_FRA

est noté à presque 10% de score de symptômes dès 12 JAI mais son niveau de symptômes augmente peu jusqu'à 21 JAI (Figure 3.2.1.3.2.).

L'étude de l'AUDPC permet de discriminer les génotypes selon l'évolution des symptômes dans le temps et le niveau de ces symptômes. Pour cette variable également, les nouveaux génotypes présentent des phénotypes extrêmes par rapport à ceux déjà évalués, avec Cult63_GER qui est supérieur à Cult33_FRA, ayant l'AUDPC maximale lors du premier test, et Cult104_SPA dont l'AUDPC est inférieure à Cult76_GER, minimum du premier test. Cet indicateur peut être utilisé pour la sélection sur le trait « sensibilité à la septoriose » en plus du score de symptômes car il apporte des informations supplémentaires. Par exemple en conditions de production au champ, une faible évolution de la maladie lors des premières semaines de l'infection laisse plus de temps pour observer les symptômes et réaliser un traitement préventif avant une plus grande propagation du champignon sur les plants encore sains. Les génotypes Cult104_SPA et Cult31_FRA apparaissent alors comme très intéressants pour la sélection, car leur niveau de symptômes est très faibles et la pente de la régression linéaire également, témoignant d'une faible évolution de symptômes.

Les génotypes phénotypés dans cette étude ont été caractérisés au sein de la diversité génétique de stévia dans l'étude de Cosson *et al.*, (2019), et sont distribués dans trois clusters génétiques. Pour autant, il ne semble pas que ces clusters expliquent la variabilité phénotypique de réponse à une infection de septoriose. En effet, le cluster 2 rassemble Cult63_GER et Cult75_GER, des génotypes présentant le plus de symptômes et Cult35_FRA qui est un des génotypes les moins symptomatiques ainsi que Cult51_FRA pouvant être classés dans les réponses intermédiaires face à une infection. De même, le cluster 3 regroupe des génotypes aux phénotypes opposés sur ce trait, avec Cult33_FRA, le génotype présentant le plus de symptômes à 21 JAI et Cult102_SPA un des génotypes les moins symptomatiques. Seul le cluster 1 semble avoir des génotypes au phénotype proche, avec Cult76_GER et Cult12_CAN, dont les réponses vont de peu sensibles à moyennement sensibles.

La notation de PLSA permet la description la plus précise des symptômes car elle est issue d'une analyse d'image à 21 JAI. Dans le cas de cette étude, les résultats du score de symptômes donnés par évaluation visuelle sont plus élevés que ceux obtenus par analyse d'image avec PLSA. Il y a donc un biais lié à l'évaluateur qui surestime la surface symptomatique des plants. Dans l'étude présentée ici, toutes les notations visuelles des symptômes ont été réalisées par le même opérateur (Zoé Le Bihan), ce qui limite les biais liés à l'opérateur entre les inoculations. Cependant, le classement des génotypes est similaire quelle que soit la variable utilisée. Les

deux variables sont positivement corrélées, la mesure de PLSA permet donc de confirmer les résultats obtenus par évaluation visuelle avec la variable de score de symptômes.

Les deux variables étant très corrélées, il est intéressant de se demander si l'on ne peut pas utiliser une seule des deux variables pour évaluer la réponse des individus. La réponse dépend de l'objectif du test et n'est certainement pas unique. PLSA permet un screening très précis, et l'obtention d'une valeur objective de la surface symptomatique. Cependant, cette donnée est relativement longue à mesurer et ce niveau de précision n'est pas toujours nécessaire. Dans le cadre d'un programme d'amélioration, l'évaluation du trait « sensibilité à la septoriose » sur une population aura pour objectif de comparer les scores des descendants entre eux. Dans ce cas, une évaluation visuelle pourra suffire dans un premier temps à sélectionner les plants peu symptomatiques. Dans un second temps, l'analyse d'image sera pertinente et permettra une notation plus précise sur des individus au phénotype proche. Cette approche a déjà été largement développée pour réaliser des analyses des inoculations de septoriose sur blé, montrant comme dans notre étude une bonne fiabilité entre notations visuelles et analyses d'images (Karisto *et al.*, 2017).

Dans le test réalisé ici, seul un isolat de *Septoria* sp. a été testé, permettant dans un premier temps de s'affranchir des interactions entre isolats. Cependant, ce design expérimental ne témoigne pas des conditions de culture où plusieurs isolats se développent sur une même parcelle et ses bords de champ. Une grande variabilité d'isolats est décrite sur la septoriose du blé, dont certains ont été isolés sur des adventices (Stukenbrock *et al.*, 2012). Il pourrait donc être intéressant de poursuivre l'essai en testant d'autres isolats, ou un mélange d'isolats sur les mêmes génotypes. Dans l'article de Hastoy, Le Bihan, *et al.*, (2019) décrivant la première mise en œuvre de ce test d'inoculation, les auteurs ont également caractérisé génétiquement cinq souches de septoriose, cette collection de champignon pourrait être utilisée à l'avenir.

Enfin, le phénotype de huit nouveaux génotypes sur le trait de sensibilité à la septoriose permet d'identifier ceux dont le niveau de symptômes est très faible. Dans le cadre d'une production en Agriculture Biologique de stévia, le choix de génotypes peu sensible est nécessaire car les traitements autorisés en AB sont uniquement préventif et ont souvent une efficacité plus faible que les produits anti-fongiques autorisés en agriculture conventionnelle. C'est pourquoi les génotypes Cult104_SPA, Cult76_GER, Cult31_FRA, Cult102_SPA, Cult35_FRA et Cult37_FRA semblent adaptés à ce mode de production.

Les réponses des plantes aux attaques fongiques peuvent être considérées à deux niveaux. Le premier correspond aux moyens de lutte passifs, constitutifs de la structure des végétaux, par

exemple la présence de la paroi au niveau des cellules végétales, barrière physique au développement des agents pathogènes (Cantu *et al.*, 2008). Le deuxième moyen de lutte est décrit comme une réponse active, c'est-à-dire une modification du métabolisme cellulaire, rapidement observable lors des stades précoces de l'infection par un agent fongique (Shen *et al.*, 2017). La variabilité de réponse observée à une infection de septoriose entre les génotypes de stévia étudiés relève très probablement de ces deux niveaux de réponse.

La variabilité liée aux moyens de lutte passifs peut être liée à une variabilité morphologique entre les génotypes étudiés à l'échelle des cellules végétales, de la feuille, du plant, mais aussi de la parcelle. Plusieurs traits peuvent alors être considérés comme le nombre de tiges, la surface foliaire, la densité des branches secondaires mais aussi l'étalement du plant. A l'échelle cellulaire, la paroi permet une première barrière aux champignons, mais c'est également une source de nutriments pour l'agent pathogène. Des études sur les protéines de dégradation des parois cellulaires, impliquées dans les mécanismes de réarrangements des polysaccharides de la paroi cellulaire, ont démontré qu'elles avaient un rôle indirect dans la sensibilité aux agents pathogènes (Cantu *et al.*, 2008; Bellincampi *et al.*, 2014). La variabilité des types de feuilles peut également expliquer la variabilité des symptômes observés. En effet, la septoriose entre dans les feuilles par les stomates. Des plants avec une faible densité de stomates, auraient un moindre développement de l'agent fongique. De même, la présence de trichomes sur les feuilles facilite l'adhésion du champignon à la surface de la feuille et favorise leur croissance (Łażniewska *et al.*, 2012). Ils peuvent également maintenir des microgouttes d'eau sur les feuilles et être des sites d'infection privilégiés (Kim, 2019).

Chez la stévia l'étude des mécanismes de réponse à une infection de septoriose pourraient se faire *via* une optimisation de la méthode de phénotypage. Le développement d'une analyse d'images plus précise que celle actuellement réalisée est envisageable sur le logiciel ImageJ. En effet, une équipe analysant une collection de cultivars de blé naturellement infectée par des isolats de septoriose, a mis au point des analyses d'images fiables permettant de comptabiliser le nombre de pycnides développées sur les échantillons, et d'en extraire la moyenne de pycnides se développant par cm² de surface foliaire, de mesurer la taille moyenne des pycnides ainsi que le nombre de pycnides par lésion (Stewart *et al.*, 2016). Ces chercheurs suggèrent que ces analyses vont permettre de caractériser plus finement la sensibilité des cultivars testés, par exemple en utilisant la densité de pycnides pour caractériser le potentiel épidémique du champignon sur un génotype particulier (Stewart *et al.*, 2016). Dans le cadre de la stévia, une caractérisation plus fine des phénotypes n'est pas nécessaire aux besoins de la sélection. En

revanche, ce type de méthodologie pourrait également être développé lors d'inoculation en conditions contrôlées et permettrait de caractériser la variabilité au sein d'une collection d'isolats de septoriose. Elle pourrait également permettre de décomposer la réponse de la stévia et d'étudier les interactions entre les génotypes et les souches de champignons.

Dans notre étude, nous avons testé des boutures de chaque génotype ne possédant qu'une tige et étant toutes testées dans des conditions de températures et d'hygrométries identiques. Cependant, en conditions de production, l'architecture des plants de stévia va jouer un rôle dans la propagation du pathogène. A l'échelle du plant, une étude investigant les effets de l'architecture des plants sur des épidémies fongiques se dispersant par voie aérienne a montré que des architectures plus denses créaient des microclimats, ces conditions favorables stimuleraient le développement des champignons (Tivoli *et al.*, 2013). La « porosité » de la canopée définit la capacité de l'air à la traverser et à sécher la surface foliaire (Fuller *et al.*, 1984). Cette porosité peut être caractérisée par différents traits comme la densité de branches, ou la rectitude des plants est définie par (Campbell and Norman, 1990). L'utilisation du concept de porosité de la canopée, ou encore de flux de spores à travers la canopée, peut être intégré aux modélisations de développement d'épidémies pendant la saison de culture, comme cela a été réalisé sur la rouille du soja (Andrade *et al.*, 2009). Une canopée poreuse, permettant une bonne circulation de l'air et donc évitant l'eau stagnant sur les feuilles, éviterait le développement du champignon. Cependant, une canopée « non-poreuse » aurait un effet barrière, en particulier grâce à un grand nombre de tiges, qui limite la dispersion verticale et horizontale des spores (Tivoli *et al.*, 2013).

L'échelle du plant n'est pas suffisante pour expliquer le développement d'une épidémie. La densité sur la parcelle peut également jouer un rôle, par exemple, les vignobles à fortes densités favorisent le développement de *Botrytis cinerea* (Valdés-Gómez *et al.*, 2008). De plus, les méthodes culturales mises en œuvre sur la parcelle peuvent également impacter le risque fongique pour les plants. Actuellement, les plants de stévia sont la plupart du temps irrigués par aspersion, une méthode qui favorise la propagation des spores de *Septoria* sp. par éclaboussures d'eau d'irrigation (Ficke *et al.*, 2017). Le choix des cultures dans la rotation culturale d'une parcelle joue également un rôle dans la limitation du pathogène.

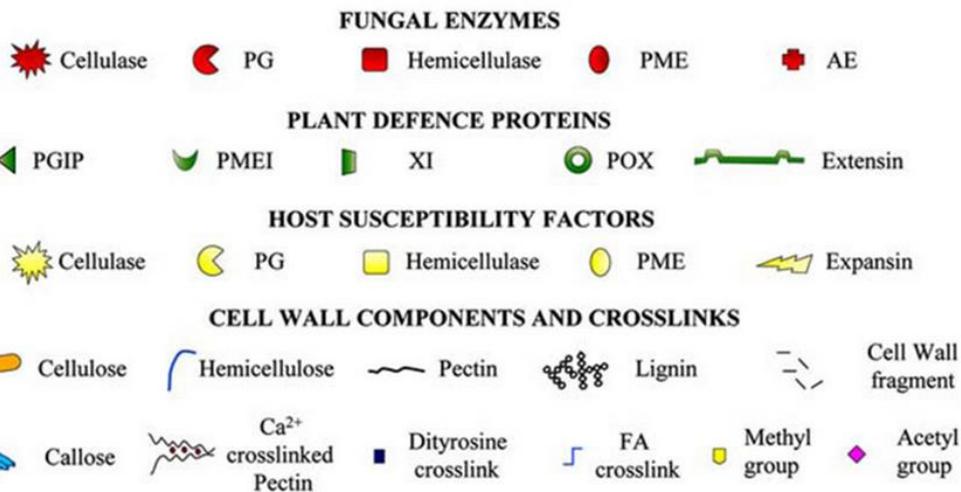
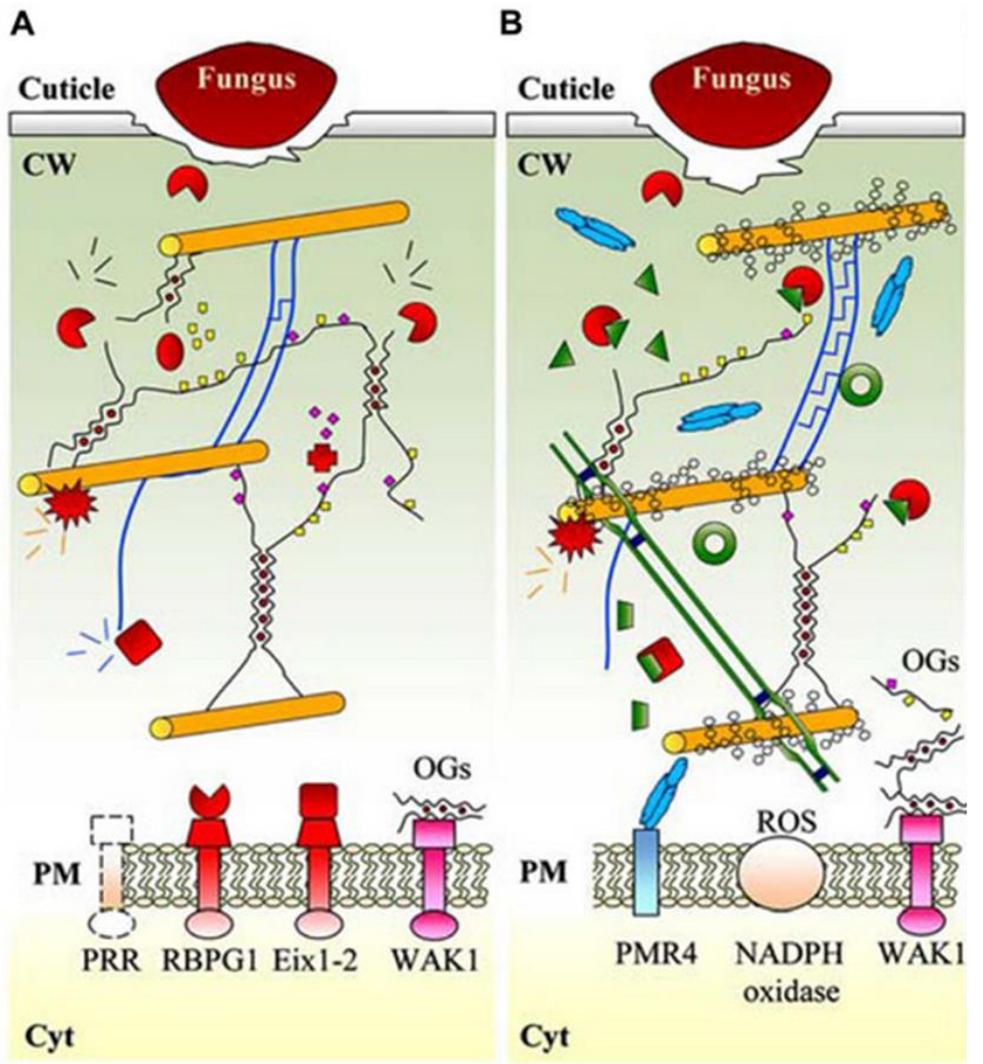


Figure 3.2.1.4 : Dynamiques de la paroi pendant l'infection d'un agent fongique (d'après Bellincampi *et al.*, 2014). (A) L'agent fongique sécrète des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire. (B) La première réaction de défense de la plante se caractérise par la production d'inhibiteurs des enzymes fongiques pour limiter la dégradation.

La réponse active d'une plante à une infection d'un agent fongique est liée à sa capacité à reconnaître rapidement une infection et à activer des réponses de défense. Lors de l'infection, l'agent pathogène va sécréter une grande variété d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, comme présenté dans la Figure 2.1.4.A, par exemple des hémicellulases, des polygalacturonases (PG), mais aussi des pectin méthylesterases (PME) qui rendent les nutriments disponibles pour le pathogène (Bellincampi *et al.*, 2014). En réponse à cette dégradation, la plante va produire des inhibiteurs des enzymes de dégradation du pathogène, présenté Figure 2.1.4.B, comme les protéines d'inhibition des polygalacturonases (PGIP), créant une accumulation de « elicitor activ pectin fragments » (OG) perçue par les récepteurs wall associated kinase (WAK1) de la plante. De plus, la perception des dommages de la paroi active des voies de signalisations spécifiques de réponses de défense, certaines visant à renforcer les parois cellulaires avec le dépôt de lignine et callose. D'autres visent à arrêter les protéines fongiques, par exemple la synthèse des protéines PR (Patogenesis-related) (Ali *et al.*, 2018), mais aussi l'induction des peroxydases. Enfin, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) vont provoquer un stress oxydatif chez les agents fongiques (Lehmann *et al.*, 2015), et des morts cellulaires localisées. Une variabilité peut être observée sur ces mécanismes entraînant une variabilité de symptômes. Par exemple, la surexpression des PGIP améliore la résistance aux champignons nécrotrophes (Ferrari *et al.*, 2012), l'accumulation des OG est détectée par les récepteurs de type WAK1 et active les réponses immunitaires de la plante (Ferrari *et al.*, 2013).

La présence de gènes de résistance plus ou moins spécifiques chez les plantes, offre également un renforcement des mécanismes de défense pendant les différentes étapes de l'infection. Lors de la pénétration dans la feuille par le champignon *via* le développement des appressoria fongiques, certaines plantes développent une résistance dite préhaustorias par la formation de « papille » limitant la pénétration dans les stomates (Niks and Rubiales, 2002). Ces résistances se retrouvent dans de nombreux pathosystèmes. C'est le cas par exemple entre la luzerne (*Medicago sativa*) et la rouille (*Uromyces striatus*) (Rubiales and Moral, 2004), ainsi qu'entre l'orge et le mildiou (*Blumeria graminis*) (Lyngkjær *et al.*, 2000). Elles peuvent être sélectionnées par sélection récurrente ou SAM (Niks and Rubiales, 2002). Si le pathogène arrive à pénétrer dans la plante et commence à développer des haustoria ou hyphes fongiques une réponse d'hypersensibilité, certaines de ces réponses sont la conséquence d'une interaction entre le produit d'un gène de résistance *R* et le produit d'un gène d'avirulence *Avr*. Des mécanismes de résistance génétique ont également été observés pendant les étapes de colonisation et de sporulation. Les résistances génétiques à la septoriose ont surtout été

développées sur le pathosystème blé-septoriose. Des études ont mis en évidence des mécanismes gène pour gène avec les gènes de type *Stb* permettant des résistances totales connus (Chartrain *et al.*, 2009; Tabib Ghaffary *et al.*, 2011; Tidd *et al.*, 2019). Chez la stévia, ce type de résistance n'a pas été étudié, mais au sein de notre étude tous les génotypes testés présentent des symptômes, suggérant l'absence de résistance totale au sein de cette collection. En revanche des résistances quantitatives ont été identifiées sur blé par détection de QTL sur des populations biparentales et par analyses GWAS (Brown *et al.*, 2015; Vagndorf *et al.*, 2017; Arraiano and Brown, 2017; Muqaddasi *et al.*, 2019). Cette stratégie semble plus prometteuse pour l'identification de résistance chez stévia.

Chez *S. rebaudiana*, les mécanismes de défense à une infection n'ont pas été étudiés. Ils doivent être communs à ceux d'autres cultures, comme décrits précédemment. Il est possible de s'interroger sur la spécificité de cette culture. En effet, le rôle des SG dans la plante n'étant pas clairement élucidé, ils pourraient intervenir dans des réactions de défense. Par exemple, une étude a montré que la forte concentration de certains composés phénoliques produits par le cassis était corrélée positivement ou négativement à ces scores de maladies foliaires. L'infection à la septoriose est par exemple négativement corrélée à la concentration des flavan-3-ols (Vagiri *et al.*, 2017). Dans l'étude présentée ici, le profil en SG ne semble pas être lié à la sensibilité à une infection à la septoriose. Il serait cependant intéressant d'étudier ce trait dans le cadre du phénotypage d'une descendance au trait de sensibilité à la septoriose, afin d'évaluer plus finement si ces traits sont corrélés.

Les résultats apportent de nouveaux éléments de description de la variabilité phénotypique de réponse à une infection de septoriose. Ils ouvrent également de nouveaux champs de questions. Le développement de ces axes de recherche et des connaissances sur la sensibilité des génotypes de stévia et la septoriose pourraient également permettre à terme de se doter des Outils d'Aide à la Décision (OAD), directement transférables à la filière de production de stévia. Les OAD sont des modèles de prédiction souvent basés sur les données météorologiques qui permettent d'ajuster les interventions en cours de campagne, et aident aux choix stratégiques (Perspectives Agricoles, 2016). En effet, ils intègrent les connaissances sur les conditions météorologiques favorables au développement de l'agent pathogène, les enregistrements des années précédentes, les valeurs de sensibilité des variétés utilisées mais aussi le stade phénologique atteint par la culture. Leur fiabilité repose particulièrement sur les données utilisées pour leur construction, mais aussi la fiabilité des données utilisées en temps réel, comme celles des capteurs météorologiques de chaque exploitation agricole par exemple (Kim *et al.*, 2018). Pour la

septoriose du blé, le modèle Septo-LIS ® développé par Arvalis est utilisé en France et d'autres modèles de prédiction de l'épidémie sont déjà développés depuis de nombreuses années (Pietravalle *et al.*, 2003; Wakie *et al.*, 2016) permettant une gestion de la protection sanitaire à l'échelle d'un territoire. Dans un contexte de conduite de la stévia en agriculture biologique, où les moyens de lutte contre la septoriose sont surtout préventifs, l'utilisation de modèle de prédiction du développement de l'épidémie pourrait permettre de cibler au mieux les applications de fongicides, et d'adapter les itinéraires culturaux selon les risques.

Finalement, ce test a permis d'évaluer tous les génotypes ayant déjà été étudiés pour leurs performances en conditions de culture en Nouvelle-Aquitaine et de compléter les connaissances sur ces ressources génétiques. L'identification d'un set d'individus présentant une faible sensibilité à la septoriose est ainsi possible. Des individus aux caractères contrastés sur ce trait pourront être utilisés comme parents pour travailler à l'amélioration génétique de la stévia de la sensibilité à la septoriose. Cependant, le développement de ce test à plus grande échelle et sur un grand nombre d'individus se heurte à plusieurs limites. Il est long à mettre en œuvre car il nécessite la production et la gestion d'un important nombre de plants par génotype testé, ainsi qu'une grande quantité de matériel fongique. Dans le cadre de nos infrastructures, il ne permet de tester que 10 génotypes en même temps. Enfin la mesure de PLSA, notation certes précise, est une mesure destructive. Des méthodes n'utilisant que des disques foliaires ont été mises en œuvre sur de nombreuses cultures dans le cadre de test de sensibilité à des agents pathogènes : sur la cerise pour la sensibilité à *Podosphaera clandestina* (Olmstead *et al.*, 2000) ou encore sur le taro pour évaluer la sensibilité à *Phytophthora colocasiae* (Nath *et al.*, 2016). Cette méthode permet d'évaluer rapidement l'agressivité d'un ou plusieurs isolats sur un grand nombre de génotypes, sans nécessiter des infrastructures importantes. Elle est donc parfaitement adaptée à une utilisation en amélioration génétique (Nath *et al.*, 2016).

3.3. Développement d'un test de phénotypage de la sensibilité à *Septoria* sp. sur disques de feuilles de *S. rebaudiana*

Résumé

L'intérêt croissant pour les molécules édulcorantes accumulées dans les feuilles de stévia a conduit à une augmentation de sa surface de production partout dans le monde. Dans le même temps, les nouvelles descriptions de pathogènes identifiés sur stévia sont en forte augmentation également. Parmi ces agents pathogènes, *Septoria* sp. est le plus décrit sur la stévia. Cet agent fongique est le responsable de la maladie Septoria Leaf Spot. Cette étude cherche à valider une méthode de phénotypage de la réponse de *Stevia rebaudiana* à une infection de *Septoria* sp. par inoculation sur disques foliaires. Cette méthode a été testée sur 10 génotypes dont les réponses au champignon sont contrastées. Les paramètres du protocole ont pu être validés. La réponse des 10 génotypes à la septoriose a été notée d'après le trait de sévérité des symptômes. Une analyse d'images a été réalisée à 9, 12, 15, 18 et 21 jours après inoculation, ce qui a permis de mesurer la proportion de surface foliaire atteinte. Une évaluation visuelle a également été réalisée 21 jours après inoculation. Les génotypes « Cult102_SPA » et « Cult36_GER » sont identifiés comme ayant le plus faible score de symptômes, avec 3% de surface symptomatique mesurée. Au contraire, « Cult33_FRA » et « Cult75_GER » sont les génotypes les plus sensibles et présentent 24% de surface foliaire symptomatique. Ces résultats sont accord avec ceux obtenus grâce à un protocole d'inoculation sur boutures, ce qui permet de valider ce protocole. Le développement d'une inoculation de septoriose sur disques foliaires de stévia ouvre de nombreuses possibilités pour les stratégies d'amélioration de la stévia dans un contexte de production en agriculture biologique.

Mots clés : *Stevia rebaudiana* ; *Septoria* sp. ; Inoculation sur disques foliaires

Screening of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) susceptibility to *Septoria* sp. through leaf disks inoculation

Zoé Le Bihan^{1,2}, Jonathan Gaudin³, Diako Rasouli⁴, Solene Boutet¹, Marianne Laurençon¹, Patrick Cosson¹, Dominique Rolin¹, Valérie Schurdi-Levraud¹

1. Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, F-33140 Villenave d'Ornon, France

2. Oviatis SA, Lacaussade, France

3. INRAE, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, Villenave d'Ornon, France

4. Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zajan, Iran

Corresponding author: valerie.schurdi-levraud@inrae.fr

Abstract

Stevia rebaudiana production area increases all over the world due to the interest into natural sweetener accumulated in its leaves. Concomitantly, the number of pathogen descriptions on stevia increases also. Among those pathogens, *Septoria* sp. is the most described on stevia. This fungal agent is responsible of the Septoria Leaf Spot. The aim of this study is to validate a leaf disk screening method for *Stevia rebaudiana* response to *Septoria* sp. infection, on 10 genotypes with contrasting responses to the fungus. The protocol parameters were validated with pre-experiments. The response to *Septoria* sp. of 10 genotypes was scoring for symptoms severity. Image analysis were performed at 9, 12, 15, 18 and 21 days after inoculation, allowing to measure the proportion of symptomatic foliar area (PLSA). A visual scoring was performed at 21 days after inoculation as well. Genotypes presented the lowest susceptibility at 21 DAI were Cult102_SPA and Cult76_GER with 3% of symptomatic surface. While genotypes presented the highest susceptibility were Cult33_FRA and Cult75_GER reaching 24% of symptomatic surface. The results are in accordance with previous inoculation protocol on stevia cuttings, allowing to validate this protocol. The development of a leaf-disk inoculation opens up the possibilities on breeding strategies for the development of organic stevia production.

Key words: *Stevia rebaudiana*, *Septoria* sp., leaf-disk inoculation

Abbreviations: DAI : days after inoculation ; AUDPC : Area Under Disease Progressive Curve ; PLSA : proportion of leaves symptomatic area ; SG : steviol glycosides

1. Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni ($2n=22$) is a perennial plant from Paraguay and traditionally used as a natural source of sweetener by Guarani Indians (Lewis 1992; Soejarto 2002). This species produces steviol glycosides, natural acaaloric sweet compounds which are 250 to 300 times sweeter than sucrose (Ceunen and Geuns 2013a). This components are mostly accumulated in leaves (Ceunen and Geuns 2013b) which are the harvested part of the plant (Angelini et al. 2018).

The increasing demand for steviol glycosides lead to an increase of stevia production area all over the world (Zenith International 2013). China is the main stevia leaves supplier, with a production up to 80% of global production (Sun 2016). Others countries in the world can be counted as significant stevia producers such as India, Indonesia, Brazil, Argentina, USA, Paraguay and Canada (Gantait et al. 2018). In Europe, recent studies proved that perennial stevia production was viable in an agronomic and economic way (Andolfi et al. 2006; Angelini et al. 2018; Hastoy, Cosson, et al. 2019; Libik-Konieczny et al. 2018; Munz et al. 2018).

Pathogens have a huge ability to infect new hosts through host-range expansion through host-jump (Corredor-Moreno and Saunders, 2020). The recent and fast extend of stevia cultivated surfaces all over the world was concomitant to an increase of pathogens identification on this crop. Indeed, various stevia pathogens are present in every cultivation area leading to yield losses (Hastoy 2018). This includes, virus such as *Tomato Spotted Wild Virus* in USA and Greece (Chatzivassiliou et al. 2007; Koehler et al. 2016), and many different fungus belonging to Ascomycota such as *Alternaria alternata* in India (Maiti et al. 2007), *Botrytis cinerea* in Italy (Garibaldi et al. 2009), and belonging to Basidiomycota such as *Sclerotium rolsfii* in USA, Greece or India (Chatzivassiliou et al. 2015; Kamalakannan et al. 2007; Koehler and Shew 2014) and *Athelia rolsfii* in France (Le Bihan et al. 2019). Among those pathogens, the fungal agent *Septoria* sp. causes the Septoria Leaf Spot, which is the foliar disease the most described

on *S. rebaudiana* over the world. This disease's symptoms are foliar chlorosis and necrosis (Reeleder 1999). Firstly described in Japan (Ishiba et al. 1982), the disease was then described in all new production areas, such as in USA (Lovering 1996), in Canada (Reeleder 1999), in India (Bhandari and Harsh 2006), in Paraguay (Sanabria and Fuente 2013) and recently in France (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). Nowadays, the impact on this fungus on stevia is growing, and approaches to control the disease development are needed (Koehler and Shew 2018).

Septoria fungi are classified in the order Mycosphaerellales (Koehler and Shew 2018), they are characterized by pycnidial conidiomata and filiform multi-septate conidia (Sutton 1980; Verkley et al. 2013). *Septoria* fungi present a wide host range and many *Septoria* species are not specific to a single host (Teterevnikova-Babaian 1976).

Development and spread of this fungus were investigated over crops such as wheat, on which fungal agent is *Mycosphaerella tritici* and *Septoria tritici*, parsley which fungal agent is *Septoria petroselini*, and tomato with the fungal agent *Septoria lycopersici* (Endrinal and Geling 1940; Kurt and Tok 2006; Sanderson 1972). Firstly, conidia are forming hyphae on adaxial leaves face to penetrate into the plant through stomata and fungal propagation into host plant occurs through intercellular spaces (Kema et al. 1996). Cohen and Eyal (1993) demonstrate on wheat that infection remains asymptomatic during 5 to 9 days after infection. Around 10 to 12 days, the fungus starts forming sporulated pycnidia visible on leaves surface (Cohen and Eyal 1993).

In the field, infected crop residues from previous years will maintain a fungal inoculum between two years of production, leading to a yield losses (Mehra et al. 2015). Pycnidia will develop from the residues, producing conidia which will infect leaves close to the soil through water by splash dispersal (Ficke et al. 2017). During the stevia growth, fungus develop upward in the canopy (Koehler and Shew 2018). Infection will be boosted with favorable environmental conditions such as an important leaves humectation (Chungu et al. 2001), due to rainfall or

aspersion irrigation for example, and a temperature between 20°C and 23°C (Fones and Gurr 2015; Kurt and Tok 2006).

In southwestern France, the stevia cultivation is developing. Moreover, South-West of France cultivation conditions suit particularly to this fungus development, with humid and warm climate (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). Additionally, *Stevia rebaudiana* is a perennial plant cultivated over 5 to 6 years in southern European conditions (Andolfi et al. 2006), which means that the stevia plants remains in the same field. Moreover, the stevia fields are mostly irrigated by water aspersion (Angelini et al. 2018), leading to a good maintenance of *Septoria* sp. inoculum during winter and an efficient and quick fungus propagation.

In order to control *Septoria* sp. propagation, different methods can be considered. Application of fungicides, such as azoxystrobin, chlorothalonil or difenoconazole, is effective and allows to maintain disease severity under five percent of damage (Koehler and Shew 2018). Furthermore, European legislation is limiting the use of phytosanitary products with the regulation (EC) 1107/2009, products must be evaluated by the EFSA agency at the European level and ANSES at the French level, before its allow on a specific crop. On stevia, no phytosanitary product is allowed so far. Moreover, for the organic crop management in Europe, the use of synthetical chemicals is prohibited (Regulation (EC) 834/2007). Natural phytosanitary products are allowed, such as copper or biocontrol agents, but their efficiency is only preventive and limited and an accumulation in soil generates phytotoxicity on leafy vegetables (Chiou and Hsu 2019). Among prophylactic methods such as irrigation technics (drop-to-drop), residues management and long crop rotation are mainly used (Ficke et al. 2017), genetic control remains one of the most important means of control.

Genetic improvement for disease resistance relies on the availability of resistance alleles among the genetic resources, and the introgression of resistance alleles to selected genotypes through

a breeding program. However, the precise characterization of the resistance response requires the implementation of a precise, simple and inexpensive phenotyping protocol.

So far, stevia breeding programs mainly focused on yield component traits, such as leaves production and SG content in leaves, as well as the SG diversity produced by stevia plants (Yadav et al. 2011). Tolerance/resistance to pathogens has not been much studied. Few stevia varieties are described as tolerant to foliar diseases in patents (Britos 2012, 2013; Hosono et al. 2003) without any details given on the type of resistance and the scoring method used. In order to include the response to *Septoria* sp. in a French stevia breeding program, an optimized phenotyping method was developed in France (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). This method is based on an inoculation method of three weeks old isolate suspension on 6 weeks old stevia cuttings through a spray chamber. However, this method is time consuming, demands an important production of stevia cuttings, which is possible only at certain time in the year. It makes it difficult to develop it on an important number of plants, and on progenies.

Leaf disks inoculation assay is a reliable screening procedure already developed on germplasm and progenies screening on many crops and their associated foliar pathogens such as; *Alternaria solani* on *Solanum tuberosum* (Bussey and Stevenson 1991), *Sphaerotheca fuliginea* on *Cucumis melo* (Cohen and Eyal 1993), *Sclerotinia trifoliorum* on *Medicago sativa* (Pratt 1996), *Melampsora larici-populina* on *Populus* sp. (Dowkiw et al. 2003), *Plasmopara viticola* on *Vitis vinifera* (Deglène-Benbrahim et al. 2010), and more recently *Phytophthora colocasiae* on *Colocasia esculenta* (Nath et al. 2016), *Podosphaera* sp. on *Phlox paniculata* (Farinas et al. 2019) and *Alternaria alternata* on *Butomus umbellatus* (Harms et al. 2020). This method was largely adopted on many pathosystems and showed its efficiency, explaining the choice to adapt the protocol to stevia.

The aim of this study is to validate a leaf disk screening method for *Stevia rebaudiana* response to *Septoria* sp. infection, on 10 genotypes with contrasting responses to the fungus.

2. Material and methods

2.1. Plant and fungal material

Ten *S. rebaudiana* genotypes, already evaluated for their susceptibility to *Septoria* sp. through cuttings inoculation (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019) were chosen to perform this test (Table 1).

The Sep-15-LIP isolate, characterized in (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019) was cultivated on Oat Agar Chloramphenicol medium (50 mg/L Chloramphenicol), in growing chamber (22°C and 12h-photoperiod).

Table 1: Genetic resources of *Stevia rebaudiana* tested in leaf-disks test, including their names, origin before selection, providers and country

Name according to Cosson et al., (2019)	Origin before selection	Providers	Country	Name correspondance with Hastoy, Le Bihan, et al. (2019)
Cult75_GER	Colombia	EUSTAS gene bank	Germany	C
Cult76_GER	Unknown	EUSTAS gene bank	Germany	Gawi
Cult33_FRA	Argentina	Oviatis	France	E161718
Cult34_FRA	Argentina	Oviatis	France	E8
Cult102_SPA	Spain	Oviatis	France	EspLac1
Cult35_FRA	Argentina	Oviatis	France	FP
Cult12_CAN	Israel	Oviatis	France	S6030-1
Cult36_FRA	Argentina	Oviatis	France	Lac4
Cult37_FRA	Argentina	Oviatis	France	Larrère
Cult51_FRA	Paraguay	Stevia store	Paraguay	Eirete

2.2. Plant production

S. rebaudiana genotypes were grown under controlled conditions in INRAE greenhouses. Mother plants were grown in 5L pots with soil Peltracom (Greenyard Horticulture France SAS), and received twice a year a nutrient supply MULTICOTE 18-6-12 (Haifa). Greenhouse conditions was 15h photoperiod, with temperatures at 18°C for three hours, 22°C for nine hours of day time, 20°C for three hours and 16°C for nine hours of the night time. Three months before inoculation, apex were cut in order to favor secondary stems and increase number of young leaves.

2.3. Preparation of leaf-disks for *in vitro* inoculation

The protocol is adapted from the one developed on the grapevine by Debieu et al. (1995). The day of the inoculation, young leaves, from the apex until the fourth node below the apex, were collected on mother plants. All following steps were performed under sterile flow hood. Leaves were sterilized by immersion in a calcium hypochlorite $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ solution, concentrated at 40g.L⁻¹, for 10 min and rinsed 3 times in sterile distilled water. Sterile leaves were dried on sterile blotting paper. Leaf disks of 15 mm diameter were cut from stevia leaves (main leaf vein in the middle of leaf disk), using a sharp disk cutter. Leaf disks were immediately placed on abaxial side in 9-cm-diameter Petri dishes containing 15 mL of agar medium, concentrated at 8 g.L⁻¹ of agar. The measure of a precise 15 mL volume of medium guaranteed a similar agar thickness in every Petri dish.

2.4. Inoculum production

A three weeks old fungus culture was used. Each inoculation requires four to five plates of fungus culture for conidia harvest. Under sterile conditions, sterile distilled water with 0.01% of Tween 20 was poured into plates. A Pasteur pipette was used to break pycnidia and suspend conidia into sterile water. Fungus solution was filtered through 450 µm filter. Conidia count was performed on a Malassez cell to adjust inoculum concentration at 10⁵ conidia / mL.

2.5. Control of the growth of the fungus in the culture medium

In order to prevent the fungus from developing in the growing medium, fungicide must be added. The fungicide difenoconazole, was added to the medium. Seven concentrations were tested, 0, 10^{-4} , 10^{-3} , 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 and 0.05 mg.L^{-1} in two different preliminary experiments in order to determine the concentration needed to prevent fungal development into the growing medium. First, one plug of the 15-LIP isolate from an OAC medium Petri dish was deposited on medium to be tested. The second experiment consisted in display on the medium of $500 \mu\text{L}$ of inoculum concentrated at $50 \text{ conidia.mL}^{-1}$ spread with sterile glass beads, in order to separate conidia. Four Petri dishes per fungicide concentration per type of experiment (plug or separate conidia) were produced. Petri dishes were placed into a grown chamber (22°C , 12h) for 24 days after deposit. The development of 15-LIP isolate was observed through binocular. For the plug test, pictures of the Petri dishes were taken at 24 days after plug deposit and the area of fungus development was estimated through image analysis, and the growth ratio of mycelium was calculated with the formula:

$$GR = \frac{\text{Fungus area}_{24 \text{ DAI}}}{\text{Plug area}_{1 \text{ DAI}}} \times 100$$

For the separated conidia method, the number of colonies were visually counted on each Petri dish.

2.6. Leaf-disks test

Five leaf disks were disposed per Petri dish following a specific pattern, in order to facilitate symptoms scoring and measurement (Figure A.1). The leaf disks were inoculated on adaxial side by deposit three drops of $10 \mu\text{L}$ of the *Septoria* sp. suspension, concentrated at $10^5 \text{ conidia.mL}^{-1}$. After inoculation, inoculated Petri dishes were placed in growth chamber (22°C , 12 h photoperiod). Negative control petri dishes were prepared with three drops of $10 \mu\text{L}$ of

sterile water, with Tween 20 added at 0.01%. The contact durations between inoculum drops or water drops and leaves was 48 h, inoculum or water drops were removed after this time.

Three independent inoculations experiments were performed. Each inoculation was carried out on leaves from the ten stevia genotypes (Table 1), five Petri dishes of five leaf disks (N=25) were inoculated with a septoria suspension and three Petri dishes of five leaf disks (N=15) were water-inoculated and considered as negative control, corresponding to 40 leaves per genotype per inoculation experiment. Control and inoculated Petri dishes were randomly disposed in the growth chamber.

2.7. Disease assessment

A first picture of each petri dishes was taken at 2 DAI. Then pictures were taken every 3 days from 9 DAI until 21 DAI. Petri dishes were placed into a dark room under white neon, on a white background, 55 cm under the camera. Pictures were taken using a Canon EOS 760D camera and a Canon lens EF-S 60 mm f/2.8 Macro USM with speed=100, open=9.0 and ISO=200. Pictures were analyzed using ImageJ software (version 1.8.0). Firstly, a binary transformation of pictures was performed to obtain total leaf area. Then, a threshold based on color was performed on pictures to select only infected areas, chlorotic and necrotic areas, (hue: 0 to 47; saturation: 37 to 255; brightness: 0 to 204). Those measures were used to calculate Percentage of Leaf Symptomatic Area % (PLSA) as:

$$PLSA_{t=i} = \frac{\text{Symptomatic leaf surface}_i}{\text{Total leaf surface}} \times 100$$

Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated using formula presented by Das et al. (1992) on score of symptoms and PLSA (%) values.

A score of symptoms through visual evaluations using a symptoms scale with 6 levels, from 0 to 5 (Table 2), were performed on each Petri dish at 21 DAI.

Table 2: Visual notations scale of *Septoria* sp. development on *S. rebaudiana* leaf-disks

Symptoms score	Description	Illustration
0	No symptom	
1	One lesion	
2	One necrotic area with its chlorotic halo	
	Several necrotic areas	
3	One necrotic area on 1/3 of leaf surface	
	Necrotic area are connecting	
4	Necrotic area is developed on 50 to 75% of leaf surface	
5	Necrotic area is developed on more than 75% of leaf area	

2.8. Statistical analysis

The adapted concentration of difenoconazole was tested through an analysis of variance type II applied on growth ratio of mycelium.

For disease assessment, statistical analyses were performed on R version 3.6.3. software (R Core Team 2018). Analysis of variance type II was applied to mixed model using the “lme4” (Bates et al. 2014) and “car” (Fox and Weisberg 2011) packages:

$$(1) y \sim A \times B + \frac{1}{C}$$

With y= measured variable; A= fixed effect genotype; B = fixed effect time of scoring; C = random effect inoculation.

For AUDPC variable, the time of scoring effect was not used into the model.

Estimated marginal means and standard errors were calculated from models using the package “emmeans” (Russel 2018). A multiple comparison was performed to obtain significant differences between genotypes with a Tuckey’s Honestly Significant Difference (HSD) test, in the “emmeans” package. The evaluation of symptoms speed development was realized through a linear regression between PLSA and time, for each tested genotype. The “emmeans” package was used to perform a pairwise comparison of the genotype regression coefficients.

Graphics were represented using the “ggplot2” package on R.

3. Results

3.1. The concentration of 0.03 mg.L⁻¹ of fungicide allows to control the development of the fungus in the medium over the course of the test.

In order to adapt the leaf disks bioassay, the fungicide concentration of the medium has to be set up. Indeed, preliminary experiments without fungicide into the medium indicated that the fungus was able to grow on the agar medium independently from the leaf. The difenoconazole concentration in agar medium was selected through the observation of the development of *Septoria* sp. colonies on the agar medium for the two tested method, plug and separated conidia, as presented in Figure 1. For the separated conidia method, no development of septoriose colonies was observed from the 0.03 mg.L⁻¹ difenoconazole concentration to the 0.05 mg.L⁻¹ difenoconazole concentration, indicating that the concentration at 0.03 mg.L⁻¹ is sufficient to inhibit the development of conidia. For the plug method, the growth ratio is very high when the difenoconazole concentrations are under 0.01 mg.L⁻¹. From 0.01 mg.L⁻¹ condition until the most concentrated condition, 0.05 mg.L⁻¹, the growth ratio is stable around 150%. This observation could be explained by the development of the fungus from the OAC medium, richer than the agar medium. The 0.03 mg.L⁻¹ concentration in the medium was validated for the protocol and used for the final inoculation test.

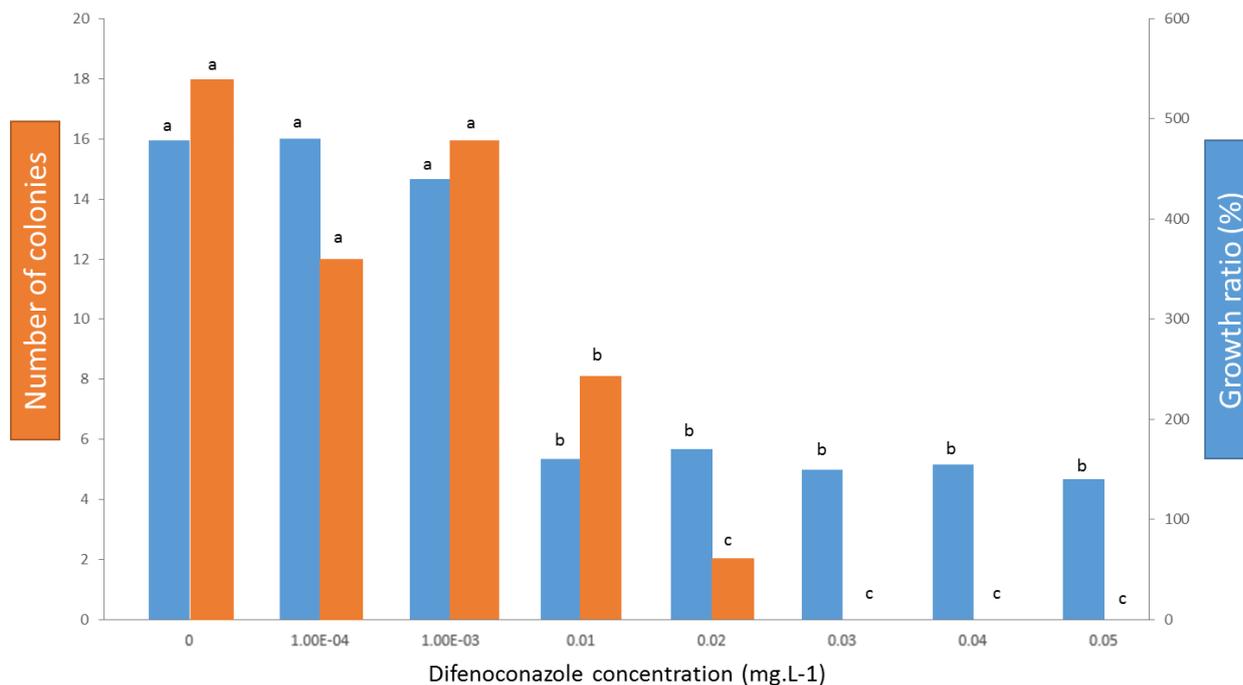


Figure 1: Estimation of the adapted difenoconazole concentration to limit *Septoria sp.* development on agar medium. The number of colonies and the growth ratio (%) were evaluated to choose the appropriate difenoconazole concentration. Black letters show the result of multiple comparison for each test. Concentrations with the same letter are not significantly different at $p=0.05$ level.

3.2. On leaf disks, the first symptoms appear 8 to 10 days after inoculation

The response of the ten *Stevia rebaudiana* genotypes to an inoculation of *Septoria sp.* isolate 15-LIP was characterized through three independent experiments. For each inoculation, control Petri dishes were inoculated with sterile water and did not developed symptoms during the 21 days of the experiment. Some control leaf-disks showed a slight necrosis line on the edge of the disk, at the location of the excision. This slight necrotic area was taking into account on the calculation of symptoms percentage. These observations confirmed that *Septoria sp.* was responsible for the symptoms development on the inoculated stevia leaf-disks. The first symptoms, necrotic lesions, were observed 8 to 10 days after inoculation according to the genotype. Then, the necrotic area extended on the leaf surface and was surrounded by a chlorotic area.

3.3. Symptoms scoring through image analysis allowed to evaluate and compare kinetics of *Septoria* sp. development on stevia genetic resources

An image analysis was performed from 9 DAI until 21 DAI for every Petri dish, allowing to calculate the Proportion of Symptomatic Foliar Area (PLSA) at each scoring time and to follow the development of the symptoms for each tested genotype (Figure 2). At 9 DAI, most of genotypes present a low level of symptoms, with a PLSA under 5%. However, a range of response is already observed, starting with the least symptomatic genotypes Cult102_SPA and Cult76_GER, at 1% of symptoms until the most symptomatic genotypes Cult33_FRA and Cult75_GER at PLSA 5% (Figure 2). For each genotype, an increase of the symptomatic foliar area is measured until 21 DAI. The variability measured at 21 DAI is ranging from 3% for Cult102_SPA until 24% for Cult33_FRA, confirming the same extreme phenotypes than at 9 DAI (Figure 2). The variance analysis performed on this trait confirmed the strong and significant genotype effect (Table 3), as well as a significant DAI effect, less important yet. Multiple comparison performed on 21 DAI scorings confirms the difference between the least susceptible genotypes Cult102_SPA and Cult76_GER and the most susceptible ones, which are Cult33_FRA, Cult75_GER and Cult34_FRA (Figure 2).

Table 3: Type II ANOVA on mixed linear models over PLSA and AUDPC on genetic resources and Days After Inoculation

Factors	PLSA		AUDPC	
	Probability	Significance	Probability	Significance
Genotypes	2.2 E-16	p < 0.001	2.2 E-16	p < 0.001
DAI	2.2 E-16	p < 0.001	–	–
Genotypes : DAI	2.2 E-16	p < 0.001	–	–

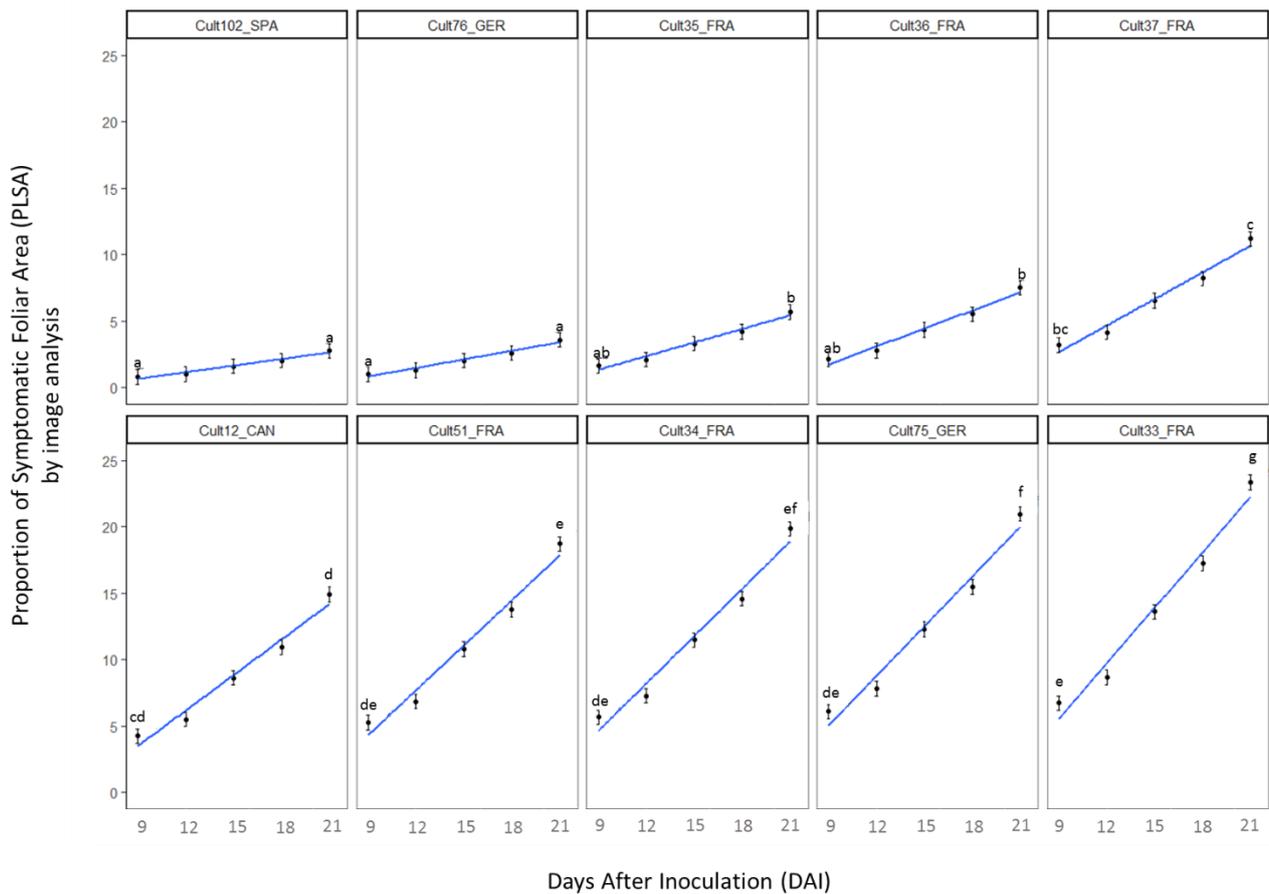


Figure 2: Symptoms evolution of Septoria leaf blotch on ten *Stevia rebaudiana* genotypes inoculated in a control conditions leaf-disks assay. The Proportion of Symptomatic Foliar Area (PLSA) was measured through image analysis on pictures of the inoculated leaf-disks Petri dishes from 9 days after inoculation (DAI) until 21 DAI. Results are estimated as Estimated Marginal Means of 5 Petri dishes per genotype, repeated 3 times, with standard error, according to number of DAI. Blue line are representing linear regression. Black letters show the result of multiple comparison at 9 and 21 DAI. At each date, genotypes with the same letter are not significantly different at $p=0.05$ level.

The symptoms evolution from 9 DAI to 21 DAI varies a lot among the tested genotypes. The evolution of the fungus development is presented on Figure 2 and indicates a linear increase over the time of scoring. The regression slopes were calculated for every genotype and appear significantly different according to the genotypes (Table 4). Cult33_FRA and Cult75_GER presented the highest slope coefficients at 1.39 and 1.24 while Cult102_SPA and Cult76_GER presented the lowest slope coefficients at 0.16 and 0.21 (Table 4).

Table 4: Linear regression coefficient of symptoms score according to days after inoculation for the ten genotypes of *Stevia rebaudiana*. 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	Regression slope coefficient
Cult102_SPA	0.16 ± 0.09 a
Cult76_GER	0.21 ± 0.09 a
Cult35_FRA	0.34 ± 0.09 ab
Cult36_FRA	0.45 ± 0.1 bc
Cult37_FRA	0.67 ± 0.09 c
Cult12_CAN	0.89 ± 0.09 d
Cult51_FRA	1.13 ± 0.2 e
Cult34_FRA	1.19 ± 0.09 ef
Cult75_GER	1.25 ± 0.09 ef
Cult33_FRA	1.39 ± 0.09 f

PLSA scorings from 9, 12, 15, 18 and 21 DAI were used to calculate Area Under Disease Progress Curve (AUDPC). This variable is an interesting indicator because it synthesizes the information of the level of symptoms as well as the symptoms development. AUPDC is often a criterion communicate to producers. As presented in the Figure 3, the AUDPC varies from 19.2 for Cult102_SPA to 163.6 for Cult33_FRA. This variance analysis confirms the results on PLSA (Table 3), showing a similar susceptibility classification among tested genotypes (Figure 3).

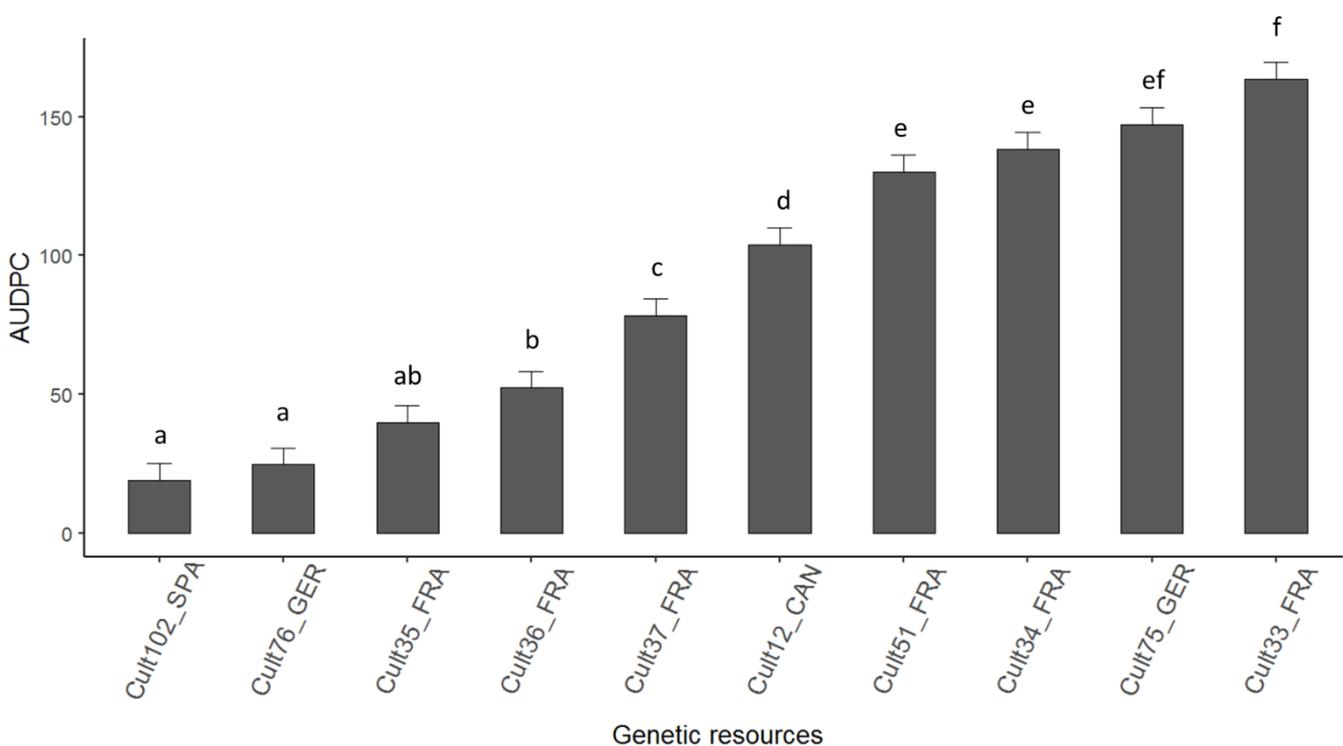


Figure 3: AUDPC was calculated from PLSA measures at 9, 12, 15,18 and 21 DAI of ten *S. rebaudiana* genotypes inoculated with *Septoria* sp. in a control conditions leaf-disks assay. Results are estimated as Estimated Marginal Means of 5 Petri dishes per genotype, repeated 3 times, with standard error. Black letters show the result of multiple comparison by HSD test of Tuckey, genotypes with the same letter are not significantly different at $p=0.05$ level.

3.4. Genotypes classification through visual scoring at 21 days after inoculation showed the same extreme groups than image analysis scoring

A visual scoring of score of symptoms was also performed at 21 DAI (Figure 4) using visual scale (Table 2). The visual end-point notation (21 DAI) by the experimenter makes it possible to classify the genotypes (Figure 4). It shows that the extreme susceptible (Cult33_FRA, Cult75_GER and Cult34_FRA) and least susceptible (Cult102_SPA and Cult35_FRA) genotypes are the same as those determined by image analysis. Only the classification of the five intermediate genotypes is slightly modified.

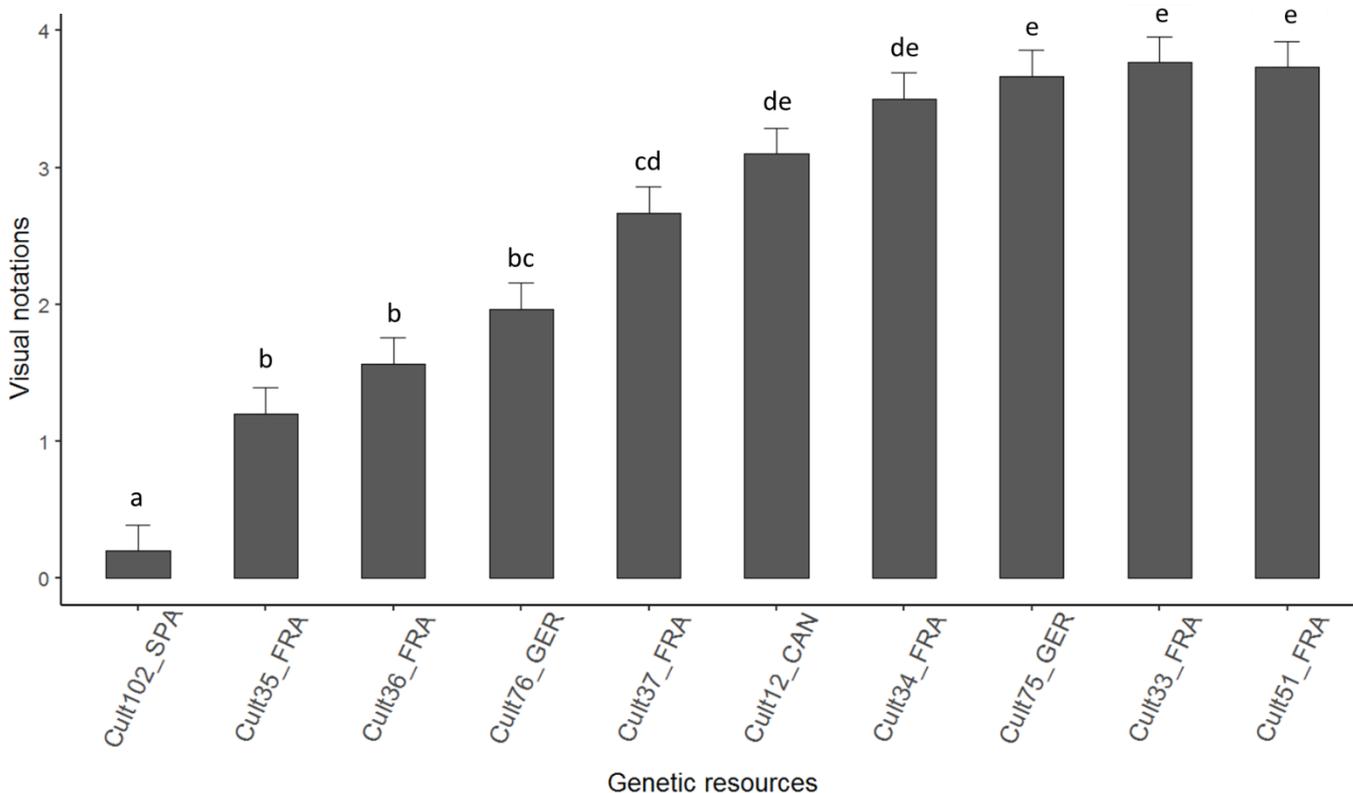


Figure 4: Visual scorings were performed according to a six-level scale on ten *S. rebaudiana* genotypes inoculated with *Septoria* sp. in a control conditions leaf-disks assay. Results are means on 5 Petri dishes per genotype, repeated 3 times, with standard error. Black letters show the result of multiple comparison by HSD test of Tuckey, genotypes with the same letter are not significantly different at $p=0.05$ level.

4. Discussion

The genetic improvement of *Stevia rebaudiana* until now has been essentially based on the quantity and quality of SG production. The development of this crop in many parts of the world with very different pedo-climatic conditions make the problem of interaction with pathogens a major issue. Once the disease and the causative pathogen have been characterized, a simple, inexpensive and reproducible test should be available to assess the response of genetic resources, parents and offspring to these pathogens. For many species, the first tests to describe response to fungal infection are realized through field trials or cuttings trials. For example, the study of wheat cultivars response to *S. nodorum* was first realized in fields (Cooke and Jones 1970; Scott and Benedikz 1977). While those protocols permit a very good description of crop's response to fungal infection in cultivation context, they can be complicated to carry out. Field trials are especially difficult to interpret due to the lack of control of inoculum source and propagation.

On perennial plants, the plantation of progenies field is time-consuming and expensive (McClure et al. 2014). On stevia, as in many perennials, another constraint is its allogamy, which impose to realize cuttings in order to obtain clones when repeats are needed. All these constraints are limiting factors for the development of progenies field trial, and inoculating *Septoria* sp. isolate on field planted progenies is not an option. That is why the development of inoculation methods in controlled conditions were a necessity to investigate the variability of the response to leaf pathogens and detached leaf inoculation methods were developed (Griffiths et al. 1985; Mebrate and Cooke 2001). It is within this framework that we have adapted a grapevine leaf disks inoculation test to study the response of stevia genetic resources to *Septoria* sp.

On stevia, the first inoculation protocol developed to score the response of genetic resources to *Septoria* sp. infection was developed on cuttings through a spray chamber inoculation by

(Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). This first test was developed on 10 genetic resources allowing a first phenotypic evaluation of variability of the response to *Septoria* sp. The validation of the stevia leaf-disk test was performed as the symptoms scoring method through image analysis is precise and shows the same genotypes classification at 21 DAI than the one obtained with cuttings inoculation test performed by (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). Moreover, the symptoms evolution according to days after inoculation was medialized through a linear regression, identically to the study on stevia cuttings. Even if the regression slope coefficients calculated in this study are smaller than the coefficients calculated in (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019) study, indicating a slower symptoms evolution for the leaf-disks inoculation. Finally, genotypes classification obtained through the visual scale-based scorings is similar for the extreme phenotypes but differs for the intermediate ones. This difference is probably linked to the construction of the visual scorings scale for leaf-disk inoculation, composed of six grades, from 0 to 5, which limits the precision in the description of variability.

This leaf-disks inoculation method presents numerous advantages compared to the cuttings spraying chamber inoculation method or field inoculation with natural or artificial infection. First of all, a smallest quantity of fungal materiel is needed. For ten genotypes, the inoculum volume for the leaf-disks inoculation is only few milliliters, which corresponds to an important reduction compared to the previous inoculation method on cuttings, using 3 liters of inoculum per inoculation. Second, a diminution of the quantity of plant material used is observed as well. Indeed, for the leaf-disk experiment the number of leaves needed is equal to the number of leaf-disks used, corresponding to 40 leaves per genotype per inoculation experiment. The plant material is available any time as mother plants grown in greenhouse. For progenies, the small quantity of plant material needed allows to work on leaves directly sampled from the field experiment. This is a main advantage compared to the cuttings inoculation method, for which 6 weeks old cuttings are used. The production of cuttings require space, a higher mother plants

number and is possible from March until July only. Another advantage of the leaf-disks inoculation method compared to the cutting method is the reduction of space used in growing chamber, allowing to test a higher number of genotypes at the same time.

Two scoring methods were performed in the leaf-disk protocol, a visual scoring method based on a 6-level scale, and an image analysis method, based on pictures. The visual scoring method is reliable to perform a symptom phenotyping and evaluates the global answer of the tested individuals. This method has the merit of being quicker and easy to execute. This explains why the phenotyping method is widely employed in the literature, with various degree of precisions. Visual scorings were performed to evaluate the *Brassica oleracea* susceptibility to *Peronospora parasitica* on three response resistant, hyper-sensitive response or moderately susceptible (Agnola et al. 2003). Some more precise visual scorings were performed to estimate the percentages of *Vitis vinifera* disk-leaf area infected by downy mildew *Plasmopara viticola* (Musetti et al. 2006). Identically to the present study, the inoculation of *Podosphaera clandestina* on *Prunus avium* L. was evaluated through visual scorings on the percentage of symptoms for the leaf-disks inoculation and a five level scale for the field screening (Olmstead et al. 2000). A leaf-disk inoculation of powdery mildew on *Cucumis melo* L. progenies was evaluated by visual scorings using a six levels scale. This phenotyping protocol associated to linkage map construction permits the detection of two QTLs associated to the susceptibility to powdery mildew (Fukino et al. 2008). Agnola et al. (2003), used a leaf-disks assay to screen, through visual scorings, a broccoli F2 population for the susceptibility to six *P. parasitica* isolates, and identified a dominant gene controlling resistance to the fungus isolates

Nevertheless, although more complicated to implement and more time-consuming, image analysis offers many advantages. This method offers similar results independent from the experimentater. Indeed, Olmstead et al. (2001) adapted the scoring of the inoculation of *Podosphaera clandestina* on *Prunus avium* L., they performed an image analysis on scanning

leaf-disks to calculate to infected foliar area, and obtained the same results as visual scoring. Image analysis provides a fine quantitative variable, allowing the implementation of QTL mapping detection strategies. It also allows a more precise monitoring of the fungus development and thus allows the production of hypotheses on the type of interaction highlighted according to the genotype tested. Moreover, a precise evaluation of the kinetics development of the fungus is also possible. Leandro et al. (2001) studied the germination and sporulation of *Colletrichum acutatum* on strawberry. They performed a count of the number of germinated and un-germinated conidia on the inoculated leaves observed by microscope. The image analysis method though, requests more material, such as a darkroom equipped with neon tubes and a camera, and more time. In the future, the scoring method can be selected according to the needed precision, the available time and material.

The development of this simplified inoculation method opens the field of a number of opportunities for stevia phenotyping and breeding. In the present test only one *Septoria* sp. isolate was inoculated. However, a genotype susceptibility can vary a lot according to the isolate inoculated, for example in wheat the cultivar “Longbow” is susceptible to IPO323 isolate but resistant to IPO88004 isolate (Orton et al. 2017). Moreover, in the field conditions studies on wheat showed that the inoculum was actually a mix of several isolates of the fungus (McDonald and Martinez 1990; Stukenbrock et al. 2012). In the present study, the isolate Sep-15-LIP was inoculated, but other isolates could be tested, alone or in an inoculum mix, to mimic field conditions (Hastoy, Le Bihan, et al. 2019). This test would answer short- and long-term questions for stevia production, do the less susceptible genotypes have the same response to other isolates? Does interaction among isolates, reduce or increase symptoms on production genotypes?

Moreover, an opportunity accessible with the development of this method is also the test of new phytosanitary products or methods to avoid or limit the fungus development. Batta (2003)

realized an inoculation of *Alternaria cucumerina* on *Cucumis sativum* L. leaf-disks with application of four different fungicides, allowing to select the most efficient to control the fungus development. This first result was validated through field experiment, indicating that leaf-disk assay was an effective preliminary test. Musetti et al. (2006) used a leaf-disk assay to investigate the inhibition potential of endophytic fungus of grapevine, *Alternaria alternata*, on the downy mildew *Plasmopara viticola*. Their results indicates that *A. alternata* is effective in inhibiting to *P. viticola* sporulation, authors concluded that this endophytic fungus has a good potential to be used as biocontrol agent (Musetti et al. 2006). A similar experiment was conducted on a leaf-disk assay and field trial by Carisse et al. (2000) to control *Venturia inaequalis* of *Malus domestica* Borkh, showing that fungal antagonists reduced the *V. inaequalis* ascospores production. In organic agriculture, this development of this disease control methods can help to maintain a low level of fungal development. This method could also be extended to screen the response to other leaf fungus, already described on stevia.

Finally, in a stevia breeding program for this trait, a first visual scoring could be performed on progenies, in order to obtain an elite set of progenies. The small number of plants could be evaluated in a second time by image analysis. This will give a more precise phenotyping and opens the field to research on the fine phenotyping of the interaction to find its cellular and molecular determinants.

The comparison with the stevia cuttings inoculation method confirms that the leaf-disks inoculation method is reliable and performant for the screening test of *Stevia rebaudiana* response to *Septoria* sp. infection. Visual scorings appeared to be a quick reliable scoring method, adapted to test a high number of plants, such as progenies. However, the image analysis scorings are more precise and give the opportunity to investigate new research paths, such as the study of the pathogen kinetics. Finally, the development and validation of this new inoculation protocol opens up new opportunities for the stevia research community.

Bibliography:

- Agnola, B., Boury, S., Monot, C., Quillévéré, A., Hervé, Y., & Silué, D. (2003). Evidence that a Leaf-Disk Test Allows Assessment of Isolate-Specific Resistance in Brassica oleracea Crops Against Downy Mildew (*Peronospora parasitica*). *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 471–478. <https://doi.org/10.1023/A:1024217223829>
- Andolfi, L., Macchia, M., & Ceccarini, L. (2006). Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 1(2), 257–262.
- Angelini, L. G., Martini, A., Passera, B., & Tavarini, S. (2018). Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges. In J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Sweeteners* (pp. 35–85). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_8
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. arXiv:1406.5823 [stat]. <http://arxiv.org/abs/1406.5823>. Accessed 31 March 2020
- Batta, Y. (2003). Alternaria Leaf Spot Disease on Cucumber: Susceptibility and Control Using Leaf Disk Assay. *J. Res. N. Sc.*, 17(2), 269–279.
- Bhandari, S., & Harsh, N. S. K. (2006). First Report of *Septoria steviae* on *Stevia rebaudiana* in India. *Indian Forester*, 132(3), 385–385.
- Britos, E. R. A. (2012, November 6). Stevia plant named ‘AKH L1.’ <https://patents.google.com/patent/USPP23164P3/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=2>. Accessed 25 June 2020
- Britos, E. R. A. (2013, July 9). Stevia plant named ‘AKH L4.’ <https://patents.google.com/patent/USPP23728P3/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=2>. Accessed 25 June 2020
- Bussey, M., & Stevenson, W. (1991). A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. *Plant Disease*, 75(4), 385–390.
- Carisse, O., Philion, V., Rolland, D., & Bernier, J. (2000). Effect of Fall Application of Fungal Antagonists on Spring Ascospore Production of the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*®, 90(1), 31–37. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.31>

- Ceunen, & Geuns. (2013a). Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1201–1228. <https://doi.org/10.1021/np400203b>
- Ceunen, & Geuns. (2013b). Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.003>
- Chatzivassiliou, E. K., Giakountis, A., Testa, A., Kienle, U., & Jungbluth, T. (2015). Natural Infection of *Stevia rebaudiana* by Cucumber mosaic virus in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. *Plant Disease*, 100(5), 1029–1029. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1149-PDN>
- Chatzivassiliou, E. K., Peters, D., & Lolas, P. (2007). Occurrence of Tomato spotted wilt virus in *Stevia rebaudiana* and *Solanum tuberosum* in Northern Greece. *Plant Disease*, 91(9), 1205–1205. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1205C>
- Chiou, W.-Y., & Hsu, F.-C. (2019). Copper Toxicity and Prediction Models of Copper Content in Leafy Vegetables. *Sustainability*, 11(22), 6215. <https://doi.org/10.3390/su11226215>
- Chungu, C., Gilbert, J., & Townley-Smith, F. (2001). *Septoria tritici* Blotch Development as Affected by Temperature, Duration of Leaf Wetness, Inoculum Concentration, and Host. *Plant Disease*, 85(4), 430–435. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.430>
- Cohen, L., & Eyal, Z. (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology*, 42(5), 737–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x>
- Cooke, B. M., & Jones, D. G. (1970). The epidemiology of *Septoria tritici* and *S. nodorum*. II. The reaction of spring and winter Wheat varieties to infection by *Septoria tritici* and *S. nodorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 56(1), 121–135.
- Corredor-Moreno, P., & Saunders, D. G. O. (2020). Expecting the unexpected: factors influencing the emergence of fungal and oomycete plant pathogens. *New Phytologist*, 225(1), 118–125. <https://doi.org/10.1111/nph.16007>
- Das, M. K., Rajaram, S., Mundt, C. C., & Kronstad, W. E. (1992). Inheritance of Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust in Wheat. *Crop Science*, 32(6), 1452–1456. <https://doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200060028x>
- Debieu, D., Corio-Costet, M.-F., Steva, H., Malosse, C., & Leroux, P. (1995). Sterol composition of the vine powdery mildew fungus, *Uncinula necator*: Comparison of

triadimenol-sensitive and resistant strains. *Phytochemistry*, 39(2), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00015-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00015-Y)

Deglène-Benbrahim, L., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., & Walter, B. (2010). Evaluation of Downy Mildew Resistance in Grapevine by Leaf Disc Bioassay with In Vitro- and Greenhouse-Grown Plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(4), 521–528. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10009>

Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., Pinon, J., & Bastien, C. (2003). Partial Resistance to *Melampsora larici-populina* Leaf Rust in Hybrid Poplars: Genetic Variability in Inoculated Excised Leaf Disk Bioassay and Relationship with Complete Resistance. *Phytopathology*®, 93(4), 421–427. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.421>

Endrinal, D. M., & Geling, M. S. (1940). *Septoria* leaf spot of Tomato. *Philippine Agriculturist*, 29(7). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19411100389>. Accessed 18 July 2017

Farinas, C., Jourdan, P., Paul, P. A., & Peduto Hand, F. (2019). Development and Evaluation of Laboratory Bioassays to Study Powdery Mildew Pathogens of Phlox In Vitro. *Plant Disease*, 103(7), 1536–1543. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0031-RE>

Ficke, A., Cowger, C., Bergstrom, G., & Brodal, G. (2017). Understanding Yield Loss and Pathogen Biology to Improve Disease Management: *Septoria Nodorum* Blotch - A Case Study in Wheat. *Plant Disease*, 102(4), 696–707. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1375-FE>

Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>

Fox, J., & Weisberg, S. (2011). *Multivariate Linear Models in R*, 31.

Fukino, N., Ohara, T., Monforte, A. J., Sugiyama, M., Sakata, Y., Kuniyama, M., & Matsumoto, S. (2008). Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/447429>. Accessed 14 October 2020

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

- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., & Gullino, M. L. (2009). First Report of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Stevia rebaudiana* in Italy. *Plant Disease*, 93(3), 318–318. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0318A>
- Griffiths, H. M., Jones, D. G., & Akers, A. (1985). A bioassay for predicting the resistance of wheat leaves to *Septoria nodorum*. *Annals of Applied Biology*, 107(2), 293–300. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1985.tb01573.x>
- Harms, N., Shearer, J., Cronin, J. T., & Gaskin, J. F. (2020). Geographic and genetic variation in susceptibility of *Butomus umbellatus* to foliar fungal pathogens. *Biological Invasions*, 22(2), 535–548. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02109-3>
- Hastoy, C. (2018, July 20). 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 (PhD). Bordeaux. Retrieved from <http://www.theses.fr/2018BORD0118>
- Hastoy, C., Cosson, P., Cavaignac, S., Boutié, P., Waffo-Teguo, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.053>
- Hastoy, C., Le Bihan, Z., Gaudin, J., Cosson, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). First report of *Septoria sp.* infecting *Stevia rebaudiana* in France and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1747-RE>
- Hosono F., Komai K., Matsuda K., Morita K., Morita T., 守田幸司, et al. (2003, January 14). ステビア品種の d n a 鑑定による識別. Accessed 14 April 2020
- Ishiba, C., Yokoyama, T., & Tani, T. (1982). Leaf spot disease of *Stevia* caused by *Septoria steviae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 48(1), 34–43. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.48.34>
- Kamalakaran, A., Valluvaparidasan, 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(2). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073076457>. Accessed 26 March 2020

- Kema, G. H. J., Yu, D., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., & Baayen, R. P. (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *The American Phytopathological Society*, 86(7), 777–786.
- Koehler, A. M., Brown, J. A., Huber, B., Wehner, T. C., & Shew, H. D. (2016). First Report of Tomato spotted wilt virus in *Stevia rebaudiana* in North Carolina. *Plant Disease*, 100(6), 1251–1251. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1367-PDN>
- Koehler, & Shew. (2014). First Report of Stem and Root Rot of *Stevia* Caused by *Sclerotium rolfsii* in North Carolina. *Plant Disease*, 98(7), 1005–1005. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1238-PDN>
- Koehler, & Shew. (2018). Field efficacy and baseline sensitivity of *Septoria steviae* to fungicides used for managing *Septoria* leaf spot of stevia. *Crop Protection*, 109, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.03.006>
- Kurt, S., & Tok, F. M. (2006). Influence of inoculum concentration, leaf age, temperature, and duration of leaf wetness on *Septoria* blight of parsley. *Crop Protection*, 25(6), 556–561. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.08.012>
- Le Bihan, Z., Gaudin, J., Robledo-Garcia, F., Cosson, P., Hastoy, C., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). First Report of *Sclerotium* stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* on *Stevia rebaudiana* in southwestern France. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0696-PDN>
- Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Nutter, F. W., Wegulo, S. N., & Dixon, P. M. (2001). Germination and Sporulation of *Colletotrichum acutatum* on Symptomless Strawberry Leaves. *Phytopathology*®, 91(7), 659–664. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.659>
- Lewis, W. (1992). Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, 46, 336–337.
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kąkol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimiak, A., Sliwiska, E., & Pistelli, L. (2018). Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae*, 234, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.015>

- Lovering, N. M. (1996). First Report of *Septoria steviae* on *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) in North America. *Plant Disease*, 80, 959. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0959D>
- Maiti, C. K., Sen, S., Acharya, R., & Acharya, K. (2007). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology*, 56(4), 723–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01578.x>
- McClure, K. A., Sawler, J., Gardner, K. M., Money, D., & Myles, S. (2014). Genomics: A potential panacea for the perennial problem. *American Journal of Botany*, 101(10), 1780–1790. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400143>
- McDonald, B. A., & Martinez, J. P. (1990). DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology*, 80(12), 1368–1373.
- Mebrate, S. A., & Cooke, B. M. (2001). Response of wheat cultivars to infection by *Stagonospora nodorum* isolates/mixture on detached and intact seedling leaves. *Euphytica*, 122(2), 263–268. <https://doi.org/10.1023/A:1012904926659>
- Mehra, L. K., Cowger, C., Weisz, R., & Ojiambo, P. S. (2015). Quantifying the Effects of Wheat Residue on Severity of *Stagonospora nodorum* Blotch and Yield in Winter Wheat. *Phytopathology*™, 105(11), 1417–1426. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-15-0080-R>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.021>
- Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., et al. (2006). Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology*®, 96(7), 689–698. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0689>
- Nath, V. S., Basheer, S., Jeeva, M. L., Hegde, V. M., Devi, A., Misra, R. S., et al. (2016). A Rapid and Efficient Method for In Vitro Screening of Taro for Leaf Blight Disease Caused by *Phytophthora colocasiae*. *Journal of Phytopathology*, 164(7–8), 520–527. <https://doi.org/10.1111/jph.12477>

- Olmstead, J. W., Lang, G. A., & Grove, G. G. (2000). A Leaf Disk Assay for Screening Sweet Cherry Genotypes for Susceptibility to Powdery Mildew. *HortScience*, 35(2), 274–277.
- Orton, E. S., Rudd, J. J., & Brown, J. K. M. (2017). Early molecular signatures of responses of wheat to *Zymoseptoria tritici* in compatible and incompatible interactions. *Plant Pathology*, 66(3), 450–459. <https://doi.org/10.1111/ppa.12633>
- Pratt, R. (1996). Screening for Resistance to *Sclerotinia trifoliorum* in Alfalfa by Inoculation of Excised Leaf Tissue. *Phytopathology*, 86(9), 923. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-923>
- Reeleder, R. (1999). Septoria Leaf Spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and Methods for Screening for Resistance. *Journal of Phytopathology*, 147(10), 605–613. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.1999.00445.x>
- Russel, L. (2018). Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. CRAN R-project.
- Sanabria, C. R. V., & Fuente, A. L. O. (2013). Eficiencia de los métodos de lixiviación y maceración de extractos vegetales para el control de enfermedades foliares en ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni). *Investigación Agraria*, 10(2), 59–65.
- Sanderson, F. R. (1972). A *Mycosphaerella* species as the Ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. *New Zealand Journal of Botany*, 10(4), 707–709. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1972.10430256>
- Scott, P. R., & Benedikz, P. W. (1977). Field techniques for assessing the reaction of winter wheat cultivars to *Septoria nodorum*. *Annals of Applied Biology*, 85(3), 345–358. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb01920.x>
- Soejarto, D. (2002). Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia : The genus stevia* (Vols. 1-0, pp. 18–39). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203165942.ch2>
- Stukenbrock, E. H., Quaedvlieg, W., Javan-Nikhah, M., Zala, M., Crous, P. W., & McDonald, B. A. (2012). *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the septoria tritici leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*). *Mycologia*, 104(6), 1397–1407. <https://doi.org/10.3852/11-374>
- Sun, J. (2016). Development of stevia and steviol glycosides industry in China. In *Proceedings of the 9th stevia symposium 2016* (Vol. 009, pp. 145–150). Presented at the From field to fork, Gothenburg, Sweden: Jan M.C. Geuns.

Sutton, B. C. (1980). The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute.

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801366283>. Accessed 11 March 2020

Teterevnikova-Babaian, D. N. (1976). Review of *Septoria* Fr. species parasitizing plants of the family Salicaceae Mirbel. i. *septoria* Fr. species on willows. Biol Zh Arm. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302514559>. Accessed 12 October 2020

Verkley, G. J. M., Quaedvlieg, W., Shin, H.-D., & Crous, P. W. (2013). A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology*, 75, 213–305. <https://doi.org/10.3114/sim0018>

Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1–27. <https://doi.org/10.1139/CJPS10086>

Zenith International. (2013). Zenith Global.

<https://www.zenithglobal.com/articles/1276?Global+Stevia+market+passes+%24300+million>. Accessed 1 February 2017

Supplemental figures and tables:

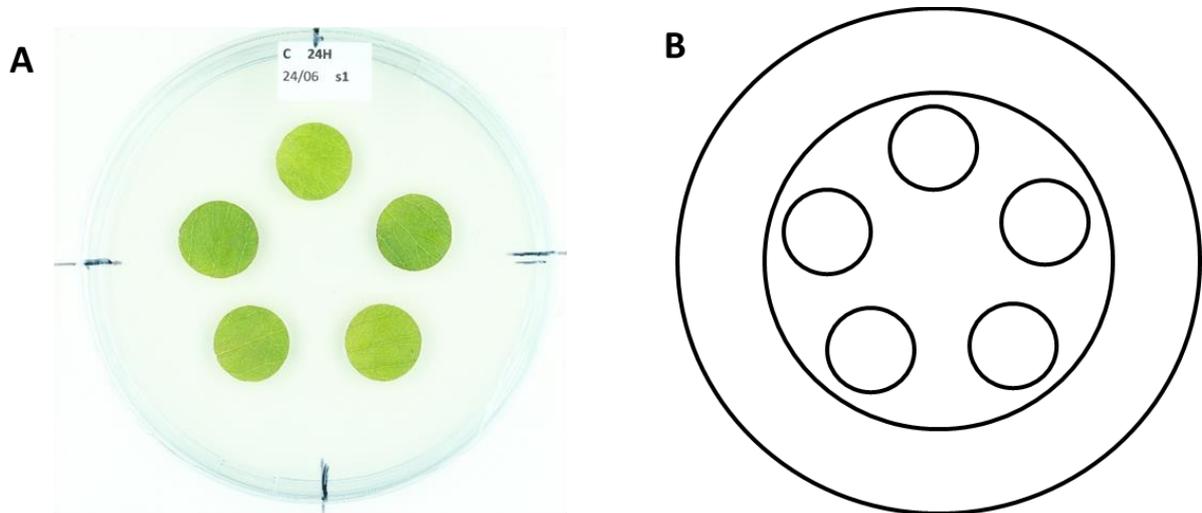


Figure A.1: (A) Example of pictures taken for the image scoring of leaf-disk symptomatic area.

(B) Pattern used to place the leaf disk into Petri dishes

Chapitre 4. Vers la sélection collaborative pour la filière de la stévia en agriculture biologique

Les résultats des chapitres précédents ont permis d'approfondir la connaissance du phénotype des ressources génétiques à disposition dans la collection de l'INRAE, Villenave d'Ornon. Les traits étudiés sont relatifs au rendement en SG, à l'architecture de la canopée, la reprise après l'hiver et la sensibilité à la septoriose. De plus, les résultats précédents ont également permis de développer de nouveaux outils pour décrire le phénotype des plants étudiés. La connaissance de la diversité phénotypique et génotypique disponible est une étape indispensable à la mise en œuvre d'un programme d'amélioration. Cependant, elle n'est pas suffisante pour l'amélioration génétique d'une culture.

En effet, la compréhension de l'architecture génétique des traits ciblés pour l'amélioration génétique est également nécessaire. Pour développer ces connaissances, une parcelle expérimentale a été mise en place à Blagon (33) en 2017, permettant la plantation de descendants issus de croisements entre les ressources génétiques décrites dans les chapitres précédents. Ces individus ont été cultivés en conditions proches des conditions de production et ont été phénotypés en 2018 et 2019, correspondant à leur deuxième et troisième année sur la parcelle. La mise en place de cet essai a permis la description du phénotype de quatre populations de plein-frères de stévia sur les traits du rendement en SG sucrés, et en lien avec l'architecture de la canopée. De plus, ces mesures phénotypiques ont permis une première estimation des paramètres génétiques relatifs à ces traits. Ce travail est un premier pas vers la compréhension de l'architecture génétique des traits du rendement chez la stévia.

Enfin, le contexte de ce projet est la mise en place d'un programme d'amélioration génétique de stévia pour une production locale et conduite en agriculture biologique (AB). Les outils et stratégies classiquement mis en œuvre pour l'amélioration d'une culture ne sont pas toujours adaptés aux filières en AB. C'est pourquoi, l'idée de construire un idéotype avec les différents acteurs du projet a émergé, s'inscrivant dans une démarche de sélection collaborative. La réflexion commune a permis de formaliser et hiérarchiser les objectifs de sélection de la filière, ce qui n'avait pas été réalisé jusqu'à ce jour.

4.1. Estimation of genetic parameters in *Stevia rebaudiana* breeding progenies

Estimation of genetic parameters in *Stevia rebaudiana* breeding progenies

Zoé Le Bihan^{a,b}, Patrick Cosson^a, Solene Boutet^a, Dominique Rolin^a, Valérie Schurdi-Levraud^a

a. Univ. Bordeaux, INRAE, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, 1332, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France

b. Oviatis SA, 3 chemin de Perroutis, 47310 Estillac, France

Corresponding author: V. Schurdi-Levraud

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

Declaration of interest:

None

Abstract:

The increasing demand for SG supply by industrials led to an increase of stevia production. The breeding of performant genotypes, well-adapted to different production conditions and areas is a necessity to produce the quantity of SG needed. However, stevia breeding programs face a lack of phenotypic and genotypic characterization of genetic resources, which appear to be potential genitors. This lack of information is combined with limited knowledge on the estimation of genetic parameters and the transmission of agronomic traits of interest. The goal of this study was to establish an estimation of genetic parameters, including narrow-sense heritabilities, genetic correlations and genetic gain, for stevia on main agronomic traits: dry leaf biomass, SG content, sweet SG yield, Harvest Index and canopy volume. To do this, phenotypic data were collected from 328 progenies derived from four full-sibs families. An important variability was observed within and among families for every studied trait. Sweet SG yield measures indicated that progenies presented a mean value higher than their parents' one. The highest narrow-sense heritabilities were found for sweet SG yield and SG content. All genetic correlations between traits were founded to be high and significant, except for one, between Harvest Index and SG content. The genetic gain calculated for sweet SG yield and its components indicates the possibility of quick progresses in a decade on the studied traits. This study is the first to estimate genetic parameters from phenotypic data measured on two years of production. Those results will support stevia breeding into the transition from a massal selection to a selection based on quantitative genetics.

Key words: *Stevia rebaudiana*, genetic parameters, progenies

1. Introduction

Stevia rebaudiana ($2n = 22$) is a perennial shrub originated from Paraguay, traditionally used for its sweet taste (Soejarto, 2002). The main economic value of stevia is its propriety to produce and accumulate steviol glycosides (SG) in its leaves, natural sweeteners 250 to 300 times sweeter than sucrose (Ceunen and Geuns, 2013a). Those compounds are a good alternative to synthetic sweeteners and can be consumed by diabetic patients (Barriocanal et al., 2008). The consumer's rejection of synthetic sweeteners leads to an increase in demand for SG from industries and the development of products sweetened with stevia on the market (Mintel Global New Products Database, 2017). Stevia production's next challenge is to provide those large amounts of high quality leaf biomass. To reach this goal, the first approach is to optimize the control of production conditions, and the contribution of new knowledges on the crop management of stevia.

Indeed, to satisfy this increasing demand for SG supply, important efforts have been made towards agronomical issues to improve stevia biomass yield through appropriate cultural itinerary (Angelini et al., 2018; Barbet-Massin et al., 2015; Benhmimou et al., 2017; Gomes et al., 2018; Lavini et al., 2008; Serfaty et al., 2013). Yield performances of stevia can be evaluated through SG yield and SG profile, and SG yield (g/plant) results from two components, dry leaves biomass production (g/plant) and SG content (% w/w_{dryleave}), which is the percentage of SG out of dry leaves biomass. The strategy based on the improvement of crop management knowledges showed a short-term efficiency to improve the dry leaf biomass production and SG content, developing knowledges on harvest date to maximize SG content (Barbet-Massin, 2015; Ceunen and Geuns, 2013b), the number of harvests (Pal et al., 2015), or the proper fertilization and irrigation for stevia (Barbet-Massin et al., 2016; Tavarini et al., 2015). This strategy is efficient for the yield's improvement if optimized and adapted varieties are available, but reaches limits if grown varieties have low agronomic potential.

The second approach is the selection of performant, well-adapted to different production conditions and areas genotypes. Indeed, the development of a stevia breeding strategy is another lever that can be investigated to provide improved varieties of stevia on the traits linked to stevia yield including abiotic and biotic stress traits. The SG yield components are the main traits targeted into breeding programs on stevia (Barbet-Massin, 2015; Tavarini et al., 2018). So far, the main breeding objectives were to maximize the SG yield, through the improvement of the leaf biomass production, the Harvest Index, the SG content and the ratio RebA/ST (Tavarini et al., 2018; Yadav et al., 2011), which are still relevant today.

However, there is a lack of phenotypic and genotypic knowledge on stevia genetic resources. Most of stevia phenotypic evaluation studies have been conducted with a very limited number of genotypes, often misidentified, with generic names such as “Rebaudiana”, “Sugar Love”, “AX” and “Candy” (Libik-Konieczny et al., 2018; Munz et al., 2018; Parris et al., 2016). Those genetic resources are yet potential interesting genitors for stevia breeding programs.

This lack of information on stevia genitors is combined with limited knowledge on the estimation of genetic parameters and the transmission of agronomic traits of interest. The study of genetic parameters on agronomic traits of interest among progenies is a first step of the study of genetic control of those traits. Indeed, heritability is a well-known tool in quantitative genetic allowing to describe the heredity of quantitative traits from genitors to progenies, and is described as the phenotypic variance resulting from additive genetic effects (Holland et al., 2010). Moreover, the genetic correlations between traits must be taken into account for genetic selection (Jackson et al., 1996). This knowledge was already developed on many crops, on jatropha (Freitas et al., 2016), on blueberry (Cellon et al., 2018), on alfalfa (Annicchiarico, 2015) and on maritime pine (Carrasquinho et al., 2018). Those estimations showed interesting perspectives, for traits relative to yield but also to pathogens susceptibility, especially to estimate the potential of genotypic selection on the studied traits. However on stevia, the

description of genetic estimators was poorly described so far. Gaurav et al., (2008) calculated the large-sense heritability for leaf yield at 0.99, for stevioside content at 0.93 and for plant height at 0.97. In a previous study, heritability was 0.75 for stevioside, 0.75 for leaf yield and 0.86 for leaf/stem ratio (Brandle and Rosa, 1992). This study provides an estimate of heritability and suggests that high heritabilities such as these should allow for substantial gains.

The goal of this study was to establish an estimation of genetic parameters, heritability and genetic correlations, for stevia on main agronomic traits: dry leaf biomass, canopy volume, Harvest Index, SG content and sweet SG, general combining ability of the tested parents and estimate the possible genetic gain through a breeding strategy.

2. **Materials and methods**

2.1. Full-sibs population development

Four populations of full-sibs were obtained from crosses between six parents Cult102_SPA, Cult35_FRA, Cult76_GER, Cult36_FRA, Cult103_SPA and Cult34_FRA (Table 1) belonging to the genetic resources collection at INRAE (Bordeaux, southwestern France). The parents were selected on the basis of contrasted SG yield, leaves biomass production, SG profile and content in leaves, flowering date and genetic clusters. Performances of parents (Table 1) were measured in a second year production in field conditions (Hastoy et al., 2019 ; Le Bihan et al., submitted article).

Genetic resources	Type of parents	Genetic cluster	Leaf biomass production (2nd year of production)	Canopy volume (m³) (2nd year of production)	Harvest Index (%) (2nd year of production)	SG content (2nd year of production)	Sweet SG yield (g/plant) RebA, RebB, RebM, RebD (2nd year of production)	SG profile Bitter SG = ST, RebC, DulA, Rub, SB, RebF Sweet SG = RebA, RebB, RebM, RebD
Cult76_GER	Female	1	61 g/plant	0.07 m ³	51.9 %	11 %w/w	2.1	65 % of bitter SG
Cult35_FRA	Male	2	42 g/plant	0.06 m ³	56.8 %	14 % w/w	2.9	54% of bitter SG
Cult102_SPA	Female	3	53 g/plant	0.05 m ³	56.4 %	15 %w/w	4.34	50 % of bitter SG
Cult36_FRA	Male	3	38 g/plant	0.04 m ³	59.3 %	12 %w/w	1.7	61 % of bitter SG
Cult34_FRA	Female	3	47 g/plant	0.04 m ³	63.4 %	10 %w/w	0.06	99 % of bitter SG
Cult103_FRA	Female	3	58 g/plant	0.08 m ³	44.4 %	12 %w/w	0.4	93 % of bitter SG

Table 1 : Description of parents characteristics, including their names, and genetic cluster (based on Cosson et al., 2019), their dry leaf biomass production, canopy volume, Harvest Index, SG content, sweet SG yield and SG profile (according to Hastoy et al., 2019).

The four full-sib progenies were obtained after field open-pollination (polycross) in 2016 in southwestern France in Lipsothey (44°17'56.9"N 0°53'14.7"W). This experimental field gathers genetic resources of INRAE collection, grown in production conditions. Those genetic resources have flourished during September 2016 and seeds were collected in December on several clones of each female parent, Cult76_GER, Cult102_SPA, Cult34_FRA, Cult103_SPA. Seeds were sowed in April 2017, on moist soil Peltracom (Greenyard Horticulture France SAS) and grown under mini-greenhouse to favor germination. Individual plantlets were re-potted in commercial plug trays containing the same soil and cultivated in greenhouses until plantation date. Fathers were identified using a set of 4 microsatellites markers as described in Cosson et al., (2019) leading to the identification of the 4 full-sibs families corresponding to 328 progenies: Cult76_GER x Cult35_FRA (93 offsprings), Cult102_SPA x Cult35_FRA (69 offsprings), Cult34_FRA x Cult36_FRA (47 offsprings) and Cult103_SPA x Cult36_FRA (119 offsprings), as presented Table 2.

Table 2: Presentation of cross matings, including female and male parents and the number of progenies

Male parent	Cult35_FRA		Cult36_FRA	
Female parent	Cult76_GER	Cult102_SPA	Cult34_FRA	Cult103_SPA
Number of progenies	93	69	47	119

2.2. Progenies phenotyping

■ Experimental design and cultural itinerary

This experiment was conducted from 2017 to 2019 in an experimental field located in Blagon Southwestern France (44°46'30.6"N 0°55'16.6"W). The climate is oceanic with mild winters, with a mean temperature range from 9.3 °C in January 2019 to 30.1 °C in August 2019 (Figure

1). The black sandy soil is airy with a small proportion of organic matter, composed by 90% of coarse and around 10% of fine mud.

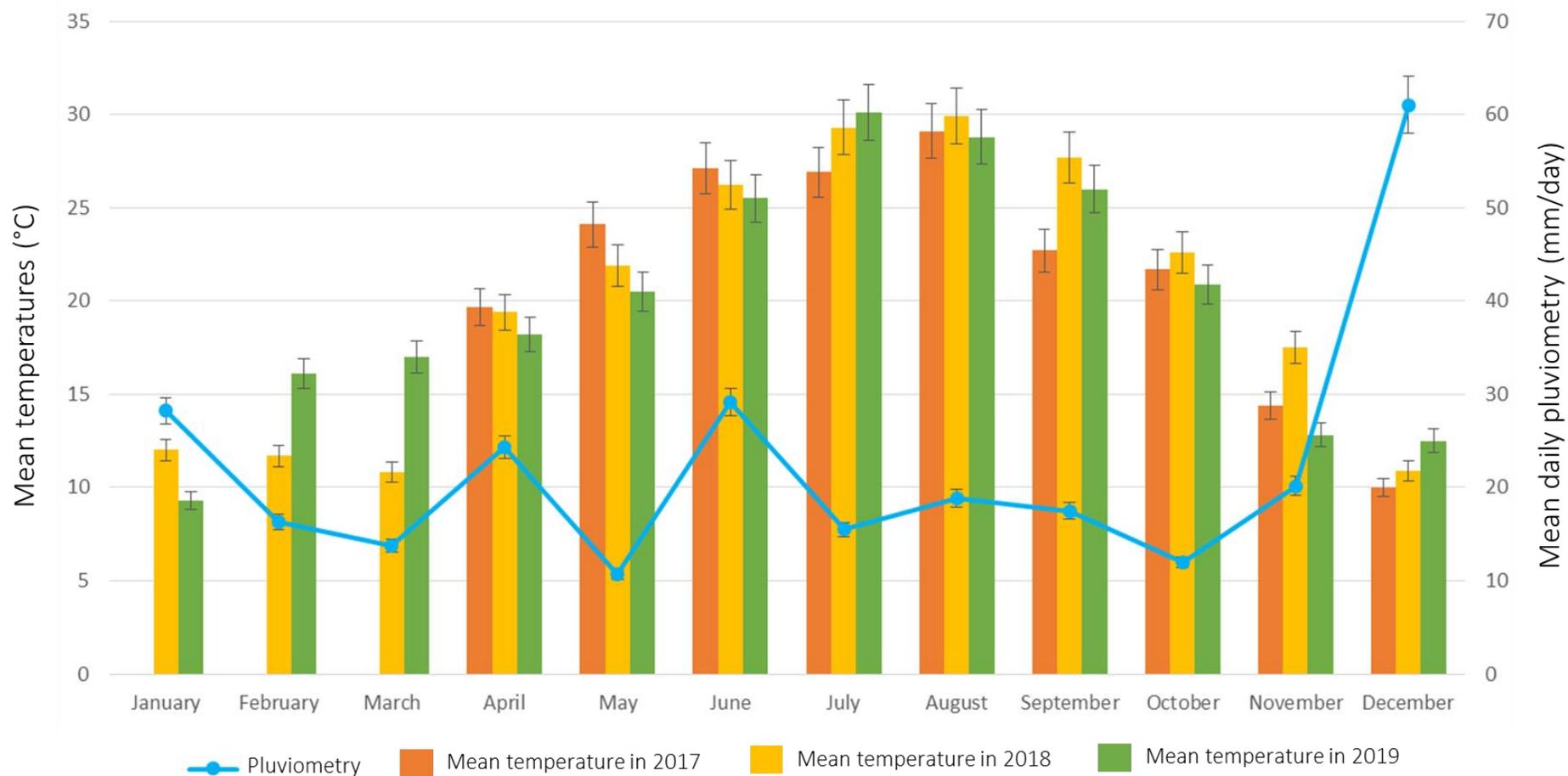


Figure 1 : Monthly temperatures and pluviometry for the three years of production of *Stevia rebaudiana* in the experimental field of Blagon (33), France.

Progenies and parents stem-cuttings were transplanted at 5 nodes stage in July 2017, corresponding to stage 15 of the stevia BBCH scale (Le Bihan et al., 2020). The field was planted with a density at 4 plants / m² on a plastic mulching and a drop-by-drop irrigation. During summer, a 1 L/h per drip irrigation was applied for 1 hour per day, during autumn it was reduced at 30 minutes. In 2017, year of implantation of the field, plants were cut down in December and covered with a winter veil (30 g/m²) until the end of March 2018, time of plants regrowth post-winter. In 2017 and 2018 a fertigation at 40 kg nitrate / ha was applied. In 2019 a foliar fertigation was performed at 5 kg/ha of “High P” (Agroleaf Power). Fungicides were used to stop Septoria Leaf Spot disease, one application of Score®250EC at 0.5 L/ha and three applications of Ortiva®25SC at 1 L/ha were performed each year. Weeds were removed by hand, once a month from regrowth time, March, until harvest time, September.

■ Trait measurements

Stevia population and parents were monitored in 2018 and 2019. Each year, plants were harvested at flower budding phenological stage 50 according to the stevia BBCH scale (Le Bihan et al., 2020), which occurred from end of August to beginning of October. Height (cm), diameter North-South and West-East (cm) of plant canopy were measured, and the number of stems was counted (Table 2). Plants were cut down at 5 cm above the ground. Samples were dried in a UF750 MEMMERT heat chamber at 40°C for 60h. Leaves were manually separated from stems. Leaves and stems dry biomass were weighted. SG’s extraction and quantification protocol carried out as described in Hastoy et al., (2019). SG of each sample were extracted and quantify using a Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) system. This protocol allowed to detect a total of 10 SG: 4 SG considered as sweet by Hellfritsch et al., (2012): RebA, RebD, RebM, RebB, and 5 SG considered as bitter by Hellfritsch et al., (2012): ST, RebC, DulA, Rub, SB and one with undetermined taste RebF. For each sample, proportion of each SG out of total SG were calculated as well as SG content per unit of dry leaf

biomass (% w/w_{dryleaf}). Finally, SG yield (g/plant) was calculated as the product of SG content (% w/w_{dryleaf}) and dry leaf biomass (g) (Table 3). Field measures were used to calculate variables linked to architecture: canopy volume, harvest index and stems density (Table 3).

	Variables	Unit	Description / formula
Raw variables	h	m	Plant height
	ϕ_{NS}	m	North-South diameter
	ϕ_{EO}	m	East-West diameter
	Principal stems number	nb	Nb / plant
	Dry leaf biomass *	g	g / plant
	Dry stem biomass	g	g / plant
Calculated variables	Canopy area	m ²	$\pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2}$
	Canopy volume *	m ³	$\frac{4}{3} \pi \times \frac{\phi_{NS}}{2} \times \frac{\phi_{EO}}{2} \times \frac{h}{2}$
	Harvest Index *	%	$\frac{\text{Economic yield (leaves)}}{\text{Biological yield (leaves + stems)}}$
	SG content *	%w/w	Content of 10 SG : RebA, RebD, RebM, RebB, ST, RebC, DulA, Rub, SB, RebF
	Sweet SG yield *	g/plant	$\text{Leaf biomass} \times (\text{RebA} + \text{RebD} + \text{RebM} + \text{RebB}) \text{ Content}$

Table 3: Presentation of variables, their unity, their formula and their type. The variables presenting an asterisk next to their name are the one included in the analyses

2.3. Statistical analysis

Variance components were estimated with restricted maximum likelihood REML using ASReml version 4.1.0.130 (Butler et al., 2018). The univariate linear model was used to analyze dry leaf biomass, sweet SG yield, SG content, canopy volume and harvest index:

$$y = Xb + Z_1a + Z_2b \times a + e$$

Where y is a vector of observation on a trait (such as dry leaf biomass), b is a vector of fixed effect of overall mean and year, a is a vector of random genetic effects, b x a is a vector of random genotype by year interaction effects. X, Z1, Z2 are known incidence matrices relating the observations in y to effects in b, a, b x a respectively. The random effects in the model defined were assumed to follow a multivariate normal distribution with means and variance defined by:

$$\begin{bmatrix} a \\ b \times a \\ e \end{bmatrix} N \left(\begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 & 0 \\ 0 & I\sigma_{a \times b}^2 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix} \right)$$

Where I is an identity matrix, and A is the additive relationship matrix (A-matrix), linking the random genetic effects to the pedigree information. The A-matrix was constructed using the pedigree, corresponding to the parental knowledges for each progeny, and ainvc functions of asreml package.

In order to check the importance of the pedigree information on the estimation of genetic parameters, our model was also fitted considering an absence of pedigree information. For this second model an Identity matrix I replaced the A-matrix to fit the model without parental information. Models were compared using AIC (Akaike, 1974) and BIC (Schwarz, 1978) criteria. The heritability was calculated according to Cellon et al., (2018) :

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{a \times b}^2 + \sigma_e^2}$$

With σ_a^2 = variance of additive genetic effect; $\sigma_{a \times b}^2$ = variance of genotype x year effect ; σ_e^2 = variance of residual effect

Genetic correlations between traits were estimated using a multitrait model, based on the previous model. For each pair of traits, a bivariate model was fitted using the same factors as presented in the first univariate model. It was written in a way that matrices and vector dimensions reflected the bivariate nature of analyses. A log-likelihood ratio test (LRT), following a Chi square distribution with one degree of freedom and alpha = 0.05, was considered to determine if the genetic correlations were significant.

The expected genetic gain was predicted using the formula given by Xu et al., (2017):

$$\Delta G = i r \sigma_a / L$$

With ΔG the response to selection; i = the intensity of the selection; r = the selection accuracy, corresponding to the square root of narrow sense heritability; σ_a = the genetic standard deviation, corresponding to the square root of genetic variance; and L = time of a breeding cycle. In this model, $L=10$ was applied.

The general combining ability (GCA) was calculated for each male using the following formula (Gardner, 1967; Griffing, 1956; Parsons et al., 2020):

$$g_I = E(Y_{Ij}) - \mu$$

With g_I = the GCA of the male parent I; $E(Y_{Ij})$ = the mean expectation of every crosses realized with the genotype I ; μ = the mean of every crosses.

3. Results

3.1. Population distribution

Phenotypic data were collected from four families which represent 328 individuals. Family size varied from 47 to 119 individuals. Progenies resulted from crossing 6 parents genetically characterized but without deep pedigree information, resulting into four full-sibs populations as presented in Table 3. Cult35_FRA is common male parent crosses with Cult76_GER and Cult102_SPA, and Cult36_FRA is shared by Cult34_FRA and Cult103_SPA. All traits were measured from two successive cropping seasons, corresponding to the second and third year of production for the progenies.

The distribution of five agronomic interest traits for each population over the two years of sampling is presented Figure 2. An important phenotypic variability for all traits within and among families is observed, which was expected in this genetically diverse progenies. For each studied trait, the variability between families is more important than the variability within families (Table A1). The dry leaf biomass is the trait that presented the most variability among families (Table A1). The variability intra-family increases between the second and third year as the difference between lowest and highest values increases in every family (Table A1).

The traits of dry leaf biomass, canopy volume and sweet SG yield are showing significantly increasing mean values from second year of production to third year of production for each family, except for Cult34_FRA x Cult36_FRA (Table A2). Harvest Index trait mean values are increasing from the second to the third year of production for every family, at the exception of Cult102_SPA x Cult35_FRA (Table A2). SG content is the only trait which remains significantly stable among years of production for all families (Table A2).

The largest increase of the mean values between the two years for the trait dry leaf biomass and sweet SG yield was measured for Cult102_SPA x Cult35_FRA family, with a gain of 33.5

g/plant and 2.4 g/plant respectively (Table A1). For the traits canopy volume and Harvest Index, the largest increase between the two years of sampling was measured on Cult103_SPA x Cult36_FRA family, with 0.06 m³ and 4.3 % (Table A1).

The family Cult102_SPA x Cult35_FRA is significantly the best dry leaf biomass producer and its leaf biomass mean reached 121.7 g/plant in third year of production (Table A3). This family presents also the progenies with the significantly largest canopy volume mean in third year of production (Table A3). The highest Harvest Index mean in third year of production is calculated for the Cult34_FRA x Cult36_FRA family at 51.3%. The population Cult102_SPA x Cult35_FRA appears to be the most productive for SG content (Table A3), with a mean value reaching 18.7 % w/w, as well as for sweet SG yield (Table A3), with a mean value at 9.2 g/plant.

Most of progenies presented transgressive segregation for the dry leaf biomass, canopy volume, SG content and sweet SG yield compared to their both parents' values (Figure 2). As an example, Cult102_SPA and Cult35_FRA are the genitors with the best SG content of 15% w/w and 14% w/w in second year of production and their progenies reached the highest mean SG content at 18.8 % w/w (Figure 2). On the contrary, most of progenies presented lower values of Harvest Index than the parental ones.

Some remarkable progenies can be noticed for the traits linked to the SG yield. The highest leaf biomass value was 322.4 g/plant and measured in third year of production on an individual from the Cult76_GER x Cult35_FRA. The cross Cult102_SPA x Cult35_FRA gathers the largest SG content and sweet SG yield producer, with 24.6 % w/w and 22.4 g/plant respectively (Table A1).

Specifically, families sharing the genitor Cult35_FRA presented a higher mean sweet SG yield than the families sharing the Cult36_FRA genitor. The same tendency was observed for dry leaf biomass and canopy volume. On the other hand, families sharing the genitor Cult36_FRA showed higher Harvest Index means. No tendency is observed for the trait SG content.

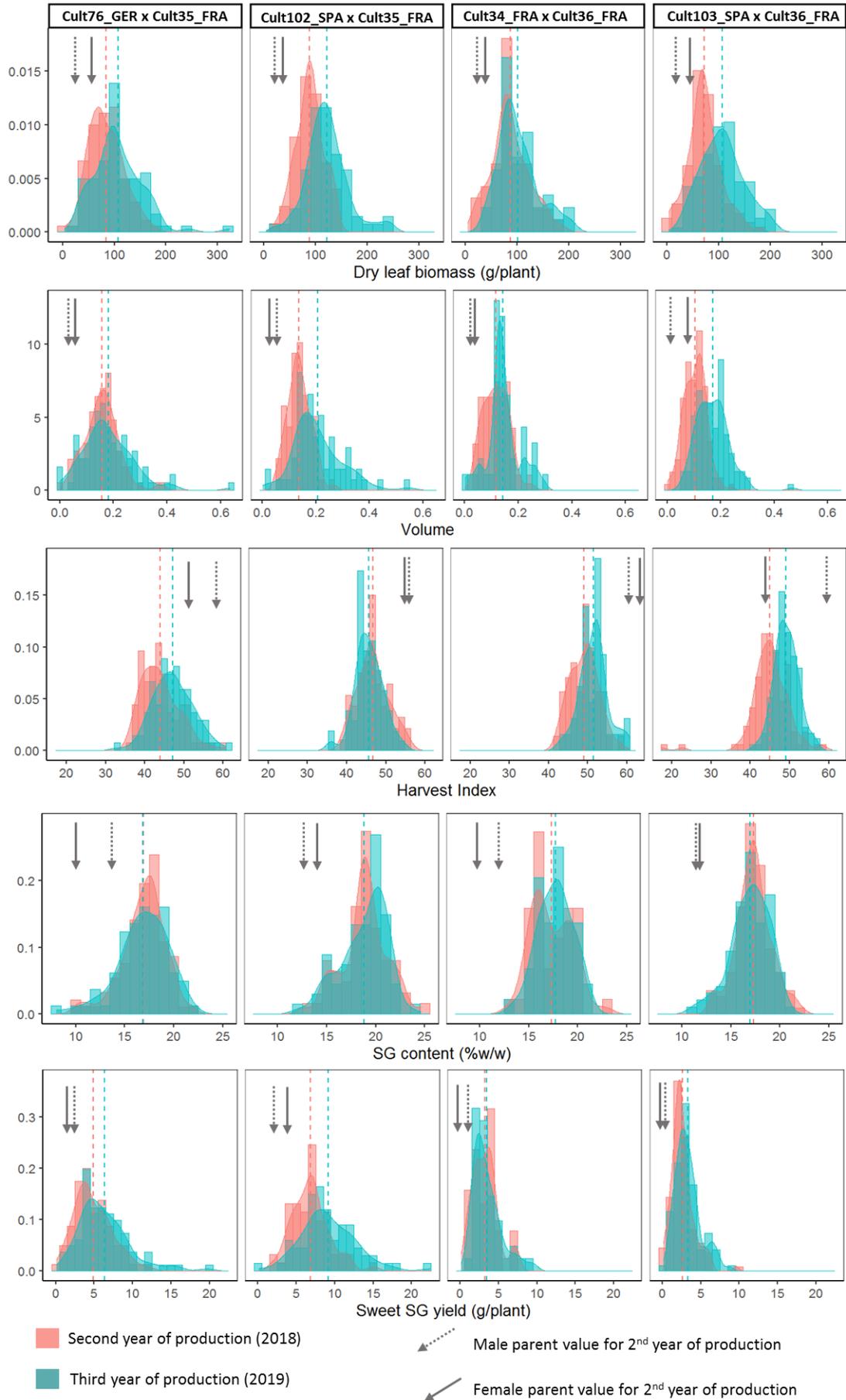


Figure 2: Phenotypic distributions of stevia agronomic and canopy architecture traits for four stevia populations. Dry leaf biomass (g), SG content (% w/w), sweet SG yield (g), canopy volume (m³) and harvest index (%) were measured in 2018 and 2019, corresponding to the second and third years of production, on a field trial localized in Blagon, France. The horizontal lines correspond to the mean of the trait measures for each year. The arrows correspond the parental values.

3.2. Genetic parameters estimations

Model validation

Models fitted considering no pedigree information, with the Identity-matrix instead of the A-matrix, gave higher AIC and BIC values than models including the pedigree information with the use of the A-matrix, for every trait, excepted for the dry leaf biomass (Table 4). The decrease of AIC and BIC indicated the importance of taking into account pedigree information. Thus, in this study, all analyses were performed based on models taking into account parental information.

Table 4: Models comparison based on model selection parameters AIC and BIC for models with different variance and covariance structures for the genetic random term, the pedigree information was used to construct the A-matrix, while no covariance among individuals was considered in the I-matrix (identity matrix).

Trait	AIC		BIC	
	A-matrix	I-matrix	A-matrix	I-matrix
Dry leaf biomass	5512.263	5506.193	5539.404	5533.335
Sweet SG yield	1620.659	1702.802	1647.257	1729.4
SG content	1587.912	1603.124	1614.746	1629.958
Canopy volume	-3190.933	-3187.775	-3163.601	-3160.443
Harvest Index	2608.972	2651.247	2636.104	2678.38

Narrow-sense heritabilities

Variations can be observed for the traits estimations of narrow-sense heritabilities between the two years of measures (Table A4). For most of traits, standard errors are smaller when both years are combined in the analysis (Figure 3). For every studied trait, an important diminution of heritability value is observed in 2019, which is the third year of production of progenies in the experimental field. The canopy volume heritability presents the highest variation between the two years of measures, varying from 0.71 in 2018 to 0.33 in 2019. The foliar biomass and the sweet SG yield present the highest heritabilities in 2018, the second year of production, with value at 0.82 and 0.83 respectively. This close result for heritability calculation is coherent because the foliar biomass production is a direct component of sweet SG yield calculation. The harvest Index and the canopy volume present the lowest heritabilities of studied traits with 0.44 and 0.54 respectively for the calculation of combined years. SG content is the trait presenting the smallest variations among the population and years, ranging from 0.53 to 0.67.

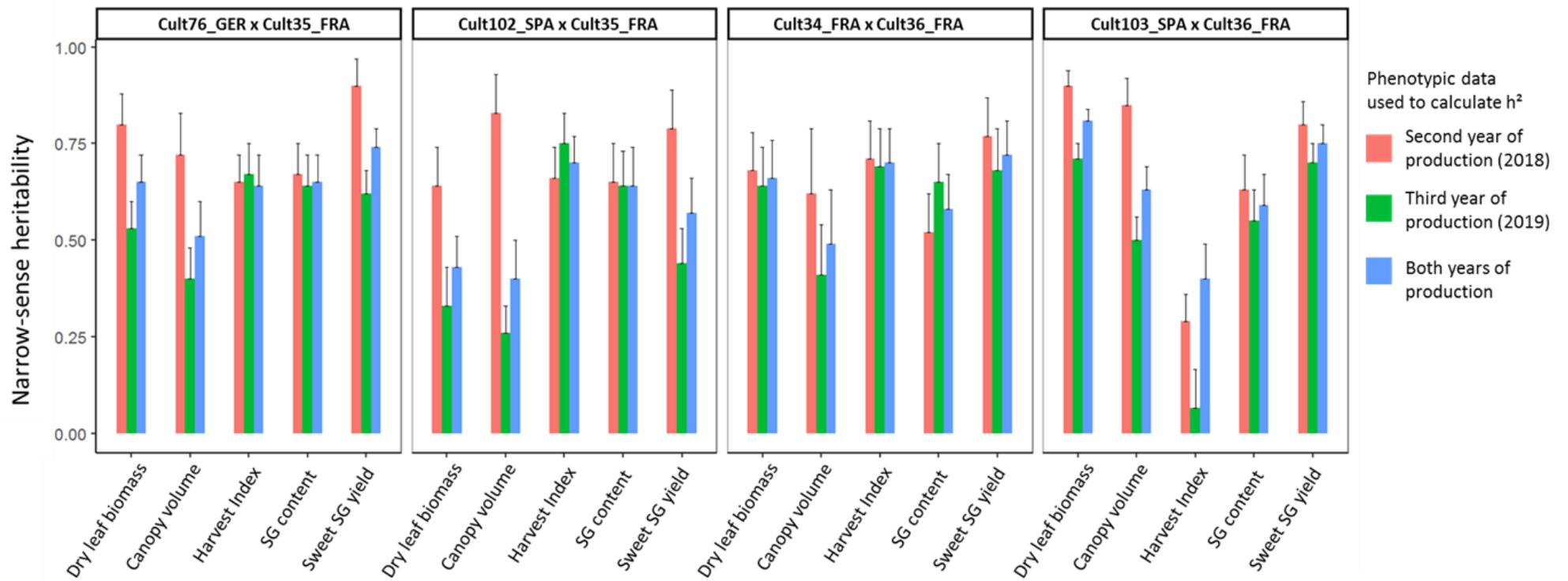


Figure 3: Narrow-sense heritability and its standard errors for dry leaf biomass, canopy volume, Harvest Index, SG content and sweet SG yield, measured in 2018 and 2019 for each family on a field trial localized in Blagon, France

Genetic correlations

Nine out of the ten genetic correlations calculated between the studied traits were significantly correlated (Figure 4), only the correlation between Harvest Index and the SG content was not significant. The two largest genetic correlation were between dry leaf biomass and sweet SG yield (0.82), and dry leaf biomass and canopy volume (0.84). Harvest Index is negatively correlated with every other trait, from -0.13 with SG content to -0.73 with canopy volume. SG content is poorly correlated with traits linked to the biomass production, as dry leaf biomass, canopy volume and harvest index.

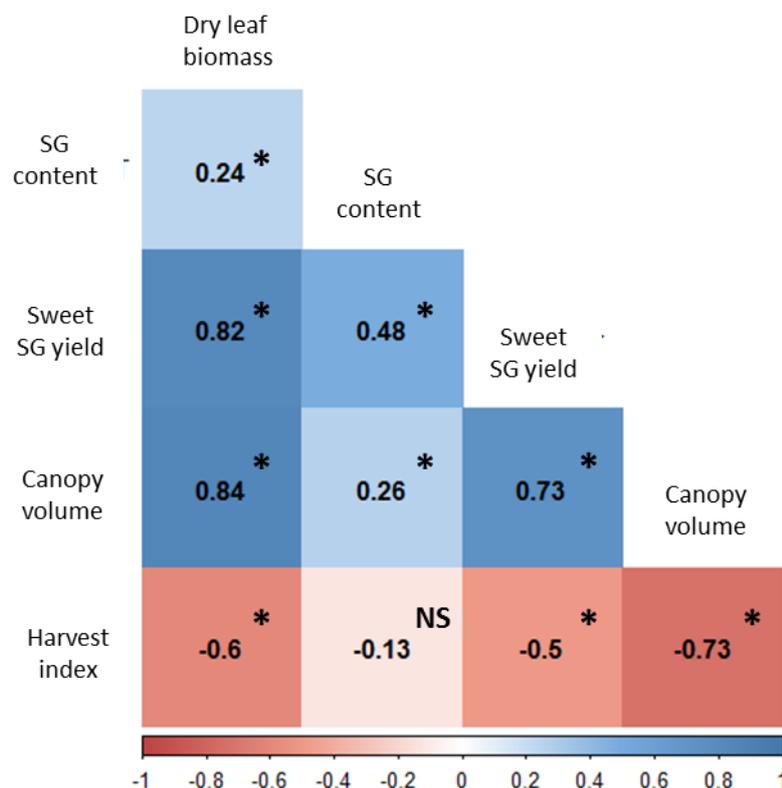


Figure 4: Synthesis of genetic correlation among agronomic traits in stevia: dry leaf biomass, SG content, Sweet SG yield, canopy volume and harvest index. The asterisk (*) indicates a significant correlation according to a log-likelihood ratio test ($\alpha < 0.05$), while the NS label indicates the correlation is not significant.

Genetic gain

The genetic gain increases with increasing selection intensity for each trait linked to SG yield (Figure 5). For every trait, the highest genetic gain was calculated for the highest selection intensity at 0.4, while the smallest genetic gain was calculated for the smallest selection intensity at 0.05. For the trait dry leaf biomass at 0.4 selection intensity, the highest genetic gain rate is 1.54 g and was calculated on the population Cult103_SPA x Cult36_FRA while the smallest was 0.43 g and calculated for the population Cult102_SPA x Cult35_FRA. For the trait SG content at 0.4 selection intensity, the highest genetic gain rate was calculated for the population Cult76_GER x Cult35_FRA at 0.079 % w/w while the smallest was calculated for the population Cult103_SPA x Cult36_FRA at 0.052 % w/w. Finally, the genetic gain rate for the trait sweet SG yield at 0.4 selection intensity ranged from 0.06 g for the population Cult103_SPA x Cult36_FRA to 0.08 g for the population Cult76_GER x Cult35_FRA.

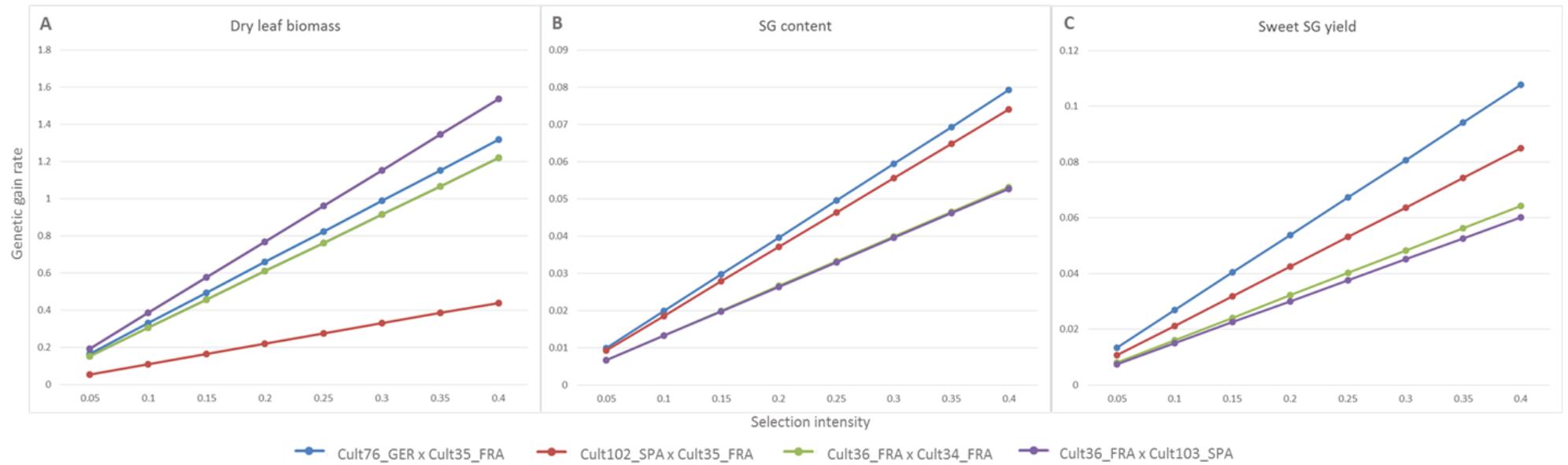


Figure 5: Expected genetic gain rate for dry leaf biomass (A), SG content (B) and sweet SG yield (C) for different selection intensities for the four full-sibs populations. The 10 years was the time of the breeding cycle.

General combining abilities of male parent

The highest GCA values (Table 5) for the traits relative to SG yield were obtained for the Cult35_FRA parent, with 1.83 for the sweet SG yield, 1 for the SG content and 4.22 for the leaf biomass production. Cult36_FRA is the male parent presenting the lowest value with -1.83 for the sweet SG yield, -1 for the SG content and -4.22 for the leaf biomass.

Table 5: General combining ability calculated for each stevia male genitor on the mean values of sweet SG yield, SG content and dry leaf biomass scorings from progenies in the second and third year of production, cultivated in field conditions in southwestern France.

Genetic resources	Type of parents	Sweet SG yield	SG content	Dry leaf biomass
Cult35_FRA	Male	1.83	1	4.22
Cult36_FRA	Male	-1.83	-1	-4.22

4. Discussion

Compared to other crops, interest in breeding and improvement in *Stevia rebaudiana* is relatively recent. It can be dated to around 1970s with the first Eirete and Morita selections in Paraguay and Japan respectively (Casaccia et al., 2016; Morita, 1984; Yadav et al., 2011). Since then, the lack of knowledge about phenotypes and genotypes of genetic resources, but also genetic estimators, can still be noted.

The different crosses, Cult76_GER x Cult35_FRA, Cult102_SPA x Cult35_FRA, Cult34_FRA x Cult36_FRA and Cult103_SPA x Cult36_FRA, are characterized by contrasted parental phenotypes on several traits, and led to a high variability within families and among families. Indeed, for every trait, the variability within families is very important. This high variability must be linked to the allogamy of stevia, and also because this crop has been poorly improved so far (Tavarini et al., 2018). Moreover, the mean value of progenies is more important than the genitors' performances on dry leaf biomass, SG content and sweet SG yield. This result indicates an interesting breeding potential for these traits.

For the dry leaf biomass, the canopy volume and the Harvest Index, there is a global and important increase of the trait value between the second and the third year of production for the four populations. This observation was already performed on the biomass production of two stevia cultivars by Andolfi et al., (2006) who measured an increase of leaf biomass until 6 years of production. The SG content measured for the two years of production is stable in every population studied. The SG content among genetic resources was already characterized with small variations for genetic resources between second year and third year of production (Le Bihan et al., 2021). The sweet SG yield presents a slight increase between the second year and the third year of production. This observation confirms the results of Le Bihan et al., (2021) in which the parents of the crossing were evaluated and showed also an increase for SG yield among years of study.

The progenies phenotypic evaluation allowed to identify remarkable individuals, presenting high performances for the dry leaf biomass, SG content and sweet SG yield, reaching 322.8 g, 24.6 %w/w and 22.4 g respectively. For the trait SG content, Montoro et al., (2013), identified a genotype accumulating until 27% w/w, a higher accumulation than the one observed in the present study. Barbet-Massin et al., (2015), observed in first year of production a genotype from a Criola population reaching a dry leaf biomass at 190 g/plant. As stevia leaf biomass production increases from first to second year of production, this individual should reach a higher leaf biomass production than the best producer measured in second year of production in this study, reaching 182 g/plant.

The phenotyping data of a landrace cultivar permits Brandle and Rosa, (1992) to calculate large-sense heritability (H^2) for leaf yield, leaf/stem ratio and stevioside content, corresponding to 0.75, 0.86 and 0.75 respectively. Brandle, (1999) conducted a study on a F_2 population to decipher the genetic control of RebA and RebC, two SG giving a sweet taste. Gaurav et al., (2008) calculated heritabilities for the leaf yield, stevioside content and plant height and obtained values from 0.93 to 0.99. More recently, in Barbet-Massin et al., (2016), 96 individuals coming from a native population were phenotyped in their first year of production in field trial for SG content and SG profile traits. However, no information is given on the origin of the population and the type of progenies it is, there is no description of the genetic diversity of the parents. In the study of Hastoy et al., (2019), the phenotyping of genetic resources allows to calculate large-sense heritability on traits relative to canopy architecture. The results of this study indicate a heritability of 0.6 for the number of stems, 0.36 for the stem density, 0.55 for the canopy volume, 0.94 for the Harvest Index and 0.92 for the specific stem mass.

The narrow-sense heritabilities (h^2) ranged from moderate to high for all the measured traits and for each population, ranging from 0.33 for the trait canopy volume to 0.83 for the trait SG content. Those results indicate a promising breeding potential, especially for the sweet SG yield.

Indeed this trait heritability ranged from 0.57 to 0.75 among families for the both years of calculations. The canopy volume heritabilities were the lowest, indicating less possibilities for the breeding of this trait. In most of case, the calculations on the second year of production lead to an increased estimation of the heritability, while the heritability value decrease for the third year of production. For perennial crops, traits measures correlations between young and adult stages are often low (Bouvet, 1992; Koubaa et al., 2000), which limit the breeding strategy based on first years of production measures. Stevia can be qualified as semi-perennial crop (Barbet-Massin et al., 2016) in temperate conditions, as a six years cultivation cycle is possible (Andolfi et al., 2006). However, the length of its juvenile stage was never investigated or defined in the literature, but a harvest in first year of production led to a significant decrease of leaf biomass yield and SG yield. For blueberry which has similar cultivation length ranging from 6 to 9 years (Vargas and Bryla, 2015), plants are not harvested in the first year but harvests are realized since the second year of production (Strik and Buller, 2005). In their study on blueberry, Cellon et al., (2018) phenotyped progenies from the second year of production to estimate genetic parameters. Moreover on perennial crops, variations in heritabilities are measured according to the plant age. Peixoto et al., (2018) observed on a perennial shrub, the *Jatropha*, variation of yield heritabilities from 0.17 until 0.65, calculating from phenotypic scorings during five years of measures on progenies. Heritabilities variations between the second and the third year of production were also observed on blueberry progenies for the trait of yield, fruits firmness and fruits diameters (Cellon et al., 2018).

Genetic correlations are a good indicator to study the relation between two traits or the possibility to setting up indirect selection on weakly heritable traits or traits very expensive to measure (Isik et al., 2016). Results showed significant and positive correlations among yield traits, especially between leaf biomass and sweet SG yield showing a significant genetic correlation of +0.84. This correlation is promising for breeding, as an increase of leaf biomass

and sweet SG yield are selection goals for the stevia sector (Tavarini et al., 2018). Moreover, the trait SG content presents low correlations with traits linked to canopy architecture. This information is quite interesting, because a selection can be based on SG content, and will poorly impact the linked leaf biomass traits. However, the positive and significant correlation between leaf biomass and canopy volume could be a brake for the stevia breeding. The agricultural mechanization of stevia production is not well-developed yet, but plants developing a large canopy volume may limit the mechanical weeding possibilities. To our knowledges, this is the first estimations of genetic correlations on stevia.

The estimations of the genetic gain rate are important for each trait linked to the sweet SG yield. So far, breeding on stevia is limited and a quick progress seems accessible in the next decade on the studied traits. The selection intensity choice will result from a compromise between a drastic selection of few individuals with high performances and the necessity to maintain a genetic diversity into the progenies. The rate of the genetic gain was calculated over a breeding cycle length of 10 years. Genetic gain estimations can vary according to several factors such as the population used, heritabilities and its estimation, selection intensity and length of the breeding cycle (Xu et al., 2017). Further analyses will be needed to validate these first results.

In this study, the four full-sibs populations are derived from 4 female parents Cult76_GER, Cult102_SPA, Cult34_FRA and Cult103_SPA and 2 male parents, Cult35_FRA and Cult36_FRA, already positioned in the stevia genetic diversity and described for their phenotypic performances. Indeed, those parents were well-characterized genetically in the study of Cosson et al., (2019), showing they are classified into different genetic groups: Cult76_GER is in the first cluster, Cult35_FRA is in the second cluster and Cult34_FRA, Cult36_FRA, Cult102_SPA, Cult103_SPA are in the third cluster. Parents are also well-known on their performance for yield agronomic traits, as they were deciphered in Hastoy et al., (2019) and Le Bihan et al., (2021).

However, there is a necessity to expand the collection of genetic resources and study progenies coming from a higher diversity of parents. In effect, the gathering of new genetic resources is a vital step for the breeding of a crop, because the genetic diversity available is the basis of the breeding possibilities (Migicovsky et al., 2019). On stevia, only one collection exists, EUSTAS collection which is composed of 6 genotypes including Cult76_GER, which is “Gawi” (Lankes and Grosser, 2015). The collecting of new genetic resources would provide added value to the project. It would allow to perform interesting mating designs such as a top cross design, with a common genotype crossed with exotic ones (Nduwumuremyi et al., 2013). The exchange of plant material with others research teams could also provide a new source of genetic diversity and would permit a better comparison of phenotypic evaluation in several production areas.

Moreover, if Cosson et al., (2019) study permits to characterize the 6 parents of our study into the world genetic diversity of stevia, pedigree information is still missing. Indeed, the parents’ pedigree is not known, so the evaluation of inbreeding levels of progenies is not possible. Pedigree information can be integrated to the models through the construction of the additive relationship matrix A (Henderson, 1975). Comparison of models included or ignored pedigree information indicated that the genetic relationship information lead to an decrease of model selection parameters (AIC and BIC) and of residual variance form each trait studied (Cellon et al., 2018). However, errors in the pedigree is a major issue in breeding program and has been estimated to be 10% on average for tree and fruit crops (Doerksen and Herbinger, 2010; Lacombe et al., 2013), which reduce the accuracy of parameters estimations, as tested on a pine breeding population (Munoz et al., 2014).

The reduced information on pedigree on the culture of stevia goes together with a lake of genetic characterization and traceability. Most of the material exchanged in the world is derived from seeds, which parents are not specified. The lake of traceability is a brake to compare the results of many studies describing stevia genetic resources phenotypes. The genetic material used have

generic names such as Rebaudiana, Sugar Love, AX, or are companies interne material (Libik-Konieczny et al., 2018; Munz et al., 2018), such as Candy of Genesis Seed company (Parris et al., 2016). The generic names do not provide any information about the genetic origin of the stevia individuals studied.

Finally, difficulties encountered for the setting up of stevia breeding are shared with other autoincompatible perennials. Indeed, for those crops, the genetic material used for production is most of the time clonal varieties. Elite individuals are identified for their agronomic performances, and are propagated through cuttings plant production (McClure et al., 2014). The elite clones were most of the time randomly obtained. This strategy was applied for avocado with the “Hass” variety (Talavera et al., 2019), mango (Krishna and Singh, 2007) and cacao (DuVal et al., 2017). This strategy is already setting up into stevia production, and some varieties under patents are vegetatively reproduced, such as the variety STEVILOMM (Lommerse, 2018) and the varieties AKHL1 and AKHL4 (Britos, 2013, 2012). However, this strategy encounters several limits. The costs of cuttings production is higher than the seed propagation one, and requires an important number of mother plants to realize enough cuttings. Moreover, the use of a stable genetic material over years of production favor the emergence of new pathogens, which had the opportunity to evolve genetically, either with sexual reproduction or mutations (McClure et al., 2014; Myles, 2013). Alternative solution to clonal varieties production is the development of synthetic varieties. Those varieties derived from an artificial population, a defined set of parents is selected for their breeding value on agronomic traits (Gallais and Wright, 1980). This strategy allow to maintain some genetic heterogeneity in the population to obtain a resilient system, which is a criteria for organic production (Enjalbert et al., 2011). On stevia, this strategy was already tested and the variety “AC Black Bird” was developed from four different genitors (Brandle, 2001). However, the deployment of this

selection strategy request to gather more information about the genetic resources available and their reproduction potential.

In the future, it would be interesting to evaluate other traits on progenies in order to estimate their genetic parameters values. In European conditions of production, traits such as flower budding stage, survival rate post winter or susceptibility to fungal agents, such as *Septoria* sp., are deeply linked to the stevia crop durability.

References:

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19, 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Andolfi, L., Macchia, M., Ceccarini, L., 2006. Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italian Journal of Agronomy* 1, 257–262.
- Angelini, L.G., Martini, A., Passera, B., Tavarini, S., 2018. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges, in: Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Sweeteners*. Springer International Publishing, Cham, pp. 35–85. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_8
- Annicchiarico, P., 2015. Alfalfa forage yield and leaf/stem ratio: narrow-sense heritability, genetic correlation, and parent selection procedures. *Euphytica* 205, 409–420. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1399-y>
- 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 steviol (PhD thesis).
- 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. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63, 685–694. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0276-9>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133067>
- Barriocanal, L.A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J.T., Jimenez, N., Rojas, V., 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 51, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.02.006>
- Benhmimou, A., Ibriz, M., Al Faïz, C., Gaboun, F., Douaik, A., Amchra, F.Z., 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.

Bouvet, J.-M., 1992. Geno-Phenotypic Regression and Juvenile-Mature Correlations: Methodological Tools for Clonal Selection of Eucalyptus Hybrids in Congo. *South African Forestry Journal* 160, 13–18. <https://doi.org/10.1080/00382167.1992.9630405>

Brandle, J., 2001. *Stevia rebaudiana* with altered steviol glycoside composition. US6255557B1.

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, 85–91. <https://doi.org/10.4141/P98-048>

Brandle, J.E., 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. <https://doi.org/10.4141/cjps92-159>

Britos, E.R.A., 2013. *Stevia* plant named ‘AKH L4.’ USPP23728P3.

Britos, E.R.A., 2012. *Stevia* plant named ‘AKH L1.’ USPP23164P3.

Butler, D.G., Cullis, B.R., Gilmour, A.R., Gogel, B.J., Thompson, R., 2018. ASReml estimates variance components under a general linear 188.

Carrasquinho, I., Lisboa, A., Inácio, M.L., Gonçalves, E., 2018. Genetic variation in susceptibility to pine wilt disease of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) half-sib families. *Annals of Forest Science* 75, 85. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0759-x>

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. IPTA 116.

Cellon, C., Amadeu, R.R., Olmstead, J.W., Mattia, M.R., Ferrao, L.F.V., Munoz, P.R., 2018. Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values in an autotetraploid blueberry breeding population with extensive pedigree data. *Euphytica* 214, 87. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2165-8>

Ceunen, Geuns, 2013a. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products* 76, 1201–1228. <https://doi.org/10.1021/np400203b>

- Ceunen, Geuns, 2013b. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.003>
- Cosson, P., Hastoy, C., Errazu, L.E., Budeguer, C.J., Boutié, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2019. Genetic diversity and population structure of the sweet leaf herb, *Stevia rebaudiana* B., cultivated and landraces germplasm assessed by EST-SSRs genotyping and steviol glycosides phenotyping. *BMC Plant Biology* 19, 436. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2061-y>
- Doerksen, T.K., Herbinger, C.M., 2010. Impact of reconstructed pedigrees on progeny-test breeding values in red spruce. *Tree Genetics and Genomes* 6, 591–600.
- DuVal, A., Gezan, S.A., Mustiga, G., Stack, C., Marelli, J.-P., Chaparro, J., Livingstone, D.I., Royaert, S., Motamayor, J.C., 2017. Genetic Parameters and the Impact of Off-Types for *Theobroma cacao* L. in a Breeding Program in Brazil. *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02059>
- Enjalbert, J., Dawson, J.C., Paillard, S., Rhoné, B., Rousselle, Y., Thomas, M., Goldringer, I., 2011. Dynamic management of crop diversity: From an experimental approach to on-farm conservation. *Comptes Rendus Biologies, Biodiversity in face of human activities / La biodiversité face aux activités humaines* 334, 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.03.005>
- Freitas, R.G., Dias, L. a. S., Cardoso, P.M.R., Evaristo, A.B., Silva, M.F., Araújo, N.M., 2016. Diversity and genetic parameter estimates for yield and its components in *Jatropha curcas* L. *Genetics and Molecular Research* 15.
- Gallais, A., Wright, A.J., 1980. A general approach to the concept of varietal ability for synthetic varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 57, 81–87. <https://doi.org/10.1007/BF00745035>
- Gardner, C.O., 1967. Simplified methods for estimating constants and computing sums of squares for a diallel cross analysis. *Filotec Latinoam* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1103-7>
- Gaurav, S.S., Singh, Y.P., Sirohi, S.P.S., 2008. Genetic variability for yield and quality traits in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Progressive Research* 3, 95–96.

- Gomes, E.N., Moterle, D., Biasi, L.A., Koehler, H.S., Kanis, L.A., Deschamps, C., Gomes, E.N., Moterle, D., Biasi, L.A., Koehler, H.S., Kanis, L.A., Deschamps, C., 2018. Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90, 3249–3264. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170510>
- Griffing, B., 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian journal of biological sciences* 9, 463–493.
- Hastoy, C., Cosson, P., Cavaignac, S., Boutié, P., Waffo-Teguo, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2019. Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Industrial Crops and Products* 128, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.053>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf301297n>
- Henderson, C.R., 1975. Inverse of a Matrix of Relationships Due to Sires and Maternal Grandsires. *Journal of Dairy Science* 58, 1917–1921. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84809-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84809-0)
- Holland, J.B., Nyquist, W.E., Cervantes-Martínez, C.T., 2010. Estimating and Interpreting Heritability for Plant Breeding: An Update, in: *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 9–112. <https://doi.org/10.1002/9780470650202.ch2>
- Isik, F., Bartholomé, J., Farjat, A., Chancerel, E., Raffin, A., Sanchez, L., Plomion, C., Bouffier, L., 2016. Genomic selection in maritime pine. *Plant Science, From genomics to breeding* 242, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.006>
- Jackson, P., Robertson, M., Cooper, M., Hammer, G., 1996. The role of physiological understanding in plant breeding; from a breeding perspective. *Field Crops Research* 49, 11–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(96\)01012-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(96)01012-X)
- Koubaa, A., Zhang, S.Y., Isabel, N., Beaulieu, J., Bousquet, J., 2000. Phenotypic Correlations Between Juvenile-Mature Wood Density and Growth in Black Spruce. *Wood and Fiber Science* 32, 61–71.

- Krishna, H., Singh, S.K., 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — A review. *Biotechnology Advances* 25, 223–243. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.001>
- Lacombe, T., Boursiquot, J.-M., Laucou, V., Vecchi-Staraz, M.D., Peros, J.-P., This, P., 2013. Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 126, 401–14. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1988-2>
- Lankes, G., Grosser, P., 2015. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. *Proceedings of the 8th Stevia Symposium* 167–176.
- Lavini, A., Riccardi, M., Pulvento, C., Luca, S.D., Scamosci, M., d'Andria, R., 2008. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy* 3, 135–143.
- Le Bihan, Z., Cosson, P., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2020. Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/aab.12626>
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kąkol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimiak, A., Sliwiska, E., Pistelli, L., 2018. Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae* 234, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.015>
- Lommerse, H.C., 2018. *Stevia* plant named 'STEVILOMM.' USPP29009P2.
- McClure, K.A., Sawler, J., Gardner, K.M., Money, D., Myles, S., 2014. Genomics: A potential panacea for the perennial problem. *American Journal of Botany* 101, 1780–1790. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400143>
- Migicovsky, Z., Warschefsky, E., Klein, L.L., Miller, A.J., 2019. Using Living Germplasm Collections to Characterize, Improve, and Conserve Woody Perennials. *Crop Science* 59, 2365–2380. <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.05.0353>
- Mintel Global New Products Database, 2017. *Global Food and Beverage Products with Stevia: 2011–2016 Data*. (2017).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.041>

Morita, K.K., 1984. Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. 59034848.

Munoz, P.R., Resende, M.F.R., Huber, D.A., Quesada, T., Resende, M.D.V., Neale, D.B., Wegrzyn, J.L., Kirst, M., Peter, G.F., 2014. Genomic Relationship Matrix for Correcting Pedigree Errors in Breeding Populations: Impact on Genetic Parameters and Genomic Selection Accuracy. *Crop Science* 54, 1115–1123. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.12.0673>

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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.021>

Myles, S., 2013. Improving fruit and wine: what does genomics have to offer? *Trends in Genetics* 29, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.01.006>

Nduwumuremyi, A., Tongoona, P., Habimana, S., 2013. Mating designs: helpful tool for quantitative plant breeding analysis. *Journal of Plant Breeding and Genetics* 1, 117–129.

Pal, P.K., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., Singh, B., Ahuja, P.S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.060>

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>

Parsons, L., Ren, Y., Yobi, A., Hurst, P., Angelovici, R., Rodriguez, O., Holding, D.R., 2020. Production and Selection of Quality Protein Popcorn Hybrids Using a Novel Ranking System and Combining Ability Estimates. *Front. Plant Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00698>

Peixoto, L. de A., Teodoro, P.E., Silva, L.A., Rodrigues, E.V., Laviola, B.G., Bhering, L.L., 2018. *Jatropha* half-sib family selection with high adaptability and genotypic stability. *PLOS ONE* 13, e0199880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199880>

Schwarz, G., 1978. Estimating the Dimension of a Model. *Annals of Statistics* 6, 461–464. <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.063>
- Soejarto, D., 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*, in: *Stevia: The Genus Stevia, Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. CRC Press, pp. 18–39. <https://doi.org/10.1201/9780203165942.ch2>
- Strik, B., Buller, G., 2005. The Impact of Early Cropping on Subsequent Growth and Yield of Highbush Blueberry in the Establishment Years at Two Planting Densities is Cultivar Dependant. *HortScience* 40, 1998–2001. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.7.1998>
- Talavera, A., Soorni, A., Bombarely, A., Matas, A.J., Hormaza, J.I., 2019. Genome-Wide SNP discovery and genomic characterization in avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientific Reports* 9, 20137. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56526-4>
- Tavarini, S., Passera, B., Angelini, L.G., 2018. Chapter 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in *Stevia* by Breeding, in: *Steviol Glycosides: Cultivation, Processing, Analysis and Applications in Food, Food Chemistry, Function and Analysis*. p. 31.
- Tavarini, S., Sgherri, C., Ranieri, A.M., Angelini, L.G., 2015. Effect of Nitrogen Fertilization and Harvest Time on Steviol Glycosides, Flavonoid Composition, and Antioxidant Properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 7041–7050. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02147>
- Vargas, O.L., Bryla, D.R., 2015. Growth and Fruit Production of Highbush Blueberry Fertilized with Ammonium Sulfate and Urea Applied by Fertigation or as Granular Fertilizer. *HortScience* 50, 479–485. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.3.479>
- Xu, Y., Li, P., Zou, C., Lu, Y., Xie, C., Zhang, X., Prasanna, B.M., Olsen, M.S., 2017. Enhancing genetic gain in the era of molecular breeding. *Journal of Experimental Botany* 68, 2641–2666. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx135>
- Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. A review on the improvement of *stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91, 1–27. <https://doi.org/10.1139/CJPS10086>

Supplemental information:

Trait		Dry leaf biomass (g/plant)		Canopy volume (m3)		Harvest Index		SG content (%w/w)		Sweet SG yield (g/plant)	
		2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y
Cult76_GER x Cult35_FRA	Mean	84.1	107.3	0.15	0.18	43.9	47.1	16.9	16.8	4.8	6.3
	Sd	32.9	48.5	0.06	0.09	4.8	5.1	2.24	2.6	2.5	3.4
	Min	9.65	26.56	0.008	0.001	36.3	32.9	10.01	8.0	0.45	1.1
	Max	176.24	322.8	0.38	0.63	60.2	60.8	21.7	21.9	12.2	19.6
Cult102_SPA x Cult35_FRA	Mean	88.2	121.7	0.13	0.20	46.6	45.6	18.8	18.7	6.8	9.2
	Sd	26.4	40.5	0.043	0.09	3.9	3.6	2.35	2.35	2.5	3.7
	Min	24.4	21.7	0.054	0.014	38.8	35.7	12.6	12.1	1.8	0.12
	Max	141.4	246.8	0.26	0.54	55.8	54.5	24.6	23.6	15	22.4
Cult34_FRA x Cult36_FRA	Mean	86.67	101.22	0.11	0.14	49.1	51.5	17.4	17.7	3.2	3.4
	Sd	36.6	38.46	0.04	0.06	3.6	3.6	2.0	1.8	1.64	1.8
	Min	19.33	38.48	0.03	0.003	42.6	42.9	13.2	13.3	0.73	0.9
	Max	182.27	204.8	0.24	0.29	58.2	59.95	22.7	21.2	7.4	9.4
Cult103_SPA x Cult36_FRA	Mean	72.3	107.3	0.11	0.17	44.9	49.2	17.3	16.9	2.6	3.3
	Sd	32.1	40.1	0.04	0.06	5.2	3.04	1.79	1.99	1.47	1.65
	Min	4.1	21.2	0.007	0.06	17.4	41.06	13.04	10.9	0.12	0.35
	Max	178.5	208.1	0.23	0.46	58.8	56.9	22.2	20.7	9.5	8.7

Table A1: Mean, standard deviation, minimal and maximal values of evaluated traits for each population for each year of measure.

Table A2: Results of the Tuckey HSD test for population mean in each year values for each trait. The « S » notation indicates that the population mean values are significantly different between the second and third years of measures, while the « NS » notation indicates that mean values are not significantly different.

	Cult76_GER x Cult35_FRA	Cult102_SPA x Cult35_FRA	Cult34_FRA x Cult36_FRA	Cult103_SPA x Cult36_FRA
Dry leaf biomass (g/plant)	S	S	NS	S
Canopy volume (m3)	S	S	NS	S
Harvest Index	S	NS	S	S
SG content (%w/w)	NS	NS	NS	NS
Sweet SG yield (g/plant)	S	S	NS	S

Table A3: Results of the Tuckey HSD test for multiple comparison between populations' mean values for each trait and each year. The population with the same letter do not show a significant difference in their mean value.

Trait	Dry leaf biomass (g/plant)		Canopy volume (m3)		Harvest Index		SG content (%w/w)		Sweet SG yield (g/plant)	
	2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y	2Y	3Y
Cult76_GER x Cult35_FRA	ab	ab	c	bc	a	a	a	a	b	b
Cult102_SPA x Cult35_FRA	b	b	bc	c	b	a	b	b	c	c
Cult34_FRA x Cult36_FRA	ab	a	ab	a	c	c	a	ab	a	a
Cult103_SPA x Cult36_FRA	a	ab	a	ab	ab	b	a	a	a	a

Trait	Cult76_GER x Cult35_FRA						Cult102_SPA x Cult35_FRA						Cult34_FRA x Cult36_FRA						Cult103_SPA x Cult36_FRA					
	2018		2019		Both		2018		2019		Both		2018		2019		Both		2018		2019		Both	
	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd	h ²	sd
Dry leaf biomass	0.8	0.08	0.53	0.07	0.65	0.07	0.64	0.1	0.33	0.1	0.43	0.08	0.73	0.09	0.6	0.09	0.66	0.08	0.9	0.04	0.71	0.04	0.81	0.03
Canopy volume	0.72	0.11	0.40	0.08	0.51	0.09	0.83	0.1	0.26	0.07	0.40	0.1	0.57	0.1	0.22	0.1	0.32	0.1	0.85	0.07	0.5	0.06	0.63	0.06
Harvest Index	0.65	0.07	0.67	0.08	0.64	0.08	0.66	0.08	0.75	0.08	0.7	0.07	0.8	0.07	0.76	0.06	0.78	0.05	0.29	0.07	0.06	0.1	0.40	0.09
SG content	0.67	0.08	0.64	0.08	0.65	0.07	0.65	0.1	0.64	0.09	0.64	0.1	0.53	0.1	0.67	0.11	0.59	0.09	0.63	0.09	0.55	0.08	0.59	0.08
Sweet SG yield	0.9	0.07	0.62	0.06	0.74	0.05	0.79	0.1	0.44	0.09	0.57	0.09	0.79	0.08	0.66	0.08	0.72	0.07	0.8	0.06	0.7	0.05	0.75	0.05

Table A4: Narrow-sense heritability and its standard errors for dry leaf biomass, canopy volume, Harvest Index, SG content and sweet SG yield measured in 2018 and 2019 for each family.

4.2. Construction d'un idéotype de *Stevia rebaudiana* pour la production en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France par la mise en œuvre de sélection collaborative

4.2.1. Introduction

Les chapitres précédents rendent compte des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche et des nouvelles connaissances développées sur stévia. A court terme, toutes ces informations acquises sur le phénotype d'une collection de ressources génétiques sont autant d'apports pour choisir des génotypes pouvant être cultivés comme variétés clonales dans le Sud-Ouest de la France en Agriculture Biologique. Cependant, le déploiement de quelques génotypes élites sous forme de variétés clonales sur un même territoire a plusieurs limites. Tout d'abord, le coût de ce mode de production des plants est plus élevé que par semis. De plus, les variétés clonales sont peu résilientes face aux stress biotiques et abiotiques (McClure *et al.*, 2014). La stratégie à long-terme du développement de *S. rebaudiana*, est donc de travailler à l'amélioration de cette culture pour développer des variétés synthétiques.

Certains critères de sélection de la stévia ont été décrits dans la littérature (Barbet-Massin, 2015; Tavarini *et al.*, 2018; Hastoy, 2018), et présentés en introduction de ce manuscrit (chapitre 6.3), mais pour l'instant aucun idéotype n'a été développé sur cette culture. Pourtant, l'utilisation d'un idéotype est un outil utile au sélectionneur pour définir les objectifs d'amélioration sur une culture. Etymologiquement, un idéotype est l'idée d'un type, qui se définit par « un ensemble de trait généraux caractérisant un genre d'êtres ou de choses » (CNRTL, 2012). Dans le contexte de l'agronomie, ce concept est développé par Donald, (1968), qui le définit comme « un modèle biologique dont on attend qu'il se comporte de manière prédictible dans un environnement défini ». C'est-à-dire un modèle de variété aux traits optimaux pour répondre à un type de production donné dans un environnement donné. La définition d'un idéotype passe alors par la définition de l'environnement de production de la culture, le design d'un modèle de plante d'après les traits morphologiques et physiologiques connus comme influençant la performance dans cet environnement et la combinaison de ces traits dans un type de plant (Mock and Pearce, 1975).

Le concept d'idéotype a vraiment été adopté en amélioration à partir des années 1980 (Dickmann, 1985) et a été largement utilisé sur les grandes cultures annuelles comme les espèces céréalières (Donald, 1968), le maïs (Mock and Pearce, 1975) ou encore le riz (Janoria,

1989). Mais le concept d'idéotype a également été étendu à d'autres cultures comme le pois chiche (Lather, 2000), la tomate (Suarma *et al.*, 2009). Celui-ci est toujours d'actualité et il est développé aujourd'hui sur de nombreuses cultures très variées. Comme dans la littérature des dernières années, qui présente des idéotypes sur le haricot carioca (Rocha *et al.*, 2019), le lin (Tork *et al.*, 2019) ou le pois (Smitchger and Weeden, 2018).

Chez les plantes pérennes, les chercheurs ont également initié la réflexion sur des idéotypes adaptés à ces espèces. En effet, dès 1985, Dickmann a construit un idéotype pour les arbres forestiers et fruitiers, en se basant sur des traits transférables à toutes les essences. Il les classe en cinq catégories de traits : (1) ceux en lien avec l'efficacité photosynthétique, avec des traits liés à l'architecture de la canopée pour intercepter le plus de lumière du soleil mais aussi des traits sur la forme des feuilles ; (2) ceux liés aux dynamiques puits-sources, avec en particulier les échanges entre les jeunes racines se développant et la partie aérienne ; (3) ceux liés à la compétition avec les autres espèces, il distingue ici les architectures se développant horizontalement avec une canopée dense, étalée, avec un système racinaire étendu, des architectures qui vont se développer verticalement pour dépasser les autres essences forestières ; (4) les traits liés à la phénologie, le débourrement ou la floraison font partie de cette catégorie ; (5) enfin, les derniers traits sont liés aux effets de l'âge, comme le maintien du rendement pour les arbres fruitiers. Dickmann a ensuite appliqué ce modèle d'idéotype au peuplier. Des idéotypes continuent à être publiés pour les plantes pérennes, par exemple, Perez *et al.*, (2018), ont récemment déterminé un idéotype sur l'architecture des palmiers à huile.

Un idéotype s'attache à décrire l'ensemble des traits pouvant être améliorés selon les conditions de culture, cela se traduit par la description d'une très grande variété de traits. Les premiers traits généralement décrits sont liés à la performance agronomique et au rendement, pour le maïs par exemple, Mock and Pearce, (1975) cherchent à définir un idéotype à fort rendement, en ciblant des traits comme la capacité à être planté tôt dans la saison, et une longue période de remplissage des grains. De même, Thurling, (1991) publie un idéotype pour les oléagineux dont l'objectif est l'augmentation du rendement. Dans ce cadre, l'idéotype peut aussi détailler les traits en lien avec le produit fini et son utilisation. Sur la pomme par exemple, Blazek *et al.*, (2007) ont publié un idéotype de pommes résistance aux maladies du stockage. Un idéotype peut également intégrer les traits liés à la sensibilité aux stress abiotiques et biotiques, comme la résistance au gel chez le pois d'hiver trait central dans l'idéotype de Castel *et al.*, (2017). Enfin, Costes *et al.*, (2009) expliquent la nécessité de penser les idéotypes variétaux au sein de leur environnement, et selon les méthodes culturales mises en œuvre, en détaillant l'exemple

du pommier dans un modèle de conduite agronomique faible en intrants. Dans cette même réflexion autour de l'environnement de production, de nombreux idéotypes ont été publiés ces dernières années afin de répondre aux contraintes environnementales du changement climatique. Chez le blé en particulier, de nombreuses publications définissent des idéotypes dans des environnements variés, en Nouvelle Zélande (Senapati *et al.*, 2019), en Europe (Senapati *et al.*, 2020) et en Australie du Sud (Wang, Feng, *et al.*, 2019). Dans le contexte de l'amélioration génétique, l'idéotype permet également de faire un état des lieux des objectifs de sélection et sert de base pour définir les stratégies de l'amélioration sur une culture.

Forts de ce constat, il est aisé de comprendre que plusieurs idéotypes puissent être définis pour une même espèce, selon le mode de production, l'environnement et les objectifs de production définis par la filière dans lesquels elle sera cultivée. La conduite de certaines espèces en Agriculture Biologique a entraîné le développement d'idéotypes qui lui sont spécifiques, c'est le cas du blé dur par exemple (Desclaux *et al.*, 2013; Parrilla *et al.*, 2016).

De plus, le concept d'idéotype n'est pas figé, il est en évolution constante selon les nouveaux enjeux auxquels font face les filières de production. Dickmann, (1985), précise que les idéotypes doivent être dynamiques, et que la publication d'un idéotype est une photo à un instant t d'un processus en évolution. Les idéotypes sont révisés lors de l'acquisition de nouvelles connaissances sur les cultures d'étude. Ces observations peuvent être synthétisées ainsi « un idéotype n'est pas un modèle a priori. Il peut se concevoir et même être remis en question, à la faveur d'observations ou d'étude physiologiques, agronomiques ou génétiques » (Techniques et développement, 1972). Ces dernières années, la réflexion sur les idéotypes a pris en compte les contraintes liées au changement climatique.

Sur stévia, l'initiation de la conception d'un idéotype permet de faire un premier bilan sur les traits cibles pour l'amélioration génétique dans le contexte de production en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France. La démarche mise en œuvre dans la construction d'idéotypes de stévia est celle proposée par Debaeke *et al.*, (2014). Elle se définit par trois grandes étapes : (1) la définition d'un cahier des charges pour les idéotypes de l'espèce, (2) la conception d'idéotypes répondant à ces cahier des charges et (3) l'évaluation de l'adéquation entre les idéotypes et les cahiers des charges.

Le travail présenté ici a été mené pendant la troisième année du doctorat avec plusieurs acteurs engagés dans le développement de la filière de stévia, démarche qui peut être qualifiée de sélection participative (Chable, 2006), c'est-à-dire la construction d'un nouveau rapport entre la recherche institutionnelle, les filières et les réseaux d'agriculteurs. Les premières étapes dans

la construction d'un idéotype pour la filière de la stévia française permettent de faire un premier état des lieux du contexte de production sur le plan pédo-climatique, économique, industriel et réglementaire. La production de stévia dans le Sud-Ouest de la France est structurée autour de l'association SweetVia, qui regroupe les producteurs, et de l'entreprise Oviatis, qui réalise la transformation et la commercialisation de la stévia. Ce sont les personnes travaillant dans ces structures qui sont le mieux placées pour réfléchir aux traits à améliorer sur la stévia, et qui peuvent apporter à la réflexion des critères de sélection. C'est pourquoi la réflexion a été menée collectivement avec les différents acteurs de la filière : Aurélie Barada, productrice et présidente de l'association SweetVia, Cécile Hastoy, responsable R&D Filière Amont chez Oviatis, Zoé Le Bihan, doctorante chez Oviatis / INRAE et Stéphan Plas, Chef de groupe Légumes Plein Champ chez Invenio. Ce travail en commun a permis la définition d'un cahier des charges, présentant les objectifs de sélection pour la stévia produite dans le Sud-Ouest de la France. Il a également permis de construire une première version d'un idéotype, présentant les traits à cibler sur cette culture. Ce travail est une première base, qui devrait servir pour orienter les stratégies d'amélioration de la stévia dans la suite du projet. Il ne manquera pas d'être ré-évalué selon les avancées de la connaissance sur cette culture.

4.2.2. Démarche pour la co-construction d'un idéotype avec les acteurs de la filière

4.2.2.1. Cahier des charges pour la constitution d'un idéotype de stévia

4.2.2.1.1. Contexte de la filière dans le Sud-Ouest de la France

La construction d'un idéotype de stévia s'inscrit dans un contexte de développement d'une filière de production et de transformation de stévia en Agriculture Biologique (AB) dans le Sud-Ouest de la France. Ce projet prend forme en 2012 avec la création d'Aquitaine Stévia Innovation (ASI), ayant pour objectif de regrouper les acteurs impliqués dans la filière de la stévia en Nouvelle Aquitaine. Au sein du projet ASI se trouve SweetVia, l'association de producteurs de stévia de la région Nouvelle-Aquitaine, et Oviatis, une entreprise de transformation et commercialisation de la stévia, créée en 2013. La production de stévia étant encore très récente en Europe, il était nécessaire d'améliorer les connaissances sur sa production pour proposer à la filière des géotypes adaptés aux conditions environnementales, permettant une production économiquement viable. Des connaissances techniques sur l'itinéraire cultural optimal pour la Nouvelle-Aquitaine et les équipements nécessaires pour le mettre en œuvre sont également indispensables. Quatre grandes thématiques sont alors identifiées, comme le présente Hastoy (2018). La première est de rassembler et d'étudier le plus de ressources génétiques possible dans les conditions de production locales, la seconde est l'amélioration des itinéraires culturaux, la troisième doit permettre d'identifier les stress biotiques et abiotiques pouvant impacter la production, enfin la quatrième vise à la mise en place d'un programme d'amélioration de *S. rebaudiana* pour la filière de Nouvelle-Aquitaine.

Suite aux constats du faible niveau de connaissances sur la culture de stévia en Europe, Oviatis crée des partenariats avec des acteurs locaux de la recherche et du développement en agronomie afin de travailler sur ces thématiques. Les stations expérimentales Fruits et Légumes d'Invenio sont impliquées dans ASI (pôles du Lot-et-Garonne et des Landes) afin de développer des connaissances sur l'itinéraire cultural de la stévia en AB dans ce nouvel environnement. Invenio s'est particulièrement investi dans la maîtrise de la septoriose en AB, ainsi que les solutions techniques permettant une meilleure survie à l'hiver. La Chambre d'Agriculture du Lot-et-Garonne soutient également la filière ASI, notamment sur le matériel pouvant être utilisé et partagé entre les agriculteurs, et concernant les problématiques spécifiques de l'AB. L'UMR Biologie du Fruit et Pathologie (BFP) de l'INRA, devenu INRAE, de Villenave d'Ornon, est investie dans le projet, à travers l'investissement de Valérie Schrudi-Levraud et Dominique Rolin. L'INRAE a pour objectif la mise en place d'un programme de sélection et d'amélioration de *S. rebaudiana* en Nouvelle Aquitaine. Ce partenariat avec l'INRAE débouche sur un projet

de doctorat réalisé entre 2015 et 2018 par Cécile Hastoy. Cette thèse a permis le développement d'outils de phénotypage sur des traits de performances agronomiques et de stress biotiques, et l'évaluation des performances de la collection de stévia de l'INRAE. Enfin, en aval de la production agricole, Rouages intervient pour développer un processus d'extraction industriel des SG compatible avec les critères de l'AB.

A ce jour, la filière ASI est en pleine restructuration. Comme présenté dans un dossier soumis à l'Agence Bio en décembre 2019, la filière ASI s'organise à présent autour de deux acteurs : l'association Sweet Via structurant la filière de production agricole de stévia, et l'entreprise Oviatis, axée sur la transformation et la commercialisation de la stévia. A l'avenir, Sweet Via fournira les plants aux producteurs, interagira avec les structures de R&D en agronomie comme Invenio, la Chambre d'Agriculture mais aussi la ferme de référence de production (EARL de Gaffier – Aurélie Barrada), afin de proposer des conseils techniques aux producteurs, ou encore d'investir dans du matériel commun. Cette association regroupe la production des producteurs pour la revendre à Oviatis. A long terme, son objectif est de devenir une organisation de producteurs OP, pouvant représenter les producteurs de stévia. De son côté, Oviatis centralise les activités de transformation des feuilles de stévia. Plusieurs transformations sont réalisées, un séchage et broyage permet de proposer de la poudre de feuilles, des infusettes, une extraction des SG permet de proposer une infusion liquide concentrée, enfin des extraits de SG concentré à 95% représente le niveau le plus transformé. Ces produits sont distribués directement dans des magasins spécialisés en produits issus de l'AB. Face aux barrières législatives, qui rendent impossible la vente à d'autres entreprises de transformation, Oviatis développe sa propre gamme de produits pour proposer des sirops « zéro sucre ».

4.2.2.1.2. *Les variétés de stévia utilisées aujourd'hui*

Les variétés de stévia aujourd'hui utilisées dans le monde sont surtout sélectionnées pour une production dans des conditions pédoclimatiques éloignées de celles de l'Europe, et adaptées à un ITK conventionnel. Les plants utilisés dans la filière de la Nouvelle Aquitaine sont des plants collectés au début du projet et dont l'étude en parcelle expérimentale a montré des performances adaptées aux exigences de la production. Les plants sont produits par bouturage à partir de pieds mères en pépinière, car la multiplication végétative est à aujourd'hui le seul système de reproduction permettant d'avoir des plants homogènes pour les caractères d'intérêt. Cependant, ces plants n'ont pas été améliorés pour ce contexte de production. En effet, ils sont issus d'une sélection suite à une évaluation phénotypique conduite dans deux conditions environnementales pendant deux années. Les travaux de thèse de Cécile Hastoy ont montré une variabilité

phénotypique très importante au sein de la collection de ressources génétiques de stévia évaluées sur les traits d'intérêt agronomique, et ces observations ont été confirmées par les résultats de cette thèse. Si la part de l'environnement dans la variabilité observée sur ces traits est faible, le potentiel d'amélioration de stévia pourrait permettre de développer des variétés plus adaptés aux conditions de production.

L'utilisation d'un idéotype est un bon outil pour définir les objectifs d'amélioration. Un idéotype est « un modèle biologique dont on attend qu'il se comporte de manière prédictible dans un environnement défini » (Donald, 1968). Un idéotype est donc une liste de caractère à cibler pour améliorer la production. La définition de cet idéotype doit d'abord passer par la définition du contexte d'utilisation (Partie 1). Ensuite, les acteurs de la filière impliqués dans cette réflexion seront présentés (Partie 2). La construction d'un cahier des charges, une liste d'objectifs auxquels doit répondre l'idéotype, sera défini en concertation entre les différents acteurs (Partie 3). Enfin, ce cahier des charges va permettre de construire un idéotype, base de travail pour le programme d'amélioration.

4.2.2.2. *Contexte d'utilisation des variétés*

4.2.2.2.1. *Contexte environnemental et agronomique*

Le contexte d'utilisation des variétés de stévia se définit par plusieurs axes. Actuellement, la zone de production privilégiée de la stévia en AB est localisée dans le Sud-Ouest de la France : Lot-et-Garonne (47), Gers (32), Pyrénées-Atlantiques (64). Cette zone présente un climat tempéré, avec des hivers qualifiés de doux et une pluviométrie importante. Ces dernières années cependant ont été plus extrêmes dans le climat avec des étés plus chauds et secs et une pluviométrie plus importante. La stévia est cultivée chez des producteurs ayant une grande diversité de type de sols pouvant être définis comme argilo-calcaire, limoneux, boulbène ou encore sableux. Le système de production de la filière est en Agriculture Biologique uniquement. Il est donc plus sensible aux agents fongiques. Deux agents fongiques sont particulièrement problématiques dans cette zone : *Septoria* sp., qui est une agent fongique se développant sur la partie aérienne du plant et en particulier les feuilles, et *Athelia roflsii*, qui est un champignon tellurique.

4.2.2.2.2. *Contexte économique*

Les débouchés de la production de stévia sont assez divers : on retrouve le domaine de l'industrie agro-alimentaire, la grande distribution, le domaine des compléments alimentaires mais aussi la cosmétique.

Deux types de produits transformés sont identifiés pour la vente :

- Le premier est un produit faiblement transformé, les feuilles récoltées sont simplement séchées, voire coupées pour être vendue en infusettes, ou en vrac. Ce produit doit présenter un goût sucré mais pas trop prononcé pour éviter un goût écœurant. Ce produit est plutôt distribué en circuit court (peu d'intermédiaires).
- Le deuxième est un produit nécessitant plus de transformations, les feuilles sont séchées puis préparées en infusion pour extraire les glycosides de stéviol. L'infusion peut être incorporée à des préparations en IAA ou être purifiée pour obtenir une poudre de glycosides de stéviol. Ce produit est plutôt distribué à d'autres industriels pour incorporation dans ces préparations.

Les acteurs économiques visés sont la grande distribution, les magasins spécialisés en bio, des particuliers (via le site d'Oviatis), ainsi que des industriels de l'IAA pour transformation.

4.2.2.2.3. *Contexte réglementaire*

Le contexte réglementaire autorise la vente de feuilles non transformées (type infusettes) en UE et sous le label bio. La vente des SG purifiés est autorisée en UE mais uniquement en conventionnel, ils doivent être identifiés sous le code E960. Une demande d'Oviatis est en cours pour intégrer les glycosides de stéviol sous label AB dans l'annexe 8 des additifs alimentaires. Celui-ci doit respecter les normes de pureté à 95% en SG et de composition en SG, validés par les règlements de l'UE. Le règlement 2016/1814, modifiant l'annexe du règlement n°231/2012 et du règlement n°1333/2008, autorise la commercialisation de 11 SG (soit les 10 SG dosés ici plus le RebE) à une pureté de 95%.

4.2.2.3. Acteurs impliqués dans la démarche

4.2.2.3.1. Présentation des acteurs



Zoé Le Bihan

Doctorante en thèse CIFRE dans le cadre de la collaboration entre l'INRAE Villenave d'Ornon et Oviatis

- Développement de connaissances sur les génotypes de stévia
- Développement d'outils pour étudier la plante



Cécile Hastoy

PhD, Responsable R&D Filière Amont chez Oviatis

- Transfert de connaissances entre instituts de recherche, producteurs et transformateurs
- Recrutement, formation, suivi des producteurs
- Suivi des pépiniéristes
- Développement des connaissances sur les génotypes à l'échelle de production (pépinière et plein champ)
- Développement de la sélection massale et production de semences à visée d'amélioration variétale



Aurélié Barada

Agricultrice, gérante de l'EARL de Gaffier et présidente de SweetVia

- Production de stévia depuis 2017
- Ferme de référence : visites sur l'exploitation, conseils aux producteurs, collectes de données techniques et économiques



Stéphane Plas

Chef de groupe Légumes Plein Champ – Invenio

- Mise en place des essais sur la conduite de culture de la stévia en AB
- Maintien d'une parcelle de ressources génétiques de stévia

4.2.2.3.2. *Contraintes et motivations des acteurs*

Chacun des acteurs a listé ses contraintes et ses motivations sur le projet.

Acteur : Cécile Hastoy
Contraintes (techniques, humaines...)
Humaine : 1 seule personne Oviatis à 60-75% sur l'amont avec renfort de service civique
Technique : peu de techniques analytiques possibles en interne (gravimétrie et HPLC)
Structuration de filière en cours
Motivations
Participer au développement de produits alternatifs sains et naturels dans une démarche écoresponsable, et proposer une culture de diversification aux producteurs
Améliorer et stabiliser la production agricole ainsi que la qualité de la feuille
Améliorer et stabiliser la production de plants
Synthétiser et prendre en compte les contraintes, exigences de tous les acteurs de la filière
Optimiser la mécanisation de la filière
Atteindre la rentabilité économique pour tous les acteurs

Acteur : Aurélie Barada (en tant que productrice)
Contraintes (techniques, humaines...)
Humaine : besoin de main d'œuvre sur l'exploitation agricole
Technique : manque de connaissances sur le comportement de la stévia
Motivations
Optimiser la mécanisation
Améliorer la qualité des feuilles récoltées
Se perfectionner dans la reconnaissance des maladies de la stévia et savoir comment les éviter / les supprimer

Acteur : Aurélie Barada (en tant que présidente de SweetVia)
Contraintes (techniques, humaines...)
Humaine : une restructuration est en cours, il faut donc pouvoir former une équipe soudée et disponible
Technique : Trouver un site adapté aux nouvelles activités de l'association
Motivations
Renforcer l'adhésion des producteurs à l'association
Maîtriser la collecte des récoltes et le séchage
Proposer une réelle commercialisation collective de la stévia
Perfectionner et développer la production de plants

Acteur : Zoé Le Bihan
Contraintes (techniques, humaines...)
Equipe de l'INRAE travaillant sur le développement des outils d'étude en phénotypage et en génotypage sur stévia est composée de 4 personnes dont 3 en temps partiel sur le projet
La production et la plantation de descendances demandent une anticipation d'au moins deux années pour produire les parents puis planter les descendances sur une parcelle expérimentale
De nombreux outils moléculaires et phénotypiques manquent sur cette culture du fait du faible développement de la communauté en recherche publique
En thèse CIFRE, contrat limité à 3 ans
Motivations
Développer des outils pour améliorer le phénotypage
Mieux décrire les ressources génétiques que l'on possède pour orienter la sélection
Poursuivre l'étude des descendances plantées en parcelle expérimentale pour développer les connaissances sur l'architecture génétique des traits du rendement chez stévia
Transférer ces connaissances et ces outils à la filière pour une utilisation par les producteurs

Acteur : Stéphan Plas
Contraintes (techniques, humaines...)
Le projet stévia est une activité secondaire d'Invenio
Pas d'autofinancement de la part de la filière dans le projet
Pas de référent dédié
Eclatement des expérimentations entre les stations de Ychoux et Sainte-Livrade
Peu de recul en agriculture biologique sur stévia
Eloignement croissant des lieux de production
Motivations
Défi technique
Développement d'une culture de diversification en agriculture biologique
Environnement scientifique motivé

4.2.2.4. Cahier des charges des idéotypes

Ce cahier des charges a été construit avec les acteurs présentés dans la partie précédente. Une première version a été proposée par Zoé Le Bihan aux autres intervenants. Cette version a servi de base aux échanges et débats, qui ont conduit à la production de plusieurs versions intermédiaires avant la validation de ce document permettant un compromis pour tous les intervenants. Ces échanges ont également permis aux acteurs de partager leurs visions et leurs points de vue.

Hiérarchisation	Objectifs fixés pour la plante	
1	Proportion élevée en glycosides de stéviol sucrés (RebA, RebM, RebD, RebB): supérieure à 50% du profil en glycosides de stéviol total	
2	Forte survie à l'hiver (+ de 90% après le premier hiver) Faible pertes pendant l'hiver	
3	Tolérance aux agents pathogènes - les agents fongiques : la septoriose (<i>Septoria</i> sp.) et la sclerotiniose (<i>Athelia rolfsii</i>) - Symptômes de « mort subite » (cause à identifier)	
4	Augmenter le rendement en glycoside de stéviol totaux Rendement supérieur à 5 g/plant en deuxième année de production	
5	Adapter l'architecture du plant aux contraintes de mécanisation de la production -Architecture du plant adaptée aux outils de désherbage, au système de récolte -Production mécanisée → favoriser les architectures au port droit pour faciliter le désherbage -Branches non cassantes en première année de production et tolérance à la verse en 1 ^{ère} année - Deux types de récoltes : soit uniquement des feuilles, soit des tiges et des feuilles, l'architecture correspondant à ces modes de récolte peut varier	
6	Teneur en SG (%w/w)	
	Pour une extraction et une purification → teneur maximale	Pour les produits de culture (consommation de feuilles) →

	au moins atteignant 18 à 20 % w/w	teneur comprise entre 12% w/w et 14% w/w
7	Propagation de plants homogènes Levée (graine) ou enracinement (bouture) et croissance rapide en serre	
8	Bonne compétitivité par rapport aux adventices En particulier lors des premiers stades de développement (implantation / reprise) à travers la vigueur de croissance, puis par l'étalement du plant (ombrage du sol)	
9	Variétés synthétiques Lots de graines issus de deux ou plusieurs parents se reproduisant bien ensemble, lots donnant des plants homogènes en performances	
10	Phénologie du plant -Variétés ou ressources génétiques avec une phénologie homogène, pour que les stades de développement soient atteints en même temps -Reprise à partir de fin mars – début avril pour éviter les gelées tardives -Floraison tardive pour augmenter la durée du cycle végétatif	

4.2.2.5. Construction des idéotypes en réponse au(x) cahier(s) des charges

Dans cette partie de la construction d'un idéotype, l'objectif est de considérer chacun des objectifs déterminés dans l'étape précédente et d'y associer des caractères cibles pour la plante. L'objectif n'est pas d'obtenir une plante réalisable scientifiquement, mais de dresser le portrait de la variété « idéale » pour la production.

Objectif	Caractères / Variables à mesurer
Proportion élevée en glycosides de stéviol sucrés (RebA, RebM, RebD, RebB)	-% SG sucrés / SG totaux qui doit être supérieur à 50% - Profil riche en RebD, RebM, RebA, RebB et pauvre en ST, RebC, DulA, Rub, SB.
Forte reprise après l'hiver (+ de 90% après le premier hiver)	-% de reprise / année consécutive est très élevé

<p>Tolérance aux agents pathogènes et en particulier les agents fongiques</p>	<p>-Faible score de symptômes (%) contre les agents fongiques</p> <p>-Tolérance des traitements biologiques anti-fongiques</p> <p>-Architecture aérée limitant la durée d'humectation des feuilles</p>			
<p>Augmenter le rendement en glycoside de stéviol totaux</p>	<p>-75% du rendement en SG est expliqué par la production de biomasse foliaire</p> <p>-Fort rendement en biomasse foliaire sèche (+ de 40g/plant en deuxième année)</p> <p>-Fort harvest index</p> <p>-Taux de croissance élevé (Relative Growth Rate %)</p> <p>-Production de biomasse foliaire croissante ou stable à l'échelle de la durée de vie de la parcelle (+ de 5 ans)</p>			
<p>Adapter l'architecture du plant selon les contraintes de mécanisation de la production</p>	<p>-Tolérance aux désherbages précoces mécaniques ou thermiques : développement racinaire rapide en première année</p> <p>-Tiges non lignifiées en première année, ne cassant pas lors du désherbage mécanique</p> <p>-Peu sensible à la verse</p> <p>-Choix architecture selon mode de récolte :</p> <table border="1" data-bbox="630 1350 1394 1792"> <tr> <td data-bbox="630 1350 1023 1792"> <p>Récolte et séchage uniquement des feuilles :</p> <p>Tiges souples et non cassantes avec la récolteuse, évitant de réaliser un deuxième tri sur après le séchage. Feuille avec un pétiole long et rigide.</p> </td> <td data-bbox="1023 1350 1394 1792"> <p>Récolte + séchage commun des tiges et feuilles :</p> <p>Tiges plus lourdes et rigides, permettant une séparation des feuilles et des tiges lors du séchage par la masse.</p> </td> </tr> </table>		<p>Récolte et séchage uniquement des feuilles :</p> <p>Tiges souples et non cassantes avec la récolteuse, évitant de réaliser un deuxième tri sur après le séchage. Feuille avec un pétiole long et rigide.</p>	<p>Récolte + séchage commun des tiges et feuilles :</p> <p>Tiges plus lourdes et rigides, permettant une séparation des feuilles et des tiges lors du séchage par la masse.</p>
<p>Récolte et séchage uniquement des feuilles :</p> <p>Tiges souples et non cassantes avec la récolteuse, évitant de réaliser un deuxième tri sur après le séchage. Feuille avec un pétiole long et rigide.</p>	<p>Récolte + séchage commun des tiges et feuilles :</p> <p>Tiges plus lourdes et rigides, permettant une séparation des feuilles et des tiges lors du séchage par la masse.</p>			
<p>Teneur en SG (%w/w) Extraction - Purification</p>	<p>-Teneur en SG maximale jusqu'à 18-20 % w/w ou même plus</p> <p>- Limitation de la présence d'impuretés de poids moléculaires proches de celui des SG</p>			

Teneur en SG (%w/w) Produit de culture	-Teneurs en SG entre 12 et 14 % w/w sont ciblés
Propagation de plants homogènes (pour la production de variétés clonales)	-Homogénéité de développement en pépinière -Si plants issus de semis : la germination des graines arrive en même temps -Si variétés clonales : facilité de bouturage et développement rapide des jeunes boutures
Compétitivité aux adventices	-Choix de plants développant une importante surface de canopée lors des premiers mois de culture peut permettre une bonne compétition avec les adventices -Détermination de la meilleure interaction entre la densité de plantation et l'architecture des géotypes.
Variétés synthétiques	-Identifier des parents avec une floraison précoce, permettant une maturation de graines suffisantes, et simultanée entre les parents - Les semences obtenues présentent un taux de germination élevée -Les semences supportent toutes les étapes de la préparation des semences et des semis : récolte, tri, ébarbage, enrobage, semis automatisé -La construction d'un idéotype spécifique pour ces parents envisagée pour les perspectives de l'amélioration de la stévia
Phénologie du plant	-Plants avec une reprise moyenne (avril) sera privilégiée en utilisant des ressources génétiques ayant les mêmes périodes de reprise sur une même parcelle, ce qui permet de faciliter la conduite culturale -La date de floraison n'est pas un critère pour la production actuellement

Ces informations ont été synthétisées dans un visuel, pouvant être facilement communiqué à la filière.

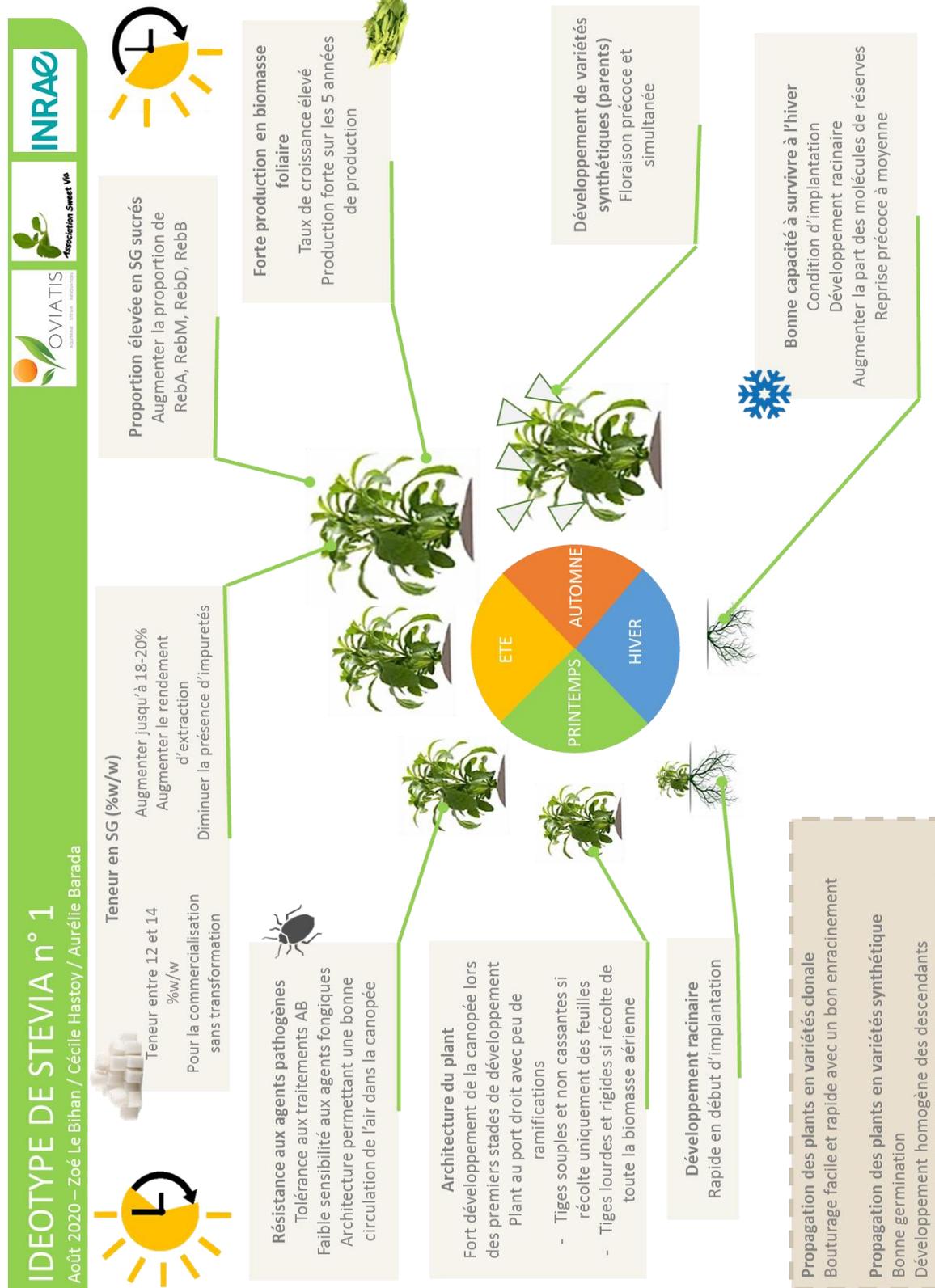


Figure 4.2.2.5: Fiche technique permettant une synthèse des propositions sur l'idéotype de stévia dans le contexte de production de la filière en Agriculture Biologique du Sud-Ouest de la France

4.2.2.6. Conclusion et perspectives sur la construction d'un idéotype de stévia

La prochaine étape à mener sur ce projet est de finaliser l'étape de conception de l'idéotype en déterminant pour chaque trait quels sont les leviers génétiques et les leviers cultureux pouvant être utilisés pour orienter la sélection, comme cela est proposé par Debaeke *et al.*, (2014) (Figure 4.2.2.6). Les auteurs distinguent alors les idéotypes variétaux ou cultureux, selon les leviers mis en œuvre. Cette étape doit de nouveau mobiliser les connaissances de différentes disciplines et le dialogue entre les acteurs de ces disciplines. Dans le cadre de la stévia, ces informations pourront provenir des connaissances produites dans le cadre de ce projet, mais également de la littérature publiée sur stévia ou sur ces espèces apparentées.

Debaeke *et al.*, (2014) décrivent plusieurs méthodes pouvant être mises en œuvres : (1) la conception par dires d'experts, (2) la conception basée sur les résultats d'expérimentations, (3) et enfin la conception par modèle, en construisant des modèles décisionnels éco-physiologiques, pouvant simuler les traits ou les associations de traits répondant le mieux aux objectifs de sélection.

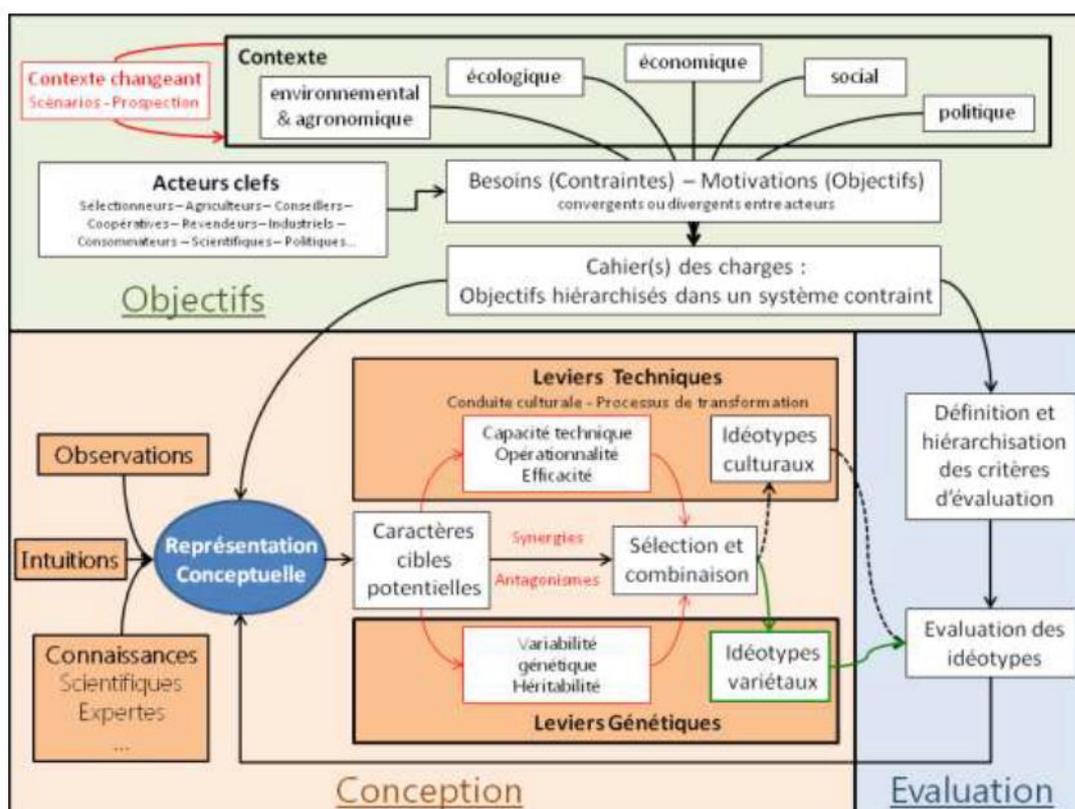


Figure 4.2.2.6 : Schéma de la démarche de conception-évaluation d'idéotypes (Debaeke *et al.*, 2014).

Le développement de nouvelles connaissances sur stévia permettra d'améliorer et retravailler cet idéotype, et le cas-échéant de développer un nouvel idéotype, ou de faire apparaître de nouveaux idéotypes. En effet, dans la construction de cet idéotype de nombreux traits sont apparus comme des traits secondaires, qui semblent liés aux traits ciblés par la sélection, mais dont le rôle n'est pas encore clairement établi, il est donc très difficile d'établir des critères de sélection sur ces traits.

La sélection d'une reprise après l'hiver importante se définit par le trait étudié « pourcentage de reprise après l'hiver ». Cependant, ce pourcentage de reprise peut-être la conséquence des pratiques culturales mises en œuvre, ou de la variabilité génétique. Quelques hypothèses ont été évoquées dans les chapitres précédents, en particulier sur le développement racinaire en première année. Il est probable qu'une interaction entre le sol/ environnement et le génotype impacte la survie pendant l'hiver. De plus, les molécules de réserves de la stévia n'ont pas été étudiées, mais leur accumulation dans les racines est peut-être variable selon les génotypes, pouvant expliquer des reprises post-hiver plus ou moins bonnes. D'autres hypothèses avancent également que la mortalité importante pendant l'hiver serait liée à la sensibilité aux sols chargés en eau. De même, les objectifs de sélection sur la teneur en SG visent à limiter la teneur des impuretés dans les plants sélectionnés, trait difficile à mettre en œuvre tant que ces molécules ne sont pas clairement identifiées et que des mesures fiables de leurs teneurs ne sont pas développées. Ces connaissances étant trop peu développées sur stévia, c'est un axe de recherche à développer pour mieux comprendre les mécanismes influant la survie de la stévia en hiver. Cela permettra d'affiner les traits à étudier et le niveau de sélection à réaliser sur ces traits.

De plus, le développement d'un unique idéotype peut être considéré comme trop restreint, car plusieurs combinaisons de traits peuvent répondre aux exigences du cahier des charges (Rasmusson, 1991). De même, le contexte réglementaire tout comme celui économique de la stévia est susceptible d'évoluer dans les prochaines années. Tout d'abord, car la place des SG dans l'industrie agro-alimentaire est croissante, et les débouchés économiques vont probablement se diversifier et se préciser. Mais également, car la réglementation évoluera probablement dans le sens de la facilitation de la vente et de la distribution de ce produit. Enfin, les améliorations des techniques de récolte et de transformation entraîneront peut-être la modification de certains objectifs d'amélioration, ou l'apparition de nouveaux traits d'intérêt. L'intégration de nouveaux acteurs dans la réflexion peut aussi être envisagée, en particulier des producteurs ayant acquis quelques années d'expériences sur la conduite de la stévia en AB. La

réflexion sur un idéotype est donc à réactualiser, et s'il est nécessaire en redéfinissant le contexte du cahier des charges (Gauffreteau, 2018).

Une contrainte peut être notée sur les objectifs et les traits mis en avant pour cet idéotype de stévia. En effet certains objectifs de sélection présentent des réponses qui rentrent en contradiction. Par exemple, sur les traits liés à l'architecture, l'objectif d'augmentation de la biomasse foliaire tendrait vers une architecture de la canopée plutôt dense, alors que l'objectif de limitation de la sensibilité des agents fongiques tend plutôt à favoriser les canopées aérées pour limiter l'humidité sur les feuilles. De plus, un seul idéotype a été envisagé sur stévia pour l'instant, mais à terme plusieurs idéotypes pourront être construits selon le mode de transformation et de commercialisation envisagée. Dans ce document, les objectifs pour sélectionner les parents de la variété synthétique ont été intégrés au cahier des charges général, du fait du faible niveau de connaissances sur la mise en œuvre possible de ce mode de propagation. Cependant, à l'avenir, le développement d'une variété synthétique devrait passer par un idéotype spécifique aux parents des croisements, car certains objectifs de sélection seront beaucoup plus travaillés sur la floraison et la maturation des graines, traits qui ne sont absolument pas étudiés pour les variétés clonales utilisées actuellement.

Cependant, les auteurs mettent en garde contre un optimisme excessif concernant l'accélération de la sélection génétique grâce à l'outil de l'idéotype. En effet, bien que de nouveaux traits ou combinaisons de traits d'intérêt soient identifiés, le processus de sélection n'en demeure pas moins très long (Rasmusson, 1991). L'utilisation de cette méthode chez le blé n'a pas conduit aux améliorations aussi rapidement qu'espéré (Martre *et al.*, 2015). Cela s'explique par la difficulté d'identifier les traits précis à améliorer, en particulier pour des objectifs de sélection complexes, comme l'amélioration du rendement (Hamblin, 2015). On peut cependant s'attendre à plus de progrès pour la stévia car cette espèce est pour l'instant peu travaillée et peu améliorée. De plus, l'idéotype est un concept, une plante idéale mais la réalité de la sélection peut se confronter aux corrélations non favorables entre des traits (Hamblin, 2015). Certaines innovations se feront plutôt par les pratiques culturales. Pour la culture de la stévia la gestion des adventices se fait principalement grâce à la mécanisation et l'utilisation d'outils se révélant adaptés à cette culture. De même, la réalisation d'un mélange de feuilles et de tiges permet d'obtenir la teneur en SG requise pour les produits de culture.

Finalement, cette réflexion autour de la construction d'un idéotype permet de produire un travail de bilan pour toute la filière, un état des lieux du contexte de production et des objectifs pour la sélection, 10 ans après le lancement de la production dans le Lot-et-Garonne. Elle a permis de

formuler un consensus sur les objectifs de sélection grâce aux connaissances actuellement disponibles. Ce travail pourra également servir de base pour organiser la recherche dans les prochaines années.

Bilan des résultats obtenus

Le travail de recherche réalisé pendant ce doctorat « Etude de l'architecture génétique des caractères du rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana* » s'inscrit dans les objectifs généraux du projet d'installation par la société Oviatis de la filière de la stévia en Agriculture Biologique dans le Sud-Ouest de la France. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont porté plus particulièrement sur le développement de nouveaux outils de description du phénotype de la stévia, avec l'échelle universelle BBCH pour décrire les stades de développement de stévia, et l'apport de connaissances sur la variabilité phénotypique des traits d'intérêt pour la sélection, avec l'évaluation du rendement sur une collection de ressources génétiques cultivées pendant quatre années en condition de production, mais aussi le phénotypage de cette même collection pour la sensibilité à la septoriose, le développement d'un test de phénotypage de la réponse de stévia à une infection de septoriose en conditions contrôlées. Le développement de connaissances sur l'architecture génétique des traits d'intérêt a pu également être réalisé par l'évaluation phénotypique de descendances. Enfin, la réflexion commune des acteurs de la filière autour d'un idéotype de stévia a permis de formaliser des objectifs de sélection et de proposer un idéotype.

L'ensemble des résultats obtenus ont permis :

(1) de construire une première version de l'échelle BBCH de *Stevia rebaudiana* basée sur des observations du développement végétatif et reproductif de ressources génétiques et de descendances produites en conditions de productions. Cette échelle BBCH a fait l'objet d'un article scientifique publié dans le journal *Annals of Applied Biology* au printemps 2020. Elle a également été utilisée pour construire une fiche technique, décrivant les stades phénologiques à suivre pour la production agricole, et communiquée aux agriculteurs de la filière. Cette fiche devrait aider les producteurs au suivi de la production de stévia et permettre une meilleure appréhension de la date de récolte.

(2) de caractériser une collection de 15 ressources génétiques de stévia sur les traits du rendement en glycosides de stéviol et les traits de description de l'architecture de la canopée jusqu'à leur quatrième année de production. Ces résultats permettent d'identifier les ressources génétiques les plus performantes pour la production dans le Sud-Ouest de la France. Ce suivi a aussi permis d'évaluer l'impact de deux itinéraires culturaux sur la mortalité et la productivité des 15 ressources génétiques pendant 3 années de production, montrant que la survie et le rendement en SG étaient particulièrement diminués lorsque les plants sont récoltés en première année. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un article scientifique soumis à *Industrial Crops and Products* en août 2020.

(3) de caractériser au sein de la collection de ressources génétiques de stévia de l'INRAE, Villenave d'Ornon, la diversité phénotypique de réponse à une souche locale de *Septoria* sp., ainsi que de développer un nouveau protocole d'inoculation de cet agent pathogène sur disques foliaires de stévia. Ce travail a été valorisé sous forme d'article scientifique, soumis auprès du *European Journal of Plant Pathology* fin 2020. L'étude des pathogènes de la stévia a également permis de décrire un nouvel agent fongique sur stévia en France : *Athelia rolfsii*, permettant la publication d'une short-note en 2019 auprès de *Plant Disease*.

(4) d'estimer les paramètres génétiques sur les traits du rendement en SG et des variables liées à l'architecture de la canopée pour quatre populations de plein-frères phénotypées pendant les deuxième et troisième années de production. Cela a permis de mieux comprendre le potentiel d'amélioration génétique sur ces traits et les croisements pouvant être réalisés pour améliorer la valeur génétique de la génération suivante. Ces résultats sont synthétisés sous la forme d'un article scientifique, sur lequel un travail est encore en cours. Enfin, les résultats produits par ces différentes approches, et la réflexion commune avec d'autres acteurs de la filière, ont permis une co-construction d'un idéotype de stévia et d'initier la sélection participative pour cette filière.

Les résultats scientifiques obtenus pendant ce doctorat ont pu être diffusés à la communauté scientifique *via* la production d'une short-note et d'articles scientifiques. Les résultats ont également été présentés *via* des communications scientifiques, comme lors du congrès *Plant and Animal Genome* en janvier 2020, lors des journées « Jeunes Chercheurs » du département BAP de l'INRAE, et lors des séminaires scientifiques organisés par l'UMR BFP de l'INRAE de Villenave d'Ornon, les intitulés de ces présentations sont détaillés en début de cette thèse, dans la partie « Productions scientifiques ». Ces résultats ont également été présentés à la filière sous diverses formes, ce point sera détaillé dans la partie 4.

Synthèse des principaux résultats obtenus pour chaque axe de recherche :

Vers l'architecture génétique des caractères du rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana*

OBJECTIFS :

- Développement d'une échelle de description des stades phénologiques de *Stevia rebaudiana*
- Evaluation de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques
- Etude des stress biotiques impactant la stévia : *Septoria* sp. et *Athelia rolfsii*
- Estimations des paramètres génétiques des traits d'intérêt pour quatre populations de plein-frères
- Développement d'un idéotype de stévia pour une culture dans le Sud-Ouest de la France

Chapitre 1

Construction de l'échelle BBCH de description des stades phénologiques de stévia

- Adaptation de l'échelle BBCH à la stévia et production d'un article scientifique accepté en mai 2020.
- Développement d'une fiche technique transférée à la filière pour être communiquée aux nouveaux producteurs de stévia.

Chapitre 2

Etude de la variabilité phénotypique d'une collection de ressources génétiques de *S. rebaudiana* en condition de production

- Une récolte pendant l'année d'implantation de la parcelle entraîne une baisse de performances sur les traits d'intérêt agronomique (reprise après l'hiver, rendement...).
- Cult75_GER, Cult102_SPA, Cult36_FRA, Cult37_FRA sont les individus les plus performants dans ce contexte de production.
- Les traits liés à l'architecture sont également à intégrer dans la sélection.

Chapitre 3

Description d'*Athelia rolfsii* sur stévia et développement d'un test pour étudier la réponse de la stévia à la septoriose

- Un nouveau pathogène a été décrit sur stévia en Nouvelle Aquitaine, *Athelia rolfsii*.
- La collection de ressources génétiques de stévia de INRAE a été phénotypée sur le trait « réponse à une infection de septoriose », avec l'identification de génotypes ayant des phénotypes plus extrêmes que les génotypes précédemment évalués.
- Un test d'inoculation sur disques foliaires en conditions contrôlées a pu être développé sur stévia, indiquant les mêmes phénotypes que ceux obtenus par inoculation sur plantes entières.

Chapitre 4

Vers la sélection participative pour la filière de la stévia en agriculture biologique

- Le phénotypage et les analyses statistiques ont permis l'estimation des paramètres génétiques de quatre populations de plein-frères.
- La collaboration entre Oviatis, INRAE, SweetVia et Invenio a permis la construction du cahier des charges d'un idéotype de stévia pour une production en agriculture biologique dans le Sud-Ouest de la France

Discussion générale

Chapitre 1. La nécessité de collecter et caractériser de nouvelles ressources génétiques.

1.1. La collection Oviatis – INRAE (Villenave d’Ornon)

Les études menées pendant ce doctorat ont été réalisées grâce à une collection de ressources génétiques provenant d’Oviatis et de l’INRAE. Un travail important et préalable à cette thèse sur le rassemblement des ressources génétiques a été effectué depuis le début du projet, d’abord par Oviatis puis dans un second temps également par l’INRAE. Un set de 15 ressources génétiques, présentées dans la partie 2.2 Chapitre 2, a été planté sur une parcelle expérimentale en 2016 pour être phénotypé dans le cadre de la thèse de Cécile Hastoy. A partir de 2017, des croisements ont été mis en place et ont permis de collecter des lots de semences et de produire plusieurs descendances, présentées dans la partie 4.1 Chapitre 4. L’implantation d’une première parcelle de descendances pendant l’été 2017 a ainsi été possible, puis d’une deuxième parcelle en 2019, toutes deux étant localisées à Blagon (33). Enfin, l’acquisition de variétés « cultivées » comme Criolla, ou SugarLeaf a permis d’intégrer des plants de nouvelles origines dans la collection. Aujourd’hui, celle-ci se compose de 53 individus conservés en serre et maintenus par propagation végétative sur le site de l’INRAE Villenave d’Ornon, incluant les 15 ressources génétiques étudiées dans cette thèse. A ces ressources génétiques s’ajoutent 9 familles regroupant 1628 descendants, qui ont été implantées sur les deux parcelles de Blagon. La collection de ressources génétiques est néanmoins restreinte et la diversité génétique étudiée ici reste faible, car elle est uniquement composée du pool de 15 ressources génétiques. Elle a cependant été décrite au niveau génotypique et positionnée au sein d’une diversité plus large de stévia, grâce à l’étude de Cosson *et al.*, (2019), ce qui n’est pas le cas de la plupart du matériel végétal étudié dans la communauté de stévia. De plus, le phénotypage de ces 15 ressources génétiques a porté sur un grand nombre de traits liés au rendement comme le rendement en SG, le profil de SG ou la production de biomasse foliaire, mais également liés aux stress biotiques et abiotiques, comme la sensibilité à la septoriose ou le taux de survie à l’hiver après 4 années de culture. A notre connaissance, c’est la seule collection de ressources génétiques de stévia sur laquelle autant d’informations sont disponibles.

1.2. Quelques autres collections existent dans le monde

A l'avenir, il est nécessaire d'élargir cette collection en poursuivant ce travail d'acquisition de ressources génétiques. Cette étape est indispensable car la diversité génétique disponible sur une culture est la base de son amélioration génétique (Migicovsky *et al.*, 2019). Chez *Stevia rebaudiana*, une collection de ressources génétiques est décrite par l'EUSTAS (European Stevia Association). Elle se compose de 6 génotypes (Lankes and Grosser, 2015), déjà présents dans la collection de l'INRAE de Villenave d'Ornon. De plus, plusieurs équipes de recherche ont également cherché à collecter des ressources génétiques de stévia. En Europe, l'équipe de Luciana Angelini (Pise, Italie) a rassemblé des ressources génétiques de stévia et initié une sélection massale sur la germination (Macchia *et al.*, 2007; Martini *et al.*, 2017b). Ryan Warner de la Michigan State University aux Etats-Unis travaille aussi sur une collection mise en place dans le cadre de son projet, dont des ressources génétiques provenant du Paraguay. Enfin, Carlos Jorge Budeguer de l'INTA en Argentine a également accès à des ressources génétiques issus de la diversité locale.

1.3. La nécessité d'enrichir les collections de ressources génétiques

Pour les plantes pérennes auto-incompatibles, comme certains arbres fruitiers et des graminées fourragères, la constitution d'une collection de plants vivants est particulièrement intéressante pour conserver de la diversité génétique mais nécessite une surface conséquente pour la plantation et beaucoup de temps pour son entretien. En effet, ces espèces ont une croissance lente et la conservation du matériel génétique sous forme de graines ne permet pas de conserver des clones des ressources génétiques. Par exemple, la National Fruit Collection (Angleterre) regroupe 3500 ressources génétiques d'arbres fruitiers : pommier, vigne, cerisier, poirier y sont représentés (NFC, 2019). Ces collections peuvent regrouper des variétés commerciales, des variétés historiques ainsi que des ressources génétiques non améliorées (Migicovsky *et al.*, 2019). Ces collections offrent également la possibilité de constituer des jeux de données sur les traits évalués, accessibles pour la communauté scientifique.

La constitution d'une collection de ressources génétiques nécessite de répondre à plusieurs contraintes quant à leur accessibilité, aux capacités de les conserver et de les caractériser aux niveaux phénotypique et génotypique.

1.3.1. Accessibilité des ressources génétiques

L'accessibilité des ressources génétiques est réglementée dans la Convention sur la Diversité Biologique (CDB). Elle impose aux états fournisseurs des ressources génétiques (RG) de faciliter l'accès de celles-ci et aux utilisateurs de ces ressources de partager de manière juste et équitable les avantages issus de l'utilisation de cette ressource. Cela peut passer par l'accès aux résultats de la recherche, à des avantages commerciaux ou à un transfert de technologie. En 2011-2012, le Protocole de Nagoya complète la CDB par un volet juridique, en réglementant l'accès aux RG et aux connaissances traditionnelles qui y sont associées (UICN, 2014), avec l'Accès et le Partage des Avantages (APA). Il doit permettre à l'utilisateur de la ressource d'avoir des procédures claires pour la demande d'accès à une RG et doit protéger le fournisseur dans son droit à l'APA (Greiber *et al.*, 2012).

Dans le cas de *Stevia rebaudiana*, des représentants des peuples Guarani Pai Tavytera et Kaiowa demandent à faire reconnaître leurs droits relatifs à l'APA. Ils dénoncent une « usurpation de [leurs] savoirs et de la biodiversité par les multinationales » et ils demandent ainsi la « restitution des droits pour l'utilisation de [leurs] connaissances relatives à *Stevia rebaudiana* à travers le partage des avantages ». Cette déclaration a conduit à la formation d'une assemblée dont l'objectif est la revendication du partage des avantages liés à l'utilisation de la stévia et ses dérivés (Public Eye *et al.*, 2016). Les revendications portées par les peuples Guarani ont été renforcées par la législation brésilienne et paraguayenne. Cependant, si le Brésil et le Paraguay ont signé la CDB, seul le Brésil a signé et ratifié le Protocole de Nagoya comme c'est le cas pour l'Union Européenne (Convention on Biological Diversity, 2018). La législation brésilienne propose que le partage entre les peuples Guarani et les entreprises utilisant les SG soit concrétisé par le versement de 1 % du chiffre d'affaire à un fond de partage des avantages, pour un accès aux RG (Public Eye *et al.*, 2016). Par ailleurs, le partage des avantages liés à l'accès aux connaissances doit être négocié entre le fournisseur et l'utilisateur. Cependant, la loi prévoit un versement de 0,5% du chiffre d'affaire au fond de partage des avantages (Public Eye *et al.*, 2016). La législation brésilienne rend également possible un refus d'accès à la RG ou aux connaissances associées. Enfin, il prévoit des amendes pour les entreprises réalisant une exploitation économique d'un produit fondé sur l'accès à des RG ou des connaissances si aucun accord n'a été établi avec les peuples autochtones ou le pays fournisseur. Le gouvernement paraguayen a publié un décret en 2006 reconnaissant que la stévia est originaire du Paraguay et a ajouté la stévia à la liste des espèces endémiques du pays. En février 2013, ce texte a été transposé dans la loi. En revanche, il ne mentionne pas l'APA et ne n'indique pas non plus que

les peuples Guarani sont les détenteurs du savoir traditionnel associé à la plante (Public Eye *et al.*, 2016). CAPASTE, une institution civile du Paraguay, a mis en place un logo pour certifier la stévia produite et transformée au Paraguay, utilisable sous réserve de respect du cahier des charges précisé par l'organisation (Capaste, 2016). CAPASTE fait également partie de l'International Stevia Council ISC, représentant les intérêts des producteurs de feuilles, d'extraits et les industries liées à la stévia dans le monde, avec pour intention de représenter l'industrie paraguayenne (New Food Magazine, 2016).

Jusqu'à présent, notre partenariat avec l'INTA, Argentine, a permis un accès à du matériel végétal argentin sous forme d'échantillons de feuilles. D'autres partenariats pourraient déboucher sur des échanges de matériel végétal, et intégrer des génotypes sauvages à la collection. Si ces partenariats sont possibles et que les ressources génétiques se révèlent être accessibles, il s'agira ensuite de les conserver en collection.

1.3.2. Conservation et caractérisation des ressources génétiques

Cela nécessite donc d'avoir des infrastructures de taille suffisante au maintien de ces ressources génétiques, soit en serre, soit en plein champ ou de développer des infrastructures pour une conservation en culture *in vitro*. La conservation d'une collection importante de ressources génétiques nécessite également le travail de personnes compétentes se consacrant à temps plein au maintien et à la production du matériel végétal. Pour la stévia, avoir une copie de chaque ressource génétique cultivée en serre permettrait de garantir le maintien des ressources sans risque de gel avec l'hiver, ainsi que la disponibilité toute l'année de matériel végétal pouvant être utilisé directement pour des analyses génétiques ou bouturé pour un phénotypage. Des lots de semences, issus de croisements choisis, sont plus faciles à conserver. A ce jour cependant, les conditions optimales pour la conservation des graines de stévia sont mal connues. Par exemple, la durée de conservation possible des semences sans forte diminution du taux de germination ou encore la température de conservation (froid) n'ont pas encore été étudiées. Macchia *et al.*, (2007) ont cependant montré un taux de germination plus élevé pour des lots de semences conservés à 5°C pendant 7 jours par rapport à des lots de semences conservés entre 20 et 25°C.

De plus, la plupart des ressources génétiques de stévia est mal caractérisée au niveau génétique. En effet, seule la publication de Cosson *et al.*, (2019) permet de caractériser 145 ressources génétiques issues de la diversité mondiale. Il n'existe pas de collection officielle, à part la collection très réduite de l'EUSTAS (European Stevia Association). Ce manque de traçabilité s'exprime également par le type de matériel génétique utilisé dans plusieurs études. Celui-ci

provient d'entreprises de vente de semences et des noms génériques comme Rebaudiana, Sugar Love, AX, X4 ou encore Candy de Genesis Seed sont utilisés (Parris *et al.*, 2016; Munz *et al.*, 2018; Libik-Konieczny *et al.*, 2018) sans pour autant définir clairement les bases génétiques de ces ressources. Il est le plus souvent hétérogène car issu de lots de semences dont les parents ne sont pas positionnés au sein de la diversité génétique.

La caractérisation génétique des nouveaux génotypes de stévia serait donc une priorité, car il est indispensable de positionner des individus au sein de la diversité génétique de stévia. Pour cela, un set de 18 marqueurs moléculaires SSR développés par Cosson *et al.*, (2019) permet de caractériser les ressources génétiques de *S. rebaudiana*. Ce travail permettra de définir correctement la base génétique disponible au sein de la collection de stévia. Enfin, l'intégration de ces ressources génétiques à la collection de ce projet sera complétée par l'étude du phénotype de celles-ci. En effet, l'étude de leurs performances sur les traits d'intérêt agronomiques pourra être réalisée grâce aux outils de phénotypage développés pendant ce doctorat.

Chapitre 2. Optimiser le phénotypage: une nécessité pour l'amélioration de la stévia et le développement de la filière.

Parmi les objectifs de cette thèse, un axe prioritaire a été de poursuivre le développement des outils de phénotypage et des connaissances du phénotype de ressources génétiques de stévia initié durant la thèse de Cécile Hastoy (2018), sur les performances agronomiques de ces individus, leur architecture, et leur sensibilité à la septoriose, une maladie fongique freinant la production de stévia en AB. Les méthodes de phénotypage utilisées sont celles qui ont été développées pendant la thèse de Cécile Hastoy, en particulier le dosage des SG (Hastoy, 2018) et l'inoculation de septoriose sur plantes entières (Hastoy, Le Bihan, *et al.*, 2019). Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse permettent d'apporter de nouvelles connaissances pour l'amélioration de stévia et pour les choix stratégiques de la filière, en particulier sur les performances agronomiques de 15 ressources génétiques suivies jusqu'en quatrième année de production et l'évaluation de la réponse de ces mêmes ressources génétiques à une infection de septoriose. Ce travail a également permis de développer de nouveaux outils pour le phénotypage de la stévia, avec la publication d'une échelle BBCH de stévia et la validation d'une inoculation de septoriose sur disques foliaires. Cependant, ce sont des connaissances encore trop partielles, posant de nombreuses questions, en particulier sur la physiologie de la culture en conditions tempérées, comme sa floraison, sa capacité à développer un système racinaire en première année pour survivre à l'hiver et reprendre sa croissance l'année suivante, ainsi que sur les stress abiotiques et biotiques pouvant impacter la production.

Il est donc fondamental de poursuivre le développement des connaissances et des outils sur le phénotypage de la culture de la stévia, que ce soit pour mieux caractériser le phénotype des ressources génétiques, ou bien pour identifier des itinéraires culturels adaptés à l'Europe et à l'Agriculture Biologique. De plus, le manque d'outils pour le phénotypage peut freiner l'avancée de l'amélioration génétique sur les plantes pérennes, certains auteurs parlent alors de « phenotyping bottleneck » (Furbank and Tester, 2011; Araus and Cairns, 2014b). Cette composante doit être intégrée dans la réflexion autour de l'amélioration génétique de stévia. Les ressources humaines et financières allouées à la recherche sur stévia restent faibles. Il faut donc réfléchir aux traits à étudier en priorité et identifier les connaissances issues d'une activité de recherche qui seront nécessaires à l'accompagnement de la production et au développement de la filière. Les discussions des différents chapitres ont été des occasions pour aborder des

pistes de développement pour le phénotypage de stévia, cette discussion générale permet d'en faire une synthèse.

2.1. Les outils de phénotypage sur la culture de la stévia ont été faiblement développés jusqu'à présent et les connaissances restent limitées.

L'intérêt industriel autour de la stévia est relativement récent. Il découle du rejet des édulcorants synthétiques par les consommateurs et de l'utilisation croissante des glycosides de stéviol (SG) issus de la stévia en agro-alimentaire (Sylvetsky and Rother, 2016). Cette augmentation de la demande, couplée à une évolution législative favorable, a entraîné une augmentation des parcelles de production de stévia dans le monde (Sun, 2016). Pour autant, cet attrait industriel ne s'est pas accompagné d'une croissance du secteur de la recherche publique sur cette culture. En effet, la recherche réalisée sur cette plante est encore confidentielle et récente, et peu d'équipes sont impliquées sur cette culture. Cela explique que la majorité de la littérature scientifique disponible sur cette culture a été publiée dans les 15 dernières années. Ces études se sont principalement intéressées au rendement en SG et ses composantes, c'est-à-dire les traits de production de biomasse foliaire, de teneur et de profil en SG. C'est pourquoi jusqu'à aujourd'hui, les outils et les connaissances disponibles pour décrire le phénotype de *Stevia rebaudiana* portent principalement sur les traits du rendement en glycosides de stéviol.

De plus, peu d'études ont été réalisées en conditions de production, c'est-à-dire sur des parcelles expérimentales. Beaucoup d'entre elles ont été menées en conditions *in vitro* ou en conditions contrôlées comme en serre (Metivier and Viana, 1979; Ceunen and Geuns, 2013a; Karimi *et al.*, 2015; Barbet-Massin, 2015; Yoneda *et al.*, 2017). Ces études en conditions contrôlées peuvent être intéressantes pour certains axes de recherche, mais ne témoignent pas correctement des performances agronomiques observées en conditions de production, informations qui sont indispensables pour les filières. Certaines équipes ont toutefois suivi le phénotype de plants de stévia sur des parcelles expérimentales. Dans la grande majorité de ces études, l'évaluation du rendement en SG est la plupart du temps décomposée par l'étude de ses composantes : la production de biomasse foliaire, la teneur en SG et le profil en SG (Kumar *et al.*, 2014; Lankes and Grosser, 2015; Vouillamoz *et al.*, 2016; Parris *et al.*, 2016). Certaines études ne décrivent que la biomasse foliaire (Andolfi *et al.*, 2006) ou seulement le ratio ST/RebA pour caractériser le profil en SG (Ceunen and Geuns, 2013c; Pal *et al.*, 2015; Zachokostas, 2016). Ces études répondent le plus souvent à des questions agronomiques et œuvrent à l'amélioration de la

connaissance de la variabilité sur ces traits selon différents itinéraires culturaux, et selon des stress abiotiques, comme un stress hydrique ou salin (Lavini *et al.*, 2008; Pordel *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2015; Pacifico *et al.*, 2017).

Chez stévia, le suivi de la production de biomasse est souvent limité à une ou deux années de production dans les conditions européennes. Seule l'étude d'Andolfi *et al.* (2006) a permis de suivre la production de biomasse foliaire pendant 7 ans. Mais les auteurs ne l'ont pas associée à un suivi du rendement en SG. De plus, parmi les études réalisées sur stévia, beaucoup ont été menées dans les zones de production originelles de la stévia, où le climat est plus chaud que celui rencontré par la stévia en Europe. Quelques études ont été conduites dans des conditions de productions tempérées, comme en Hongrie, (Denev *et al.*, 2017) en Pologne, (Libik-Konieczny *et al.*, 2018), en Suisse (Vouillamoz *et al.*, 2016), en Italie (Tavarini and Angelini, 2013) et en France (Barbet-Massin *et al.*, 2016; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019). Il est cependant complexe de comparer les rendements en biomasse obtenus entre plusieurs études entre elles. Une autre difficulté rencontrée pour la comparaison des études sur stévia est l'imprécision dans la description des stades phénologiques, car aucune échelle n'est utilisée par la communauté scientifique. En 2007, Carneiro publie une échelle décrivant les stades phénologiques de stévia, mais son utilisation n'est pas adaptée à la description des stades de plants de stévia en conditions de production. Ces inconvénients ont fortement limité son adoption au sein de la communauté scientifique. Dans ce projet la description précise des stades phénologiques des plants de stévia a été construite sur la base de l'échelle universelle BBCH. L'adaptation de cette échelle sur stévia a permis une description des stades de développement végétatif et reproductif de la stévia en conditions de production. Cette échelle est un outil pour la description uniformisée des plants, permettant une comparaison plus facile entre les études. C'est également un outil d'intérêt pour la filière de production.

La compréhension du lien entre architecture du plant et production de la biomasse foliaire est encore faible pour *Stevia rebaudiana*, en particulier car peu d'outils ont été développés sur stévia pour décrire l'architecture des plants utilisés. Dans leur étude de 2018, Munz *et al.*, utilisent le Leaf Area Index (LAI) et le Specific Leaf Area (SLA), le LAI étant l'aire foliaire totale par unité d'aire du sol et le SLA étant le ratio entre la biomasse foliaire et l'aire de la canopée. Leur étude met en évidence qu'un LAI élevé conduit à un rendement en feuilles sèches plus important. Ce travail a toutefois pu être complété par l'étude de (Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019), dans laquelle les auteurs identifient des descripteurs de l'architecture et de la biomasse, tels que la densité de tiges ou encore le ratio biomasse foliaire / biomasse totale, autrement

nommé le Harvest Index, donnant un indice de récolte. L'utilisation de ces descripteurs leur a également permis d'identifier trois architectures au sein d'une collection de ressources génétiques décrites en conditions de production.

Enfin, pour réaliser une description complète du rendement de stévia, l'étude des autres composants que la biomasse est nécessaire, c'est-à-dire qu'il faut s'intéresser à la teneur en SG et au profil de SG produit par les plants. La méthode de phénotypage employée en routine pour décrire ces deux traits est majoritairement le dosage des SG par HPLC (Bergs *et al.*, 2012; Bililign *et al.*, 2014; Hastoy, 2018). Les techniques employées peuvent varier selon le type de colonnes utilisé C₁₈ (Barbet-Massin, 2015; Hastoy, 2018) ou NH₂ (Hearn and Subedi, 2009; Pal *et al.*, 2015) mais aussi avec le gradient de solvants choisi. Si la teneur en SG est décrite dans une grande majorité d'études, nombre d'entre elles ne décrivent que partiellement le profil en SG. Parmi les 10 SG majoritairement accumulés chez *Stevia rebaudiana*, de nombreuses études ne décrivent que la teneur en ST et RebA et le ratio entre ces deux SG, comme Ceunen and Geuns, (2013a), ou Munz *et al.* (2018).

2.2. Les outils de phénotypage pouvant être développés sur les traits étudiés dans le cadre de projet sont nombreux.

2.2.1. Perspectives sur l'étude de la biomasse foliaire et de l'architecture de la stévia

La biomasse foliaire est majoritairement décrite par le poids de feuilles sèches produites, cependant il n'y a pas d'uniformité dans cette description, soit le rendement est décrit par la récolte plant à plant en g/plant, soit il est décrit à l'échelle de la parcelle en kg/ha. Ces deux notations représentent deux approches de la biomasse foliaire. La notation en g/plant est plutôt associée à la recherche en lien avec le fonctionnement de la plante, alors que la notation kg/ha est plutôt associée à la production agricole. De plus, la notation en kg/ha est difficile à utiliser car elle intègre la notion de densité. Or il n'y a pas réellement de consensus sur la densité idéale à mettre en œuvre sur une parcelle de stévia : les densités précisées dans la littérature vont de 27 300 plants/ha (Fabre and Guigal-Merle, 2013) à 166 667 plants/ha (Gomes *et al.*, 2018).

L'intégration du facteur densité dans les études agronomiques évaluant la biomasse aérienne de la stévia pourra fournir des informations d'intérêt à la filière, mais également placer les individus à évaluer dans les conditions les plus proches des conditions de production. Pour cela, un design expérimental formé de micro parcelles à différentes densités peut être envisagé, permettant d'évaluer la relation entre la densité et le rendement en biomasse foliaire. Ce genre d'analyses a déjà été développé pour de nombreuses cultures, nécessitant cependant la prise en compte des effets de bord. L'étude de Shirliffé and Johnston, (2002), portant sur plusieurs cultivars de haricot sec (*Phaseolus vulgaris* L.) a mis en évidence une interaction entre la densité et le cultivar, la densité permettant d'obtenir le meilleur rendement diffère selon le cultivar étudié. Pour le soja, Carciocchi *et al.*, (2019) ont identifié qu'une augmentation de la densité entraîne une augmentation du rendement jusqu'à une stabilisation de ce même rendement bien que les densités soient encore augmentées. Cependant, pour l'étude de la densité optimale de *Stevia rebaudiana*, la prise en compte de sa pérennité sur la parcelle peut être une difficulté. En effet, sur la parcelle de ressources génétiques de Liposthey (40), il était visible que l'architecture des plants entre la première et la quatrième année avait évolué dans le sens d'une augmentation de la hauteur et de la surface de la canopée. Une augmentation de la densité en première année permettrait probablement d'obtenir des rendements plus élevés au début de l'exploitation de la parcelle mais présenterait un risque de compétition lors du développement de l'architecture mature des plants.

La stévia étant une culture pérenne, la mise en place d'essais en plein champ et leur suivi peut se révéler couteux et assez lourd en travail humain. De plus, le prélèvement de la biomasse aérienne est une méthode de phénotypage destructif, exigeant de prélever toute la biomasse aérienne pour évaluer la biomasse foliaire. Une solution alternative serait de développer un phénotypage non destructif de la biomasse. Des protocoles de ce type ont déjà été développés, mettant en place des techniques d'évaluation aérienne de la biomasse totale, *via* des caméras embarquées sur drones ou tracteurs. Des cultures d'oignons ont été phénotypées à différents moments de la croissance grâce à une caméra RGB transportée par un drone. Ces images ont permis d'obtenir la hauteur de la culture, le volume de la canopée des plants ainsi que la couverture du sol par la canopée (Ballesteros *et al.*, 2018). Les auteurs ont pu établir les relations entre ces variables et la biomasse aérienne pendant la croissance végétative. De même, une étude du phénotype architectural de 17 géotypes de fraise cultivés en plein champ par caméra RGB a permis d'enregistrer les variables d'aire de la canopée, de volume de la canopée, de hauteur moyenne ainsi que les descripteurs de la densité de la canopée (Guan *et al.*, 2020). Comme dans l'étude précédente, ces données leur ont permis de développer un modèle de prédiction de la biomasse foliaire et de l'aire foliaire totale des plants. Ces techniques de phénotypage permettraient de répondre plus précisément à l'évaluation de la mise en place de la biomasse pendant le cycle de développement végétatif, sans mise en œuvre d'un protocole destructif. Elles permettraient aussi de mieux décrire l'architecture des plants de stévia, notamment en utilisant les variables de description de la densité de la canopée. Enfin, cette approche pourrait permettre de comprendre la modification de répartition de la biomasse lors du passage entre les stades végétatifs et les stades reproductifs chez stévia, et donc de mieux cibler la date de récolte. En effet, cette transition entraîne une allocation des ressources aux organes impliqués dans la reproduction, bourgeons floraux, fleurs, fruits, au détriment des organes végétatifs, comme les feuilles pour plusieurs plantes pérennes ou annuelles (Ruiters and McKenzie, 1994; McConnaughay and Coleman, 1999).

L'approfondissement des connaissances sur l'architecture des plants est également un axe de recherche à cibler pour la stévia. Tout d'abord, le lien entre les traits de l'architecture des plants et ceux du rendement en biomasse foliaire a été étudié mais n'est pas clairement défini (Munz *et al.*, 2018; Hastoy, Cosson, *et al.*, 2019). L'architecture est pourtant un critère de sélection (Adams, 1982; Zalapa *et al.*, 2006; Teichmann and Muhr, 2015), que ce soit chez les annuelles ou les pérennes car elle est en lien étroit avec la conduite culturale. En effet, les enjeux autour de l'architecture des plants ne se limitent pas à la production de biomasse foliaire.

L'architecture des plants peut impacter les possibilités de mécanisation lors de toutes les étapes de la vie de la culture : désherbage, travail du sol, application d'intrants, ainsi que la récolte. Cette architecture est également un facteur de contrôle des épidémies d'agents pathogènes (Andrade *et al.*, 2009; Tivoli *et al.*, 2013).

2.2.2. Le phénotypage des SG, vers le développement d'outils à plus haut débit

Le phénotypage de la teneur et du profil des SG pourraient être diversifiés. La priorité sur le projet stévia serait l'ajout du rebaudioside E (RebE) aux différents SG déjà détectés par la méthode de dosage développée par Hastoy (2018). En effet, le RebE est un autre SG d'intérêt pour la filière stévia, car il est autorisé à la commercialisation dans le règlement de l'Union Européenne n° 2016/1814. La méthode d'analyse des SG utilisée actuellement (Hastoy, 2018) a été développée sur HPLC, mais l'utilisation d'autres technologies de détection des SG peut également être envisagée, comme la Spectroscopie Proche dans l'InfraRouge (SPIR), la spectroscopie Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), ou l'électrophorèse en gel capillaire (Wölwer-Rieck, 2018). L'électrophorèse capillaire ainsi que la RMN ont été employées pour détecter le ST et le RebA (Dacome *et al.*, 2005) mais ces méthodes n'ont pas été déployées à grande échelle, probablement pour des raisons de coût. La technique du SPIR (ou NIRS en anglais) est basée sur le principe d'absorption des rayonnements infrarouges de la matière organique. L'absorption d'un échantillon va dépendre de sa composition chimique, permettant de faire le lien entre ces deux informations. La détection des substances en très faibles quantités est très difficile à calibrer car leur signal est trop faible par rapport au reste de la matière organique de l'échantillon (CIRAD, 2015). Le développement d'un dosage par SPIR s'appuie sur un lot d'échantillons de référence de composition connue pour les composés étudiés (Lila and Furstoss, 2000). Sur stévia cette méthode est particulièrement étudiée pour détecter les SG à partir de poudre de feuilles sèches mais aussi de feuilles fraîches. Les premiers essais ont permis de doser le ST sur du matériel végétal sec (Nishiyama *et al.*, 1992). Par la suite, des auteurs ont développé des modèles permettant de doser le ST et le RebA sur matériel sec (QiKun *et al.*, 2014; Kujundžić *et al.*, 2017; Martono *et al.*, 2017), et le RebC (Hearn and Subedi, 2009). Si le développement d'un dosage équivalent sur matériel frais est réalisé, cette méthode pourrait s'avérer très intéressante afin de mesurer la concentration en SG directement en plein champ en utilisant du matériel portatif, du type microNIR (VIAVI) ou NirQuest (Ocean Insight). Cependant, cette technique reste peu précise pour une utilisation sur matériel frais, du fait de la forte présence d'eau dans les échantillons qui brouillent le signal. Sur la cerise par

exemple, le technique SPIR ne permet pas d'estimations satisfaisantes du pH ou de l'acidité (Lepoittevin, 2017). En revanche, le développement de cette méthode sur feuilles fraîches de ginkgo a permis la détermination de la teneur totale en flavonoïdes qui est un critère de la qualité des feuilles de ginkgo (Shi *et al.*, 2012). Cependant, la teneur totale des flavonoïdes atteint plus de 24% de la masse foliaire. Cette technique pourrait donc permettre un premier phénotypage sur matériel frais pour estimer la teneur totale en SG, méthode qui peut s'avérer utile pour un phénotypage précoce sur des descendances, ou un suivi de la teneur en SG chez les producteurs. Elle semble peu adaptée à un phénotypage précis du profil en SG, comme celui réalisé par HPLC.

2.2.3. Le phénotypage des traits de sensibilité aux agents pathogènes est nécessaire pour l'amélioration génétique de la stévia pour une production en agriculture biologique.

Enfin, la réponse aux stress biotiques est un enjeu pour l'amélioration de la stévia dans un contexte d'agriculture biologique. La septoriose étant le pathogène le plus problématique à ce jour, la gestion de l'épidémie peut passer à court terme par la production de modèle de prévision, comme cela a déjà été conduit sur d'autres cultures (Savary *et al.*, 2015). Le projet de recherche actuel a permis de poursuivre la description de la variabilité phénotypique de réponse à une infection de septoriose au sein de la collection de ressources génétiques de l'INRAE. Cette méthode d'inoculation a été adaptée à une inoculation sur disques foliaires, permettant de réduire le matériel végétal et fongique nécessaire à ce test. Ce protocole offre de nombreuses possibilités, comme le phénotypage d'une population de stévia, mais également le test de plusieurs isolats de septoriose.

Dans le cadre d'une filière en Agriculture Biologique, plusieurs axes de lutte sont à développer. En effet, des mesures prophylactiques peuvent être envisagées, en passant par l'utilisation de produits phytosanitaires non synthétiques, comme le cuivre, le soufre (Speiser and Tamm, 2011), l'utilisation de variétés résistantes, mais aussi l'adaptation de la conduite culturale. Les producteurs investis dans l'association SweetVia mettent déjà ces bonnes pratiques en place, avec l'utilisation des ressources génétiques peu sensibles comme Cult102_SPA et Cult32_FRA, ou en récoltant en juillet dès la deuxième année, pour casser le cycle de propagation de l'agent fongique. Des mesures à l'échelle du territoire peuvent également être envisagées, des modélisations du suivi épidémiologique de la septoriose ont déjà été développées sur d'autres cultures, comme le blé avec le modèle EPIWHEAT (Savary *et al.*, 2015). Ce modèle intègre les informations relatives à la température journalière, la

pluviométrie, l'âge de la culture et leurs effets sur le déploiement de l'infection. Le phénotypage haut-débit est également une perspective intéressante pour la gestion des maladies et l'amélioration génétique des cultures infectées. De nouvelles avancées des plateformes de phénotypage ouvrent la possibilité de produire des données de façon semi-automatisée à plus haut débit, plus précises et pouvant être analysées via des solutions développées sur site, par machine learning (Shakoor *et al.*, 2017). Plusieurs échelles de phénotypage peuvent être également mises en œuvre allant d'un plant, avec l'utilisation de véhicules autonomes, à une parcelle dans sa totalité, avec prise de données par satellite (Shakoor *et al.*, 2017).

Enfin, l'évaluation des risques liés à d'autres agents pathogènes est un facteur prioritaire pour le développement de la production de stévia dans les prochaines années. La description de l'agent pathogène *Athelia rolfsii* sur la stévia dans le Sud-Ouest de la France a été réalisée dans ce projet de recherche. Cet agent pathogène est décrit comme ayant une très rapide propagation et comme entraînant de fortes pertes de rendement, allant jusqu'à 60% pour des cultures de tomates et de cacahuètes (Kator *et al.*, 2015). En agriculture conventionnelle aux Etats-Unis, des essais sur ce pathogène et des cultures de stévia ont montré que les molécules actives d'azoxystrobin et de tebuconazole étaient efficaces contre son développement. En agriculture biologique cependant, les moyens de lutte pouvant être mis en œuvre sont restreints à une réflexion au système de rotation culturale et à l'arrachage des plants infectés. Le développement de l'amélioration génétique sur ce trait serait donc parfaitement adapté à notre système de culture. La mise en place d'un test de phénotypage de la réponse à ce champignon serait intéressante pour décrire la variabilité de réponse au sein de la collection de ressources génétiques.

2.3. L'identification de nouveaux traits d'intérêt pour le phénotypage de *Stevia rebaudiana*

Ce travail de thèse a également mis en lumière de nouveaux traits d'intérêt pour le phénotypage de stévia. Certains sont liés à l'appareil racinaire, comme le développement des racines en première année, le stockage de molécules de réserves avant le passage de l'hiver, d'autres concernent la floraison. Leur étude permettrait de mieux comprendre la physiologie de cette culture et d'affiner les objectifs de sélection. En effet, comme cela a été discuté dans le chapitre sur la construction de l'idéotype, certains traits n'ont pas encore été étudiés sur les ressources génétiques de ce projet mais semblent être liés à des traits d'intérêt pour l'amélioration.

2.3.1. L'architecture du système racinaire de la stévia et sa physiologie sont encore largement méconnus.

L'étude présentée dans ce manuscrit sur l'impact de deux itinéraires culturaux sur le rendement de la stévia a ouvert de nombreuses questions sur la partie racinaire de la stévia et ses relations avec la partie aérienne, en particulier le suivi du stockage de ressources dans les racines. Parmi quelques articles scientifiques portant sur l'appareil racinaire de *Stevia rebaudiana*, certains donnent uniquement une description morphologique, décrivant les racines comme fasciculées, filiformes et peu ramifiées (Angelini *et al.*, 2018), se développant dans les premiers horizons du sol (Soejarto, 2002). D'autres ont dosé les SG sur des plants cultivés *in vitro* (Reis *et al.*, 2017; Kazmi *et al.*, 2019). De plus, le développement et l'établissement du système racinaire sont corrélés avec la productivité agronomique, en particulier dans la tolérance à certaines conditions défavorables, comme un stress hydrique pour le blé (Reynolds *et al.*, 2007) et pour le maïs (Gao and Lynch, 2016). Sur l'ensemble des cultures, les traits en lien avec les racines sont peu étudiés et leur phénotypage reste un frein pour l'amélioration génétique (Zhu *et al.*, 2011).

Le premier aspect à développer sur l'appareil racinaire de la stévia serait la description précise de son architecture racinaire, sa mise en place pendant l'implantation et son évolution avec les pratiques culturales et l'âge de la parcelle. Les techniques de phénotypage sur les racines ont principalement été développées en conditions de laboratoire. Des analyses non destructrices du système racinaire permettent d'évaluer la croissance des racines par des imagerie 3D *via* des scanners sur le riz (Fang *et al.*, 2009) ou encore sur la pomme de terre (Matteau *et al.*, 2019). Les dispositifs RhizoTubes ont été développés sur la plateforme Plant Phenotyping Platform for Plant and Micro-organism Interactions (4PMI) de l'INRAE Dijon (Figure 5.2.a). Ce sont

des tubes concentriques permettant le développement des racines le long d'une membrane poreuse à une solution nutritive (Jeudy *et al.*, 2016). L'installation RhizoCab permet un phénotypage non destructif et automatisé de la croissance racinaire. RhizoCab a été utilisée pour évaluer différentes architectures de plant ainsi que les interactions entre les racines des plantes et des microorganismes, comme entre le pois et *Medicago truncatula* (Jeudy *et al.*, 2016).



Figure 5.2.a : Dispositifs RhizoTubes développés par la plateforme 4PMI, INRAE Dijon, par Jeudy *et al.*, (2016).

Des analyses au champ ont également été développées. Historiquement celles-ci consistaient surtout à déraciner les plants et à réaliser des prélèvements de sol (Böhm, 1979). Elles sont toujours mises en œuvre aujourd'hui (Zhu *et al.*, 2011). Des techniques non destructives ont également été développées. L'installation de tubes minirhizotrons permet le suivi de la croissance des racines par caméras dans le long des tubes (Figure 5.2.b).

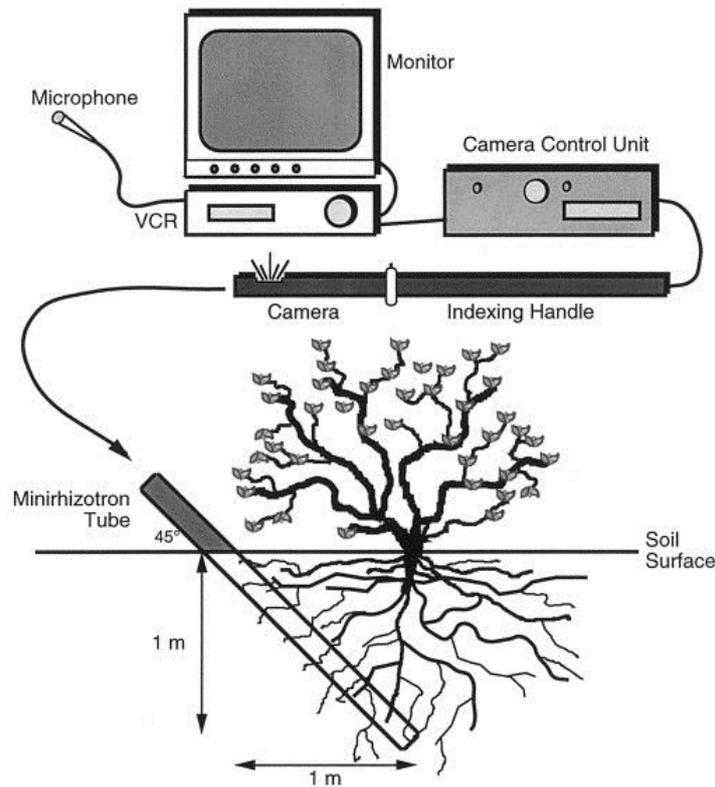


Figure 5.2.b: Système d'étude des racines par la mise en place de tubes minirhizotron (Johnson *et al.*, 2001).

Ces dispositifs permettent de récupérer plusieurs traits sur le système racinaire : le taux d'élongation racinaire, l'évolution de la surface, de la densité, du nombre et de la longueur des racines, l'estimation de la biomasse racinaire, ainsi que la profondeur de développement (Johnson *et al.*, 2001; Ao *et al.*, 2010). Cependant, la taille de ces tubes minirhizotrons limite la taille des racines pouvant être étudiée. Des techniques de radar pénétrant GPR (Ground Penetrating Radar) permettent d'étudier les racines des arbres, comme sur des cultures de peupliers et de pins (Zenone *et al.*, 2008). Enfin, la technique géophysique de prospection électrique (ou electrical resistivity tomography, ERI) a été développée plutôt sur les racines des arbres (Amato *et al.*, 2008) mais semble également adaptée pour estimer la biomasse racinaire et la densité des racines de luzerne (Amato *et al.*, 2008).

Comme cela a été observé dans l'article « to cut or not to cut » du Chapitre 2 de ce manuscrit, une récolte pendant l'année d'implantation engendre une diminution de la survie à l'hiver et du rendement en SG lors des années suivantes par rapport à une culture non récoltée pendant l'année d'implantation. Dans les cultures de myrtilles, des résultats similaires sont observés: une récolte en année d'implantation entraîne également une diminution du rendement les années suivantes (Strik and Buller, 2005). Chez stévia, nous ne connaissons pas les mécanismes mis

en œuvre lors de la plantation pour la croissance racinaire et l'accumulation de ressources avant l'hiver, ni ceux de re-mobilisation de ces réserves après l'hiver. La nature des molécules de stockage chez stévia est également inconnue. Des études ont émis l'hypothèse d'une utilisation des SG comme molécule de stockage. Un stockage à long terme semble le plus probable (De Guzman, 2010). La teneur en SG décrite dans les racines est cependant très faible (Bondarev *et al.*, 2003) avec une teneur comprise en 0.1 et 0.25%w/w (Ceunen and Geuns, 2013a). Ces mesures ont été réalisées sur des plants en serre au stade végétatif et mériteraient d'être approfondies.

Ces approches posent également la question de la relation source-puits entre la biomasse aérienne et la biomasse souterraine. En première année de production, est-ce que le développement de la biomasse aérienne se fait au détriment de la partie racinaire ? De plus, lors de la floraison ou de la reprise après l'hiver, quels sont les mécanismes d'utilisation des ressources qui sont mis en œuvre entre les organes présents ? L'étude des interactions existantes entre ces organes de la stévia permettraient de meilleurs conseils pour la gestion de la plantation.

2.3.2. L'étude des traits en lien avec la floraison permettra de mieux cibler la date de récolte.

De même, le processus de floraison est peu décrit chez *Stevia rebaudiana*. Pourtant, les traits liés aux stades phénologiques du cycle reproductif ont un intérêt pour la gestion de la culture et l'organisation de la récolte. En effet, il n'y a pas de consensus scientifique sur le stade phénologique permettant d'avoir le rendement en SG maximal. Ceunen and Geuns, (2013a) et Barbet-Massin, (2015) expliquent que le stade de début de floraison est celui qui présente la teneur maximale en SG, cependant ces tests ont été conduits en conditions de serre. Dans l'étude d'Hastoy (2018), conduite sur cinq géotypes en parcelle expérimentale, le rendement maximal en SG est obtenu quelques semaines avant la floraison, soit mi-août pour une culture dans le Sud-Ouest de la France. Une nouvelle évaluation du lien entre la mise à fleur et la variabilité de la teneur en SG serait une première information d'intérêt qui pourrait être réalisée sur les ressources génétiques à disposition dans le projet. De plus, il serait intéressant d'évaluer les facteurs impactant la date de floraison, car cela permettrait de mieux anticiper les récoltes. Les facteurs environnementaux comme la température et la photopériode pourront être ciblés en particulier. Les mécanismes jouant un rôle sur la mise à fleur ont été étudiés sur d'autres cultures. Des complexes de gènes impliqués dans la date de floraison ont été décrits sur des espèces modèles comme *A. thaliana* (photopériode longue) ou le riz (photopériode courte) (Bouché *et al.*, 2016). Les principaux facteurs régulant la date de floraison sont liés à la sensibilité à la photopériode, dépendant de l'acide gibbérélique, dépendant de l'âge du plant, liés à la température, et enfin dépendant de la nutrition carbonée et des niveaux de saccharose (Cho *et al.*, 2018). Ce réseau complexe se décline selon les cultures considérées. Le lien entre la floraison et la qualité de la fibre est de plus en plus étudié sur la culture du chanvre (Amaducci *et al.*, 2008; Petit *et al.*, 2020), elle semble être un bon modèle pour la stévia. De façon identique à la stévia, le chanvre est sensible à la photopériode et sa floraison est inhibée par de longues photopériodes, la floraison est également utilisée comme point de référence pour la récolte (Salentijn *et al.*, 2019). Le chanvre présente également une grande variabilité sur ce trait comme observé au sein du matériel génétique, en particulier sur la précocité de la floraison ainsi que la durée de cette même floraison (Amaducci *et al.*, 2008). L'équipe d'Amaducci *et al.*, (2012) a développé un modèle de prédiction de la date de floraison du chanvre en utilisant des données météorologiques et des paramètres phénologiques connus sur des cultivars. Ce modèle permet de mieux anticiper la date de semis et le choix du cultivar pour un environnement donné, il ne permet pas cependant de prévoir la date de récolte (Amaducci *et al.*, 2012).

Finally, the genetic improvement of stevia should pass through more precise, faster, less costly and allowing to measure a large number of individuals phenotyping methods. This step is indispensable to accelerate the improvement of cultures (Araus and Cairns, 2014a; Shakoor *et al.*, 2017). In fact, many authors warn against the « phenotyping bottleneck », due to the slower innovations in phenotyping methods compared to high-throughput genotyping methods (Furber and Tester, 2011; Araus and Cairns, 2014b; Mir *et al.*, 2019).

Chapitre 3. Perspectives pour la description de l'architecture génétique des traits d'intérêt et la mise en œuvre de stratégies de sélection sur stévia

3.1. Les résultats de ce travail de recherche permettent d'initier le programme d'amélioration de la stévia en collaboration avec les acteurs de la filière.

Si les outils et les connaissances sur le phénotypage de la stévia sont encore trop peu développés, ceux concernant le génotypage et la description de l'architecture génétique des traits d'intérêt de cette espèce le sont encore moins. En effet, la recherche sur l'amélioration génétique est principalement conduite par des entreprises privées, comme PureCircle®, Pepsi Co, Coca-Cola et Cargill® (Tavarini *et al.*, 2018). Ces entreprises ont surtout orienté la recherche vers l'augmentation du rendement en SG, en visant à augmenter la production de biomasse foliaire et la teneur en SG dans les plants mais aussi en ciblant la sélection d'un profil en SG faiblement pourvu en SG au goût amer. La recherche publique travaillant sur ces thématiques rencontre des difficultés pour s'organiser, comme en témoigne l'arrêt de l'activité de l'association European Stevia Association, EUSTAS, qui était dirigé par un chercheur belge Jan Geuns. A cela s'ajoute la difficulté d'obtenir une traçabilité sur le matériel végétal utilisé, qui est par ailleurs rarement caractérisé au niveau génétique. Enfin, très peu d'études portant sur la stévia ont analysé le phénotypage de populations. En effet, Barbet-Massin *et al.*, (2016) ont décrit le phénotype d'une population de 96 individus nommée « Criola », pour sa teneur en SG et le profil en SG. Cependant, aucune information sur les parents n'est disponible dans cette étude.

C'est pourquoi ce projet stévia poursuit le développement d'outils moléculaires permettant le génotypage de la stévia, travail mené par Patrick Cosson, ingénieur INRAE, ainsi que l'étude de l'architecture des caractères du rendement. Dans le cadre de ce projet de thèse deux axes de recherche ont été principalement développés. Tout d'abord, l'analyse du phénotypage des quatre populations de plein-frères implantées en parcelle expérimentale, présentées partie 4.1 Chapitre 4, a permis l'estimation des paramètres génétiques sur deux années de production (2018 et 2019) pour les traits d'intérêt agronomique. En effet, les mesures sur le rendement en SG, la production de biomasse foliaire, le profil en SG, et les traits en lien avec l'architecture, tels que le volume de la canopée et le Harvest Index ont été utilisés pour déterminer les paramètres génétiques relatifs à ces traits d'intérêt.

De plus, un travail collaboratif pour construire un idéotype de stévia a été initié entre des acteurs issus des partenaires du projet stévia, Chapitre 4, partie 4.2. Cet aspect de la thèse a été mis en place grâce à la participation de plusieurs acteurs, Aurélie Barada (Chef d'exploitation agricole), Cécile Hastoy (Responsable R&D chez Oviatis), Stéphan Plas (Ingénieur chez Invenio) et Zoé Le Bihan (Doctorante Oviatis/INRAE), intervenant à différentes étapes de la filière stévia : recherche / production / transformation et commercialisation. La construction de cet idéotype est passée par la production de documents de travail par Zoé Le Bihan, comme un état des lieux du contexte d'utilisation des idéotypes, et la synthèse des objectifs et des limites de chacun des participants. Ces documents ont systématiquement été soumis aux autres participants pour une validation. Les conclusions résultant de ces échanges prennent la forme d'un document de synthèse, regroupant les objectifs de sélection, et les traits à cibler pour l'amélioration de la stévia.

Le travail de phénotypage des descendances réalisé sur la parcelle de Blagon (33) a également permis l'identification d'individus élites avec des performances élevées en deuxième et troisième années de production. La sélection de ces individus a été réalisée sur des critères de performances sur les traits prioritaires pour la filière : biomasse foliaire supérieure à 50 g /plant g/plant, teneur en SG supérieure à 12 % w/w, une proportion de SG sucrés supérieure à 40% du profil, architecture compatible avec la mécanisation de la production. Les seuils de biomasse ont été établis avec Oviatis selon les estimations de rendements en SG communiqués aux nouveaux producteurs de stévia. Ils sont de 1,8 t en deuxième année et 2,2 t en troisième année, et dépendent de la densité choisie par les producteurs, allant de 40 000 à 59 000 plants / ha. Ces critères ont permis la collecte et le bouturage d'un set de 10 individus sur la parcelle par Cécile Hastoy et Zoé Le Bihan. Le critère de facilité de bouturage a conduit à éliminer deux individus. Les 8 plants élites restants seront multipliés pendant l'hiver pour être testés chez des producteurs lors de la prochaine saison de culture.

Enfin, la construction d'une carte génétique sur une des quatre populations de plein-frères et la détection de QTL sur les traits du rendement auraient dû être présentés dans ce manuscrit. Cependant, le trop faible nombre de marqueurs moléculaires disponibles pendant la réalisation de ce projet n'a pas permis de produire une carte complète. Ce point sera discuté dans la suite de cette discussion.

3.2. Stratégies pour l'amélioration génétique de la stévia dans le contexte d'une production locale en agriculture biologique

3.2.1. La stratégie employée jusqu'à présent : sélection massale et identification de clones élite

Jusqu'à présent, la stratégie d'amélioration de la stévia n'a été que faiblement développée. Le matériel majoritaire aujourd'hui est issu de lots de semences non caractérisés au niveau génétique, dont les performances sont le plus souvent hétérogènes en conditions de production (Hastoy, 2018). Des variétés clonales sont également utilisées. Cette stratégie est commune à de nombreuses cultures pérennes auto-incompatibles, comme chez l'avocatier avec le cultivar « Hass » (Talavera *et al.*, 2019) ou la mangue (Krishna and Singh, 2007). Elle consiste à sélectionner des individus élites dont les phénotypes répondent aux exigences de la production. Ces individus sont souvent obtenus au hasard. Les sélectionneurs réalisent une sélection massale positive sur les individus et conservent les plus performants pour une propagation plus large. Ces individus sont multipliés végétativement, par bouturage en serre ou en *in vitro* ce qui permet d'obtenir des clones aux performances homogènes (McClure *et al.*, 2014). Chez stévia, ces variétés clonales sont plutôt sélectionnées pour correspondre aux conditions de culture de l'agriculture conventionnelle, en s'intéressant principalement aux traits liés à la teneur en SG, la production de la biomasse et leur profil en SG. Plusieurs d'entre elles ont par ailleurs été déposées, comme la variété STEVILOMM (Lommerse, 2018), ou les variétés AKHL1 et AKHL4 (Britos, 2012, 2013). Enfin, un génotype multiplié végétativement est décrit comme étant adapté aux conditions de productions tempérées et tolérant aux saisons hivernales, il s'agit de Cult76_GER de la collection de l'EUSTAS (Lankes and Grosser, 2015). Le reste du matériel végétal n'a pas été sélectionné en conditions tempérées, ni pour une conduite en agriculture biologique.

Cependant, la stratégie de variétés clonales présente plusieurs limites. Son coût est plus important qu'une propagation par semis, et il est nécessaire d'avoir une grande quantité de pieds-mères pour la production d'un nombre de clones suffisants. L'utilisation d'un matériel génétique stable sur de nombreuses années peut également favoriser l'émergence de nouveaux agents pathogènes, qui eux évoluent au niveau génétique, par mutation ou reproduction sexuée (Myles, 2013; McClure *et al.*, 2014). C'est pourquoi cette stratégie est souvent nommée « épée à double tranchant » (Myles, 2013). De plus, les filières en agriculture biologique se heurtent à la problématique du matériel génétique à utiliser. La plupart des variétés développées sont adaptées à une agriculture conventionnelle, parfaitement homogènes et permettant une grande

stabilité pour une production de masse (Chable *et al.*, 2014). L'agriculture biologique ne correspond pas à une production stabilisée dans le temps, elle a plutôt besoin d'un matériel végétal conservant une part d'hétérogénéité (Enjalbert *et al.*, 2011). L'utilisation de mélange de clones cultivables pourrait permettre une solution intermédiaire.

Jusqu'à aujourd'hui, la filière de la stévia du Sud-Ouest de la France a privilégié l'utilisation de variétés clonales. En effet, la sélection de clones élites a permis assez rapidement le déploiement d'un matériel végétal bien adapté à la production du Sud-Ouest de la France en agriculture biologique. Et c'est dans ce cadre que des individus élites ont été identifiés au sein des populations phénotypées au champ. Cependant, à long terme cette stratégie peut se révéler problématique car le risque sanitaire est particulièrement important en agriculture biologique.

3.2.2. Les variétés synthétiques : une stratégie à long terme pour l'amélioration de la stévia

Une solution alternative est le développement de variétés synthétiques, qui consiste à produire une population artificielle, issue d'un croisement entre un nombre défini et contrôlé de parents choisis pour leur valeur propre ou en combinaison sur un certain nombre de traits d'intérêts (Gallais and Wright, 1980). Cette stratégie d'amélioration a déjà été employée par la stévia, avec la création de la variété « AC Black Bird » produite à partir de quatre géniteurs (Brandle, 2001). Pour développer plus largement cette stratégie, plus d'informations sur les ressources génétiques disponibles et leur potentiel pour la reproduction sont nécessaires. Aujourd'hui, c'est cette stratégie qui est privilégiée pour la sélection à long terme sur la filière stévia, car elle permettra le maintien de la diversité génétique pour la mise en place d'un système agricole plus résilient, sans faire l'impasse sur l'amélioration des performances agronomiques.

3.2.3. Les apports de la sélection assistée par marqueurs

Pour développer des variétés plus adaptées aux conditions de production, la stratégie d'amélioration privilégiée pour la filière de la stévia est la mise en œuvre d'une sélection assistée par marqueurs (SAM). Cette stratégie a déjà montré des résultats intéressants chez certaines plantes pérennes. Sur le pommier par exemple, une procédure de sélection de marqueurs associés aux gènes de résistance de la tavelure du pommier a pu être réalisée (Patocchi *et al.*, 2009). De même, l'acidité des fruits a pu être sélectionnée par SAM dans une collection de pêches (Wang, Wang, *et al.*, 2016).

Chez stévia, la SAM permettrait probablement un gain rapide sur le profil de SG. En revanche, le rendement en biomasse foliaire ou l'architecture des plants sont des traits plus compliqués à sélectionner par la mise en œuvre de la SAM car son application sur des traits complexes est

faiblement efficace. Elle se révèle souvent de moins performante que la sélection phénotypique quand les marqueurs identifiés ont un faible effet sur la variation génétique totale (Xu and Crouch, 2008). Shimizu *et al.*, (2020) considèrent que cette stratégie est difficile à mettre en œuvre sur les Citrus, du fait de la difficulté de mener des analyses à très larges échelles sur ces espèces. Luby and Shaw, (2001) décrivent cette stratégie comme étant pertinente pour l'amélioration des arbres fruitiers à plusieurs conditions : (1) les traits étudiés ont une hérédité est simple, (2) le trait est exprimé pendant toute la durée de vie de la culture et représente une forte valeur ajoutée pour la production, (3) la SAM peut être mise en œuvre précocement dans la durée de vie de la culture, (4) la technique de génotypage est peu coûteuse, (5) la SAM permet de sélectionner des individus supérieurs comparé aux autres techniques de sélection.

3.2.4. Conditions pour la mise en œuvre de la SAM sur l'amélioration de la stévia

La mise en œuvre de la SAM pour la filière de la stévia requiert la validation de plusieurs objectifs. Le premier objectif est le développement d'outils moléculaires, que ce soit des marqueurs SSR ou SNP, sur la culture de la stévia ce qui permettait de mieux connaître la diversité génétique. Le deuxième objectif est la production de descendances issues de différents parents, leur phénotypage en conditions de production et leur génotypage. Ce travail devrait permettre d'estimer le potentiel reproductif des géniteurs sur les différents traits d'intérêt pour la filière ainsi que le potentiel d'amélioration des différents traits ciblés, pertinents pour une amélioration par SAM. Enfin, le dernier objectif, consiste en la sélection de géniteurs au sein des parents préalablement testés, selon les résultats obtenus sur leurs descendants.

Pendant ce processus de tests et d'identification de géniteurs potentiels, les descendants présentant des performances agronomiques importantes pourront être intégrés à la collection, et testés pour une utilisation comme variétés clonales ou comme géniteurs. Ces étapes requièrent des infrastructures disponibles sur plusieurs années pour le stockage de la collection, la production de descendants et leur évaluation phénotypique. Cela exige du personnel formé et compétent pouvant intervenir sur les différentes étapes, et enfin un financement sur plusieurs années. Ce travail n'est pas envisageable sans le maintien de la forte interaction entre la recherche et la filière de la stévia. Il est nécessaire d'orienter la sélection des traits en fonction des contraintes et des exigences de la production agricole.

Dans ce contexte, la poursuite du travail de construction d'un idéotype est indispensable, car c'est une approche de sélection participative avec les partenaires du projet. Cette première version d'idéotype de stévia pour l'agriculture biologique a mis en évidence la forte implication des différents acteurs du projet. La volonté de chacun de partager ses connaissances et

d'échanger avec les autres participants est un atout considérable pour l'avancée du projet et permet une collaboration étroite de toute la filière stévia. Le processus de construction d'un idéotype est souvent intéressant pour la sélection, il permet de stimuler une réflexion sur la sélection d'une culture, de faire émerger et de formuler de nouvelles hypothèses (Rasmusson, 1987). La réflexion autour d'un idéotype permet des interactions entre les disciplines et les approches sur les traits d'intérêt et favorise la diversité de points de vue sur une même thématique (Martre *et al.*, 2015). La sélection collaborative est une démarche créative, qui peut servir de base pour une interaction entre acteurs n'ayant pas forcément l'habitude de travailler ensemble (Gauffreteau, 2018). Elle est particulièrement développée dans les filières en agriculture biologique en France (Chable *et al.*, 2014). Cette réflexion est déjà mise en œuvre dans le processus d'amélioration car les sélectionneurs font des choix sur les traits qu'ils souhaitent cibler. L'utilisation de l'idéotype permet de formaliser ces choix et d'aller plus loin dans la description des objectifs de sélection (Rasmusson, 1987). Enfin, le travail de construction de l'idéotype est un processus dynamique, qui nécessite d'être réévalué avec l'apport des nouvelles connaissances sur les traits d'intérêt, et la compréhension plus fine des mécanismes physiologiques de stévia.

3.3. Développer l'information génomique pour améliorer la stévia

Les perspectives de l'amélioration génétique de la stévia résident à la fois dans l'acquisition de nouvelles ressources génétiques, comme détaillé dans la partie 1, dans le développement d'outils de phénotypage plus précis, à plus grande échelle et sur de nouveaux traits, comme détaillé dans la partie 2, et enfin dans la recherche de nouveaux outils de génotypage.

3.3.1. Le développement de marqueurs moléculaires est facilité par la publication de la séquence du génome de la stévia.

Les outils moléculaires développés sur cette culture ont été assez restreints ces dernières années. En effet avant 2014, les outils de génotype développés sur stévia ont été principalement des marqueurs RADP ou ISSR (Yao *et al.*, 1999; Heikal *et al.*, 2008; Chester *et al.*, 2013). Le problème de ces marqueurs est leur faible reproductibilité (Schulman, 2007). De plus, la majorité des études les développaient sur un faible nombre d'individus. A partir de 2014, le développement de marqueurs SSR et SNP a commencé sur la stévia (Chen *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015; Markosyan *et al.*, 2017; Cosson *et al.*, 2019), permettant de décrire une plus grande diversité génétique. Les marqueurs SSR sont intéressants car ils sont plus reproductibles que les ISSR et les RADP. Les marqueurs SNP présentent également des atouts, car les nouvelles techniques de GBS (genotyping-by-sequencing) offrent des solutions pour l'identification d'un très grand nombre de SNP (Chung *et al.*, 2017). Dans l'équipe de l'INRAE de Villenave d'Ornon, Patrick Cosson a pu réaliser le développement de marqueurs SSR fiables et robustes permettant ainsi de décrire la diversité génétique de 145 individus (Cosson *et al.*, 2019). Une centaine de marqueurs supplémentaires ont pu être développés. Des marqueurs SNP ont pu être développés *de novo* grâce à une approche dd-RADseq et une validation bioinformatique, dans le cadre d'un projet en collaboration avec Biogeco, l'INRAE et le LABRI. En 2018, Galadriel Brière a réalisé les analyses bioinformatiques, elle a utilisé des critères assez stricts pour la validation des marqueurs car elle ne disposait pas de séquence de référence (Brière *et al.*, données non publiées). Son protocole est fiable car un nombre important de SNP identifiés par analyses informatiques a pu être validé par les tests biologiques. Cependant, cette méthode n'a pas permis de développer un grand nombre de marqueurs SNP, 761 uniquement.

Le faible développement des outils moléculaires s'explique principalement par le fait qu'aucune séquence complète du génome de la stévia n'a été publiée avant l'année 2020. En 2017, un consortium entre PureCircle®, Coca-Cola® et Keygene® a affirmé avoir séquencé le génome de stévia mais aucune séquence n'était publiée depuis (Schauer *et al.*, 2017). En

2020, une première séquence du génotype VGN1BUR7E3 a été communiquée sur la base de données NCBI par la société Iridian Genomes (O'Neill and Pirro, 2020).

La publication de la séquence du génome de stévia devrait donner un nouvel élan à la recherche sur la stévia. A présent, la séquence de la stévia va donc pouvoir être utilisée pour faciliter le développement de nouveaux marqueurs SSR et SNP. A l'échelle de ce projet, Patrick Cosson, pourra également poursuivre le travail de développement des marqueurs SSR, facilité par la disponibilité de cette séquence. De plus, les données de séquençage obtenues dans le projet en collaboration avec Biogeco et le LABRI pourraient être analysées de nouveau afin de poursuivre le développement de marqueurs SNP. L'accessibilité de la séquence du génome de stévia va également faciliter l'utilisation des outils moléculaires déjà développés sur les autres espèces de la famille des Astéracées. En effet, au sein de cette famille il existe des espèces pour lesquelles plus d'outils moléculaires sont disponibles, citons par exemple : le tournesol (Talukder *et al.*, 2014) et la laitue (Kwon *et al.*, 2013). Enfin, Chapman *et al.*, (2007), ont développé et identifié un set de 39 marqueurs, qu'ils qualifient d'universel entre des espèces de la famille des Astéracées. Ces marqueurs étant développés sur huit espèces de la famille des Astéracées, il serait intéressant de vérifier s'ils sont également applicables à la stévia.

De plus, les technologies du Next Generation Sequencing (NGS) peuvent permettre de poursuivre la découverte et le génotypage de marqueurs moléculaires au sein de larges collections de ressources génétiques. Les NGS offrent d'ailleurs de nombreuses perspectives pour l'amélioration génétique des plantes horticoles (D'Agostino and Tripodi, 2017). Parmi ces technologies, le GBS (Genotyping-by-Sequencing) permet la découverte de SNP à très large échelle et le développement des connaissances sur la diversité génétique au sein d'un germplasm (Taranto *et al.*, 2016; Voss- Fels and Snowdon, 2016).

3.3.2. Ces outils moléculaires devront permettre la construction de cartes génétiques robustes

Le développement de marqueurs moléculaires sur une espèce permet de décrire la diversité génétique au sein de cette même espèce. C'est également une condition *sine qua non* pour la construction de cartes génétiques robustes. A ce jour, une unique carte génétique est disponible sur stévia, elle a été publiée par Yao *et al.*, (1999) et a été construite grâce à des RAPD, marqueurs peu reproductibles. Cette carte est incomplète, 21 groupes de liaisons sont identifiés, et la résolution de la carte ne permet pas la détection de QTL. De plus, cette carte porte sur une population de 100 individus dont les parents n'ont pas été caractérisés au sein de la diversité génétique de la stévia. Dans le cadre du projet INRAE – Oviatis, la construction d'une carte

génétique est vite apparue comme indispensable pour travailler sur l'amélioration génétique. Ce travail a été mené par Patrick Cosson à partir de l'année 2019. La population Cult76_GER x Cult35_FRA, cultivée sur la parcelle de Blagon a été sélectionnée pour la construction de la carte génétique. En effet, l'étude plus approfondie des descendants issus de ces deux parents semblent être prometteuse. Cult76_GER et Cult35_FRA proviennent de clusters génétiques différents et ils présentent des traits contrastés. Cult76_GER se caractérise par une floraison tardive, un profil assez riche en SG amers et une teneur de SG moyenne à 11 % w/w en deuxième année de production. Cult35_FRA a une floraison précoce, un profil riche en SG sucrés et une teneur en SG à 14 % w/w en deuxième année de production, comme détaillé dans le chapitre 4 de ce manuscrit. Les résultats de phénotypage de cette population ont été présentés dans le même chapitre, et une variabilité phénotypique au sein de la population est confirmée pour la deuxième et la troisième années de production. La construction d'une carte partielle a été possible en 2020 grâce aux marqueurs SSR et SNP préalablement développés. Cependant leur nombre restreint pouvant être appliqué à cette population n'a pas permis pas de valider tous les groupes de liaisons de façon robuste. Les prochaines étapes de ce travail sont donc le développement de nouveaux marqueurs moléculaires sur cette carte. Ces résultats et les mesures de phénotypage de cette population pourront ensuite être utilisés pour la détection de QTL, ciblant en premier lieu des traits d'intérêt au rendement en SG et le profil en SG lui-même. Ces résultats devraient permettre d'initier une SAM sur la stévia. En 2020, cette population a été de nouveau phénotypée sur la parcelle de production, permettant de récupérer les mesures de phénotypage en quatrième année de production. Il existe donc un fort potentiel à poursuivre la collecte de données de phénotypage sur cette population sur les traits liés au rendement en SG directement mesuré au champ. La réponse à une infection de septoriose pourrait également être mesurée grâce au protocole développé dans ce projet de thèse.

Un autre axe de développement serait l'évaluation de cette population à d'autres zones de productions du Sud-Ouest de la France. Ce qui permettrait d'estimer l'interaction génotype x environnement.

3.3.3. Investigation de l'effet GxE

La connaissance de l'interaction génotype x environnement (GxE) est également un aspect à développer pour l'amélioration génétique de la stévia. En effet, notre population a été phénotypée dans un seul environnement. La mise en place d'essais multi-environnements permet d'évaluer l'ampleur de l'interaction GxE et la performance des génotypes entre les différents environnements (Shalizi and Isik, 2019). Deux types d'interactions GxE peuvent être

mesurés (Lynch and Walsh, 1997; White *et al.*, 2007; Li, Suontama, *et al.*, 2017), la première est une interaction entraînant un changement de classement des génotypes entre les environnements, la deuxième est une interaction du niveau d'expression mais qui n'entraîne pas de changement dans l'ordre du classement des génotypes. La connaissance de l'interaction GxE peut déboucher sur plusieurs stratégies : des génotypes spécifiques peuvent être sélectionnés pour leurs performances dans certains environnements spécifiques, ou un groupe de génotypes largement adaptés peuvent être sélectionnés pour être déployés dans de nombreux environnements (Li, Suontama, *et al.*, 2017). A notre connaissance, aucune étude n'a étudié cette interaction sur l'espèce *Stevia rebaudiana*.

Pour mettre en place ce type de protocole, il est nécessaire d'identifier le design expérimental qui serait le plus adapté aux objectifs de ce projet. Deux échelles géographiques peuvent alors être envisagées pour la mise en œuvre d'essais multi environnements (MET). Le déploiement d'une même population directement chez les producteurs du réseau Oviatis / SweetVia permettrait une évaluation à une échelle locale. En effet, les parcelles actuelles sont localisées dans le Lot-et-Garonne, le Pays Basque, le Gers et les Landes. Cette approche permettrait de mieux guider la sélection de la stévia pour le Sud-Ouest de la France et offrirait également une nouvelle interaction entre recherche et production pouvant être très positive sur le développement de la filière. Cela a été employé dans d'autres projets d'amélioration : Shalizik and Isik, (2019) ont étudié la même population de *Pinus taeda* L. plantée dans huit zones du Sud-Est des Etats-Unis. La deuxième échelle géographique pourrait être élargie à différentes zones de production en conditions tempérées et ainsi des pays producteurs pourraient être intégrés à l'étude via les partenariats dans le monde de la stévia : Etats-Unis, Argentine, Italie, France, selon les partenaires du projet. Cela permettrait également de consolider les liens entre les équipes de recherche travaillant sur la stévia.

Le choix de la ou des populations à planter et à phénotyper est également à réfléchir. L'étude de Shalizik and Isik, (2019) a permis de déployer 2362 descendants issus de 53 croisements, qui ont tous été clonés et plantés dans tous les environnements d'étude. Ce design permet d'obtenir de nombreuses données et de réaliser des analyses poussées, mais il nécessite un investissement financier et humain que la filière stévia ne peut actuellement pas soutenir. A ce jour, les connaissances phénotypiques et génotypiques les plus développées le sont sur la population Cult76_GER x Cult35_FRA pour laquelle une carte génétique devrait être disponible en 2021. L'utilisation de cette population déjà étudiée permettrait d'approfondir les connaissances à son sujet. Enfin, la question du nombre et du type de traits à étudier se pose.

En priorité, les traits en lien avec le rendement en SG : biomasse foliaire, teneur en SG et profil en SG sont indispensables.

3.3.4. GWAS, sélection génomique, et New Plant Breeding Techniques : autant d'approches avec un fort potentiel chez les cultures pérennes, dont la stévia.

De nouvelles approches en amélioration génétique des cultures ont émergé ces dernières années, et d'autres semblent très prometteuses pour l'avancée de la recherche sur les plantes pérennes.

Chez les plantes pérennes, le phénotypage de nombreuses populations est coûteux, demande un suivi très long et beaucoup d'espace et de main d'œuvre. Le développement des analyses de GWAS (Genome-Wide Association Studies) ouvre des perspectives intéressantes et permet de valoriser les collections de ressources génétiques existantes pour de nombreuses cultures pérennes (D'Agostino and Tripodi, 2017). Ces ressources génétiques sont la plupart du temps déjà caractérisées au niveau de la diversité génétique et une approche GWAS peut permettre de valoriser ces collections (Migicovsky *et al.*, 2019). Cette méthode présente donc un potentiel prometteur sur la culture de la stévia et a fait ses preuves sur d'autres cultures pérennes, comme sur l'étude de traits en lien avec la forme des feuilles et le poids des fruits sur l'olivier (Kaya *et al.*, 2019) ou sur l'identification de QTL de résistance au *Plum Pox Virus* chez les abricotiers (Mariette *et al.*, 2016). La collection de ressources génétiques de l'INRAE de Villenave d'Ornon, composée des ressources génétiques actuellement étudiées ainsi que des futures ressources génétiques collectées pourraient être phénotypées pour réaliser une analyse GWAS.

La sélection génomique montre également des perspectives intéressantes sur les plantes pérennes *via* la prédiction des valeurs génétiques (Kainer *et al.*, 2015). Son principal avantage est la diminution des coûts par cycle de sélection, et la réduction du temps nécessaire au développement d'une variété (Crossa *et al.*, 2017). McClure *et al.*, (2014) considère que c'est un axe intéressant pour l'amélioration du rendement des plantes pérennes. Cependant, son application sur ce type de culture montre des résultats contrastés. Des études réalisées sur le pin maritime (Isik *et al.*, 2016) ou les eucalyptus et les arbres à thé (Kainer *et al.*, 2015) indiquent qu'elle n'est pas fiable sur tous les traits. Enfin, les New Plant Breeding Techniques (NPBT) utilisent des étapes de modifications génétiques et permettent d'obtenir des variétés ne présentant pas de gènes étrangers (Schaart *et al.*, 2016). Elles semblent prometteuses sur l'amélioration des plantes pérennes (Bokszczanin, 2019). Mais la mise en œuvre de ces techniques a plutôt été développée sur des cultures déjà très améliorées, comme le riz (Li *et al.*, 2012) ou le maïs (Shukla *et al.*, 2009) et est peu compatible avec l'Agriculture Biologique.

Perspectives de ce travail de recherche

Vers le développement la filière stévia dans le Sud-Ouest
de la France et la poursuite des efforts de recherche à l'INRAE
de Villenave d'Ornon

1.1. Perspectives de développement de la filière stévia en Agriculture Biologique

1.1.1. L'apport des résultats de cette thèse

Dans le cadre de cette thèse CIFRE, le travail de recherche réalisé doit soutenir le développement local de la filière stévia. Pour cela, des outils et données développés pendant le doctorat sur le phénotype des ressources génétiques sont transférés à la société Oviatis. Ces connaissances participent directement à la prise de décisions stratégiques au sein de la société Oviatis et de l'association des producteurs SweetVia. Durant toute la durée du doctorat, des réunions organisées tous les trimestres ont permis des présentations des résultats obtenus les mois précédents et de nombreux échanges entre les acteurs du projet.

Certains résultats de ce doctorat ont conduit à un transfert de connaissances et de compétences immédiat pour la filière. Tout d'abord, l'échelle BBCH de stévia a pu être synthétisée sous la forme d'une fiche par Zoé Le Bihan et Cécile Hastoy, comme présenté dans le Chapitre 1, à destination des acteurs de la filière. Cécile Hastoy a également utilisé la notation de ces stades phénologiques pour détailler l'itinéraire technique de la stévia.

Les résultats de phénotypage des performances agronomiques des ressources génétiques étudiées ont également été chaque année communiqués à la filière. Certaines des ressources génétiques évaluées pendant ce travail de recherche sont aujourd'hui utilisées comme variétés clonales pour la production. Si ces parcelles n'ont pas été cultivées en conditions AB, elles apportent cependant des informations très intéressantes pour la filière car elles ont été suivies jusqu'en quatrième année de production. De telles données ne sont pas disponibles sur les parcelles de production, en effet, la plus ancienne parcelle de production de stévia a été plantée en 2018 chez Aurélie Barada. Ces résultats permettent une estimation du rendement en production des prochaines années pour les ressources génétiques utilisées comme variétés clonales, c'est-à-dire Cult35_FRA, Cult36_FRA, Cult37_FRA et Cult102_SPA. L'étude de deux itinéraires culturaux, plants récoltés en première année et plants non récoltés, apporte également des informations directement applicables pour la production.

De plus, ces mêmes ressources génétiques ont été phénotypées sur le trait de réponse à une infection de septoriose, indiquant la variabilité de réponse présente au sein de la collection. Ces résultats permettent à la filière de déterminer les RG les plus sensibles parmi celles utilisées pour la production, soit Cult37_FRA et Cult36_FRA, qui seront plutôt cultivées dans des zones peu touchées par la septoriose. Ils permettent également de sélectionner les ressources

génétiques présentant un niveau de symptômes faible, plus compatibles avec la production en Agriculture Biologique. Enfin, l'identification de descendants aux performances agronomiques particulièrement prometteuses a permis un transfert direct de ces individus à la filière, qui seront testés chez des producteurs dès l'année 2021. Une utilisation comme variétés clonales est envisagée dès l'année 2022. La construction d'un idéotype avec plusieurs acteurs de la filière stévia a aussi permis de réaliser la synthèse des objectifs d'amélioration de la filière de l'année 2020. L'idéotype est directement utilisable pour la filière comme outil de communication sur les axes de recherche autour de la stévia.

Le transfert de certaines connaissances pouvant être utiles à la filière est également prévu à plus long terme, soit de 3 à 10 ans. La filière reste très restreinte et Oviatis n'a pas encore un pôle entièrement dédié à la R&D (Recherche et Développement). Cécile Hastoy, Responsable R&D filière amont, ne peut pas encore se consacrer à temps plein à cette activité car ses missions sont actuellement très étendues, en particulier avec le suivi de la production. Dans les prochaines années, Oviatis souhaite recruter un salarié en charge de ce suivi agronomique, ce qui devrait permettre à Cécile Hastoy de se consacrer aux activités de R&D à temps plein.

Le développement des tests d'inoculation sur disques foliaires est un protocole indispensable à transférer à Oviatis. En effet, il pourrait permettre de tester des traitements en Agriculture Biologique en conditions contrôlées, avant d'envisager de le faire sur les parcelles de production, ou encore de tester des descendance sur ce trait directement au sein de l'entreprise. Cependant, Oviatis ne possède pas encore les infrastructures nécessaires à la conservation en collections des isolats de *Septoria* sp. et à la mise en œuvre d'un tel test en conditions contrôlées qui nécessite une chambre de culture ou encore une hotte à flux laminaire.

Enfin, certaines compétences et connaissances relatives à la description génétique de la stévia et à son amélioration génétique seront également transférables à long terme, comme l'utilisation de l'idéotype. En effet, il est indispensable de ré-actualiser le cahier des charges, voire d'en développer plusieurs, et de compléter les objectifs de sélection qui y sont associés selon l'avancée des recherches sur stévia. Cette mise à jour permettra de mieux orienter les axes de recherche sur les traits ciblés. De même, l'évaluation phénotypique des descendance doit être poursuivie et complétée par des analyses QTLs avant d'être utilisable pour la filière, c'est d'ailleurs un des objectifs des prochaines années.

Enfin, toutes ces propositions sont à mettre en perspective avec l'âge et le contexte de la filière stévia. En effet, cette dernière n'a que quelques années et la culture de la stévia peut être caractérisée d'orpheline, car elle est encore très peu étudiée aujourd'hui.

1.1.2. Les objectifs de l'entreprise Oviatis des prochaines années

Pour l'entreprise Oviatis, l'enjeu principal des prochaines années est de parvenir à augmenter les surfaces cultivées de stévia en AB pour produire plus de matière première, c'est-à-dire plus de biomasse foliaire. Cela est possible en contractualisant de nouveaux agriculteurs, mais également en augmentant les surfaces chez les agriculteurs déjà investis dans la production de stévia. Pour se faire, plusieurs stratégies sont d'ores et déjà employées. Tout d'abord, des journées techniques de découverte de la production pour les agriculteurs souhaitant s'investir dans le projet stévia ont été organisées en 2019 et 2020 et de nouvelles sont prévues pour 2021. Ces journées permettent de conforter le réseau des producteurs de stévia et d'échanger sur des questions techniques relatives à la production de cette culture (choix de la parcelle, plantation, mécanisation, récolte...) en particulier grâce à la visite de la ferme-référence d'Aurélié Barada (EARL Gaffier, dans le Lot-et-Garonne), présidente de l'association SweetVia. De plus, ce réseau est consolidé par les échanges organisés par l'association SweetVia, avec l'assemblée générale annuelle, qui permet un dialogue entre les producteurs déjà investis dans la filière. Concernant l'amont de la production, Oviatis et SweetVia ont également pour ambition de produire leurs propres plants, afin de contrôler toutes les étapes de la filière, de diminuer les coûts d'implantation et de mieux gérer les risques sanitaires liés aux pathogènes de la stévia, comme la septoriose. Pour cela, ils souhaitent louer une serre, infrastructure qui sera également utilisée pour élargir la collection de ressources génétiques de stévia.

La législation autour de la commercialisation de produits à base de stévia ou de SG évolue beaucoup ces dernières années et facilite plutôt leur démocratisation sur le marché. Cependant, ces évolutions ne permettent pas encore de commercialiser l'infusion de stévia pour des clients industriels qui réaliseraient une transformation. Cela est un véritable frein pour l'activité d'Oviatis, qui a décidé de développer sa propre gamme de produits issus des infusions concentrées de stévia. Les premiers produits seront des sirops zéro sucre au goût citron et menthe.

Enfin, Oviatis poursuit ses efforts de diversification des distributeurs, avec des magasins spécialisés comme Aventure Bio, Pronadis, BioCoop, le Marché des Saveurs, mais aussi des enseignes de la grande distribution comme Carrefour BIO, Intermarché.

1.2. Perspectives de recherche pour le projet stévia

Le partenariat avec l'équipe « stévia » de l'INRAE de Villenave d'Ornon se trouve consolidé par la perspective d'une nouvelle thèse CIFRE entre Oviatis et l'INRAE. Les objectifs de ce projet de doctorat sont : (1) la mise en place d'une méthode de phénotypage précoce des teneurs en SG des descendances par technique NIRS, (2) l'évaluation de descendances chez différents producteurs afin d'évaluer l'interaction GxE, (3) le phénotypage et le génotypage de descendances de *Stevia rebaudiana* et la détection de QTL sur ces mêmes descendances.

De plus, l'équipe de recherche de Valérie Schurdi-Levraud poursuit le développement de partenariat avec d'autres équipes de recherche travaillant sur la stévia. Une première collaboration avec Luis Ernesto Erazzu de l'INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de Tucuman et Carlos Jorge Budeguer, de l'Université de Tucuman en Argentine, a conduit à la publication d'un article scientifique en 2018. Fortes de ce succès, les deux équipes ont soumis en 2019 un projet ECOSUD visant à financer des déplacements de chercheurs, ingénieurs et doctorants. Ce projet a été accepté en 2020, mais les déplacements n'ont pu commencer du fait de la situation sanitaire. L'objectif de ce partenariat est de favoriser l'échange de compétences entre les équipes ainsi que l'échange de matériel végétal. A long terme, l'utilisation d'un set de ressources génétiques « référentes » dans les différents environnements d'étude et aussi l'évaluation d'une population dans ces deux environnements seraient très intéressantes pour étudier l'interaction génotype x environnement chez stévia, qui n'est pas décrit pour l'instant pour cette culture.

Une deuxième collaboration est en construction avec l'équipe de Ryan Warner, Michigan University. La synthèse bibliographique réalisée dans l'introduction de ce manuscrit va servir de base pour la rédaction d'une revue sur l'amélioration génétique de la stévia, écrite avec Ryan Warner et notre équipe. De plus, cette équipe a investi de nombreux efforts sur le développement de marqueurs moléculaires et leur utilisation pour construire une carte génétique. Les séquences des marqueurs SSR utilisés pour la construction de cette carte nous ont été envoyées en juin 2020. Ces marqueurs seront ajoutés à ceux utilisés pour la construction de la carte génétique réalisée au sein de l'équipe, permettant un ancrage entre les deux cartes. A terme, la consolidation de ce partenariat pourrait permettre d'intégrer de nouvelles ressources génétiques et de former une base d'outils moléculaires pour l'étude de stévia.

Enfin, l'équipe de la stévia fait partie d'un projet « Multitypage » porté par Olivier Lepais, Chargé de recherche sur la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux et financé par le

LabEx COTE. Ce projet a pour objectif le développement de marqueurs et de protocoles de géotypage SNP et SSR.

L'amélioration génétique ne pourra répondre à toutes les problématiques rencontrées par la filière, car l'architecture génétique de certains traits est complexe, comme la production de biomasse. C'est pourquoi le développement de connaissances et outils axés sur l'amélioration génétique par l'équipe de l'INRAE doit s'accompagner d'une meilleure connaissance de la conduite de la culture de la stévia. Dans le projet actuel c'est le rôle d'Invenio. En effet, de nombreux aspects de la conduite de culture sont encore mal maîtrisés sur la culture de la stévia, comme la nutrition azotée, la conduite culturale favorisant une bonne survie à l'hiver, et les meilleures conditions de récolte. Deux axes sont prioritaires car ils engendrent de fortes pertes de rendement. Il s'agit donc d'étudier les leviers agronomiques permettant une meilleure gestion du risque fongique et des adventices.

Conclusion

Finally, this research work carried out within a CIFRE thesis contract has allowed the development of description and phenotyping tools adapted to the cultivation of stevia, with the adaptation of the BBCH scale to the cultivation of stevia, and the validation of the inoculation protocol of septoria on stevia leaf discs. It has also allowed to improve the knowledge on the phenotypic variability of a collection of genetic resources. This set of genetic resources has been evaluated on agronomic performance traits in production conditions, allowing to compare two harvest modalities during the year of implantation and to follow the individuals up to the fourth year of production. This same collection has also been evaluated on a trait of sensitivity to abiotic stress, with the evaluation of the recovery after winter, but also on a trait of sensitivity to a biotic stress, a septoria infection. The phenotypic follow-up of four stevia populations has resulted in the description of genetic parameters of yield traits. Finally, the collaboration between the actors of the stevia sector has led to the construction of an ideotype for organic agriculture. The results obtained in this doctorate have been communicated to the scientific community, through oral presentations but also through the writing of scientific articles, but also transferred to the stevia sector, through numerous follow-up meetings of the project for and by the production of sheets for producers. The work presented in this manuscript testifies to the richness of the collaboration between Oviatis and the INRAE team as well as the actors of the stevia sector, Sweet Via and Invenio. The perspectives of this project are numerous, first of all thanks to the continuation of these works by a new CIFRE thesis validated between Oviatis and INRAE, but also thanks to international collaborations in construction, in particular with the team of Ryan Warner, Michigan, and Carlos Jorge Budeguer, Argentina.

Bibliographie

- Abdelsalam N, Haraz A, Khalid A, Saleh M, Elsheikh A, 2016. Genetic Improvement through Selection of Different *Stevia rebaudiana* Genotypes. Alexandria Science Exchange Journal 37:10–25.
- Adams MW, 1982. Plant architecture and yield breeding. Iowa State Journal Of Research 56:225–54.
- AFSSA, 2009. Saisie N°2011-SA-0012. Avis de l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire des aliments sur un nouveau projet d'arrêté relatif à l'emploi du rébaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana* comme additif alimentaire.
- Ahanger MA, Tyagi SR, Wani MR, Ahmad P, 2014. Drought Tolerance: Role of Organic Osmolytes, Growth Regulators, and Mineral Nutrients. In: Ahmad P, Wani MR (eds) Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment: Volume 1. Springer, New York, NY, pp 25–55. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8591-9_2
- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A, 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research 212–213:29–37.
- Alves LM, 1976. *The gibberellin and the gibberellin-like substances of Stevia Rebaudiana bertonii*. PhD thesis, University of Chicago Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=7149849>
- Alves LM, Ruddat M, 1979. The presence of gibberellin A20 in *Stevia rebaudiana* and its significance for the biological activity of steviol. Plant Cell Physiol 20:123–30.
- Amaducci S, Colauzzi M, Bellocchi G, Cosentino SL, Pahkala K, Stomph TJ, Westerhuis W, Zatta A, Venturi G, 2012. Evaluation of a phenological model for strategic decisions for hemp (*Cannabis Sativa* L.) biomass production across European sites. Industrial Crops And Products 37:100–10.
- Amaducci S, Colauzzi M, Zatta A, Venturi G, 2008. Flowering Dynamics in Monoecious and Dioecious Hemp Genotypes. Journal Of Industrial Hemp 13:5–19.
- Amato M, Basso B, Celano G, Bitella G, Morelli G, Rossi R, 2008. In situ detection of tree root distribution and biomass by multi-electrode resistivity imaging. Tree Physiol 28:1441–8.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends In Ecology & Evolution 19:535–44.
- Andolfi L, Macchia M, Ceccarini L, 2006. Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. Italian Journal Of Agronomy 1:257–262.

- Andrade D, Pan Z, Dannevik W, Zidek J, 2009. Modeling Soybean Rust Spore Escape from Infected Canopies: Model Description and Preliminary Results. *Journal Of Applied Meteorology And Climatology* 48:789–803.
- Andrivon D, Giorgetti C, Baranger A, Calonnec A, Cartolaro P, Faivre R, Guyader S, Lauri PE, Lescourret F, Parisi L, Ney B, Tivoli B, Sache I, 2013. Defining and designing plant architectural ideotypes to control epidemics? *European Journal Of Plant Pathology* 135:611–7.
- Angayarkanni T, Subash A, Tamilselvi V, Kamalakannan A, 2012. Antimicrobial compounds production by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Asian Journal Of Research In Chemistry* 5:61–4.
- Angelini LG, Martini A, Passera B, Tavarini S, 2018. Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges. In: Mérillon J-M, Ramawat KG (eds) *Sweeteners*. Springer International Publishing, Cham, pp 35–85. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-27027-2_8
- Angelini LG, Tavarini S, 2014. Crop Productivity, Steviol Glycoside Yield, Nutrient Concentration and Uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean Field Conditions. *Communications In Soil Science And Plant Analysis* 45:2577–92.
- Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA, 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55:37–43.
- Ao J, Fu J, Tian J, Yan X, Liao H, 2010. Genetic variability for root morph-architecture traits and root growth dynamics as related to phosphorus efficiency in soybean. *Functional Plant Biology* 37:304–12.
- Araus JL, Cairns JE, 2014a. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends In Plant Science* 19:52–61.
- Araus JL, Cairns JE, 2014b. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends In Plant Science* 19:52–61.
- Archontoulis SV, Struik PC, Vos J, Danalatos NG, 2010. Phenological growth stages of *Cynara cardunculus*: codification and description according to the BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 156:253–70.
- Arcila-Pulgarín J, Buhr L, Bleiholder H, Hack H, Meier U, Wicke H, 2002. Application of the extended BBCH scale for the description of the growth stages of coffee (*Coffea* spp.). *Annals Of Applied Biology* 141:19–27.
- Arraiano LS, Brown JKM, 2017. Sources of resistance and susceptibility to *Septoria tritici* blotch of wheat. *Molecular Plant Pathology* 18:276–92.
- Arturo MC, González CT, Peña EJ, 2009. Microorganismos patógenos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bioagro* 21:173–8.

- Assefa T, Beebe SE, Rao IM, Cuasquer JB, Duque MC, Rivera M, Battisti A, Lucchin M, 2013. Pod harvest index as a selection criterion to improve drought resistance in white pea bean. *Field Crops Research* 148:24–33.
- Balbin KMR, Salazar BM, 2017. Flowering response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to different photoperiods and nitrogen levels. In: *Philippine Journal of Crop Science* (Philippines). Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH2018000051>
- Ballesteros R, Ortega JF, Hernandez D, Moreno MA, 2018. Onion biomass monitoring using UAV-based RGB imaging. *Precision Agriculture* 19:840–57.
- 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 steviol*. PhD thesis Available from: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00003080/>
- 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 (F.M. DaMatta, Ed.). *PLOS ONE* 10 Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133067>
- 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. *Genetic Resources And Crop Evolution* 63:685–94.
- Barriocanal LA, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez JT, Jimenez N, Rojas V, 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology And Pharmacology* 51:37–41.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S, 2014. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. ArXiv:1406.5823 [Stat] Available from: <http://arxiv.org/abs/1406.5823>
- Bebber DP, Field E, Gui H, Mortimer P, Holmes T, Gurr SJ, 2019. Many unreported crop pests and pathogens are probably already present. *Global Change Biology* 25:2703–13.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V, 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers In Plant Science* 5 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00228/full>
- Benelli G, Canale A, Romano D, Flamini G, Tavarini S, Martini A, Ascriczzi 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* 11:381–8.
- Benhmimou A, Ibriz M, Al Faïz C, 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* 7:83–9.

- Bergs D, Burghoff B, Joehnck M, Martin G, Schembecker G, 2012. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit* 7:147–54.
- Bertetti D, Pensa P, Saracco P, Gullino ML, Garibaldi A, 2009. First report of *Botrytis cinerea* on potted plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni observed in Liguria (Northern Italy). *Protezione Delle Colture*:27–8.
- Bertoni M, 1905. Le Kaà Hê-é: sa nature et ses propriétés. *Anales Cientificos Paraguayos*: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, Ahuja PS, Sharma RK, 2015. Functionally relevant novel microsatellite markers for efficient genotyping in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal Of Genetics* 94:75–81.
- Bililign T, Moore JC, 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* 62:1384–9.
- Blancard D, 2013. Tomato - *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*). Ephytia Available from: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5197/Tomate-Athelia-rolfsii-Sclerotium-rolfsii>
- Blazek J, Opatova H, Golias J, Homutova I, 2007. Ideotype of apples with resistance to storage diseases. *Horticultural Science* 34 Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2008000069>
- Blundell JE, Hill AJ, 1987. Artificial Sweeteners and the Control of Appetite: Implications for the Eating Disorders. In: Worden AN, Parke DV, Marks J (eds) *The Future of Predictive Safety Evaluation: In Two Volumes Volume 2*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 263–81. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-009-3201-2_19
- Böhm W, 1979. *Methods of Studying Root Systems*. Springer Science & Business Media.
- Bokszczanin KŁ, 2019. Future Breeding Strategies. In: Korban SS (ed) *The Pear Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 301–15. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-11048-2_16
- Boku U, Morita T, ト宇成, 守田豊重, 2000. ステビア植物の新品種. Available from: <https://patents.google.com/patent/JP2000032859A/en?q=cultivar+stevia&assignee=morita>
- Bondarev NI, Sukhanova MA, Reshetnyak OV, Nosov AM, 2003. Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. *Biologia Plantarum* 47:261–4.
- Bouché F, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C, 2016. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* 44:D1167–71.

- Bourgeois B, Munoz F, Fried G, Mahaut L, Armengot L, Denelle P, Storkey J, Gaba S, Violle C, 2019. What makes a weed a weed? A large-scale evaluation of arable weeds through a functional lens. *American Journal Of Botany* 106:90–100.
- Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM, 2002. A Gene-for-Gene Relationship Between Wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria Tritici* Blotch Pathogen. *Phytopathology* 92:439–45.
- Brandán JP, Curti RN, Acreche MM, 2019. Phenological growth stages in chia (*Salvia hispanica* L.) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae* 255:292–7.
- Brandle J, 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal Of Plant Science* 79:85–91.
- Brandle J, 2001. *Stevia rebaudiana* with altered steviol glycoside composition. Available from: <https://patents.google.com/patent/US6255557B1/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=1>
- 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* 50:613–22.
- 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* 72:1263–6.
- Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M, 1998. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal Of Plant Science* 78:527–536.
- Brandle JE, Sys EA, Marsolais AA, 1998. Stevia plant named `RSIT 95-166-13`. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP10563/en>
- Brandle JE, Telmer PG, 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68:1855–63.
- Bridel M, Lavieille R, 1931. The sweet principle in Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*. Bertoni). II. Hydrolysis of stevioside by enzymes. III. Steviol by enzymic hydrolysis and isosteviol by acid hydrolysis. *Bulletin De La Société Chimique Biologique* 13:781–96.
- Britos ERA, 2012. Stevia plant named ‘AKH L1’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP23164P3/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=2>
- Britos ERA, 2013. Stevia plant named ‘AKH L4’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP23728P3/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=2>
- Brower RJ, Carlson TL, Dang B, Gonzalez MD, Kennedy MM, Knutson NE, 2016. Stevia plants with an increased rebaudioside d content. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20160021918A1/en>

- Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C, 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics And Biology* 79:33–41.
- Buck M, Hamilton C, 2011. The Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity. *Review Of European Community & International Environmental Law* 20:47–61.
- Budeguer CJ, Camadro EL, Erazzo LE, 2018. Pollen viability and meiotic irregularities in a collection of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni cultivated in Tucumán, Argentina. Available from: <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/98295>
- Campbell GS, Norman, 1990. *Plant Canopies: Their Growth, Form and Function*. Cambridge University Press.
- Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB, Powell ALT, 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends In Plant Science* 13:610–7.
- Capaste, 2016. Uso del sello dela Capaste. Available from: http://capaste.org.py/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=89
- 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:S1–10.
- Carciochi WD, Schwalbert R, Andrade FH, Corassa GM, Carter P, Gaspar AP, Schmidt J, Ciampitti IA, 2019. Soybean Seed Yield Response to Plant Density by Yield Environment in North America. *Agronomy Journal* 111:1923–32.
- Cargill, 2018. Application of the approval of steviol glycosides from *Saccharomyces cerevisiae* expressing steviol glycosides biosynthesis pathway genes under Australia and New Zealand Food Standard Code - Standard 1.3.1 - Food Additives.
- Carneiro JWP, 1990. *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni: produção de sementes. Maringá: Fundação Universidade Estadual De Maringá
- Carneiro JW, 2007. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. *Canadian Journal Of Plant Science* 87:861–5.
- 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* 20:933–43.
- Carrieri R, Cozzolino E, Tarantino P, Cerrato D, Lahoz E, 2015. 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. *IPTA*:116.

- Castel T, Lecomte C, Richard Y, Lejeune-Hénaut I, Larmure A, 2017. Frost stress evolution and winter pea ideotype in the context of climate warming at a regional scale. *Oilseeds And Fats Crops And Lipids* 24:D106.
- Ceunen, Geuns, 2013a. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198:72–82.
- Ceunen, Geuns, 2013b. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198:72–82.
- Ceunen, Geuns, 2013c. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry* 89:32–8.
- Ceunen, Geuns, 2013d. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Biol Plant* 57:390–4.
- Ceunen, Geuns, 2013e. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal Of Natural Products* 76:1201–28.
- Chable V, 2006. La sélection participative en France : présentation des expériences en cours pour les agricultures biologiques et paysannes. *Dossier De L'environnement De L'INRA* 30:129–38.
- Chable V, Dawson J, Bocci R, Goldringer I, 2014. Seeds for Organic Agriculture: Development of Participatory Plant Breeding and Farmers' Networks in France. In: Bellon S, Penvern S (eds) *Organic Farming, Prototype for Sustainable Agricultures: Prototype for Sustainable Agricultures*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 383–400. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7927-3_21
- Chambre d'Agriculture PACA, 2019. Guide phytosanitaire.
- Chang KF, Howard RJ, Gaudiel RG, Hwang SF, 1997. First Report of *Stevia* as a Host of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 81:311–311.
- Chapman MA, Chang J, Weisman D, Kesseli RV, Burke JM, 2007. Universal markers for comparative mapping and phylogenetic analysis in the Asteraceae (Compositae). *Theoretical And Applied Genetics* 115:747–55.
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM, 2004. Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53:454–60.
- Chartrain L, Sourdille P, Bernard M, Brown JKM, 2009. Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology* 58:547–55.
- Chaturvedula VSP, Meneni SR, 2017. A New Penta β -D-Glucopyranosyl Diterpene from *Stevia rebaudiana*. *International Journal Of Organic Chemistry* 07:91–8.
- Chaturvedula VSP, Upreti M, Prakash I, 2011. Structures of the novel α -glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Carbohydrate Research* 346:2034–8.

- Chatzivassiliou EK, Giakountis A, Testa A, Kienle U, Jungbluth T, 2015. 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, Lolas 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*. Thesis, UASD Available from: <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810004133>
- Chen MZ, Hong WL, Chen SP, Wan DV, 1983. Leaf cell vacuole of *Stevia rebaudiana* Bertani under electron microscope. *Chih Wu Hsueh Pao = Acta Botanica Sinica* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302140393>
- 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, 2018. 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* 69:472–9.
- Cheng XW, Zhu P, Cui GR, 2016. *Stevia* Triploid Breeding and Agronomic Traits Analysis. *Journal Of Anhui Science And Technology University*:6.
- 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.
- Chiou W-Y, Hsu F-C, 2019. Copper Toxicity and Prediction Models of Copper Content in Leafy Vegetables. *Sustainability* 11:6215.
- Cho L-H, Pasriga R, Yoon J, Jeon J-S, An G, 2018. Roles of Sugars in Controlling Flowering Time. *Journal Of Plant Biology* 61:121–30.
- Chung YS, Choi SC, Jun T-H, Kim C, 2017. Genotyping-by-sequencing: a promising tool for plant genetics research and breeding. *Horticulture, Environment, And Biotechnology* 58:425–31.
- Chungu C, Gilbert J, Townley-Smith F, 2001. *Septoria tritici* Blotch Development as Affected by Temperature, Duration of Leaf Wetness, Inoculum Concentration, and Host. *Plant Disease* 85:430–5.
- Ciriminna R, Meneguzzo F, Pecoraino M, Pagliaro M, 2018. *A bioeconomy perspective for natural sweetener Stevia*. AgriXiv. Available from: <https://osf.io/7bcvr>
- CNRTL, 2012. Etymologie et histoire du mot Type. Available from: <https://www.cnrtl.fr/etymologie/type>

- Coelho L, Osório J, Beltrão J, Reis M, 2019. Efeito da aplicação de compostos orgânicos no controlo de infestantes na cultura de *Stevia rebaudiana* e nas propriedades do um solo na região do Mediterrâneo. *Revista De Ciências Agrárias* 42:111–20.
- Cohen L, Eyal Z, 1993. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology* 42:737–43.
- Colaço AF, Trevisan RG, Molin JP, Rosell Polo JR, Escolà i Agustí A, 2017. Orange tree canopy volume estimation by manual and LiDAR-based methods. *Proceedings Of The 11th European Conference On Precision Agriculture* Available from: <https://repositori.udl.cat/handle/10459.1/60239>
- Coleman JR, 1968. Chromosome numbers in some brazilian Compositae. *Rhodora* 70:228–40.
- Convention on Biological Diversity, 2018. Parties to the Nagoya Protocol. Available from: <https://www.cbd.int/abs/nagoya-protocol/signatories/>
- Corredor-Moreno P, Saunders DGO, 2020. Expecting the unexpected: factors influencing the emergence of fungal and oomycete plant pathogens. *New Phytologist* 225:118–25.
- Cosson P, Hastoy C, Errazzu LE, Budeguer CJ, Boutié P, Rolin D, Schurdi-Levraud V, 2019. Genetic diversity and population structure of the sweet leaf herb, *Stevia rebaudiana* B., cultivated and landraces germplasm assessed by EST-SSRs genotyping and steviol glycosides phenotyping. *BMC Plant Biology* 19:436.
- Costes E, Lauri P-E, Laurens F, Durel CE, Parisi L, 2009. Construire un idéotype de variétés de pommier pour des vergers agronomiquement performants et à faibles intrants. *Innovations Agronomiques* 7:49–64.
- Crossa J, Pérez-Rodríguez P, Cuevas J, Montesinos-López O, Jarquín D, de los Campos G, Burgueño J, González-Camacho JM, Pérez-Elizalde S, Beyene Y, Dreisigacker S, Singh R, Zhang X, Gowda M, Roorkiwal M, Rutkoski J, Varshney RK, 2017. Genomic Selection in Plant Breeding: Methods, Models, and Perspectives. *Trends In Plant Science* 22:961–75.
- Çrak C, Radušienė J, Janulis V, Ivanauskas L, 2007. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Botanica Helvetica* 117:29–36.
- Da Lio D, De Martino L, Tavarini S, Passera B, Angelini LG, Vannacci G, Sarrocco S, 2019. First report of *Verticillium dahliae* causing verticillium wilt on *Stevia rebaudiana* in Europe. *Journal Of Plant Pathology* 101:1291–1291.
- Dacome AS, da Silva CC, da Costa CEM, Fontana JD, Adelman J, da Costa SC, 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 40:3587–94.
- D'Agostino N, Tripodi P, 2017. NGS-Based Genotyping, High-Throughput Phenotyping and Genome-Wide Association Studies Laid the Foundations for Next-Generation Breeding in Horticultural Crops. *Diversity* 9:38.

- Das A, Biswas M, Mandal N, 2010. An Economic Analysis of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) Cultivation through Stem Cutting and Tissue Culture Propagule in India. Trends In Agricultural Economics Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012055925>
- Das MK, Rajaram S, Mundt CC, Kronstad WE, 1992. Inheritance of Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust in Wheat. *Crop Science* 32:1452–6.
- De Guzman R, 2010. *Autoecological role of steviol glycosides in Stevia Rebaudiana Bertoni*. Faculty of Sciences, Engineering and Health CQUniversity Australia
- De Guzman R, Midmore DJ, Walsh KB, 2018. Do Steviol Glycosides Act Either as a Carbon Storage Pool or in Osmoregulation within Leaves of *Stevia rebaudiana* ? *Journal Of Natural Products* 81:2357–63.
- Debaeke P, Gauffreteau A, Durel C-E, Jeuffroy M-H, 2014. Conception d'idéotypes variétaux en réponse aux nouveaux contextes agricoles et environnementaux. *Agronomie, Environnement & Sociétés* 4:65–73.
- Denev PN, Uchkunov I, Uchkunov V, Kratchanova MG, 2017. Content of steviol glycosides in stevia (*Stevia Rebaudiana* B .) genotypes cultivated in Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications* 49:121–5.
- Desclaux D, Chiffolleau Y, Nolot JM, 2009. Pluralité des agricultures biologiques: Enjeux pour la construction des marchés, le choix des variétés et les schémas d'amélioration des plantes. *Innovations Agronomiques* 4:297–306.
- Desclaux D, Chiffolleau Y, Nolot JM, 2013. Du concept d'Ideotype à celui de Reatype : gestion dynamique des Innovations Variétales par une approche transdisciplinaire et partenariale. Exemple du blé dur pour l'AB. In: *DinABio : Développement & innovation en agriculture biologique*. Colloque national. 1, p 250 p. Available from: <https://hal.inrae.fr/hal-02745009>
- Desnoues E, 2015. *Du gène au phénotype : contrôle génétique et modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche*. PhD thesis, Avignon Available from: <https://www.theses.fr/2015AVIG0667>
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Tigchelaar M, Battisti DS, Merrill SC, Huey RB, Naylor RL, 2018. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* 361:916–9.
- Devi A, Angayarkanni T, Subash A, Kamalakannan A, 2010. Studies on the effect of *Bacillus subtilis* against leaf spot of stevia caused by *Alternaria alternata*. *Plant Archives* 10:107–11.
- Diago MP, Aquino A, Millan B, Palacios F, Tardaguila J, 2019. On-the-go assessment of vineyard canopy porosity, bunch and leaf exposure by image analysis. *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 25:363–74.
- Díaz-Gutiérrez C, Poschenrieder C, Arroyave C, Martos S, Peláez C, 2019. First Report of *Fusarium oxysporum* Causing Vascular Wilt of *Stevia rebaudiana* in Colombia. *Plant Disease* 103:1779–1779.

- Dickinson HG, Hiscock SJ, Crane PR, Hiscock SJ, Tabah DA, 2003. The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences* 358:1037–45.
- Dickmann DI, 1985. Ideotype concept applied to forest trees. *Attributes Of Trees As Crop Plants*:89–101.
- Dobbs R, Sawers C, Thompson F, Manyka J, Woetzel J, Child P, 2014. Overcoming obesity: An initial economic analysis.
- Donald CM, 1968. The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17:385–403.
- Donalisio MGR, Duarte FR, Pinto AJDA, Souza CJ, 1982. *Stevia rebaudiana*. *Agronomico* 34:65–8.
- DuBois GE, Stephenson RA, 1985. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organoleptic properties. *Journal Of Medicinal Chemistry* 28:93–8.
- Duncan KE, Howard RJ, 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* 104:1074–82.
- Dyduch-Siemińska M, Najda A, Gawroński J, Balant S, Świca K, Żaba A, 2020. *Stevia Rebaudiana* Bertoni, a Source of High-Potency Natural Sweetener—Biochemical and Genetic Characterization. *Molecules* 25:767.
- Eggleston G, Legendre B, Godshall MA, 2017. Sugar and Other Sweeteners. In: Kent JA, Bommaraju TV, Barnicki SD (eds) *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp 933–78. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_15
- Emery C, Lafuma A, Khoshnood B, Fagnani F, Dinot J, Sermet C, 2007. Évaluation du coût associé à l'obésité en France. *Médecine Des Maladies Métaboliques* 1:28–34.
- Endrinal DM, Geling MS, 1940. Septoria leaf spot of Tomato. *Philippine Agriculturist* 29 Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19411100389>
- Enjalbert J, Dawson JC, Paillard S, Rhoné B, Rousselle Y, Thomas M, Goldringer I, 2011. Dynamic management of crop diversity: From an experimental approach to on-farm conservation. *Comptes Rendus Biologies* 334:458–68.
- Ephytia, 2017. Tomate - Biologie, épidémiologie. Available from: <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20873/Tomate-Biologie-epidemiologie>
- Erper I, Ozer G, Yildirim E, Ozgen T, Turkkan M, 2020. First report of southern blight caused by *Athelia rolfsii* on candyleaf in Turkey. *Journal Of Plant Pathology* 102:245–6.
- Esaulko NA, Romanenko ES, Selivanova MV, Mironova EA, Aisanov TS, Miltusov VE, German MS, 2019. Quality improvement and shelf life extension of functional bakery products with the use of stevia. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 315:022019.

- Espinoza MI, Vincken J-P, 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* 62:11797–804.
- Eyal Z, 1987. *The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. CIMMYT.
- Fabre C, Guigal-Merle L, 2013. Culture de la Stévia dans l’Hérault - Itinéraire technique.
- Fang S, Yan X, Liao H, 2009. 3D reconstruction and dynamic modeling of root architecture in situ and its application to crop phosphorus research. *The Plant Journal* 60:1096–108.
- Fanizza G, Lamaj F, Costantini L, Chaabane R, Grando MS, 2005. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theoretical And Applied Genetics* 111:658–64.
- 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.
- Fattahi M, Bonfill M, Fattahi B, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Palazon J, 2016. Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschy* Boiss at three phenological stages using uni- and multivariate methods. *Journal Of Applied Research On Medicinal And Aromatic Plants* 3:177–85.
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G, 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00049/full>
- Ferrari S, Sella L, Janni M, Lorenzo GD, Favaron F, D’Ovidio R, 2012. Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in Arabidopsis and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology* 14:31–8.
- Ficke A, Cowger C, Bergstrom G, Brodal G, 2017. Understanding Yield Loss and Pathogen Biology to Improve Disease Management: Septoria Nodorum Blotch - A Case Study in Wheat. *Plant Disease* 102:696–707.
- Flachsland E, Mroginski L, Davina J, 1996. Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) cultivated in vitro. *Biocell* 20:87–90.
- Flemmer AC, Franchini MC, Lindström LI, 2015. Description of safflower (*Carthamus tinctorius*) phenological growth stages according to the extended BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 166:331–9.
- Fones H, Gurr S, 2015. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics And Biology* 79:3–7.
- Foreign Agricultural Service/ USDA, 2017. Sugar : World Markets and Trade.

- Forneck A, 2005. Plant Breeding: Clonality — A Concept for Stability and Variability During Vegetative Propagation. In: Esser K, Lüttge U, Beyschlag W, Murata J (eds) Progress in Botany: Genetics Physiology Systematics Ecology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 164–83. Available from: https://doi.org/10.1007/3-540-27043-4_8
- Fox J, Weisberg S, 2011. Multivariate Linear Models in R. :31.
- Frederico AP, Ruas PM, Marin-Morales MA, Ruas CF, Nakajima JN, 1996. Chromosome studies in some *Stevia*. Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. Brazilian Journal Of Genetics 19:605–9.
- Freeman C, Zerha, Ramirez, Wiers, Volkow, Wang, 2018. Impact of sugar on the body, brain, and behavior. Front Biosci (Landmark Ed) 23:2255–66.
- Fried G, Chauvel B, Reynaud P, Sache I, 2017. Decreases in Crop Production by Non-native Weeds, Pests, and Pathogens. In: Vilà M, Hulme PE (eds) Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services. Springer International Publishing, Cham, pp 83–101. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45121-3_6
- Froelicher Y, 2010. *Amélioration génétique des agrumes : gestion de la diversité et de la ploïdie*. thesis, Université de Corse Available from: <https://agritrop.cirad.fr/560040/>
- Fuller PA, Steadman, JR, Coyne DP, 1984. Enhancement of white mold avoidance and yield in dry beans by canopy elevation. HortScience:78–9.
- Furbank RT, Tester M, 2011. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. Trends In Plant Science 16:635–44.
- Gabay G, Dahan Y, Izhaki Y, Faigenboim A, Ben-Ari G, Elkind Y, Flaishman MA, 2018. High-resolution genetic linkage map of European pear (*Pyrus communis*) and QTL fine-mapping of vegetative budbreak time. BMC Plant Biology 18:175.
- Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P, 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. Trends In Plant Science 10:542–9.
- Galiano NG, 1987. Estudios cromosomico en especies argentinas de stevia (Compositae). Darwiniana 28:311–5.
- Galiano NG, Hunziker JH, 1987. Estudios cariologicos en Compositae. Darwiniana 28:1–8.
- Gallais A, 1989. Optimization of recurrent selection on the phenotypic value of doubled haploid lines. Theoretical And Applied Genetics 77:501–4.
- Gallais A, Wright AJ, 1980. A general approach to the concept of varietal ability for synthetic varieties. Theoretical And Applied Genetics 57:81–7.
- Gantait S, Das A, Banerjee J, 2018. Geographical Distribution, Botanical Description and Self-Incompatibility Mechanism of Genus *Stevia*. Sugar Tech 20:1–10.
- Gao Y, Lynch JP, 2016. Reduced crown root number improves water acquisition under water deficit stress in maize (*Zea mays* L.). Journal Of Experimental Botany 67:4545–57.

- García Vázquez J, 2019. *Método del anillado en el cultivo de aguacate hass*. Thesis, Facultad de Ingeniería - Ingeniería Ecológica - UNICACH Available from: <https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12114/2539>
- Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P, 2003. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Extracts by Human Microflora. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 51:6618–22.
- 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’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP22593P3/en>
- Gauffreteau A, 2018. Using ideotypes to support selection and recommendation of varieties. *OCL* 25:D602.
- 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* 54:2794–8.
- Geuns J, Struyf T, 2010. Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide. In: *Proceedings of the 4th EUSTAS Stevia Symposium*. Euprint bvba; Heverlee Belgium, pp 191–207. Available from: <https://lirias.kuleuven.be/1638916>
- Ghaffary SMT, Chawade A, Singh PK, 2018. Practical breeding strategies to improve resistance to Septoria tritici blotch of wheat. *Euphytica* 214:122.
- Glowka L, Burhenne-Guilmin F, Synge H, McNeely JA, Gündling L, 1996. *Guide de la convention sur la diversité biologique*. IUCN.
- Goettemoeller J, Ching A, 1999. Seed Germination in *Stevia rebaudiana*. *Perspectives On New Crops And New Uses*:510–1.
- Gomes EN, Moterle D, Biasi LA, Koehler HS, Kanis LA, Deschamps C, Gomes EN, Moterle D, Biasi LA, Koehler HS, Kanis LA, Deschamps C, 2018. Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências* 90:3249–64.
- González-Paleo L, Vilela AE, Ravetta DA, 2016. Back to perennials: Does selection enhance tradeoffs between yield and longevity? *Industrial Crops And Products* 91:272–8.
- Graham J, Hackett CA, Smith K, Karley AJ, Mitchell C, Roberts H, O’Neill T, 2014. Genetic and environmental regulation of plant architectural traits and opportunities for pest control in raspberry. *Annals Of Applied Biology* 165:318–28.
- Greiber T, Moreno SP, Ahrén M, Carrasco JN, Kamau EC, Medaglia JC, Oliva MJ, 2012. Protocole de Nagoya sur l’accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation relatif à la convention sur la diversité biologique. *Secrétariat De La Convention Sur La Diversité Biologique*

- Grevsen K, Sorensen JN, Clausen MR, Henriksen MB, Jensen I, Kyed S, 2015. A Danish research project for the development of 'Green Stevia'-a natural sweetener for organic food products. Proceedings Of The 8th Stevia Symposium
- Guan Z, Abd-Elrahman A, Fan Z, Whitaker VM, Wilkinson B, 2020. Modeling strawberry biomass and leaf area using object-based analysis of high-resolution images. ISPRS Journal Of Photogrammetry And Remote Sensing 163:171–86.
- Guleria P, Masand S, Yadav SK, 2014. Overexpression of SrUGT85C2 from Stevia reduced growth and yield of transgenic Arabidopsis by influencing plastidial MEP pathway. Gene 539:250–7.
- 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 66:3907–16.
- Guleria P, Yadav SK, 2013. Agrobacterium Mediated Transient Gene Silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway (K. Wu, Ed.). PLoS ONE 8 Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0074731>
- Haiyan Y, Guo Z, Yulin H, Suzhen H, 2008. 双无性系优良 f1 代甜菊制种方法.
- Hajihashemi 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 6:937–44.
- Hall KD, 2018. Did the Food Environment Cause the Obesity Epidemic? Obesity 26:11–3.
- Hamblin J, 2015. The Ideotype Concept: Useful or Outdated? In: International Crop Science I. John Wiley & Sons, Ltd, pp 589–97. Available from: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2135/1993.internationalcrops.c93>
- Hastoy C, 2018. *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*. PhD thesis, Bordeaux Available from: <http://www.theses.fr/2018BORD0118>
- Hastoy C, Cosson P, Cavaignac S, Boutié P, Waffo-Teguo P, Rolin D, Schurdi-Levraud V, 2019. Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. Industrial Crops And Products 128:607–19.
- Hastoy C, Le Bihan Z, Gaudin J, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V, 2019. First report of *Septoria* sp. infecting *Stevia rebaudiana* in France and screening of *Stevia rebaudiana* genotypes for host resistance. Plant Disease 103:1544–50.
- Hay RKM, 1995. Harvest index: a review of its use in plant breeding and crop physiology. Annals Of Applied Biology 126:197–216.

- Heap I, 2014. Herbicide Resistant Weeds. In: Pimentel D, Peshin R (eds) Integrated Pest Management. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 281–301. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7796-5_12
- 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* 22:165–8.
- Heikal A, Badawy OM, Hafez AM, 2008. Genetic Relationships among Some *Stevia (Stevia Rebaudiana Bertonii)* Accessions Based on ISSR Analysis. *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* 60:6782–93.
- Hernán Martínez G, 2017. *Defense strategies against herbivory in seagrasses*. Universitat de les Illes Balears Available from: <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/148981>
- Hilal AA, Baiuomy MA, 2000. First record of fungal diseases of stevia (*Stevia rebaudiana Bertonii*) in Egypt. *Egyptian Journal Of Agricultural Research* 78:1435–48.
- Hill J, 1966. Recurrent backcrossing in the study of quantitative inheritance. *Heredity* 21:85–120.
- Hodgins KA, Lai Z, Oliveira LO, Still DW, Scascitelli M, Barker MS, Kane NC, Dempewolf H, Kozik A, Kesseli RV, Burke JM, Michelmore RW, Rieseberg LH, 2014. Genomics of Compositae crops: reference transcriptome assemblies and evidence of hybridization with wild relatives. *Molecular Ecology Resources* 14:166–77.
- Hong L, Lan Y, Zeng Xu X, 2012. In vitro induction and identification of autotetraploid *Stevia rebaudiana Bertonii*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 32:1692–7.
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising HB, 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal Of Plant Physiology* 168:51–62.
- Hosono F, Komai K, Matsuda K, Morita K, Morita T, 守田幸司, 守田豊重, 松田一彦, 細野文夫, 駒井功一郎, 2003. ステビア品種の DNA 鑑定による識別.
- Humphrey TV, 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.
- Hutapea AM, Toskulkao C, Buddhasukh D, Wilairat P, Glinsukon T, 1997. Digestion of Stevioside, a Natural Sweetener, by Various Digestive Enzymes. *Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition* 23:177–86.
- Hutteau F, Mathlouthi M, 1998. Physicochemical properties of sweeteners in artificial saliva and determination of a hydrophobicity scale for some sweeteners. *Food Chemistry* 63:199–206.

- Ibrahim MA, Rodenburg DL, Alves K, Perera WH, Fronczek FR, Bowling J, McChesney JD, 2016. Rebaudiosides R and S, Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal Of Natural Products* 79:1468–72.
- IFOAM EU, 2017. Regulation: On *Stevia rebaudiana*. Available from: <https://www.ifoam-eu.org/en/news/2017/09/01/regulation-stevia-rebaudiana>
- Imai A, Yoshioka T, Hayashi T, 2017. Quantitative trait locus (QTL) analysis of fruit-quality traits for mandarin breeding in Japan. *Tree Genetics & Genomes* 13:79.
- Ingle MR, Venugopal CK, 2009. Effect of different growth regulators on rooting of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cuttings. *Karnataka Journal Of Agricultural Sciences* 22:455–6.
- Ishiba C, Tani T, Yokoyama T, 1982. Black spot disease of stevia caused by *Alternaria steviae*. *Annals Of The Phytopathological Society Of Japan* 48
- Ishiba C, Yokoyama T, Tani T, 1982. Leaf spot disease of Stevia caused by *Septoria steviae*. *Annals Of The Phytopathological Society Of Japan* 48:34–43.
- Isik F, Bartholomé J, Farjat A, Chancerel E, Raffin A, Sanchez L, Plomion C, Bouffier L, 2016. Genomic selection in maritime pine. *Plant Science* 242:108–19.
- Jackson MC, 2019. Stevia cultivars a01, a03, a05, a06, a07, a08. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20190289806A1/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=1>
- Janoria MP, 1989. Basic plant ideotype for rice. *International Rice Research Newsletter (Philippines)* Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH8912138>
- Judy C, Adrian M, Baussard C, Bernard C, Bernaud E, Bourion V, Busset H, Cabrera-Bosquet L, Cointault F, Han S, Lamboeuf M, Moreau D, Pivato B, Prudent M, Trouvelot S, Truong HN, Vernoud V, Voisin A-S, Wipf D, Salon C, 2016. RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant Methods* 12:31.
- Johnson MG, Tingey DT, Phillips DL, Storm MJ, 2001. Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environmental And Experimental Botany* 45:263–89.
- 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) Bertoni) under hydroponic conditions. *Journal Of Applied Research On Medicinal And Aromatic Plants* 7:136–42.
- Kainer D, Lanfear R, Foley WJ, Külheim C, 2015. Genomic approaches to selection in outcrossing perennials: focus on essential oil crops. *Theoretical And Applied Genetics* 128:2351–65.
- Kamalakaran A, Valluvaparidasan 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 Available from:
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073076457>
- Kaplan B, Turgut K, 2019. Improvement of rebaudioside A diterpene glycoside content in *Stevia rebaudiana* Bertoni using clone selection. Turk J Agric For 43:232–40.
- 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 183:93–9.
- Karisto P, Hund A, Yu K, Anderegg J, Walter A, Mascher F, McDonald BA, Mikaberidze A, 2017. Ranking Quantitative Resistance to Septoria tritici Blotch in Elite Wheat Cultivars Using Automated Image Analysis. Phytopathology® 108:568–81.
- Karp S, Wyrwicz J, Kurek MA, Wierzbicka A, 2017. Combined use of cocoa dietary fibre and steviol glycosides in low-calorie muffins production. International Journal Of Food Science & Technology 52:944–53.
- Kator L, Hosea ZY, Oche OD, 2015. *Sclerotium rolfsii*; Causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. Available from:
</paper/Sclerotium-rolfsii%3B-Causative-organism-of-southern-Kator-Hosea/07962457012c86081cf5ef27ad8cf313a18fc338>
- Kaur R, Sharma N, Raina R, 2015. Identification and functional annotation of expressed sequencetags based SSR markers of *Stevia rebaudiana*. Turkish Journal Of Agriculture And Forestry 39:439–50.
- Kaya HB, Akdemir D, Lozano R, Cetin O, Sozer Kaya H, Sahin M, Smith JL, Tanyolac B, Jannink J-L, 2019. Genome wide association study of 5 agronomic traits in olive (*Olea europaea* L.). Scientific Reports 9:18764.
- Kazmi A, Khan MA, Mohammad S, Ali A, Kamil A, Arif M, Ali H, 2019. Elicitation directed growth and production of steviol glycosides in the adventitious roots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Industrial Crops And Products 139:111530.
- Kema GHJ, Yu D, Rijkenberg FHJ, Shaw MW, Baayen RP, 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. The American Phytopathological Society 86:777–86.
- 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 21:566–73.
- Khan AH, Hassan M, Khan MN, 2020. Conventional Plant Breeding Program for Disease Resistance. In: Ul Haq I, Ijaz S (eds) Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches. Springer International Publishing, Cham, pp 27–51. Available from:
https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_3

- Khan SA, Rahman LU, Verma R, Shanker K, 2016. Physical and chemical mutagenesis in *Stevia rebaudiana*: variant generation with higher UGT expression and glycosidic profile but with low photosynthetic capabilities. *Acta Physiologiae Plantarum* 1:1–12.
- Khan SA, Ur Rahman L, Shanker K, Singh M, 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic plant and somaclone production through direct and indirect regeneration from leaves in *Stevia rebaudiana* with their glycoside profile. *Protoplasma* Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00709-013-0568-x>
- Kim KW, 2019. Plant trichomes as microbial habitats and infection sites. *Eur J Plant Pathol* 154:157–69.
- Kim H, Do KS, Park JH, Kang WS, Park EW, 2018. Evaluation of Short-term Weather Prediction Data from the Unified Model for Plant Disease Forecast. *Proceedings Of The Korean Society Of Agricultural And Forest Meteorology Conference*:115–6.
- Kim I-S, Yang M, Lee O-H, Kang S-N, 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science And Technology* 44:1328–32.
- Kim MJ, Zheng J, Liao MH, Jang I-C, 2019. Overexpression of SrUGT76G1 in *Stevia* alters major steviol glycosides composition towards improved quality. *Plant Biotechnology Journal* 17:1037–47.
- Kinghorn AD, 2002. *Stevia: the Genus Stevia.*, CRC Press. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203165942>
- Kishore K, 2018. Phenological growth stages of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) according to the extended BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 172:366–74.
- Kishore GM, Motion M, Hicks PM, Hansen J, Houghton-Larsen J, Hansen EH, Mikkelsen MD, Tavares S, Blom C, 2013. Production of steviol glycosides in microorganisms.
- Kobayashi M, Horikawa S, H. Degrandi I, Ueno J, Mitsuhashi H, 1977. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 16:1405–8.
- 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* 100:1251–1251.
- Koehler, 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, Shew, 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, Shew, 2017a. Enhanced Overwintering Survival of *Stevia* by QoI Fungicides Used for Management of *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease* 101:1417–21.

- Koehler AM, Shew HD, 2017b. First Report of Charcoal Rot of Stevia Caused by *Macrophomina phaseolina* in North Carolina. *Plant Disease* 102:241–241.
- Koehler, Shew, 2018. Field efficacy and baseline sensitivity of *Septoria steviae* to fungicides used for managing Septoria leaf spot of stevia. *Crop Protection* 109:95–101.
- Kohda H, Kasai R, Yamasaki K, Murakami K, Tanaka O, 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 15:981–3.
- Krishna H, Singh SK, 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — A review. *Biotechnology Advances* 25:223–43.
- Kujundžić D, Jambrak AR, Vukušić T, Stulić V, Kljusurić JG, Banović M, Herceg Z, 2017. Near-infrared spectroscopic characterization of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-power ultrasound and gas-phase plasma. *Journal Of Food & Nutrition Research* 56:109–20.
- Kumar N, 2006. *Breeding of Horticultural Crops: Principles and Practices*. New India Publishing.
- Kumar J, Choudhary AK, Solanki RK, Pratap A, 2011. Towards marker-assisted selection in pulses: a review. *Plant Breeding* 130:297–313.
- Kumar H, Kaul K, Bajpai-Gupta S, Kaul VK, Kumar S, 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene* 492:276–84.
- 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* 60:1731–45.
- Kurt S, Tok FM, 2006. Influence of inoculum concentration, leaf age, temperature, and duration of leaf wetness on Septoria blight of parsley. *Crop Protection* 25:556–61.
- Kwon S, Simko I, Hellier B, Mou B, Hu J, 2013. Genome-wide association of 10 horticultural traits with expressed sequence tag-derived SNP markers in a collection of lettuce lines. *The Crop Journal* 1:25–33.
- Lancashire PD, Bleiholder H, Boom TVD, Langelüddeke P, Stauss R, Weber E, Witzemberger A, 1991. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals Of Applied Biology* 119:561–601.
- Lankes G, Grosser P, 2015. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. *Proceedings Of The 8th Stevia Symposium*:167–76.
- Lankes G, Zabala UM, 2011. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *Proceedings Of The 5th Stevia Symposium*:75–87.
- Lather VS, 2000. Promising chickpea ideotype for higher plant density. *International Chickpea And Pigeonpea Newsletter*:26–7.

- Lavini A, Riccardi M, Pulvento C, Luca SD, Scamosci M, d'Andria R, 2008. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Italian Journal Of Agronomy* 3:135–43.
- Łażniewska J, Macioszek VK, Kononowicz AK, 2012. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological And Molecular Plant Pathology* 78:24–30.
- Le Bihan Z, Cosson P, Rolin D, Schurdi-Levraud V, 2020. Phenological growth stages of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) according to the Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scale. *Annals Of Applied Biology* Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/aab.12626>
- Lee J-I, 1982. Changes in Variety and Cultural Practices of Industrial Crops Since 1962 in Korea. *Korean Journal Of Crop Science* 27:470–9.
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F, Tjamos SE, Metraux J-P, 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112:54–62.
- Lenz PRN, Beaulieu J, Mansfield SD, Clément S, Despouts M, Bousquet J, 2017. Factors affecting the accuracy of genomic selection for growth and wood quality traits in an advanced-breeding population of black spruce (*Picea mariana*). *BMC Genomics* 18:335.
- Lepoittevin C, 2017. Pour ceux qui veulent prédire des propriétés chimiques : exemple de la cerise.
- Lesniarek J, 2015. *Stevia rebaudiana* B.: réels enjeux de santé publique ou campagne marketing? PhD thesis, Grenoble Alpes
- Lewis W, 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany* 46:336–7.
- Leyva-Mir SG, Gutiérrez-Salazar JD, Camacho-Tapia M, Aguilar-Pérez LA, García-López E, Tovar-Pedraza JM, Leyva-Mir SG, Gutiérrez-Salazar JD, Camacho-Tapia M, Aguilar-Pérez LA, García-López E, Tovar-Pedraza JM, 2018. *Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez de estevia en Veracruz, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 9:245–50.
- Li TSC, 2000. *Medicinal Plants: Culture, Utilization and Phytopharmacology*. CRC Press.
- Li SW, Bu YC, Markosyan A, 2016. Stevia Cultivar '814011'. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20160057966A1/en?q=cultivar+stevia&inventor=wang>
- Li SW, Bu YC, Markosyan A, 2017a. Stevia cultivar '817096'. Available from: <https://patents.google.com/patent/US9668450B2/en>
- Li SW, Bu YC, Markosyan A, 2017b. Stevia cultivar '807086'. Available from: <https://patents.google.com/patent/US9675015B2/en?q=US+9675015+B2+>

- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B, 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* 30:390–2.
- Li Y, Suontama M, Burdon RD, Dungey HS, 2017. Genotype by environment interactions in forest tree breeding: review of methodology and perspectives on research and application. *Tree Genetics & Genomes* 3:1–18.
- Li J, Xie RZ, Wang KR, Ming B, Guo YQ, Zhang GQ, Li SK, 2015. Variations in Maize Dry Matter, Harvest Index, and Grain Yield with Plant Density. *Agronomy Journal* 107:829–34.
- Li W, Zhou Y, You W, Yang M, Ma Y, Wang M, Wang Y, Yuan S, Xiao Y, 2018. Development of Photoaffinity Probe for the Discovery of Steviol Glycosides Biosynthesis Pathway in *Stevia rebaudiana* and Rapid Substrate Screening. *ACS Chemical Biology* 13:1944–9.
- Libik-Konieczny M, Capecka E, Kałol E, Dziurka M, Grabowska-Joachimiak A, Sliwiska E, Pistelli L, 2018. Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae* 234:10–8.
- Lila M, Furstoss V, 2000. L'utilisation de la spectrométrie dans le proche infrarouge pour l'évaluation de la qualité des fourrages. *Fourrages*:69–81.
- Lima Filho OF de, Malavolta E, 1997. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Scientia Agricola* 54:53–61.
- Lindemann B, 1996. Taste reception. *Physiological Reviews* 76:719–66.
- Lindemann B, 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219–25.
- Lixin W, Jiayun L, Zhongda F, 1987. Identification of the causal organism of *Verticillium Wilt* disease on different plants. *Journal Of Nanjing Agricultural University* 1
- Llewellyn R, Ronning D, Clarke M, Mayfield A, Consulting AM, Walker S, Ouzman J, 2016. Impact of weeds on australina grain production. *Grains Research & Development Corportation*:112.
- Lommerse HC, 2018. Stevia plant named 'STEVILOMM'. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP29009P2/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=5>
- Lommerse H, 2019. Stevia plant named 'LOSTE1517'. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP30361P2/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=5>
- Lovering NM, 1996. First Report of *Septoria steviae* on Stevia (*Stevia rebaudiana*) in North America. *Plant Disease* 80:959.
- Lowery H, 2017. Insects Associated with *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bertoni), and Toxicity of Compounds from *S. rebaudiana* against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) Larvae. Masters Theses Available from: https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/4755

- Luby JJ, Shaw DV, 2001. Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? : Molecular Genetics: Applications in Small and Tree Fruits: Where Is it Working. HortScience 36:872–9.
- Luz GC, Strioto DK, Mangolin CA, Machado M de FPS, 2020. ISSR markers to assess genetic diversity of cultivated populations from artificial selection of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Breeding Science 70:508–14.
- Lynch M, Walsh B, 1997. Genetics and analysis of quantitative traits. Genetics And Analysis Of Quantitative Traits. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19980108045>
- Lyngkjær M, Newton A, Atzema J, Baker S, 2000. The Barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source. Agronomie 20:745–56.
- Macchia M, Andolfi L, Ceccarini L, Angelini LG, 2007. Effects of Temperature, Light and Pre-Chilling on Seed Germination of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni Accessions. Italian Journal Of Agronomy 2:55–62.
- Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG, 2016. Biological fate of low-calorie sweeteners. Nutrition Reviews 74:670–89.
- Mahdi SA, Meena CM, Tholakabavi A, 2018. Induction of Genetic Variability by Colchicine Treatment in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Al-Qadisiyah Journal Of Pure Science 23:161–73.
- Maia MCC, Araújo LB de, Dias CT dos S, Oliveira LC de, Vasconcelos LFL, Carvalho Júnior JEV de, Simeão M, Bastos YGM, Maia MCC, Araújo LB de, Dias CT dos S, Oliveira LC de, Vasconcelos LFL, Carvalho Júnior JEV de, Simeão M, Bastos YGM, 2016. Selection of mango rosa genotypes in a breeding population using the multivariate-biplot method. Ciência Rural 46:1689–94.
- 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.
- 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 08:441–50.
- Mariette S, Tai FWJ, Roch G, Barre A, Chague A, Decroocq S, Groppi A, Laizet Y, Lambert P, Tricon D, Nikolski M, Audergon J-M, Abbott AG, Decroocq V, 2016. Genome-wide association links candidate genes to resistance to Plum Pox Virus in apricot (*Prunus armeniaca*). New Phytologist 209:773–84.
- Market Research Firm, 2017. Stevia Market Size -Trends and Analysis. Available from: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/stevia-market-167065378.html>
- Markosyan A, Jing R, 2018. Self-compatible stevia varieties, breeding methods therefrom and methods of preparing novel compositions using said varieties. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20180070553A1/en>

- Markosyan A, ONG SS, Jing R, Huang T, SCHAUER SE, KHAZI F, 2018. High rebaudioside m stevia plant cultivars and methods of producing the same. Available from:
<https://patents.google.com/patent/WO2018165330A1/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=1>
- Markosyan A, ONG SS, WONG YY, Bu YC, CHEN JN, 2017. Single nucleotide polymorphism (snp) markers for stevia. Available from:
[https://patents.google.com/patent/EP3197269A1/en?q=%3CSingle+Nucleotide+Polymorphism+\(SNP\)+markers+Stevia&oq=%3CSingle+Nucleotide+Polymorphism+\(SNP\)+markers+for+Stevia](https://patents.google.com/patent/EP3197269A1/en?q=%3CSingle+Nucleotide+Polymorphism+(SNP)+markers+Stevia&oq=%3CSingle+Nucleotide+Polymorphism+(SNP)+markers+for+Stevia)
- Marsolais AA, Brandle J, Sys EA, 1998. Stevia plant named `RSIT 94-751`. Available from:
<https://patents.google.com/patent/USPP10564P/en>
- Martinelli T, Galasso I, 2011. Phenological growth stages of *Camelina sativa* according to the extended BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 158:87–94.
- Martinez-Nicolas JJ, Legua P, Melgarejo P, Martinez R, Hernandez F, 2016. Phenological growth stages of nashi tree (*Pyrus pyrifolia*): codification and description according to the BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 168:255–63.
- Martini A, Tavarini S, Macchia M, Benelli G, Canale A, Romano D, Angelini LG, 2017a. Influence of insect pollinators and harvesting time on the quality of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni seeds. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology* 151:341–51.
- Martini A, Tavarini S, Macchia M, Benelli G, Canale A, Romano D, Angelini LG, 2017b. Influence of insect pollinators and harvesting time on the quality of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni seeds. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology* 151:341–51.
- Martono Y, Rondonuwu FS, Trihandaru S, 2017. Classification of *Stevia rebaudiana* Using Near Infrared Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Materials Science Forum* 901:103–9.
- Martre P, Quilot-Turion B, Luquet D, Memmah M-MO-S, Chenu K, Debaeke P, 2015. Chapter 14 - Model-assisted phenotyping and ideotype design. In: Sadras VO, Calderini DF (eds) *Crop Physiology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 349–73. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124171046000145>
- Mathur S, Bulchandani N, Parihar S, Shekhawat G, 2017. Critical review on steviol glycosides: pharmacological, toxicological and therapeutic aspects of high potency zero caloric sweetener. *International Journal Of Pharmacology*:916–28.
- Matsui M, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, Sawada M, Hayashi M, Nohmi T, Yoshihira K, Ishidate M, Sofuni T, 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* 11:573–9.

- Matteau J-P, Létourneau G, Walter C, Moussa R, Gumiere SJ, 2019. Development of a method to describe irrigation effect on root growth and architecture based on CT-scan images. *Geophysical Research* 21 Available from: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2019EGUGA..2114405M>
- McClure KA, Sawler J, Gardner KM, Money D, Myles S, 2014. Genomics: A potential panacea for the perennial problem. *American Journal Of Botany* 101:1780–90.
- McConnaughay KDM, Coleman JS, 1999. Biomass Allocation in Plants: Ontogeny or Optimality? A Test Along Three Resource Gradients. *Ecology* 80:2581–93.
- Mehra LK, Cowger C, Weisz R, Ojiambo PS, 2015. Quantifying the Effects of Wheat Residue on Severity of *Stagonospora nodorum* Blotch and Yield in Winter Wheat. *Phytopathology*TM 105:1417–26.
- Meienberg F, Sommer L, Lebrecht T, Lovera M, 2015. The bitter sweet taste of stevia.
- Meier U, Bleiholder H, Buhr L, Feller C, Hack H, Heß M, Lancashire PD, Schnock U, Stauß R, Van Den Boom T, 2009. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—history and publications. *Journal Für Kulturpflanzen* 61:41–52.
- Melendez MV, Heckman JR, Murphy S, D’Amico F, 2020. New Jersey Farm Soil Copper Levels Resulting from Copper Fungicide Applications. *HortTechnology* 1:1–5.
- 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* 30:1211–22.
- Meuwissen T, 2007. Genomic selection : marker assisted selection on a genome wide scale. *Journal Of Animal Breeding And Genetics* 124:321–2.
- Mhamdi A, Breusegem FV, 2018. Reactive oxygen species in plant development. *Development* 145 Available from: <https://dev.biologists.org/content/145/15/dev164376>
- Michalik A, Hollinshead J, Jones L, Fleet GWJ, Yu C-Y, Hu X-G, van Well R, Horne G, Wilson FX, Kato A, Jenkinson SF, Nash RJ, 2010. Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Letters* 3:136–8.
- Migicovsky Z, Warschefsky E, Klein LL, Miller AJ, 2019. Using Living Germplasm Collections to Characterize, Improve, and Conserve Woody Perennials. *Crop Science* 59:2365–80.
- Mintel Global New Products Database, 2017. Global Food and Beverage Products with Stevia: 2011–2016 Data. (2017). Available from: www.mintel.com/global-new-products-database
- Mir RR, Reynolds M, Pinto F, Khan MA, Bhat MA, 2019. High-throughput phenotyping for crop improvement in the genomics era. *Plant Science* 282:60–72.

- Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Shibata H, 2014. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism* 63:69–78.
- Mizukami H, Shiba K, Ohashi H, 1983. Effect of temperature on growth and stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. *Shoyakugaku Zasshi* 37:175–9.
- Mizutani K, Tanaka O, 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. *Stevia, The Genus Stevia*:178–95.
- Mock JJ, Pearce RB, 1975. An ideotype of maize. *Euphytica* 24:613–23.
- 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* 141:745–53.
- Moose SP, Mumm RH, 2008. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology* 147:969–77.
- Moraes RM, Donega MA, Cantrell CL, Mello SC, McChesney JD, 2013. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Industrial Crops And Products* 51:385–9.
- Mordor Intelligence, 2019. Stevia Market - Growth, trends and forecast (2020 - 2025). Available from: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/stevia-market>
- Morita T, Bu Y, 2000. Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Available from: <https://patents.google.com/patent/US6031157A/en?q=Variety+of+Stevia+rebaudiana+Bertoni.+Plant+Patent+Application%2c+N%C2%B0+6%2c031%2c157>.
- Morita T, Morita K, Kanzaki S, 2009. 新規ステビア種および甘味料製造方法. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2009093610A1/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=5>
- Morita T, Morita K, Komai K, 2006. ステビア甘味料. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2006093229A1/en?q=V260+Morita+T%2c+Morita+K%2c+Komai+K.+2007.+Stevia+sweetener.+European+Patent+Application%2c+N%C2%B0+PCT%2fJP2006%2f303992>.
- Morris AP, Cardon LR, 2019. Genome-Wide Association Studies. In: *Handbook of Statistical Genomics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 597–550. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119487845.ch21>
- Mubarak M, El Halmouch Y, Belal A, Elfadeel Ma, EL-Din Tn, Mahmoud SF, El Sharnouby ME, El Sarag E, 2015. Improving sweet leaf (*Stevia rebaudiana* var. Bertoni) resistance to bialaphos herbicide via ‘bar’ gene transfer. *Plant Omics* 8:232.
- 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* 111:520–8.

- Muqaddasi QH, Zhao Y, Rodemann B, Plieske J, Ganai MW, Röder MS, 2019. Genome-wide Association Mapping and Prediction of Adult Stage *Septoria tritici* Blotch Infection in European Winter Wheat via High-Density Marker Arrays. *The Plant Genome* 12:180029.
- Murphy DJ, 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress In Lipid Research* 32:247–80.
- Myles S, 2013. Improving fruit and wine: what does genomics have to offer? *Trends In Genetics* 29:190–6.
- Naik AQ, Zafar T, Shrivastav VK, 2018. Health Implications Associated with Aspartame Consumption: A Substantial Review. *Pakistan Journal Of Biological Sciences* 21:127–34.
- Naismith DJ, Rhodes C, 1995. Adjustment in energy intake following the covert removal of sugar from the diet. *Journal Of Human Nutrition And Dietetics* 8:167–75.
- Nakamura S, Tamura Y, 1985. Variation in the main glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Japanese Journal Of Tropical Agriculture* 29:109–15.
- Nanayakkara NPD, Klocke JA, Compadre CM, Hussain RA, Pezzuto JM, Kinghorn AD, 1987. Characterization and Feeding Deterrent Effects on the Aphid, *Schizaphis graminum*, of Some Derivatives of the Sweet Compounds, Stevioside and Rebaudioside A. *Journal Of Natural Products* 50:434–41.
- Nath VS, Basheer S, Jeeva ML, Hegde VM, Devi A, Misra RS, Veena SS, Raj M, 2016. A Rapid and Efficient Method for *In Vitro* Screening of Taro for Leaf Blight Disease Caused by *Phytophthora colocasiae*. *Journal Of Phytopathology* 164:520–7.
- Nduwumuremyi A, Tongoona P, Habimana S, 2013. Mating designs: helpful tool for quantitative plant breeding analysis. *Journal Of Plant Breeding And Genetics* 1:117–29.
- New Food Magazine, 2016. Paraguay's stevia industry now represented on International Stevia Council. *New Food Magazine* Available from: <https://www.newfoodmagazine.com/news/27199/capaste-ambassador-paraguays-stevia-industry-joins-international-stevia-council/>
- NFC, 2019. Presentation of the National Fruit Collection. Available from: <http://www.nationalfruitcollection.org.uk/>
- Ng SW, Slining MM, Popkin BM, 2012. Use of Caloric and Noncaloric Sweeteners in US Consumer Packaged Foods, 2005-2009. *Journal Of The Academy Of Nutrition And Dietetics* 112:1828-1834.e6.
- Nikiforov AI, Rihner MO, Eapen AK, Thomas JA, 2013. Metabolism and Toxicity Studies Supporting the Safety of Rebaudioside D. *International Journal Of Toxicology* 32:261–73.
- Niks RE, Rubiales D, 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* 124:201–16.

- Nishiyama P, Alvarez M, Vieira LG, 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 59:277–281.
- van Nocker S, Gardiner SE, 2014. Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* 1:1–8.
- O'Brien-Nabors L, 2016. *Alternative Sweeteners*. CRC Press.
- Ohta M, Sasa S, Inoue A, Tamai T, Fujita I, Morita K, Matsuura F, 2010. Characterization of Novel Steviol Glycosides from Leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *Journal Of Applied Glycoscience* 57:199–209.
- Ohtani K, Aikawa Y, Kasai R, Chou W-H, Yamasaki K, Tanaka O, 1992. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of *Rubus suavissimus*. *Phytochemistry* 31:1553–9.
- Oliveira VM de, Forni-Martins ER, Magalhães PM, Alves MN, 2004. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415-47572004000200015&lng=en&nrm=iso&tlng=en. *Genetics And Molecular Biology* 27:215–22.
- Olmstead JW, Lang GA, Grove GG, 2000. A Leaf Disk Assay for Screening Sweet Cherry Genotypes for Susceptibility to *Powdery Mildew*. *HortScience* 35:274–7.
- O'Neill K, Pirro S, 2020. The complete genome sequence of *Stevia rebaudiana*, the Sweetleaf. *F1000Research* 9 Available from: <https://f1000research.com/articles/9-751/v1>
- 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* 63:111–20.
- 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* 65:556–64.
- Parent C, Capelli N, Dat J, 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies* 331:255–61.
- Parrilla TG, Chrétien F, Desclaux D, Trouche G, 2016. La construction d'un bien commun à travers une démarche de sélection participative : le cas du blé dur adapté à l'AB. *Agronomie, Environnement & Sociétés* 6:71–81.
- Parris CA, Shock CC, Qian M, 2016. Dry Leaf and Steviol Glycoside Productivity of *Stevia rebaudiana* in the Western United States. *HortScience* 51:1220–7.
- Patocchi A, Frei A, Frey JE, Kellerhals M, 2009. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes. *Molecular Breeding* 24:337.

- Peña C de la, 2010. Artificial sweetener as a historical window to culturally situated health. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1190:159–65.
- Perera WH, Ghiviriga I, Rodenburg DL, Alves K, Bowling JJ, Avula B, Khan IA, McChesney JD, 2017. Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Phytochemistry* 135:106–14.
- Perera WH, Ramsaroop T, Carvalho R, Rodenburg DL, McChesney JD, 2019. A silica gel orthogonal high-performance liquid chromatography method for the analyses of steviol glycosides: novel tetra-glucopyranosyl steviol. *Natural Product Research* 33:1876–84.
- Perez RPA, Dautzat J, Pallas B, Lamour J, Verley P, Caliman J-P, Costes E, Faivre R, 2018. Designing oil palm architectural ideotypes for optimal light interception and carbon assimilation through a sensitivity analysis of leaf traits. *Annals Of Botany* 121:909–26.
- Perspectives Agricoles, 2016. Les outils d'aide à la décision modifient-ils le métier d'agriculteur ? Available from: <https://www.perspectives-agricoles.com/question-d-actu-les-outils-d-aide-a-la-decision-modifient-ils-le-metier-d-agriculteur--@/view-2718-arvarticlepa.html>
- Petit E, 2019. *Identification et caractérisation d'UGTs clés impliquées dans la biosynthèse des glycosides de stéviol chez Stevia rebaudiana*. PhD thesis, Toulouse, INPT Available from: <http://www.theses.fr/s160542>
- Petit J, Salentijn EMJ, Paulo M-J, Thouminot C, van Dinter BJ, Magagnini G, Gusovius H-J, Tang K, Amaducci S, Wang S, Uhrlaub B, Müssig J, Trindade LM, 2020. Genetic Variability of Morphological, Flowering, and Biomass Quality Traits in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Frontiers In Plant Science* 11 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00102/full>
- Philippaert K, Pironet A, Mesuere M, Sones W, Vermeiren L, Kerselaers S, Pinto S, Segal A, Antoine N, Gysemans C, Laureys J, Lemaire K, Gilon P, Cuypers E, Tytgat J, Mathieu C, Schuit F, Rorsman P, Talavera K, Voets T, Vennekens R, 2017. Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nature Communications* 8:14733.
- Pietravalle S, Shaw MW, Parker SR, van den Bosch F, 2003. Modeling of Relationships Between Weather and Septoria tritici Epidemics on Winter Wheat: A Critical Approach. *Phytopathology*TM 93:1329–39.
- Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M-C, Fournet S, Durel C-E, Delourme R, 2017. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. *Front. Plant Sci.* 8 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01838/full>
- Ping A, Keqin H, Nengbing H, 2015a. 一种甜叶菊杂交制种的方法. Available from: <https://patents.google.com/patent/CN105052503A/en?q=Hybrid+seed+production+me>

- thod+Stevia+rebaudiana.&oq=Hybrid+seed+production+method+for+Stevia+rebaudiana.
- Ping L, Keqin H, Nengbing H, 2015b. 一种甜叶菊杂交制种的配套方法. Available from: <https://patents.google.com/patent/CN105104169A/en?q=Mating+method+Stevia+rebaudiana+hybrid+seed+production&oq=Mating+method+for+Stevia+rebaudiana+hybrid+seed+production>
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW, 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews* 70:3–21.
- 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* 6:238–47.
- Pozza C, Isidori AM, 2018. What's Behind the Obesity Epidemic. In: Laghi A, Rengo M (eds) *Imaging in Bariatric Surgery*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–8. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-49299-5_1
- Prakash I, Chaturvedula VSP, 2014. Structures of Some Novel α -Glucosyl Diterpene Glycosides from the Glycosylation of Steviol Glycosides. *Molecules* 19:20280–94.
- Prakash I, Markosyan A, Bunders C, 2014. Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods* 3:162–75.
- Predieri S, 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture* 64:185–210.
- Public Eye, CEIDRA, Misereor, Pro Stevia Switzerland, SUNU, Université de Hohenheim, 2016. *Stévia : vers un accord de partage des avantages - Réactions des entreprises, revendications des Guaranis et récents développements du cadre juridique*.
- Punja ZK, 1985. The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium Rolfsii* Annu. Rev. Phytopathol. 23:97–127.
- Punja ZK, 1988. *Sclerotium (Athelia) Rolfsii*, a Pathogen of Many Plant Species. In: *Advances in Plant Pathology*. Elsevier, pp 523–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120337064500396>
- PureCircle, Road H, Brook O, 2016. Application for the Approval of Those Steviol Glycosides Present in *Stevia rebaudiana* under Australia and New Zealand Food Standard Code Standard 1.3.1– Food Additives. :14.
- Purkayastha S, Markosyan A, Prakash I, Bhusari S, Pugh G, Lynch B, Roberts A, 2016. Steviol glycosides in purified stevia leaf extract sharing the same metabolic fate. *Regulatory Toxicology And Pharmacology* 77:125–33.
- QiKun T, Di M, TongHua H, GuiQing K, Yu W, 2014. Determination of the content of steviol glycoside in *Stevia rebaudiana* by near infrared spectroscopy (NIRS). *Medicinal Plant* 5:33–5.

- Qingfu M, Aihua M, 1998. Studies on overwintering of *Stevia rebaudiana* Bertoni perennial root. Journal Of Hebei Agricultural Sciences 01
- 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 7:1793–9.
- Rajasekaran T, Giridhar P, Ravishankar G, 2007. Production of steviosides in vitro and in vitro grown *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal Of The Science Of Food And Agriculture 87:420–4.
- Ramesh K, Singh V, Megeji NW, 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. In: Advances in Agronomy. Academic Press, pp 137–77. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305890030>
- Rasmusson DC, 1987. An Evaluation of Ideotype Breeding1. Crop Science 27:cropsci1987.0011183X002700060011x.
- Rasmusson DC, 1991. A plant breeder's experience with ideotype breeding. Field Crops Research 26:191–200.
- Reeleder R, 1999. Septoria Leaf Spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and Methods for Screening for Resistance. Journal Of Phytopathology 147:605–13.
- Reilly JJ, El-Hamdouchi A, Diouf A, Monyeki A, Somda SA, 2018. Determining the worldwide prevalence of obesity. The Lancet 391:1773–4.
- Reis RV, Chierrito TPC, Silva TFO, Albiero ALM, Souza LA, Gonçalves JE, Oliveira AJB, Gonçalves RAC, Reis RV, Chierrito TPC, Silva TFO, Albiero ALM, Souza LA, Gonçalves JE, Oliveira AJB, Gonçalves RAC, 2017. Morpho-anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown in vitro and in vivo. Revista Brasileira De Farmacognosia 27:34–9.
- Reis M, Coelho L, Santos G, Kienle U, Beltrão J, 2015. Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. Agricultural Water Management 152:217–21.
- Renwick AG, Tarka SM, 2008. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. Food And Chemical Toxicology 46:S70–4.
- Reynolds M, Dreccer F, Trethowan R, 2007. Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. Journal Of Experimental Botany 58:177–86.
- Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ, 2002. Salinity, Osmolytes and Compatible Solutes. In: Läuchli A, Lüttge U (eds) Salinity: Environment - Plants - Molecules. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 181–204. Available from: https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_9
- Richards RA, Townley-Smith TF, 1987. Variation in leaf area development and its effect on water use, yield and harvest index of droughted wheat. Australian Journal Of Agricultural Research 38:983–92.

- Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, Yang Z, Brandle JE, 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal* 19:411–21.
- Richman A, Swanson A, Humphrey T, Chapman R, McGarvey B, Pocs R, Brandle J, 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *The Plant Journal* 41:56–67.
- Ritu M, Nandini J, 2016. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 96:4231–4.
- Robinson H, King RM, 1977. Eupatorieae systematic review. *Biology And Chemistry Of The Compositae* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302430036>
- Rocha JR do AS de C, Nunes KV, Carneiro ALN, Marçal T de S, Salvador FV, Carneiro PCS, Carneiro JES, 2019. Selection of Superior Inbred Progenies toward the Common Bean Ideotype. *Agronomy Journal* 111:1181–9.
- Rodríguez-Craverro JF, Gutiérrez DG, Katinas L, Grossi MA, Bonifacino JM, Marchesi E, Rodríguez-Craverro JF, Gutiérrez DG, Katinas L, Grossi MA, Bonifacino JM, Marchesi E, 2019. A revision and morphological analysis of the Uruguayan species of *Stevia* (Compositae, Eupatorieae). *Rodriguésia* 70 Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2175-78602019000100274&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Rubiales D, Moral A, 2004. Prehaustorial Resistance against Alfalfa Rust (*Uromyces striatus*) in *Medicago truncatula*. *European Journal Of Plant Pathology* 110:239–43.
- Ruddat M, Lang A, Mosettig E, 1963. Gibberellin activity of steviol, a plant terpenoid. *Die Naturwissenschaften* 50:23–23.
- Ruiters C, McKenzie B, 1994. Seasonal Allocation and Efficiency Patterns of Biomass and Resources in the Perennial *Geophyte Sparaxis grandiflora* Subspecies *fimbriata* (Iridaceae) in Lowland Coastal Fynbos, South Africa. *Annals Of Botany* 74:633–46.
- Russel L, 2018. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- Saintenac C, Lee W-S, Cambon F, Rudd JJ, King RC, Marande W, Powers SJ, Bergès H, Phillips AL, Uauy C, Hammond-Kosack KE, Langin T, Kanyuka K, 2018. Wheat receptor-kinase-like protein *Stb6* controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50:368–74.
- Sakamoto I, Yamasaki K, Tanaka O, 1977a. Application of ¹³C NMR Spectroscopy to Chemistry of Natural Glycosides : Rebaudioside-C, a New Sweet Diterpene Glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 25:844–6.
- Sakamoto I, Yamasaki K, Tanaka O, 1977b. Application of ¹³C NMR Spectroscopy to Chemistry of Plant Glycosides : Rebaudiosides-D and -E, New Sweet Diterpene-Glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 25:3437–9.

- Salentijn EMJ, Petit J, Trindade LM, 2019. The Complex Interactions Between Flowering Behavior and Fiber Quality in Hemp. *Frontiers In Plant Science* 10 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00614/full>
- 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.
- Sanabria CRV, Fuente ALO, 2013. Eficiencia de los métodos de lixiviación y maceración de extractos vegetales para el control de enfermedades foliares en ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Investigación Agraria* 10:59–65.
- Sánchez-Cordova Á de J, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, López-Torres A, Sanchez-Ocampo PM, García-López E, Huerta-Heredia AA, 2019. Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation Enhances Steviol Glycosides Production and Growth in *Stevia rebaudiana* Plantlets. *Sugar Tech* 21:398–406.
- Sanderson FR, 1972. A Mycosphaerella species as the Ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. *New Zealand Journal Of Botany* 10:707–9.
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR, 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243:281–96.
- Savary S, Stetkiewicz S, Brun F, Willocquet L, 2015. Modelling and mapping potential epidemics of wheat diseases—examples on leaf rust and *Septoria tritici* blotch using EPIWHEAT. *European Journal Of Plant Pathology* 142:771–90.
- Schaart JG, van de Wiel CCM, Lotz LAP, Smulders MJM, 2016. Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends In Plant Science* 21:438–49.
- Schauer S, Huang T, Samuel P, Khazi F, Markozyan A, 2017. Insights from the sequencing and annotation of the *Stevia rebaudiana* genome and their application in agronomy and health. *Annals Of Nutrition And Metabolism* 71:1316–7.
- Schiffman SS, Rother KI, 2013. Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B* 16:399–451.
- Schulman AH, 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158:313–21.
- Sen S, Biswas G, Basu SK, Acharya K, 2012. Management of leaf spot disease of '*Stevia rebaudiana*' Bertoni with antagonistic bacteria. *Australian Journal Of Crop Science* 6:350.
- Senapati N, Brown HE, Semenov MA, 2019. Raising genetic yield potential in high productive countries: Designing wheat ideotypes under climate change. *Agricultural And Forest Meteorology* 271:33–45.
- Senapati N, Griffiths S, Hawkesford M, Shewry PR, Semenov MA, 2020. Substantial increase in yield predicted by wheat ideotypes for Europe under future climate. *Climate Research* 80:189–201.

- Shah AB, Jones GP, Vasiljevic T, 2010. Sucrose-free chocolate sweetened with *Stevia rebaudiana* extract and containing different bulking agents – effects on physicochemical and sensory properties. *International Journal Of Food Science & Technology* 45:1426–35.
- Shakoor N, Lee S, Mockler TC, 2017. High throughput phenotyping to accelerate crop breeding and monitoring of diseases in the field. *Current Opinion In Plant Biology* 38:184–92.
- Shalizi MN, Isik F, 2019. Genetic parameter estimates and GxE interaction in a large cloned population of *Pinus taeda* L. *Tree Genetics & Genomes* 15:46.
- 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 Available from: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/34522>
- Shen Y, Liu N, Li C, Wang X, Xu X, Chen W, Xing G, Zheng W, 2017. The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. *Open Biology* 7 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5451545/>
- Shetty NP, Kristensen BK, Newman M-A, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL, 2003. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological And Molecular Plant Pathology* 62:333–46.
- Shi J, Zou X, Zhao J, Mel H, Wang K, Wang X, Chen H, 2012. Determination of total flavonoids content in fresh *Ginkgo biloba* leaf with different colors using near infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy* 94:271–6.
- Shimizu T, Aka Kacar Y, Cristofani-Yaly M, Curtolo M, Machado MA, 2020. Markers, Maps, and Marker-Assisted Selection. In: Gentile A, La Malfa S, Deng Z (eds) *The Citrus Genome*. Springer International Publishing, Cham, pp 107–39. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_7
- Shirtliffe SJ, Johnston AM, 2002. Yield-density relationships and optimum plant populations in two cultivars of solid-seeded dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Saskatchewan. *Canadian Journal Of Plant Science* 82:521–9.
- Shock CC, 1982. *Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California*. Agronomy Progress Report University of California Davis.
- Shock CC, Parris CA, 2017a. Stevia plant named ‘SW 201’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP27815P3/en>
- Shock CC, Parris CA, 2017b. Stevia plant named ‘SW 107’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP27937P3/en>
- Shock CC, Parris CA, 2017c. Stevia plant named ‘SW 129’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP28373P3/en>
- Shock CC, Parris CA, 2018. Stevia plant named ‘SW 227’. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP28977P3/en>

- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu Y-Y, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459:437–41.
- Shuping DSS, Eloff JN, 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal Of Traditional, Complementary And Alternative Medicines* 14:120–7.
- Shwetha GS, Hegde YR, 2012. Management of *Sclerotium wilt* of *Stevia rebaudiana* through biorationals. *International Journal Of Plant Protection* 5:248–51.
- Singh SD, Rao GP, 2005. *Stevia*: The herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech* 7:17–24.
- Singh G, Singh G, Singh P, Parmar R, Paul N, Vashist R, Swarnkar MK, Kumar A, Singh S, Singh AK, Kumar S, Sharma RK, 2017. Molecular dissection of transcriptional reprogramming of steviol glycosides synthesis in leaf tissue during developmental phase transitions in *Stevia rebaudiana* Bert. *Scientific Reports* 7:11835.
- Siomos AS, 2018. The quality of asparagus as affected by preharvest factors. *Scientia Horticulturae* 233:510–9.
- Smitchger J, Weeden NF, 2018. The Ideotype for Seed Size: A Model Examining the Relationship between Seed Size and Actual Yield in Pea. *International Journal Of Agronomy* 2018:e9658707. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ija/2018/9658707/>
- Soejarto D, 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In: *Stevia : The genus stevia*. CRC Press, pp 18–39. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203165942.ch2>
- Soejarto DD, Compadre CM, Medon PJ, Kamath SK, Kinghorn AD, 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany* 37:71–9.
- Sosa-Zuniga V, Brito V, Fuentes F, Steinfort U, 2017. Phenological growth stages of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on the BBCH scale. *Annals Of Applied Biology* 171:117–24.
- Speiser B, Tamm L, 2011. Regulation of Plant Protection in Organic Farming. In: Ehlers R-U (ed) *Regulation of Biological Control Agents*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 113–25. Available from: https://doi.org/10.1007/978-90-481-3664-3_4
- Sserumaga JP, Beyene Y, Pillay K, Kullaya A, Oikeh SO, Mugo S, Machida L, Ngolinda I, Asea G, Ringo J, Otim M, Abalo G, Kiula B, 2018. Grain-yield stability among tropical maize hybrids derived from doubled-haploid inbred lines under random drought stress and optimum moisture conditions. *Crop And Pasture Science* 69:691–702.
- Starratt AN, Kirby CW, Pocs R, Brandle JE, 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 59:367–70.

- Steinberg G, 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics And Biology* 79:17–23.
- Stewart EL, Hagerty CH, Mikaberidze A, Mundt CC, Zhong Z, McDonald BA, 2016. An Improved Method for Measuring Quantitative Resistance to the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Using High-Throughput Automated Image Analysis. *Phytopathology* 106:782–8.
- Stoskopf NC, Tomes DT, Christie BR, Christie BR, 2019. *Plant Breeding: Theory And Practice*. CRC Press.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg É, Van Den Ende W, 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition* 62:207–14.
- 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.
- Strik B, Buller G, 2005. The Impact of Early Cropping on Subsequent Growth and Yield of Highbush Blueberry in the Establishment Years at Two Planting Densities is Cultivar Dependant. *HortScience* 40:1998–2001.
- Stukenbrock EH, Quaedvlieg W, Javan-Nikhah M, Zala M, Crous PW, McDonald BA, 2012. *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the septoria tritici leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*). *Mycologia* 104:1397–407.
- Suarma JP, Singh AK, Kumar S, Kumar S, 2009. Identification of traits for ideotype selection in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Mysore Journal Of Agricultural Sciences* 43:222–6.
- Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* 60:166–77.
- Sumida T, 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan. *Kenkyu Hokoku*. = *Journal Of The Central Agricultural Experiment Station-Japan, Nogyo Shikenjo, Konosu* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302793802>
- Sun J, 2016. Development of stevia and steviol glycosides industry in China. In: *Proceedings of the 9th stevia symposium 2016*. Jan M.C. Geuns, Gothenburg, Sweden, pp 145–50.
- Sutton BC, 1980. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801366283>
- Sylvetsky AC, Rother KI, 2016. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior* 164:446–50.

- Sys EA, Marsolais AA, Brandle J, 1998. Stevia plant named `RSIT 94-1306`. Available from: <https://patents.google.com/patent/USPP10562P/en?q=stevia+cultivar&inventor=brandle>
- Tabib Ghaffary SM, Robert O, Laurent V, Lonnet P, Margalé E, van der Lee TAJ, Visser RGF, Kema GHJ, 2011. Genetic analysis of resistance to septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theoretical And Applied Genetics* 123:741–54.
- Takács-Hájos M, Rubóczki T, Szabó FM, Kiss A, 2019. Effect of Environmentally Friendly Nutrition Supply on Stevia (*Stevia rebaudiana* B.) Production. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47:201–6.
- Talavera A, Soorni A, Bombarely A, Matas AJ, Hormaza JI, 2019. Genome-Wide SNP discovery and genomic characterization in avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientific Reports* 9:20137.
- Talukder ZI, Gong L, Hulke BS, Pegadaraju V, Song Q, Schultz Q, Qi L, 2014. A High-Density SNP Map of Sunflower Derived from RAD-Sequencing Facilitating Fine-Mapping of the Rust Resistance Gene R12. *PLOS ONE* 9:e98628.
- 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* 45:2165–6.
- Tandel K, 2011. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal Of Pharmacology And Pharmacotherapeutics* 2:236.
- Tanova K, Kaschieva M, 2018. Testing alternative control means for the pathogenic fungus *Alternaria alternata* f. ssp. *stevae*, isolated from stevia - *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal Of Mountain Agriculture On The Balkans* 21:214–23.
- Tappy L, 2018. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *Journal Of Experimental Biology* 221 Available from: https://jeb.biologists.org/content/221/Suppl_1/jeb164202
- Taranto F, D'Agostino N, Tripodi P, 2016. An Overview of Genotyping by Sequencing in Crop Species and Its Application in Pepper. In: Rogato A, Zazzu V, Guarracino M (eds) *Dynamics of Mathematical Models in Biology : Bringing Mathematics to Life*. Springer International Publishing, Cham, pp 101–16. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45723-9_9
- Tateo F, Mariotti M, Bononi M, Lubian E, Martello S (Milan U (Italy) D di F delle PC e CA, Cornara L (Genoa U (Italy) IBH, 1998. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay [sweeteners]. *Italian Journal Of Food Science (Italy)* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2000060510>
- 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* 93:2121–9.

- Tavarini S, Passera B, Angelini LG, 2018. Chapter 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in Stevia by Breeding. In: Steviol Glycosides: Cultivation, Processing, Analysis and Applications in Food, Royal Society of Chemistry.p 31.
- Tavarini S, Sgherri C, Ranieri AM, Angelini LG, 2015. Effect of Nitrogen Fertilization and Harvest Time on Steviol Glycosides, Flavonoid Composition, and Antioxidant Properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 63:7041–50.
- Techniques et développement, 1972. Idéotype. Mots-Clés:40.
- Teichmann T, Muhr M, 2015. Shaping plant architecture. Frontiers In Plant Science 6 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00233/full>
- Thalman M, Santelia D, 2017. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. New Phytologist 214:943–51.
- Thilakarathna MS, McElroy MS, Chapagain T, Papadopoulos YA, Raizada MN, 2016. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under managed herbaceous cropping systems. A review. Agronomy For Sustainable Development 36:58.
- Tholl D, 2015. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: Schrader J, Bohlmann J (eds) Biotechnology of Isoprenoids. Springer International Publishing, Cham, pp 63–106. Available from: https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Thurling N, 1991. Application of the ideotype concept in breeding for higher yield in the oilseed brassicas. Field Crops Research 26:201–19.
- Tidd H, Bryant R, Kanyuka K, 2019. Characterisation of major genes mediating resistance to *Septoria tritici* blotch disease in wheat. In: International Symposium on Cereal Leaf Blights 2019 Available from: <https://repository.rothamsted.ac.uk/item/8w8y0/characterisation-of-major-genes-mediating-resistance-to-septoria-tritici-blotch-disease-in-wheat>
- Tivoli B, Calonnec A, Richard B, Ney B, Andrivon D, 2013. Current knowledge on plant/canopy architectural traits that reduce the expression and development of epidemics. European Journal Of Plant Pathology 135:471–8.
- Todd J, 2010. La culture du stévia, l'édulcorant naturel. Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/stevia.htm>
- Toft BD, Alam MM, Wilkie JD, Topp BL, 2019. Phenotypic Association of Multi-scale Architectural Traits with Canopy Volume and Yield: Moving Toward High-density Systems for Macadamia. HortScience 54:596–602.
- Topp BL, Nock CJ, Hardner CM, Alam M, O'Connor KM, 2019. Macadamia (*Macadamia* spp.) Breeding. In: Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (eds) Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops: Volume 4. Springer International Publishing, Cham, pp 221–51. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5_7

- Tork DG, Anderson NO, Wyse DL, Betts KJ, 2019. Domestication of Perennial Flax Using an Ideotype Approach for Oilseed, Cut Flower, and Garden Performance. *Agronomy* 9:707.
- Torriani SF, Brunner PC, McDonald BA, Sierotzki H, 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 65:155–62.
- Totté N, Charon L, Rohmer M, Compennolle F, Baboeuf I, Geuns JMC, 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters* 41:6407–10.
- Totté N, Ende WV den, Van Damme EJ, Compennolle F, Baboeuf I, Geuns JM, 2003. Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal Of Botany* 81:517–22.
- Uçar E, Özyiğit Y, Turgut K, 2015. The Effect of Different Pollination Methods on Seed Yield and Germination Features in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 2:114–7.
- Uçar E, Özyiğit Y, Turgut K, 2016. The Effects of Light and Temperature on Germination of *Stevia (Stevia rebaudiana BERT.)* Seeds. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 3 Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.19159/tutad.76528>
- Uchkunov V, Uchkunova K, Uchkunov I, 2015. Effect of the Selection on the Degree of Resistance to *Alternaria alternata* f. ssp. *steviae* in Breeding Origins of *Stevia (Stevia rebaudiana B.)*. *РАСТЕНИЕВЪДНИ НАУКИ* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BG2015005838>
- UICN, 2014. Guide explicatif du Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages.
- Urban JD, Carakostas MC, Taylor SL, 2015. Steviol glycoside safety: Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens? *Food And Chemical Toxicology* 75:71–8.
- Utumi MM, Monnerat PH, Pereira PRG, Fontes PCR, Godinho V de PC, 1999. Macronutrient deficiencies in stevia: visual symptoms and effects on growth, chemical composition, and stevioside production. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brazil)* Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR1999004231>
- Vagiri M, Johansson E, Rumpunen K, 2017. Phenolic compounds in black currant leaves – an interaction between the plant and foliar diseases? *Journal Of Plant Interactions* 12:193–9.
- Vagndorf N, Nielsen NH, Edriss V, Andersen JR, Orabi J, Jørgensen LN, Jahoor A, 2017. Genomewide association study reveals novel quantitative trait loci associated with resistance towards *Septoria tritici* blotch in North European winter wheat. *Plant Breeding* 136:474–82.
- Valdés-Gómez H, Fermaud M, Roudet J, Calon nec A, Gary C, 2008. Grey mould incidence is reduced on grapevines with lower vegetative and reproductive growth. *Crop Protection* 27:1174–86.

- Vasilakoglou I, Kalfountzos D, Gougoulis N, Reppas C, 2016. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. *Archives Of Agronomy And Soil Science* 62:457–72.
- Verkley GJM, Quaedvlieg W, Shin H-D, Crous PW, 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies In Mycology* 75:213–305.
- Verkley GJM, Starink-Willemse M, Iperen A van, Abeln ECA, 2004. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 96:558–71.
- Verma NK, Lamb DW, Reid N, Wilson B, 2016. Comparison of Canopy Volume Measurements of Scattered Eucalypt Farm Trees Derived from High Spatial Resolution Imagery and LiDAR. *Remote Sensing* 8:388.
- Vijayan K, Ravikumar G, Tikader A, 2018. Mulberry (*Morus* spp.) Breeding for Higher Fruit Production. In: Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits: Volume 3*. Springer International Publishing, Cham, pp 89–130. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_3
- Voss-Fels K, Snowdon RJ, 2016. Understanding and utilizing crop genome diversity via high-resolution genotyping. *Plant Biotechnology Journal* 14:1086–94.
- Vouillamoz JF, Wolfram-Schilling E, Carron CA, Baroffio CA, 2016. Agronomical and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. *Julius-Kühn-Archiv*:86–8.
- Wakie TT, Kumar S, Senay GB, Takele A, Lencho A, 2016. Spatial prediction of wheat septoria leaf blotch (*Septoria tritici*) disease severity in Central Ethiopia. *Ecological Informatics* 36:15–30.
- Wang Q, 2016. High Rebaudioside-A Plant and Methods of Producing the Same and Uses. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20160338396A1/en?q=US20160338396A1>
- Wang B, Feng P, Chen C, Liu DL, Waters C, Yu Q, 2019. Designing wheat ideotypes to cope with future changing climate in South-Eastern Australia. *Agricultural Systems* 170:9–18.
- Wang Y, Li W, Xu X, Qiu C, Wu T, Wei Q, Ma F, Han Z, 2019. Progress of Apple Rootstock Breeding and Its Use. *Horticultural Plant Journal* 5:183–91.
- Wang Q, Wang L, Zhu G, Cao K, Fang W, Chen C, Wang X, 2016. DNA marker-assisted evaluation of fruit acidity in diverse peach (*Prunus persica*) germplasm. *Euphytica* 210:413–26.
- Wang Q, ZHANG YL, LI CK, 2016. High rebaudioside-a plant varietal, methods of extraction and purification therefrom, of compositions with enhanced rebaudioside-a content and uses of said composition. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2016134449A1/en?q=High+rebaudioside-c+plant+varietal+compositions+extracted+therefrom+high+rebaudioside-c+total+steviol+glycoside+content&oq=High+rebaudioside->

c+plant+varietal+and+compositions+extracted+therefrom+with+high+rebaudioside-c+and+total+steviol+glycoside+content

- 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. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20170290285A1/en?q=stevia+cultivar&oq=stevia+cultivar&page=1>
- 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:S54–60.
- White TL, Adams WT, Neale DB, 2007. *Forest Genetics*. CABI.
- Wickham H, Chang W, Henry L, Lin Pederson T, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D, 2016. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Velag New York. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Willetts HJ, 1971. The Survival of Fungal Sclerotia Under Adverse Environmental Conditions. *Biological Reviews* 46:387–407.
- Wise K, Johnson B, Mansfield CW, Krupke CH, 2011. Managing Wheat by Growth Stage. *Purdue Agriculture* 422:6.
- Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M, 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research And Technology* 231:581–8.
- Wölwer-Rieck U, 2018. CHAPTER 4: Analysis of Steviol Glycosides. In: *Steviol Glycosides*.pp 84–112. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782628309-00084/978-1-78262-830-9>
- Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J, 2006. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature Biotechnology* 24:1441–7.
- Xiong J-S, Ding J, Li Y, 2015. Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticulture Research* 2:1–10.
- Xu Y, Crouch JH, 2008. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science* 48:391–407.
- Xu Z, Gleason ML, Mueller DS, Esker PD, Bradley CA, Buck JW, Benson DM, Dixon PM, Monteiro JEBA, 2008. Overwintering of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii* in Different Latitudes of the United States. *Plant Disease* 92:719–24.
- 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, Rajeev R, 2014. Self-incompatibility evidenced through scanning electron microscopy and pollination behaviour in *Stevia rebaudiana*. *Indian Journal Of Agricultural Sciences* 84:93–100.
- Yan MF, Liu B, Wang YX, Zhu J, Yang PS, Xiao X, Jiang JX, 2018. First Report of *Alternaria steviae* Causing Black Leaf Spot of Stevia in China. *Plant Disease* 102:2650–2650.
- 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 Physiology And Biochemistry* 86:174–80.
- Yang J, Zhang J, 2010. Crop management techniques to enhance harvest index in rice. *Journal Of Experimental Botany* 61:3177–89.
- Yao Y, Ban M, Brandle J, 1999. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome* 42:657–61.
- Yates S, Mikaberidze A, Krattinger SG, Abrouk M, Hund A, Yu K, Studer B, Fouche S, Meile L, Pereira D, Karisto P, McDonald BA, 2019. Precision Phenotyping Reveals Novel Loci for Quantitative Resistance to Septoria Tritici Blotch. *Plant Phenomics* 2019:1–11.
- Yoneda Y, Nakashima H, Miyasaka J, Ohdoi K, Shimizu H, 2017. Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 137:57–65.
- Zachokostas P, 2016. Effects of Agricultural Techniques on the Quantitative and Qualitative Characteristics of *Stevia Rebaudiana* Bertoni, under Mediterranean Conditions (Karditsa, Thessaly, Greece). APAR 3 Available from: <https://medcraveonline.com/APAR/effects-of-agricultural-techniques-on-the-quantitative-and-qualitative-characteristics-of-stevia-rebaudiana-bertoni-under-mediterranean-conditions-karditsa-thessaly-greece.html>
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415–21.
- Zafar T, 2017. Aspartame: Effects and Awareness. MOJ Toxicology 3 Available from: <https://medcraveonline.com/MOJT/aspartame-effects-and-awareness.html>
- Zalapa JE, Staub JE, McCreight JD, 2006. Generation means analysis of plant architectural traits and fruit yield in melon. *Plant Breeding* 125:482–7.
- Zenone T, Morelli G, Teobaldelli M, Fischanger F, Matteucci M, Sordini M, Armani A, Ferrè C, Chiti T, Seufert G, 2008. Preliminary use of ground-penetrating radar and electrical resistivity tomography to study tree roots in pine forests and poplar plantations. *Functional Plant Biology* 35:1047–58.
- 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* 35:81–6.

- Zhao H, Speed TP, 1996. On Genetic Map Functions. *Genetics* 142:1369–77.
- Zheng J, Zhuang Y, Mao H-Z, Jang I-C, 2019. Overexpression of SrDXS1 and SrKAH enhances steviol glycosides content in transgenic *Stevia* plants. *BMC Plant Biology* 19:1.
- Zhong Z, Marcel TC, Hartmann FE, Ma X, Plissonneau C, Zala M, Ducasse A, Confais J, Compain J, Lapalu N, Amselem J, McDonald BA, Croll D, Palma-Guerrero J, 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytologist* 214:619–31.
- Zhou, Liang, Xu, Zhang, Liang, Huang, Su, 2012. Study on chemical constituents of *Angelica keiskei*. *Chinese Journal Experimental Traditional Medical Formulae* 18:103–5.
- Zhu J, Ingram PA, Benfey PN, Elich T, 2011. From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Current Opinion In Plant Biology* 14:310–7.
- Zobel EH, Hansen TW, Rossing P, von Scholten BJ, 2016. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. *Curr Obes Rep* 5:449–55.

Vers l'architecture génétique des caractères de rendement en glycosides de stéviol chez *Stevia rebaudiana* : caractérisation fine des ressources génétiques

Résumé

Le rejet des édulcorants de synthèse par les consommateurs a conduit ces derniers à privilégier les édulcorants naturels comme les glycosides de stéviol (SG). Ces molécules sont accumulées dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni, plante pérenne originaire du Paraguay, et aujourd'hui cultivée sur tous les continents. Dans le Sud-Ouest de la France, une filière de production en Agriculture Biologique est en développement, sous l'impulsion de la société Oviatis. Ce travail de thèse sous contrat CIFRE s'intéresse à la caractérisation fine des ressources génétiques cultivées sur les traits d'intérêt, et au développement des connaissances et des outils génétiques sur cette culture. La performance agronomique de la stévia a été évaluée par l'étude des composantes du rendement en SG, de l'architecture de la canopée et de la réponse à un agent fongique. Ces travaux ont permis (1) l'adaptation de l'échelle de stades phénologiques BBCH à la culture de la stévia et sa transmission à la filière, (2) l'évaluation des traits du rendement en SG sur 15 ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* phénotypées pendant quatre années sur une parcelle expérimentale, (3) l'évaluation de la variabilité de la réponse à une infection de septoriose de ces mêmes ressources génétiques en conditions contrôlées et le développement d'un test d'inoculation sur disques foliaires, (4) d'estimer les paramètres génétiques pour les traits du rendement sur quatre populations de stévia cultivées en plein champ pendant trois ans, (5) enfin de construire des idéotypes de stévia dans le contexte local de production. Ces résultats participent au développement de la stévia dans le Sud-Ouest de la France, et alimentent la mise en place d'un programme d'amélioration pour une production en Agriculture Biologique.

Mots clés: *Stevia rebaudiana*, sélection génétique, biomasse, glycosides de stéviol

Through genetic architecture of traits of steviol glycosides' yield in *Stevia rebaudiana*: fine characterization of genetic resources

Abstract

The rejection of synthetic sweeteners by consumers has led to an increase in the use of natural sweeteners such as steviol glycosides. These molecules are accumulated in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a perennial plant from Paraguay, which is now cultivated on all continents. Oviatis is developing the local production sector in organic agriculture in southwestern France. The objectives of this PhD project under CIFRE contract are to finely characterize the genetic resources cultivated in temperate conditions on the traits of interest and to develop a genetic tools and knowledges on this crop. This work has made it possible to (1) the adaptation of BBCH phenological scale to stevia and its skill transfer to the stevia sector, (2) the phenotyping of steviol glycosides yield on 15 genetic resources of *Stevia rebaudiana* for 4-years of production, (3) evaluate response variability of the same genetic resources to septoria infection and the development of a leaf-disk inoculation test, (4) to estimate genetic parameters for SG yield traits on four populations cultivated in field trial for three years, and finally (5) to build stevia idéotypes for the local production context. These results are contributing to the development of stevia in southwestern France, and will be used to set up a stevia breeding program for local organic agriculture.

Key words: *Stevia rebaudiana*, plant breeding, biomass, steviol glycosides

UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE

71 av. Edouard Bourlaux CS 20032 33882 Villenave d'Ornon Cedex