



**HAL**  
open science

# Les agents du dépérissement des noyers en France : écologie, diversité et cycle de vie

Marie Belair

► **To cite this version:**

Marie Belair. Les agents du dépérissement des noyers en France : écologie, diversité et cycle de vie. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2023. Français. NNT : 2023BRES0065 . tel-04598593

**HAL Id: tel-04598593**

**<https://theses.hal.science/tel-04598593>**

Submitted on 3 Jun 2024

**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 DE DOCTORAT DE

## L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation*  
Spécialité : *Microbiologie*

Par

**Marie BELAIR**

## Les agents du dépérissement des noyers en France : écologie, diversité et cycle de vie

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 1<sup>er</sup> décembre 2023

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne (UR 3882 / USC  
INRAE 1504)

### Rapporteurs avant soutenance :

Marie FOULONGNE-ORIOU Chargée de Recherches, INRAE, UR 1264 MycSA, Centre INRAE Nouvelle-Aquitaine  
Bordeaux, Villenave d'Ornon  
Marc BUEE Directeur de Recherches, INRAE, UMR 1136 IAM, Centre INRAE Grand-Est - Nancy,  
Champenois

### Composition du Jury :

Président : Cécile ROBIN Directrice de Recherches, INRAE, UMR 1202 BIOGECO,  
INRAE - Université de Bordeaux, Cestas

Examineurs : Marie FOULONGNE-ORIOU Chargée de Recherches, INRAE, UR 1264 MycSA  
Marc BUEE Directeur de Recherches, INRAE, UMR 1136 IAM

Dir. de thèse : Gaétan LE FLOCH Professeur des Universités, UR 3882 LUBEM, UBO, Plouzané

Encadrantes : Flora PENSEC Maîtresse de Conférences, UR 3882 LUBEM, UBO, Plouzané  
Adeline PICOT Maîtresse de Conférences, UR 3882 LUBEM, UBO, Plouzané

Invitée Cyrielle MASSON Chargée d'expérimentation, Station d'Expérimentation  
Nucicole Rhône Alpes



## Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci à Marie Foulongne-Oriol et Marc Buée d'avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi qu'à Cécile Robin d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Emmanuel Coton, directeur du LUBEM, de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire.

Je souhaite par la suite remercier mon directeur de thèse, Gaétan Le Floch. Merci pour ta présence et ton soutien nécessaires au bon déroulement de cette thèse, pour ton accompagnement et tes conseils aux instants clefs de ce projet.

Je remercie particulièrement mes encadrantes, Flora Pensec et Adeline Picot. Merci pour votre soutien sans faille, vos conseils avisés et votre oreille attentive. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir aiguillée, mais aussi d'avoir laissé la place à mes idées et de m'avoir suivie. Flora, merci pour ton accompagnement et ton aide à la décision concernant les isolats, pour ton soutien et ton investissement dans l'analyse des données de génétique. Merci aussi pour toutes ces discussions, pour ton amour de la science que tu sais si bien transmettre, et pour ta personnalité que j'ai tant apprécié découvrir. Adeline, tu as su me soutenir, m'accompagner, me remettre dans le droit chemin quand mes pensées s'égarèrent. Merci pour ta réactivité permanente et pour tes bonnes idées, même lors d'un passage éclair de 5 minutes dans ton bureau. A toutes les deux, merci pour ce que vous m'avez apporté, pour votre joie de vivre qui fait du bien, vos encouragements et compliments qui remettent d'aplomb, et pour m'avoir aidée à cultiver cette passion du laboratoire. Je suis sincèrement reconnaissante d'avoir pu réaliser cette thèse sous votre encadrement.

Merci à vous trois pour votre accompagnement et soutien quant à la poursuite de ma carrière. Merci de m'avoir permis de découvrir l'enseignement. J'ai une chance inestimable de travailler une année de plus à vos côtés.

Je tiens par la suite à remercier les membres de mon comité de suivi individuel. Cécile Robin, c'est un plaisir, après avoir communiqué avec vous autour de mes résultats de thèse lors de ces réunions, que vous soyez à présent l'examinatrice de ce manuscrit de thèse final. Florent Trouillas, merci pour ton expertise sur les agents du dépérissement du noyer en Californie et pour ces discussions enrichissantes concernant mon projet.



Merci au personnel administratif, Cathy, Anne-Cécile, Sophie, Zindy, Céline, pour votre sympathie et votre bonne humeur. Marielle, merci pour ton accompagnement indispensable, c'est grâce à toi que tout se déroule si bien. Sabine R., Florence C., merci pour votre accompagnement lors de mes enseignements à l'IUT. Merci également à Michèle Kerleroux, Cécile Faure, Véronique Ziegler, et Isabelle Baumgarten.

Merci aux membres du LUBEM, Amélie, Franck, Gaëtan B., Jean-Luc, Jérôme, Karim, Laurence, Marie-Elisabeth, Monika, Nolwenn, Patrice, Valérie. Patrice, merci d'avoir partagé avec moi ton expertise en mycologie, l'identification morphologique de mes isolats en a été grandement simplifiée. Merci Amélie pour ton accompagnement dans la mise en collection. Jean-Luc, merci beaucoup d'avoir pris le temps de me former à la phylogénie, d'avoir partagé avec moi tes connaissances et m'avoir guidée. Jérôme, merci pour ton intégration dans l'équipe enseignante. Merci à tous pour votre bonne humeur et ces petites discussions au fil de couloirs qui m'ont fait sentir membre à vos côtés.

Un énorme merci à Audrey, Christophe, Clément, Elisabeth, Stella, Sylvie. Audrey, j'ai vraiment apprécié te rencontrer, merci pour ton rire si communicatif et ta joie de vivre. Stella, merci pour ton accompagnement inestimable lors de mon arrivée au laboratoire, tu m'as formée à toutes les techniques dont j'ai eu besoin. Sylvie, tous mes champignons n'auraient pas pu avoir l'attention que je leur ai portée si tu n'avais pas été là pour couler ces centaines et centaines de boîtes, c'est grâce à toi aussi que tout cela a pu se faire. Enfin, Christophe, je ne saurais te remercier assez pour ton soutien durant les TP, qui n'auraient pas pu se dérouler aussi bien sans ta présence à mes côtés. A vous tous, ce fut un réel plaisir de faire votre connaissance et d'avoir partagé cette aventure avec vous.

Merci aux stagiaires avec qui j'ai pu travailler, Axel, Charline, Léa et Vincent. Axel, Charline, ce fut un plaisir de vous rencontrer et de vous voir avancer. Léa, merci pour ton aide et le sérieux de tes travaux qui ont permis à cette thèse une belle avancée. Vincent, le livret de reconnaissance que tu as créé nous suit partout pour chaque identification. Je vous souhaite à tous le meilleur pour l'avenir, et que vos projets se réalisent.

Une pensée pour Gwennina et Romain. Quel plaisir de vous avoir rencontrés, merci pour votre esprit si drôle et décalé, vous êtes uniques.

Merci à vous, Amandine, Océane C., Charlotte G., Claire Quelle équipe de copines, quelle joie d'avoir tissé avec vous des liens si forts, et de me sentir ici comme chez moi grâce à vous. Merci pour ces soirées quasiment hebdomadaires, ces discussions interminables, ces camemberts

rôtis, ces soirées à la Gua. Une grosse pensée pour toi aussi copain Steven. Merci pour tes conseils sur les manips, merci pour ces fous rires, merci pour ces cours express sur la bière, le métal, les vikings.

Un immense merci aux doctorants du LUBEM, ceux qui sont dans la même barque et qui sont d'un soutien indispensable. Merci à Aurélie et Ewen, avec qui j'ai eu la chance de commencer ma thèse. Aurélie, mon Doudou, les mots sont rarement suffisants. Tu m'as été indispensable, merci pour tes expressions remodelées, merci pour ta passion des sorties entre amies, merci pour la personne que tu es. Ewen, tu es arrivé, puis tu es parti (merci Paris), et puis tu es revenu. Ça fait du bien de t'avoir dans les locaux et de partager avec toi, ta perpétuelle remise en question du moindre détail aide indéniablement à la réflexion et la prise de recul.

Adrien, je te souhaite de réussir. Merci pour ta façon d'être, tu es assurément unique, le seul à vivre la thèse de cette façon.

Nolwenn, sois fière de toi. C'est un plaisir d'avoir rencontré une telle battante.

A tous, je suis si heureuse de rester un an de plus, et impatiente de vous voir à votre tour, terminer cette aventure, boucler votre manuscrit, et tourner la page.

Mélanie, merci pour cette année et demie. Tu es pour moi une véritable amie, ton départ du laboratoire n'aura rien changé à nos habitudes. Merci pour ton aide, pour tes conseils, quand les manips font douter et que la remise en question est douloureuse. Merci pour ces sessions de rédaction, toi le manuscrit, moi la revue, merci pour le métabarcoding, qui nous a fait perdre autant de cheveux et que de patience. Merci pour tout, encore. Je suis extrêmement chanceuse de t'avoir rencontrée. Cette thèse n'aurait pas été si agréable sans toi.

Océane S., Vincent, Bastien, ce fut un plaisir de vous rencontrer et de passer ces quelques premiers mois avec vous. Merci pour cette intégration en bonne et due forme au sein de l'équipe des doctorants.

A ceux arrivés en cours de route, et qui attaquent la troisième année, Damien, Toan, Nicolas, merci. Damien, merci pour ces discussions qui ont rarement de sens, tu as cette capacité à rendre une pause plus fatigante que le travail lui-même. Nicolas, quelle belle personne tu es. Merci pour ces formations accélérées en biochimie, merci pour tes folles idées.

Marco, I am so happy to have met you. You are such a wonderful person. Thank you so much for all the conversations and the beers by the sea. You have been so helpful to see the PhD from another point of view and putting life into perspective. I wish you all the best, you really deserve it.

Aux dernières arrivées, Charlotte, Charlène, et Mélanie C., je vous souhaite le meilleur. France, un peu plus d'1 an que tu as rejoint le laboratoire, et tu fais déjà largement partie du groupe des amies. Merci pour ton grain de folie et tes accents saugrenus.

Merci aussi aux post-doctorants, Beatriz et Maxence, pour votre expérience de la thèse et les discussions.

Enfin, merci à mes amis, qui ont suivi de près ou de loin cette folle aventure bretonne, Julian, Inès, Anaïs. Anaïs, ma meilleure amie depuis bientôt plus de 10 ans. Le destin nous aura fait quitter les Ardennes en même temps, et nous aura réunies dans ce magnifique Finistère. Tu as toujours été un soutien incroyable, le meilleur de tous. Du fond du cœur, merci.

Merci à ma famille, qui m'aura appris à croire en mes rêves et à ne jamais les lâcher. Malgré la difficulté, merci de m'avoir laissée partir, et de toujours être mon cocon à chacun de mes retours. Merci pour votre soutien, je ne saurais être forte sans vous.

Merci à la famille Devaux, pour votre soutien. Vous m'avez suivie durant toute cette aventure, et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Je terminerais cette partie par remercier Thomas. Tu as suivi cette thèse depuis l'autre bout de la France, et ce malgré ces presque 800 km, presque 7h00 de train. Cette aventure n'aurait pas eu la même saveur sans toi, tu as été un pilier indispensable, tu m'as donné la force d'aller jusqu'au bout. De nouvelles aventures nous attendent, j'ai hâte de construire ces nouveaux projets avec toi.

# Sommaire

Liste des abréviations .....	8
INTRODUCTION.....	11
Liste des illustrations.....	13
Liste des tableaux .....	15
Introduction générale.....	17
Contexte bibliographique .....	21
1. Le noyer commun ( <i>Juglans regia</i> L.).....	21
2. Les maladies de dépérissement .....	30
3. Décrypter le pathobiome fongique : diversité inter et intraspécifique des micro-organismes et interactions .....	46
RESULTATS .....	75
CHAPITRE I - Mise au point méthodologique du séquençage métabarcoding pour son application aux échantillons environnementaux de noyer .....	77
I. Introduction des travaux .....	79
II. Article publié dans Plants .....	80
CHAPITRE II - Etude de la diversité fongique associée aux fruits et rameaux de noyer présentant des symptômes de dépérissement et leurs interactions.....	115
I. Introduction des travaux .....	117
II. Article en préparation .....	119
CHAPITRE III - Etude de la diversité intraspécifique des populations de <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i> .....	173
I. Introduction des travaux .....	175
II. Article en préparation .....	176
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	213
ANNEXES .....	235
I. Annexe 1 - Revue publiée dans Pathogens .....	236
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES.....	251
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	261

## Liste des abréviations

**AASW** Aguas Agrias Stream Water

**ACT** Actine

**ADN** Acide désoxyribonucléique

**AFLP** Amplified Fragment Length Polymorphism

**ANOVA** Analysis of Variance

**ANSES** Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**AOP** Appellation d'Origine Protégée

**ARN** Acide ribonucléique

**ARNr** Acide ribonucléique ribosomique

**ASV** Amplicon sequence variant

**BAN** Brown Apical Necrosis

**BDA** Black Dead Arm

**BLAST** Basic Local Alignment Search Tool

**BPP** Bayesian posterior probabilities

**CAL** Calmoduline

**CARIBOU** Caractérisation d'Outils Innovants de CARactérisation et de détection des Botryosphaeriaceae

**CASDAR** Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural

**CAZymes** Carbohydrate active enzymes

**CHS-1** Chitine synthase 1

**CNV** Copy number variation

**CTIFL** Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

**CWDE** Cell Wall Degrading Enzymes

**DAPC** Discriminant Analysis of Principal Components

**DGDDI** Direction Générale des Douanes et Droits Indirects

**EF1- $\alpha$**  Facteur d'élongation 1 alpha

**FAOSTAT** Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

**GAPDH** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**GEVES** Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

**HIS** Histone 3

**INSEE** Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

**ITS** Internal Transcribed Spacer

**LSU** Large subunit (grande sous-unité ARNr 28S)

**LWM** Leaf Wetness Model

**MAGIC** Gestion des Maladies fongiques du noyer par des solutions de bioContrôle

**MCMC** Markov Chain Monte Carlo

**MLG** Multilocus genotype

**MP-PCR** Microsatellite-Primed PCR

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**NGS** Next Generation Sequencing

**PCC** Pearson's correlation coefficient

**PCoA** Principal Coordinates Analysis

**PCR** Polymerase Chain Reaction

**PDA** Potato Dextrose Agar

**PERMANOVA** Permutational Multivariate Analysis of Variance

**PGTB** Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux

**qPCR** Quantitative PCR

**RAPD** Random Amplified Polymorphic DNA

**RFLP** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RPB1** sous-unité RPB1 de l'ARN polymerase II

**RPB2** sous-unité RPB2 de l'ARN polymerase II

**SDA** Sabouraud Dextrose Agar

**SENuRA** Station d'Expérimentation Nucicole Rhône Alpes

**SNP** Single Nucleotide Polymorphism

**SparCC** Sparse Correlations for Compositionnal data

**SSP** Small Secreted Protein

**SSR** Simple Sequence Repeat

**SSR-seq** SSR sequencing

**SSU** Small subunit (petite sous-unité ARNr 18S)

**TUB**  $\beta$ -tubuline

**UBO** Université de Bretagne Occidentale

**UBOCC** Collection de culture de l'UBO

**UPGMA** Unweighted Paired Group Mean Arithmetic

## INTRODUCTION





## Liste des illustrations

- Figure 1. Surfaces cultivées (ha) et production (t) de noix non décortiquées en France, et exportation (t) vers l'Europe entre 1961 et 2021 (d'après FAOSTAT 2021). Les données concernant les surfaces dédiées ne sont disponibles qu'à partir de 1985. .... 22
- Figure 2. Répartition en pourcentage des pays de destination des noix non décortiquées exportées depuis la France en 2021 (d'après DGDDI 2022). .... 23
- Figure 3. Verger de noyers commun (*Juglans regia* L.) de la variété Franquette en Isère échantillonné durant ce projet de thèse (photographie personnelle). .... 24
- Figure 4. Planche photographique de symptômes de ravageurs et maladies sur le noyer commun. A : Nécroses sur fruits provoquées par les larves de la mouche du brou (d'après SENURA 2019) ; B : Symptômes de la nécrose apicale du fruit (d'après Moya-Elizondo *et al.* 2021) ; C : Symptômes sur fruit de l'antracnose causée par la présence de *Colletotrichum* (d'après SENURA 2019) ; D : Symptômes sur fruits de la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (d'après SENURA 2019) ; E : Symptômes sur rameau de la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (d'après SENURA 2019) ; F : Symptômes sur fruits de l'antracnose à *Gnomonia* (d'après SENURA 2019) ; G et H : Symptômes sur fruits du dépérissement du noyer (Flora Pensec, Adeline Picot) ; I et J : Symptômes sur rameaux du dépérissement du noyer (Flora Pensec, Adeline Picot). .... 29
- Figure 5. Carte de la surface (ha) dédiée à la nuciculture et recensement des espèces majeures de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* isolées à partir d'échantillons de *J. regia* présentant des symptômes de dépérissement (Figure réalisée sur la base des données FAOSTAT 2021 et de la littérature citée précédemment). .... 36
- Figure 6. Cycle biologique commun aux différentes espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* sur noyer commun selon les conditions climatiques des pays à climat méditerranéen (d'après López-Moral *et al.* 2020b). .... 39
- Figure 7. Risque d'infection des fruits du pistachier par *N. mediterraneum* d'après le modèle LWM en Californie. Les courbes de régression correspondent aux durées d'humectation et températures nécessaires au développement de nécroses sur 10 % (courbe du haut) et sur 5 % (courbe du bas) des feuilles de pistachiers inoculées artificiellement (adapté de Morgan *et al.* 2009). .... 43

Figure 8. Diversité des espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* étudiées sur milieu PDA après incubation à température et lumière ambiante et structures de reproduction sexuée et asexuée (d'après Phillips *et al.* 2013; Udayanga *et al.* 2014a, respectivement). A-E. *B. dothidea* ; F-J. *N. parvum* ; K-O. *D. eres*. A-B. Face supérieure et inférieure de *B. dothidea* à 10 jours. C. Ascospores. D. Conidies. E. Conidies âgées. F-G. Face supérieure et inférieure de *N. parvum* à 10 jours. H. Ascospores. I. Conidies. J. Conidies âgées. K-L. Face supérieure et inférieure de *D. eres* à 7 jours. M. Ascospores dans asques. N.  $\alpha$ -conidies. O.  $\beta$ -conidies. Barres d'échelle : C-E = 10  $\mu$ m, H = 10  $\mu$ m, I-J = 5  $\mu$ m, M-N = 15  $\mu$ m, O = 10  $\mu$ m..... 51

Figure 9. Diversité des espèces de *Colletotrichum* et de *Fusarium* étudiées sur milieu PDA après incubation à température et lumière ambiante et structures de reproduction asexuée (d'après Damm *et al.* 2012; Crous *et al.* 2021, respectivement). A-C. *C. fioriniae* ; D-F. *C. godetiae* ; G-I. *F. juglandicola* UBOCC-A-119001. A-B. Face supérieure et inférieure de *C. fioriniae* à 7 jours. C. Conidies. D-E. Face supérieure et inférieure de *C. godetiae* à 10 jours. F. Conidies. G-H. *F. juglandicola* UBOCC-A-119001 à 7 jours. I. Conidies. Barres d'échelle : C, F, I = 10  $\mu$ m..... 52

Figure 10. Arbre phylogénétique de genres de la famille des Botryosphaeriaceae obtenu à l'aide des loci SSU, LSU, ITS, EF1- $\alpha$  et TUB combinés, et enraciné par *Saccharata proteae* CBS 1125206 (Phillips *et al.* 2013). ..... 55

Figure 11. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Diaporthe* obtenu à l'aide des loci ACT, Apn2, CAL, EF1- $\alpha$ , HIS, FG1093 (protéine ribosomique L37) et TUB combinés, et enraciné par *D. citri* AR3405 (Udayanga *et al.* 2014a). ..... 56

Figure 12. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Fusarium* obtenu à l'aide des loci EF1- $\alpha$ , RPB1 et RPB2 combinés, et enraciné par *F. heterosporum* CBS 391.68 (Crous *et al.* 2021). 56

## Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des maladies et ravageurs majeurs du noyer commun ( <i>Juglans regia</i> L.) en France et des principales espèces associées. ....	25
Tableau 2. Exemples d'hôtes ligneux et principales espèces de Botryosphaeriaceae et de <i>Diaporthe</i> reconnues comme étant associées aux symptômes de dépérissement à travers le monde. ....	32
Tableau 3. Caractéristiques des principales espèces pathogènes étudiées. ....	53
Tableau 4. Longueur et diamètre des nécroses moyens après inoculation de Botryosphaeriaceae sp., <i>Colletotrichum</i> sp. et <i>Diaporthe eres</i> selon la méthode, le modèle, les conditions d'inoculation et le cultivar de <i>J. regia</i> . ....	65



## Introduction générale

L'agriculture tient une place importante dans le paysage français. En 2020, près de 47 % du territoire français étaient dédiés à l'agriculture, soit près de 30 millions d'hectares, positionnant la France comme premier pays producteur européen (Agreste 2022a). Ces surfaces sont partagées en trois principales catégories, soit les cultures dites grandes cultures (environ 13 millions d'hectares en 2020), les cultures fourragères (environ 15 millions d'hectares) et les cultures dites permanentes (plus d'1 million d'hectares), majoritairement représentées par les vignobles et les vergers (Agreste 2022a). Parmi les vergers, les pommeraies (40 000 hectares en 2020) et les noyeraies (environ 27 000 hectares en 2020) sont les deux cultures les plus étendues (Agreste 2022a; b), cette dernière plaçant la France à la 9ème position mondiale en termes de superficie et à la 12ème position en termes de production, avec plus de 37 000 tonnes en 2021 (FAOSTAT 2021). La production nucicole française est d'autant plus importante que le nombre d'hectares dédiés n'a cessé d'augmenter depuis les années 1990 (FAOSTAT 2021). Elle est répartie entre deux bassins de production majoritaires : le bassin du Sud-Ouest, ou territoire du Périgord, et le bassin du Sud-Est, ou territoire du Dauphiné (FranceAgriMer 2022). Les noix françaises sont majoritairement commercialisées sous forme de fruits secs non décortiqués, dont le prix de vente hors taxe se situait entre 3,22 € et 3,40 € par kilogramme en 2021 (Réseau des Nouvelles des Marchés 2022).

Les noyeraies sont la cible de nombreux ravageurs et maladies bactériennes et fongiques pouvant provoquer de lourdes pertes de rendement pour les nuciculteurs. Viennent s'ajouter aux maladies et ravageurs connus et installés dans les vergers depuis de nombreuses années, tels que la bactériose (Giraud *et al.* 2011) ou l'antracnose à *Gnomonia* (Verhaeghe 2014), de nouvelles maladies fongiques dites émergentes. C'est le cas de l'antracnose causée par les espèces du genre *Colletotrichum*, constatée dans les noyeraies françaises au début des années 2000 (Giraud & Verhaeghe 2015), tandis que de nouveaux symptômes de dépérissements des arbres ont été signalés à partir de 2015 (Laloum *et al.* 2022). Ces nouveaux symptômes étaient principalement caractérisés par des brûlures et nécroses sur fruits, des nécroses et chancre sur rameaux, ainsi que des branches et leurs rameaux totalement desséchés et improductifs (Laloum *et al.* 2022). La nouveauté des symptômes et leur ampleur, jusque-là jamais décrites par les stations d'expérimentations nucicoles, suggèrent leur caractère émergent sans toutefois exclure que ces symptômes étaient déjà présents les années précédentes mais dans une moindre mesure et étaient donc passés inaperçus. Suite à ces premières observations en 2015, des premiers échantillonnages et isolements réalisés dans les vergers du bassin du Sud-Ouest en 2018 ont

permis de mettre en avant la présence d'espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe* (F. Trouillas, communication personnelle). L'identification de ces espèces pathogènes associée à la description des symptômes ont permis d'orienter le diagnostic vers la maladie du dépérissement du noyer, autrement appelée *Botryosphaeria/Phomopsis* canker and blight disease, maladie particulièrement étudiée en Californie de par son impact dans les noyeraies (Michailides *et al.* 2013, 2016).

De ces différentes observations est né ce projet de thèse dont l'objectif central est l'étude des agents fongiques pathogènes associés au dépérissement du noyer en France. Les différentes questions scientifiques qui se sont posées durant ce projet visaient à apporter des éléments de réponse quant à l'étiologie, c'est à dire l'identification des agents pathogènes responsables de ces symptômes, d'une part, mais aussi l'épidémiologie et le cycle de vie de ces agents pathogènes, et sont les suivantes :

1. Quels sont les agents fongiques pathogènes responsables du dépérissement du noyer en France et quels sont les facteurs influençant leur répartition ?

Afin de répondre à cette première question, quatre campagnes de prélèvements d'échantillons de noyers sur deux années ont été réalisées. Les échantillons collectés étaient des fruits (deux campagnes) et des rameaux (deux campagnes) à la fois d'apparence saine, afin d'étudier le caractère latent des infections, et présentant des symptômes de dépérissement du noyer. Un total de 12 parcelles a été échantillonné, six parcelles réparties dans le bassin du Sud-Ouest et six autres dans le bassin du Sud-Est. La sélection des parcelles a été réalisée sur la base de leur historique de symptômes de dépérissement réalisé par les stations expérimentales nucicoles.

La caractérisation des communautés fongiques associées à ces échantillons a été réalisée à l'aide de deux approches complémentaires : une approche culturale et une approche culture-indépendante par la réalisation de séquençage métabarcoding. Par la suite, le pouvoir pathogène des principales espèces fongiques suspectées d'être pathogènes et responsables des symptômes a été évalué à l'aide d'inoculations sur rameaux détachés. Dans un deuxième temps, les différents facteurs pouvant influencer la présence et le développement des agents pathogènes ont été évalués, tels que la zone géographique, les conditions météorologiques ou encore les pratiques agronomiques. Les résultats obtenus font l'objet du **chapitre I**, visant à valider une méthode d'analyse par métabarcoding du pathobiome et du **chapitre II**, portant sur sa caractérisation.

2. Quelles sont les interactions entre ces micro-organismes et le microbiome présent dans les noix et rameaux ?

La présence simultanée de différents agents pathogènes associés aux symptômes sur rameaux et sur noix, dans des proportions variables, suggère fortement la possibilité d'interactions entre les composants du pathobiome, pouvant conduire à un ralentissement ou à l'accélération du développement des symptômes. Une analyse des interactions entre les agents pathogènes, entre eux d'une part, mais aussi avec l'ensemble des genres fongiques composant le phytomicrobiome d'autre part a donc été réalisée afin d'approfondir la compréhension du développement des agents pathogènes et donc des symptômes. Des hypothèses ont été émises sur la base des résultats des analyses culture-dépendante et -indépendante présentées précédemment, via des analyses de corrélations et des réseaux de co-occurrence. Des tests d'inoculations simultanées ou différées ont ensuite été réalisés afin de valider certaines hypothèses d'interactions compétitives ou facilitatrices entre les agents pathogènes. Ces travaux sont inclus dans le **chapitre II**.

3. Quelle est la répartition des populations de Botryosphaeriaceae émergentes et leur degré de diversité génétique dans les noyeraies françaises ?

Les maladies de dépérissement des espèces ligneuses sont souvent associées à la présence de champignons de la famille des Botryosphaeriaceae. Aussi, cette partie du projet a été centrée sur les principales espèces de Botryosphaeriaceae collectées lors des campagnes d'isolement afin de comprendre les particularités de cette famille dans le cadre du dépérissement des noyers en France. Une analyse de la diversité génétique et de la structure des populations des deux espèces présentes, à savoir *N. parvum* et *B. dothidea*, a donc été réalisée à l'aide d'un séquençage de régions microsatellites. Cette étape a pour objectif de comprendre la répartition de ces populations dans les deux bassins de production échantillonnés ainsi que leur degré de diversité génétique dans le but d'émettre des premières hypothèses concernant leur origine, leur capacité à se reproduire de manière sexuée et les éventuelles voies de dispersion. Ont ainsi été ajoutés à cette analyse des isolats provenant de Californie (collectés à partir de noyers et d'amandiers) ainsi que d'Espagne (collectés à partir de noyers), mais aussi à partir de vignes en France, culture particulièrement impactée par des dépérissements associés à la présence des Botryosphaeriaceae. Cette analyse est présentée dans le **chapitre III**.

Ces recherches ont été possibles grâce au travail collaboratif mené avec les stations nucicoles françaises et le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL),



notamment dans le cadre du projet CARIBOU (Développement d'**Outils Innovants de Caractérisation** et de détection des **Botryosphaeriaceae** responsables du dépérissement du noyer, 2021-2022). Ce projet d'une durée de 18 mois est un projet CASDAR porté par le CTIFL par le biais du Centre opérationnel de Lanxade et réunit trois autres structures partenaires : la Station d'Expérimentation Nucicole Rhône-Alpes (SENuRA), la Station Expérimentale de Creysse, et le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne (LUBEM). Les stations expérimentales nucicoles de Creysse et de la SENuRA ont eu un rôle crucial dans la détection des symptômes aux vergers et l'échantillonnage des organes pour la réalisation des analyses culturales et culture-indépendantes et ont apporté leur expertise sur la conduite de la culture.

Ce manuscrit rend compte de l'ensemble des études menées sur les agents fongiques pathogènes associés aux symptômes de dépérissement du noyer en France et résultats obtenus via des articles publiés et en préparation.

# Contexte bibliographique

## 1. Le noyer commun (*Juglans regia* L.)

### 1.1. La nuciculture - une culture à l'échelle mondiale

#### 1.1.1. La noix à travers le monde

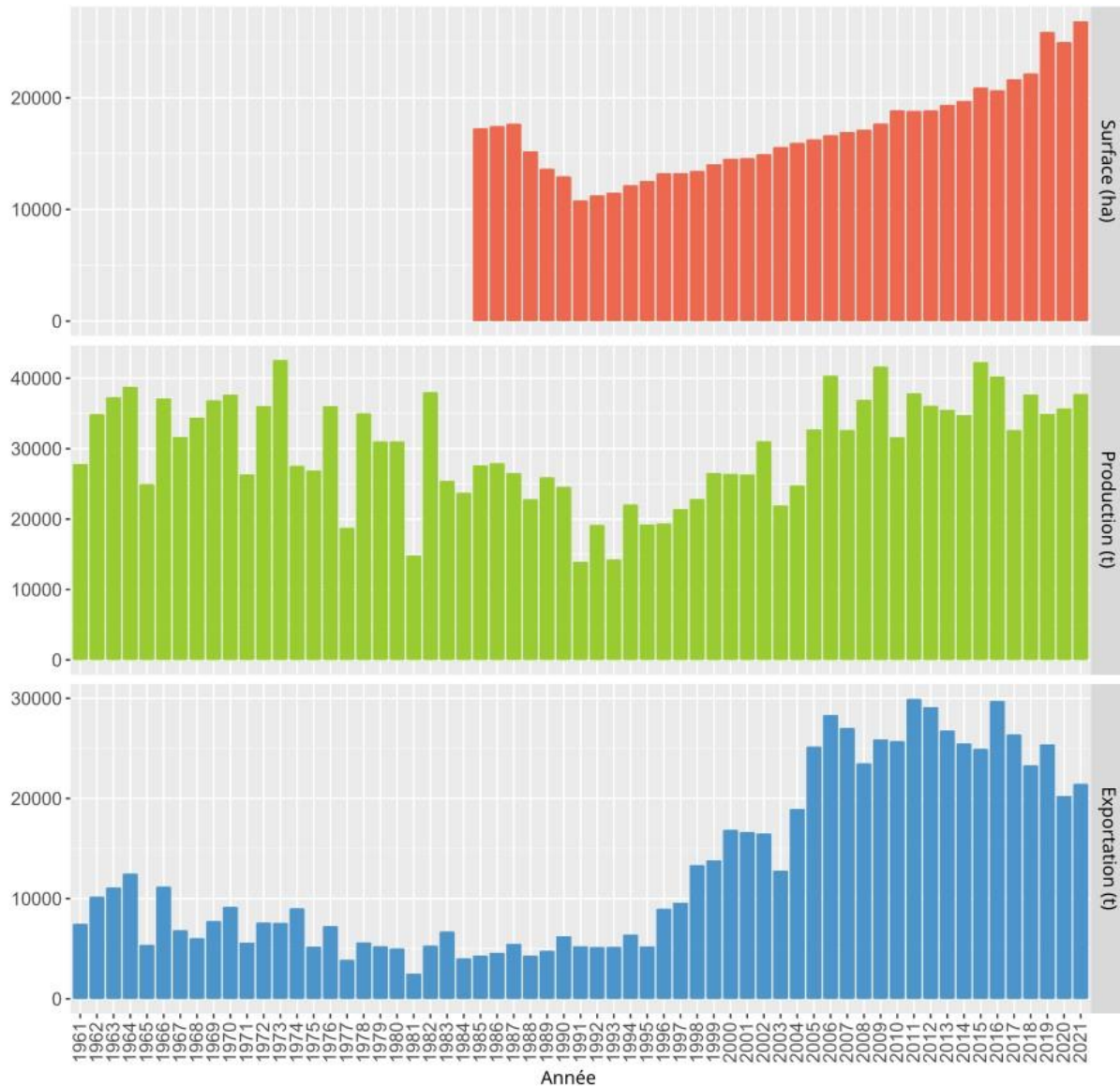
Le noyer commun, *Juglans regia* L., est l'espèce de noyer la plus cultivée à travers le monde pour la production commerciale (Martínez-García *et al.* 2016). Son origine n'est à ce jour pas encore totalement clarifiée, les études paléobotaniques suggérant actuellement de multiples origines possibles allant de l'Europe de l'Est à l'Asie centrale (Aradhya *et al.* 2017). Sa culture est aujourd'hui étendue à la majorité des continents, principalement en Europe et en Amérique, et dans une moindre mesure au continent africain ainsi qu'à l'Océanie (Luo *et al.* 2022; McGranahan & Leslie 2012).

La production mondiale de noix non décortiquées ne cesse de croître, de plus de 800 000 tonnes en 1986 à 1,6 millions de tonnes en 2007, elle atteint en 2021 plus de 3,5 millions de tonnes (FAOSTAT 2021; McGranahan & Leslie 1991, 2012). Le podium à l'échelle mondiale est largement dominé par la Chine, avec 1 100 000 tonnes en 2021, suivie par les Etats-Unis (657 710 tonnes) et l'Iran (386 976,5 tonnes). L'Union européenne se place quant à elle en cinquième position après la Turquie (325 000 tonnes) avec une récolte s'élevant à 217 350 tonnes en 2021 (FAOSTAT 2021).

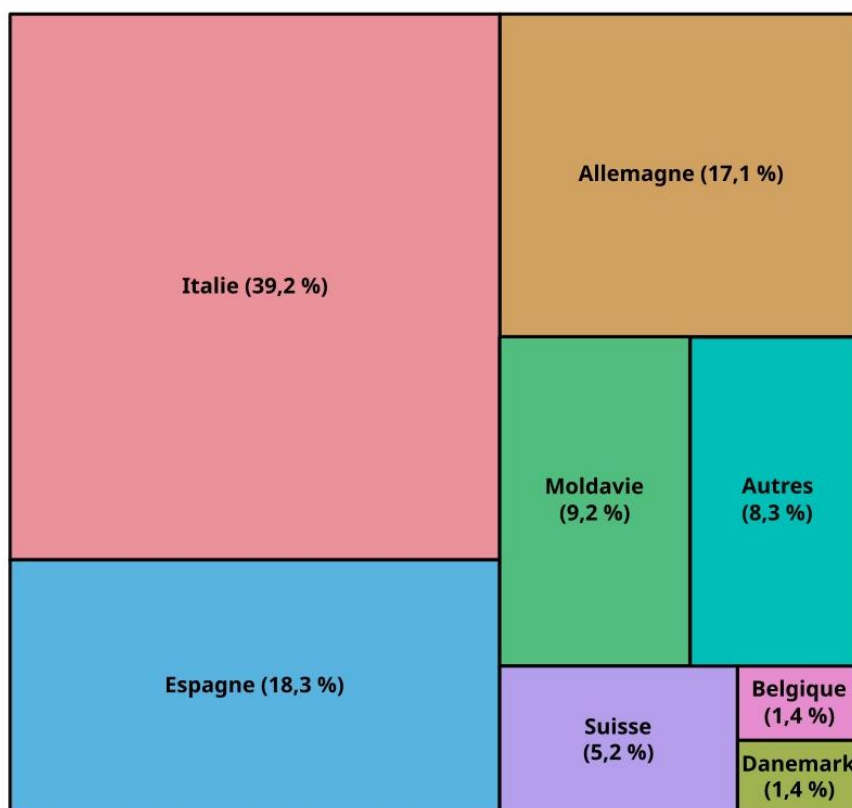
#### 1.1.2. La filière nucicole française

La filière nucicole française se positionne dans le top 15 mondial en termes de production récoltée (tonnes) et de surfaces dédiées (ha) en 2021. A l'échelle de l'Union européenne, la France est le troisième plus gros pays producteur de noix (37 740 tonnes en 2021) et se positionne en tête des pays européens possédant le plus de surfaces dédiées à la nuciculture avec un total de 26 850 ha en 2021 (Agreste 2022b; FAOSTAT 2021). Depuis 1991, après une légère baisse entre 1985 et le début des années 90, les surfaces dédiées aux noyers n'ont cessé d'augmenter, la valeur actuelle étant près de 2,5 fois supérieure à celle de 1991, tendance suivie par la production dont les quantités ont été multipliées par 2,7 entre 1991 et 2021 (**Figure 1**). La nuciculture en France fait partie aujourd'hui des cultures fruitières les plus importantes en termes de surfaces dédiées en se positionnant à la deuxième place derrière la

culture des pommiers (Agreste 2022b). Le commerce extérieur de noix est un important débouché pour la production française. La majorité des noix exportées le sont sous forme de noix sèches ou fraîches non décortiquées (21 579 tonnes contre 3 132 tonnes de noix exportées sous forme de cerneaux en 2021). En lien avec l'augmentation des surfaces dédiées et de la production, plus de la moitié de la production française est exportée depuis la fin des années 90, dont plus de 95 % vers le continent européen, notamment l'Italie, l'Espagne et l'Allemagne (DGDDI 2022; FAOSTAT 2021; **Figure 1** et **Figure 2**).



**Figure 1. Surfaces cultivées (ha) et production (t) de noix non décortiquées en France, et exportation (t) vers l'Europe entre 1961 et 2021 (d'après FAOSTAT 2021). Les données concernant les surfaces dédiées ne sont disponibles qu'à partir de 1985.**



**Figure 2. Répartition en pourcentage des pays de destination des noix non décortiquées exportées depuis la France en 2021 (d'après DGDDI 2022).**

La production française de noix est majoritairement concentrée dans deux bassins de production : le bassin du Sud-Est, représenté par la région Auvergne-Rhône-Alpes, et le bassin du Sud-Ouest, s'étendant de la région Nouvelle-Aquitaine à l'Occitanie. Les cinq départements les plus producteurs sont, dans l'ordre décroissant de production en tonnes, la Dordogne, l'Isère, la Drôme, le Lot et la Corrèze. A eux seuls, ces cinq départements représentent plus de 85 % de la production française de noix (FranceAgriMer 2022). Le territoire périgourdin (bassin du Sud-Ouest) et le territoire du Dauphiné (bassin du Sud-Est) sont tous deux concernés par une Appellation d'Origine Protégée (AOP) : la Noix du Périgord (Syndicat professionnel de la noix, du cerneau et de l'huile de Noix du Périgord n.d.) et la Noix de Grenoble (Comité Interprofessionnel de la Noix de Grenoble n.d.) respectivement. Chacune de ces AOP soutient la production des variétés typiques des deux territoires (les variétés Corne, Marbot et Grandjean pour la première, les variétés Mayette et Parisienne pour la seconde), mais aussi la variété Franquette, variété la plus répandue sur le territoire français et commune aux deux bassins bien qu'initialement cultivée en Auvergne-Rhône-Alpes (Bernard *et al.* 2018; Garcin *et al.* 1999; **Figure 3**).





**Figure 3. Verger de noyers commun (*Juglans regia* L.) de la variété Franquette en Isère échantillonné durant ce projet de thèse (photographie personnelle).**

## **1.2. Intérêts et utilisation du noyer**

Le noyer est particulièrement apprécié pour la qualité nutritionnelle de ses cerneaux du fait de leur forte concentration en acides gras insaturés, vitamines, stérols, polyphénols et fibres. En effet, des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires ainsi que protectrices du système cardiovasculaire sont communément associées à ces composés (Ni *et al.* 2022). De plus, il a été démontré que les noix présentent des effets positifs dans la régulation du diabète de type II et du microbiote intestinal ainsi que dans la prévention de certains types de cancers et maladies neurodégénératives (Jahanban-Esfahlan *et al.* 2019; Ni *et al.* 2022). Ces effets bénéfiques ont été constatés lors d'une consommation de noix constante et proche des recommandations, soit une poignée par jour (Jahanban-Esfahlan *et al.* 2019; Ni *et al.* 2022; Santé publique France 2019). La noix peut également être associée en co-formulation avec d'autres produits tels que la viande, afin de réduire les risques cardiovasculaires associés à la consommation de ce type d'aliment (Jiménez-Colmenero *et al.* 2010).

Outre ses cerneaux destinés à l'alimentation, le noyer présente nombreux autres intérêts notamment industriels et technologiques. Tout d'abord dans l'industrie du bois, second domaine d'utilisation le plus important après l'alimentation, le noyer fait partie des essences les plus précieuses pour l'ameublement et la menuiserie, du fait notamment de ses propriétés physiques et mécaniques ainsi que la diversité de ses couleurs qui en font un bois particulièrement esthétique (Voulgaridis & Vassiliou 2005). D'autres utilisations mineures concernent notamment la coque et le brou de noix dans le domaine des matériaux (Prabhakaran *et al.* 2021; Shejkar *et al.* 2020), de la cosmétique (Beiki *et al.* 2018), pour l'absorption de colorant ou pour la décontamination des eaux (Li *et al.* 2020) ou encore dans le domaine des biotechnologies comme la bioraffinerie et la chimie verte (Morales *et al.* 2021, 2022; Tan *et al.* 2019).

### 1.3. Les bio-agresseurs du noyer commun

Les noyers sont la cible de nombreux ravageurs mais aussi de maladies, aussi bien bactériennes, virales que fongiques, toutes responsables de dégâts potentiellement importants (Tableau 1).

**Tableau 1. Liste des maladies et ravageurs majeurs du noyer commun (*Juglans regia* L.) en France et des principales espèces associées.**

Type d'agression	Agresseur (Espèce)	Première référence associée
Ravageur	Acarien rouge ( <i>Panonychus ulmi</i> )	Koch, 1836
	Carpocapse ( <i>Cydia pomonella</i> )	Linnaeus, 1758
	Cochenille du noyer ( <i>Quadraspidiotus juglansregiae</i> )	Comstock, 1881
	Gros puceron du noyer ( <i>Panaphis juglandis</i> )	Goeze, 1778
	Lécanium du cornouiller ( <i>Parthenolecanium corni</i> )	Bouché, 1844
	Mouche du brou ( <i>Rhagoletis completa</i> )	Cresson, 1929
	Petit puceron du noyer ( <i>Chromaphis juglandicola</i> )	Kaltenbach, 1843
	Phytopte du noyer ( <i>Aceria erinea</i> )	Nalepa, 1891
Maladie bactérienne	Bactériose ou Brûlure du noyer ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i> )	Pierce, 1901
	Chancre vertical suintant ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i> )	Pierce, 1901
	Galle du collet ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	Conn, 1942
	Nécrose de l'écorce ( <i>Brenneria nigrifluens</i> )	Hauben, 1999

**Table 1. Suite.**

Type d'agression	Agresseur (Espèce)	Première référence associée
Maladie fongique	Anthracnose ( <i>Ophiognomonia leptostyla</i> )	Cesati & de Notaris, 1863
	Anthracnose ( <i>Colletotrichum godetiae</i> , <i>C. fiorinae</i> )	Neergaard, 1950 Marcelino & Gouli, 2008
	Chancre ( <i>Cytospora</i> sp.)	Ehrenb, 1818
	Chancre des tiges ( <i>Fusarium solani</i> )	Saccardo, 1881
	Chancre ( <i>Phaeoacremonium</i> spp.)	Gams, Crous and Wingfield, 1996
	Dépérissement du noyer (Botryosphaeriaceae spp., <i>Diaporthe</i> spp.)	Theissen & Sydow, 1918 Nitschke, 1870
	Encre du noyer ( <i>Phytophthora</i> sp.)	de Bary, 1876
	Nécrose apicale du fruit ( <i>Alternaria</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.)	Nees, 1817 Link, 1809
	Pourridié ( <i>Armillaria mellea</i> )	Kumm, 1871
Maladie virale	Maladie de la ligne noire ( <i>Cherry Leaf Roll virus</i> )	-

Parmi ces ravageurs et maladies, cinq sont particulièrement répandus depuis plusieurs années dans les vergers de noix français : la mouche du brou, la bactériose à *Xanthomonas*, la nécrose apicale du fruit, et enfin, l'anthracnose causée par *Gnomonia* ou par *Colletotrichum*. Ces ravageurs et maladies ont la particularité de provoquer des symptômes similaires au cours de leur développement et peuvent alors être confondus :

- La mouche du brou (*Rhagoletis completa*) est l'un des principaux ravageurs des noyers français. Originnaire du continent américain, elle est présente en Europe depuis la fin des années 80, et sa présence en France a été rapportée en 2007 (Verheggen *et al.* 2017). Les dégâts causés par la mouche du brou sont dus à ses larves, que la femelle pond dans le brou des fruits, et qui s'en nourrissent après éclosion jusqu'à la fin de leur cycle larvaire. Leur développement entraîne alors un pourrissement important du brou et du fruit (**Figure 4A**). Les pertes de rendement provoquées par sa présence peuvent aller de moins de 10 % à 100 % en cas d'absence de traitement (ANSES 2014).
- La bactériose du noyer, aussi appelée brûlure du noyer, est une maladie bactérienne causée par l'espèce *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (syn. *X. arboricola* pv. *juglandis*; Radix *et al.* 1994). Cette bactérie phytopathogène est capable de provoquer des symptômes sur les fruits, mais aussi sur les bourgeons, les feuilles, les rameaux ainsi

que sur les fleurs femelles et les chatons (Giraud *et al.* 2011; Radix *et al.* 1994). Sur fruits, la bactériose se caractérise par l'apparition de petites taches noires huileuses qui évoluent vers d'importantes nécroses au cours de l'avancement de la maladie (**Figure 4D**). L'infection précoce des fruits entraîne de façon importante leur chute avant maturité (Giraud *et al.* 2011). Sur rameaux, elle est responsable de dessèchement du bois pouvant entraîner un enroulement caractéristique en crosse (**Figure 4E**).

- La nécrose apicale du fruit, autrement appelée BAN (pour Brown Apical Necrosis), est une maladie fongique principalement causée par des espèces des genres *Alternaria* (dont *A. alternata*) et *Fusarium*. La bactérie *X. campestris* pv. *juglandis*, régulièrement collectée de fruits présentant des symptômes de BAN, semble aussi avoir un rôle dans le développement de cette maladie (Belisario *et al.* 2002, 2010; Moragrega *et al.* 2011). Observée et étudiée en France à la fin des années 1990, elle est caractérisée par le noircissement et un décollement de l'extrémité stigmatique ainsi que le pourrissement des tissus internes (**Figure 4B**; Belisario *et al.* 2002; Moragrega & Özaktan 2010). A un stade avancé, les nécroses peuvent s'étendre sur plus de la moitié des fruits (Belisario *et al.* 2010).
- L'antracnose associée à *Gnomonia*, aussi appelée maladie des tâches foliaires, est une maladie fongique causée par *Ophiognomonia leptostyla* (auparavant *Gnomonia leptostyla*), espèce phytopathogène appartenant au phylum des Ascomycota, qui touche les deux espèces cultivées *Juglans regia* (noyer commun) et *J. nigra* (noyer noir d'Amérique; Belisario *et al.* 2008; Sogonov *et al.* 2008). Cette maladie, fortement répandue sur la totalité des continents cultivateurs de noix, cible essentiellement les feuilles et les fruits et son développement se traduit principalement par l'apparition de tâches nécrotiques irrégulières, entourées de halos chlorotiques et dont le centre présente une coloration typique vert clair à blanchâtre lors de stades avancés (**Figure 4F**; Verhaeghe 2014). Des infections précoces peuvent entraîner la malformation des fruits ainsi que leur chute. Enfin, lors d'infections sévères, les arbres peuvent souffrir d'une sévère défoliation, impactant la santé des branches et des fruits (Verhaeghe 2014; Woeste & Beineke 2001).
- L'antracnose associée à *Colletotrichum* est une maladie apparue plus récemment sur noyers. En France, elle a été rapportée pour la première fois en 2007 (Da Lio *et al.* 2018; Giraud & Verhaeghe 2015; Verhaeghe *et al.* 2021). De nombreuses espèces du genre



*Colletotrichum* sont associées à cette maladie, appartenant principalement aux complexes d'espèces *C. acutatum* et *C. gloeosporioides*. Parmi celles-ci, les espèces majoritairement identifiées en France sont *C. fioriniae* et *C. godetiae*, toutes deux appartenant au complexe *C. acutatum* (Da Lio *et al.* 2018). Cette maladie provoque principalement des symptômes sur fruits (Da Lio *et al.* 2018; Giraud & Verhaeghe 2015). Elle se caractérise par l'apparition de petites taches nécrotiques qui évoluent jusqu'à recouvrir l'entièreté du brou, causant des nécroses importantes. Lors d'un stade avancé au cours duquel le cerneau est souvent atteint, le développement d'acervules oranges caractéristiques peut être visualisé (**Figure 4C**; Giraud & Verhaeghe 2015). Des symptômes sont aussi observables sur les feuilles, sous la forme de taches nécrotiques à centre clair. Les pertes de rendement provoquées par la maladie sont conséquentes et peuvent aller jusqu'à 70 % certaines années en France (Da Lio *et al.* 2018; Giraud & Verhaeghe 2015; Verhaeghe *et al.* 2021).

Les symptômes provoqués par ces cinq maladies et ravageurs peuvent facilement être confondus, aussi bien au début du développement des symptômes que plus tard dans l'avancée de la maladie. Sur fruits, les nécroses provoquées par ces cinq maladies sont semblables lors des premiers stades de développement, jusqu'à l'apparition de centres blancs caractéristiques des taches nécrotiques causées par *O. leptostyla*. L'observation de nécroses causées par les espèces du genre *Colletotrichum* à un stade avancé est commune aux nécroses provoquées par la bactériose, la nécrose apicale de fruit et par la mouche du brou sur fruits. Ces maladies pouvant être présentes conjointement sur un même fruit, leur distinction devient alors particulièrement difficile voire impossible.

De plus, les cinq maladies et ravageurs présentés ci-dessus provoquent sur fruits des symptômes similaires à ceux causés par le dépérissement du noyer, maladie qui fait l'objet de ce manuscrit et dont la description se trouve dans la partie suivante.



**Figure 4. Planche photographique de symptômes de ravageurs et maladies sur le noyer commun.**  
**A :** Nécroses sur fruits provoquées par les larves de la mouche du brou (d'après SENURA 2019) ;  
**B :** Symptômes de la nécrose apicale du fruit (d'après Moya-Elizondo *et al.* 2021) ; **C :** Symptômes sur fruit de l'antracnose causée par la présence de *Colletotrichum* (d'après SENURA 2019) ;  
**D :** Symptômes sur fruits de la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (d'après SENURA 2019) ; **E :** Symptômes sur rameau de la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (d'après SENURA 2019) ; **F :** Symptômes sur fruits de l'antracnose à *Gnomonia* (d'après SENURA 2019) ; **G et H :** Symptômes sur fruits du dépérissement du noyer (Flora Pensec, Adeline Picot) ; **I et J :** Symptômes sur rameaux du dépérissement du noyer (Flora Pensec, Adeline Picot).

## 2. Les maladies de dépérissement

### 2.1. Le dépérissement des ligneux

Les maladies dites de dépérissement sont des pathologies atteignant les branches et les racines, et provoquant un déclin progressif de l'hôte atteint pouvant aller jusqu'à sa mort (Shurtleff & Averre 1997). Elles sont répandues partout à travers le monde, sur de très nombreux hôtes, et sont provoquées par une très grande diversité d'agents pathogènes.

Les maladies du dépérissement provoquées par des pourritures racinaires sont causées par un agent pathogène commun à la majorité des arbres présentant cette maladie : les espèces du genre *Phytophthora*. Sur noyer, ce genre est responsable de la maladie de l'encre du noyer, détruisant les racines du porte-greffe et entraînant la mort de l'hôte (Belisario *et al.* 2005; Mircetich & Matheron 1983). Plus de 10 espèces différentes de *Phytophthora* sont associées aux symptômes de la maladie de l'encre, dont plusieurs ont été retrouvées conjointement. Certaines espèces semblent être associées à des symptômes différents (Belisario *et al.* 2005; Vettraiño *et al.* 2003).

Les maladies de dépérissement de la partie aérienne des arbres ligneux peuvent, quant à elles, se manifester sous la forme de divers symptômes sur les feuilles (de type chloroses), les jeunes rameaux, les branches voire les troncs (de type assèchement, brûlures, nécroses et chancres), les bourgeons, ainsi que sur fruits dans le cas de quelques arbres fruitiers et arbres à fruits à coques et à noyaux (de type flétrissement, nécroses, brûlures et momification, qui se caractérise par un assèchement complet des fruits). Ces divers dépérissements sont regroupés sous le terme plus large de "maladies du tronc", ou "trunk diseases", du fait de leur important impact sur les organes lignifiés des hôtes cibles. Ces maladies de dépérissement peuvent toucher une large gamme d'hôtes ligneux, des arbres fruitiers aux plantes ornementales en passant par les cultures et les arbres forestiers (voir paragraphe ci-dessous).

Parmi celles-ci, il est possible de citer le mondialement répandu et étudié dépérissement de la vigne, regroupant entre autres, le dépérissement à *Botryosphaeria* ou Botryosphaeriose (aussi nommé Black Dead Arm - BDA ou *Botryosphaeria* canker) ainsi que les dépérissements causés par *Diaporthe*. Les maladies responsables de ces dépérissements ont une aire de répartition à l'échelle mondiale et ont été rapportés dans de nombreux pays viticoles sur tous les continents (en Afrique (Guerin-Dubrana *et al.* 2019; Lesuthu *et al.* 2019; van Niekerk *et al.* 2006), Amérique (Larach *et al.* 2022; Travadon *et al.* 2022; Úrbez-Torres *et al.* 2013a; Úrbez-Torres & Gubler 2009), Asie (Guerin-Dubrana *et al.* 2019; Manawasinghe *et al.* 2019;

Yan *et al.* 2013), Europe (Guarnaccia *et al.* 2018; Guerin-Dubrana *et al.* 2019) et en Océanie (Billones-Baaijens & Savocchia 2019)). Leurs symptômes sont similaires, représentés principalement par des chancres pérennes, la mortalité des jeunes pousses et des bourgeons, le flétrissement des fruits et le développement de chloroses foliaires. Les agents pathogènes associés à ces deux maladies sont parfois retrouvés en co-occurrence dans les organes symptomatiques (Guerin-Dubrana *et al.* 2019; Hrycan *et al.* 2020; Travadon *et al.* 2022; Úrbez-Torres *et al.* 2013a), soit des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*, principalement associées au dépérissement à *Botryosphaeria*, et des espèces du genre *Diaporthe* (forme téléomorphe de *Phomopsis* spp.), principalement associées avec les dépérissements causés par *Diaporthe*. A présent, plus de 25 espèces de *Botryosphaeriaceae* ont été reconnues comme associées aux symptômes de dépérissement de la vigne, dont principalement *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* et *Neofusicoccum parvum* (Billones-Baaijens & Savocchia 2019; Gramaje *et al.* 2018; Larignon 2016; Úrbez-Torres 2011; Úrbez-Torres & Gubler 2009), ainsi qu'au moins 20 espèces de *Diaporthe*, dont principalement *Diaporthe ampelina* (*Phomopsis viticola*), *Dia. eres* et *Dia. foeniculina* (Larignon 2016; Lawrence *et al.* 2015; Makris *et al.* 2022; Manawasinghe *et al.* 2019; Úrbez-Torres *et al.* 2013a).

De nombreuses espèces de *Botryosphaeriaceae* et de *Diaporthe* ont aussi été reconnues comme faisant partie du complexe d'espèces responsable du dépérissement sur d'autres hôtes ligneux, comme par exemple le pommier, le pistachier, l'olivier ou encore le chêne (**Tableau 2**). Plus de 35 espèces de *Botryosphaeriaceae*, dont principalement les genres *Botryosphaeria* (1 espèce), *Diplodia* (16 espèces), *Dothiorella* (6 espèces), *Lasiodiplodia* (5 espèces) et *Neofusicoccum* (8 espèces), et plus de 5 espèces de *Diaporthe* ont été isolées à partir de symptômes de dépérissement sur ces différents hôtes, mais seules les espèces les plus fréquemment retrouvées sont considérées comme majoritairement associées aux symptômes, ces espèces étant souvent les seules dont la pathogénicité a été vérifiée, souvent par simple inoculation. Les espèces des différents taxons, comme pour la vigne, sont fréquemment retrouvées en co-occurrence (**Tableau 2**).

**Tableau 2. Exemples d'hôtes ligneux et principales espèces de Botryosphaeriaceae et de Diaporthe reconnues comme étant associées aux symptômes de dépérissement à travers le monde.**

Hôte ( <i>Espèce</i> )	Espèce	Référence
Chêne ( <i>Quercus</i> spp.)	<i>D. agrigolia</i> <i>D. corticola</i> <i>D. quercivora</i> <i>Dot. iberica</i> <i>Phomopsis quercina</i>	Batista <i>et al.</i> 2020; Linaldeddu <i>et al.</i> 2013; Lynch <i>et al.</i> 2013; Moricca <i>et al.</i> 2018
Olivier ( <i>Olea europaea</i> )	<i>B. dothidea</i> <i>D. mutila</i> <i>D. seriata</i> <i>Dot. iberica</i> <i>L. theobromae</i> <i>N. australe</i> <i>N. luteum</i> <i>N. mediterraneum</i> <i>N. stellenboschiana</i> <i>N. vitifusiforme</i> <i>Dia. foeniculina</i> <i>Dia. viticola</i>	Linaldeddu <i>et al.</i> 2023; Moral <i>et al.</i> 2010; Úrbez-Torres <i>et al.</i> 2013b; van Dyk <i>et al.</i> 2021
Pistachier ( <i>Pistacia vera</i> )	<i>B. dothidea</i> <i>D. seriata</i> <i>Dot. iberica</i> <i>Dot. sarmentorum</i> <i>L. americana</i> <i>L. citricola</i> <i>L. gilanensis</i> <i>L. pseudotheobromae</i> <i>N. hellenicum</i> <i>N. mediterraneum</i> <i>N. parvum</i> <i>N. vitifusiforme</i> <i>Dia. ambigua</i> <i>Dia. chamaeropsis</i> <i>Dia. foeniculina</i>	Chen <i>et al.</i> 2014b, 2015; Gusella <i>et al.</i> 2022; López-Moral <i>et al.</i> 2020a; Nouri <i>et al.</i> 2019
Pommier ( <i>Malus domestica</i> )	<i>B. dothidea</i> <i>D. intermedia</i> <i>D. mutila</i> <i>D. pseudoseriata</i> <i>D. seriata</i> <i>L. theobromae</i> <i>N. arbuti</i> <i>N. australe</i> <i>N. luteum</i> <i>N. parvum</i> <i>Dia. eres</i> <i>Dia. foeniculina</i>	Delgado-Cerrone <i>et al.</i> 2016; Díaz <i>et al.</i> 2022; Havenga <i>et al.</i> 2019; Mang <i>et al.</i> 2022; Sessa <i>et al.</i> 2016

Outre ces agents pathogènes majeurs, d'autres espèces fongiques saprophytes et/ou pathogènes sont aussi parfois isolées dans les organes infectés, telles que des espèces des genres cités précédemment (**Tableau 1**) : *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Cytospora*, *Fusarium* et

*Phaeoacremonium* (Díaz *et al.* 2022; Gao *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2020a; Michailides *et al.* 2013; Nouri *et al.* 2019; Spies *et al.* 2020; Úrbez-Torres *et al.* 2013b).

## 2.2. Cas du dépérissement du noyer

### 2.2.1. Historique du dépérissement

C'est en Californie, en 1915, que Fawcett décrit pour la première fois des symptômes se rapprochant de ceux du dépérissement du noyer et rapporte l'implication d'espèces de la famille des Botryosphaeriaceae, notamment l'espèce *Dothiorella gregaria* (Fawcett 1915). Le dépérissement des noyers, qualifié de nouvelle maladie ciblant le noyer commun *J. regia*, est alors décrit sous le nom de "Melaxuma" et sévit dans les vergers californiens depuis les années 1910. Il y est rapporté d'importants chancres et zones de nécroses sur les troncs et aux embranchements ainsi que sur les jeunes branches, symptômes se rapprochant de la maladie du flétrissement des branches causées par *Neo. dimidiatum* (**Tableau 1**; Fawcett 1915). La présence d'espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe* associée à des nécroses et des brûlures de rameaux a ensuite été rapportée sur le continent asiatique, au Japon en 1954 (Matuo & Sakurai 1954) puis dans l'ouest de l'Asie en 1960 (Ibragimov 1960). Le premier rapport de la présence de dépérissement de noyer sous ce terme en Europe date du début des années 1980, mettant en avant cette fois-ci l'implication d'espèces du genre *Diaporthe* dans des noyeraies italiennes (Sisto & Luisi 1983; Vercesi 1982) ainsi qu'en Europe de l'Est (Voronin *et al.* 1986). Par la suite, l'espèce *B. ribis* est rapportée comme étant associée au flétrissement et dépérissement de branche de noyers en Grèce en 1987 (Rumbos 1987). Des chancres et des dépérissements de branches et de rameaux ont ensuite de nouveau été rapportés en Italie en lien avec l'espèce *B. ribis* (Frisullo *et al.* 1994). Toutes ces études rapportent essentiellement la présence d'un seul acteur fongique phytopathogène principal, les différentes espèces étaient alors rarement signalées en association, et étaient souvent associées à des maladies distinctes. En effet, le paradigme "un agent pathogène - une maladie" était, à cette époque, la clé de voûte de la phytopathologie, créant ainsi d'éventuels biais dans la description de ces maladies.

La maladie du dépérissement du noyer telle qu'elle est connue et décrite aujourd'hui a fait l'objet de nombreuses et récentes études du fait d'une ré-émergence des symptômes dans les pays cités ci-dessus ainsi qu'une émergence dans de nouveaux pays, actuellement étendue à la totalité des pays producteurs de noix. Ces symptômes regroupent à la fois ceux décrits précédemment ainsi que des symptômes nouvellement constatés sur fruits et sur feuilles, en

association avec une plus grande diversité d'espèces. L'émergence nouvelle de la maladie a été constatée depuis le début des années 2000. Tout d'abord aux Etats-Unis (Californie), où elle est décrite sous le nom de “*Botryosphaeria* and *Diaporthe* canker and blight”, témoignant de la potentielle implication conjointe d'espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe* (Chen *et al.* 2014a; Michailides *et al.* 2012; Michailides & Hasey 2010), puis plus récemment au Chili (Díaz *et al.* 2018; Jiménez Luna *et al.* 2020). C'est aussi le cas sur le continent Eurasiatique, particulièrement en Corée (Cheon *et al.* 2013), Chine (Fan *et al.* 2018; Li *et al.* 2016; Yu *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017), Croatie (Novak *et al.* 2018), Espagne (López-Moral *et al.* 2020b; Moral *et al.* 2010), Iran (Sohrabi *et al.* 2020), Italie (Gusella *et al.* 2021), Hongrie (Zabiák *et al.* 2023), République tchèque (Eichmeier *et al.* 2020), Roumanie (Mihaescu *et al.* 2021), Slovaquie (Juhásová *et al.* 2005) et Turquie (Yildiz *et al.* 2022). Enfin, l'Égypte (Haggag *et al.* 2007) et l'Australie (Antony *et al.* 2023) font eux aussi des pays dans lesquels se répand la maladie.

### 2.2.2. Les agents responsables et leur distribution

Comme présenté précédemment, les principaux agents pathogènes responsables du dépérissement du noyer appartiennent à la famille des Botryosphaeriaceae et au genre *Diaporthe*. A ce jour, de nombreuses études ont permis de recenser 21 espèces de Botryosphaeriaceae isolées à partir de symptômes de dépérissement sur le noyer commun, ainsi que 7 espèces du genre *Diaporthe* à l'échelle mondiale (**Figure 5**). Certaines espèces sont majoritairement isolées et communes à de nombreuses zones géographiques, telles que *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. mediterraneum*, *N. parvum* et *Dia. eres* (rapportées dans 3 à 10 pays), tandis que d'autres espèces semblent associées à certaines zones géographiques (comme par exemple *D. gallae*, *Dot. plurivora* et *L. mahajangana*, à ce jour associées au dépérissement du noyer en Iran, ainsi que *Dia. nobilis* à ce jour uniquement associées au dépérissement du noyer commun en Chine; **Figure 5**).

Sur le continent américain, et plus particulièrement en Californie, probablement en partie du fait de la concentration des cultures de noyers, une large diversité d'espèces associées au dépérissement de cette culture est présente. Actuellement, 10 espèces de Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *D. mutila*, *D. seriata*, *Dot. iberica*, *L. citricola*, *N. mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme* et *Neo. dimidiatum*) et une espèce de *Diaporthe* (*Dia. foeniculina* (syn. *Dia. neotheicola*/*Dia. rhusicola* selon Udayanga *et al.* 2014b) ont été rapportées dans les noyeraies californiennes (Chen *et al.* 2014a; Michailides *et al.* 2012). De



même, au Chili, second pays du continent américain ayant rapporté la présence de dépérissement du noyer sur son territoire, quatre espèces de Botryosphaeriaceae (*D. mutila*, *D. seriata*, *Dot. sarmentorum* et *N. parvum*) et deux espèces de *Diaporthe* (*Dia. australafricana* et *Dia. cynaroidis*) ont été isolées de symptômes de dépérissement sur noyer jusqu'à présent (Díaz *et al.* 2018; Iqbal *et al.* 2023; Jiménez Luna *et al.* 2020, 2022a). Il est intéressant de noter ici que ces deux espèces de *Diaporthe* ont exclusivement été retrouvées au Chili comme associées au dépérissement du noyer commun.

En Europe, le dépérissement du noyer commun a été détecté et rapporté dans 7 pays à ce jour. C'est en Espagne que la plus grande diversité d'espèces a été décrite, soit 6 espèces de Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *D. seriata*, *Dot. sarmentorum*, *Dot. sp.*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*) et 2 espèces de *Diaporthe* (*Dia. amygdali* et *Dia. foeniculina*), (López-Moral *et al.* 2020b)). Ces espèces ont été retrouvées dans 7 des 10 vergers échantillonnés présentant des symptômes de dépérissement, et en co-occurrence dans 5 d'entre eux, soulignant leur potentielle forte implication dans le dépérissement des noyers (López-Moral *et al.* 2020b). L'association d'espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe* a aussi été rapportée en Hongrie (*D. seriata* et *Dia. eres*; Zabiák *et al.* 2023), et en République tchèque (*D. seriata*, *Dot. omnivora* et *Dia. eres*; Eichmeier *et al.* 2020). Enfin, seules des espèces de Botryosphaeriaceae ont été décrites en Grèce (Chen *et al.* 2014a), Italie (Gusella *et al.* 2021) et en Slovaquie (Juhásová *et al.* 2005), et de *Diaporthe* en Roumanie (Mihaescu *et al.* 2021).

De la Turquie à la Corée, la présence de *B. dothidea*, *D. gallae*, *D. seriata*, *Dot. omnivora*, *Dot. plurivora*, *Dot. sarmentorum*, *Dot. viticola*, *L. mahajangana*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Neo. dimidiatum*, ainsi que de *Dia. amygdali*, *Dia. eres* et *Dia. nobilis* a été rapportée dans les noyeraies, dont la majorité en Iran (Cheon *et al.* 2013; Derviş *et al.* 2019; Li *et al.* 2016; Liu *et al.* 2020; Meng *et al.* 2018; Sohrabi *et al.* 2020; Yang *et al.* 2018a; Yildiz *et al.* 2022; Yu *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017).

Les noyeraies australiennes sont, quant à elles, plutôt associées au développement de *D. seriata*, *Dot. omnivora*, *Dot. viticola*, *N. macroclavatum* et *N. parvum* (Antony *et al.* 2023).

Enfin, sur le continent africain, seule l'Égypte a rapporté la présence de dépérissement de noyers, associé *L. theobromae*, la seule espèce y ayant été rapportée à ce jour (Haggag *et al.* 2007).



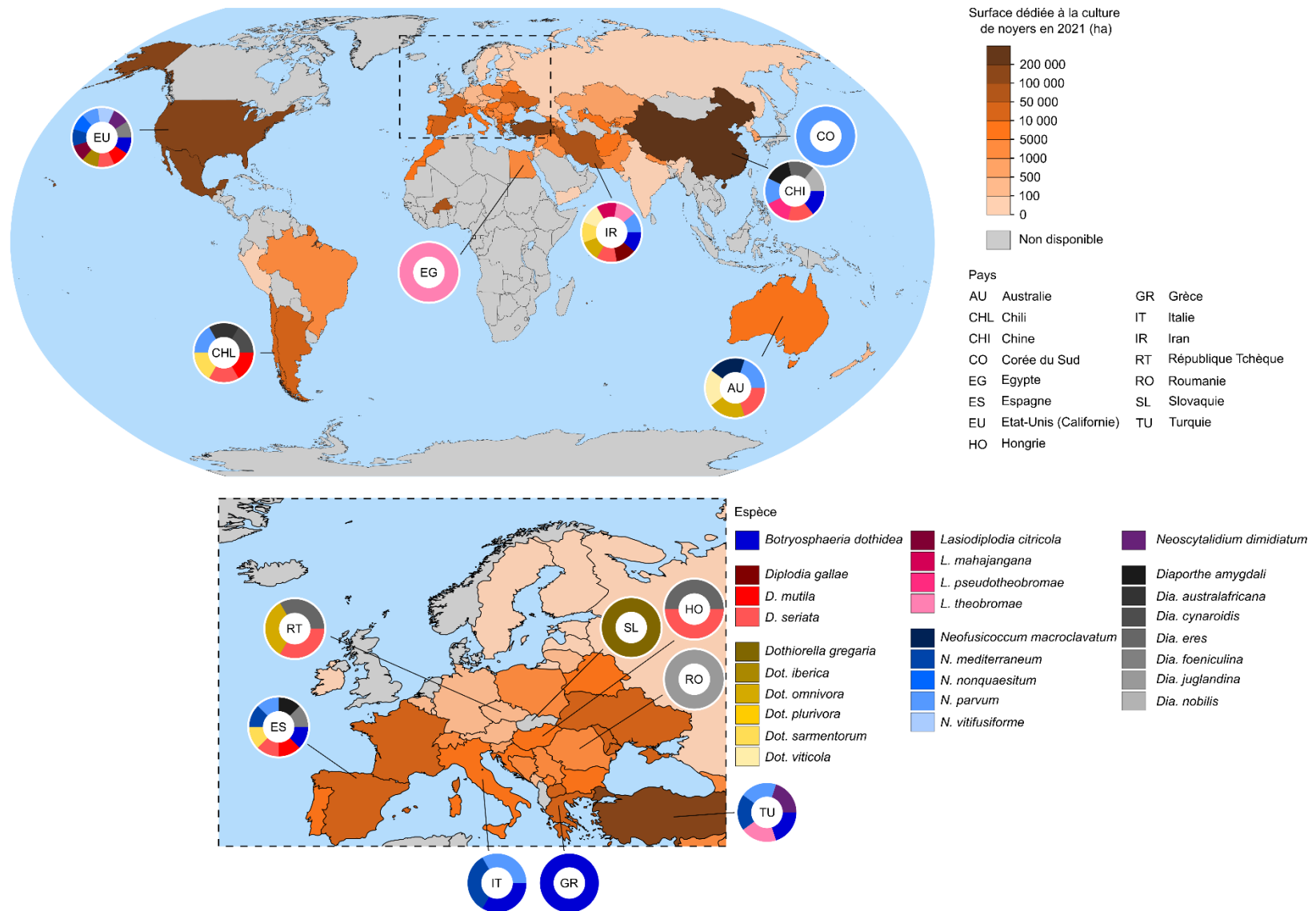


Figure 5. Carte de la surface (ha) dédiée à la nuciculture et recensement des espèces majeures de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* isolées à partir d'échantillons de *J. regia* présentant des symptômes de dépérissement (Figure réalisée sur la base des données FAOSTAT 2021 et de la littérature citée précédemment).

### 2.2.3. Cycle infectieux et symptômes observés sur noyer commun

#### 2.2.3.1. Nature de l'inoculum

Bien que les espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe* soient capables de se reproduire de manière sexuée et asexuée, cette dernière a été rapportée comme la plus répandue dans les noyeraies, comme en témoignent les travaux de Michailides *et al.* (2017) dans les noyeraies californiennes et de López-Moral *et al.* (2020b) dans les noyeraies espagnoles. Grâce à ces études, le cycle d'infection de ces espèces sur noyer a commencé à être élucidé, comme détaillé dans les paragraphes ci-dessous. Bien que *B. dothidea* et *Dia. foeniculina* aient déjà présenté la capacité à produire des ascospores dans les noyeraies, très peu d'informations sont à ce jour disponibles concernant les autres espèces de Botryosphaeriaceae et les espèces de *Diaporthe* qui y sont aussi présentes (López-Moral *et al.* 2020b; Michailides *et al.* 2013, 2017). Ainsi, certaines questions en lien avec leur épidémiologie, telles que l'identification de la nature de l'inoculum (spores sexuées : ascospores, asexuées : conidies, mycélium) et leurs voies de dispersion, restent encore à préciser. De plus, aucune étude n'a été menée à ce jour en France concernant la recherche et l'identification de structures de reproduction (pycnides et ascocarpes) à la surface de branches de noyers présentant des symptômes de dépérissement.

#### 2.2.3.2. Sources d'inoculum

En outre, les sources d'inoculum dans les noyeraies ne sont encore que partiellement identifiées. Les principales sources actuellement définies sont les organes présentant des symptômes du dépérissement (branches, jeunes pousses, fruits), ainsi que les résidus de taille et de la récolte (López-Moral *et al.* 2020b; Michailides *et al.* 2017; Michailides & Hasey 2010; Moral *et al.* 2019b). De plus, du fait du mode de vie endophyte des Botryosphaeriaceae et des *Diaporthe* au cours de leur cycle, les organes sains dans lesquels se développent ces espèces (il est alors possible de parler d'infection latente) peuvent aussi servir de réservoir d'inoculum. En effet, l'affaiblissement de l'hôte sain du fait de stress biotiques (tels que les blessures causées par la mouche du brou et les cochenilles) comme abiotiques (tels que les plaies de taille et de la récolte, et les effets des conditions climatiques comme les brûlures ou le gel) peut conduire à un comportement pathogène de ces espèces et causer par la suite l'apparition des symptômes (Michailides *et al.* 2012, 2013, 2017; Michailides & Hasey 2010; Moral *et al.* 2019b; **Figure 6**). De plus, les jeunes plants cultivés en pépinière peuvent aussi servir de source d'inoculum, des

infections latentes de *L. citricola* et *Neo. dimidiatum* ayant déjà été constatées (Chen *et al.* 2013). Ce phénomène d'infections latentes est largement reconnu par la communauté scientifique sans que l'on sache toutefois déterminer leur degré de contribution par rapport aux infections exogènes dans l'apparition des symptômes.

#### 2.2.3.3. Voies de dispersion

Les spores présentent un type de dispersion préférentiel en fonction de leur nature (ascospores ou conidies). Les ascospores sont principalement dispersées à l'aide du vent, tandis que l'eau est le vecteur principal de la dispersion des conidies (Michailides *et al.* 2017; Moral *et al.* 2019b). Ainsi, le cycle biologique des agents pathogènes associés au dépérissement du noyer est météo-dépendant. Dans les pays à climat dit méditerranéen ou tempéré, tels que l'Espagne, l'Etat de Californie, l'Italie, mais aussi la France, les débuts du printemps souvent pluvieux et humides pourraient favoriser la formation de spores et leur dispersion par splashing, puis les longs mois d'été secs et chauds, faciliteraient le développement de l'infection et des symptômes (López-Moral *et al.* 2020b; Moral *et al.* 2019b; **Figure 6**). Divers facteurs seraient impliqués dans ce processus, tels que la fragilisation de l'hôte soumis à différents stress abiotiques tels que la sécheresse, l'augmentation des températures à des valeurs proches de celles permettant une croissance optimale des agents pathogènes (entre 20°C et 30°C; Chen *et al.* 2014a; López-Moral *et al.* 2020b; Michailides *et al.* 2017; Moral *et al.* 2019b), ou encore la diminution de la concentration en composés phénoliques dans les rameaux, jeunes pousses et fruits en maturation au cours de l'été impliquant une plus grande susceptibilité de l'hôte (Moral *et al.* 2019b; Wianowska *et al.* 2016). En outre, les méthodes d'irrigation des vergers pouvant humidifier la canopée (principalement l'irrigation par aspersion) peuvent aussi servir de vecteur de dispersion des conidies et donc de la maladie (Michailides *et al.* 2017; Moral *et al.* 2019b). Les outils de taille sont aussi un facteur pouvant favoriser la dispersion des spores au sein des vergers (Moral *et al.*, 2019b), la taille d'entretien classique des noyers ayant lieu tous les 3 à 5 ans durant la période suivant la récolte au début de l'automne (SENuRA 2021).

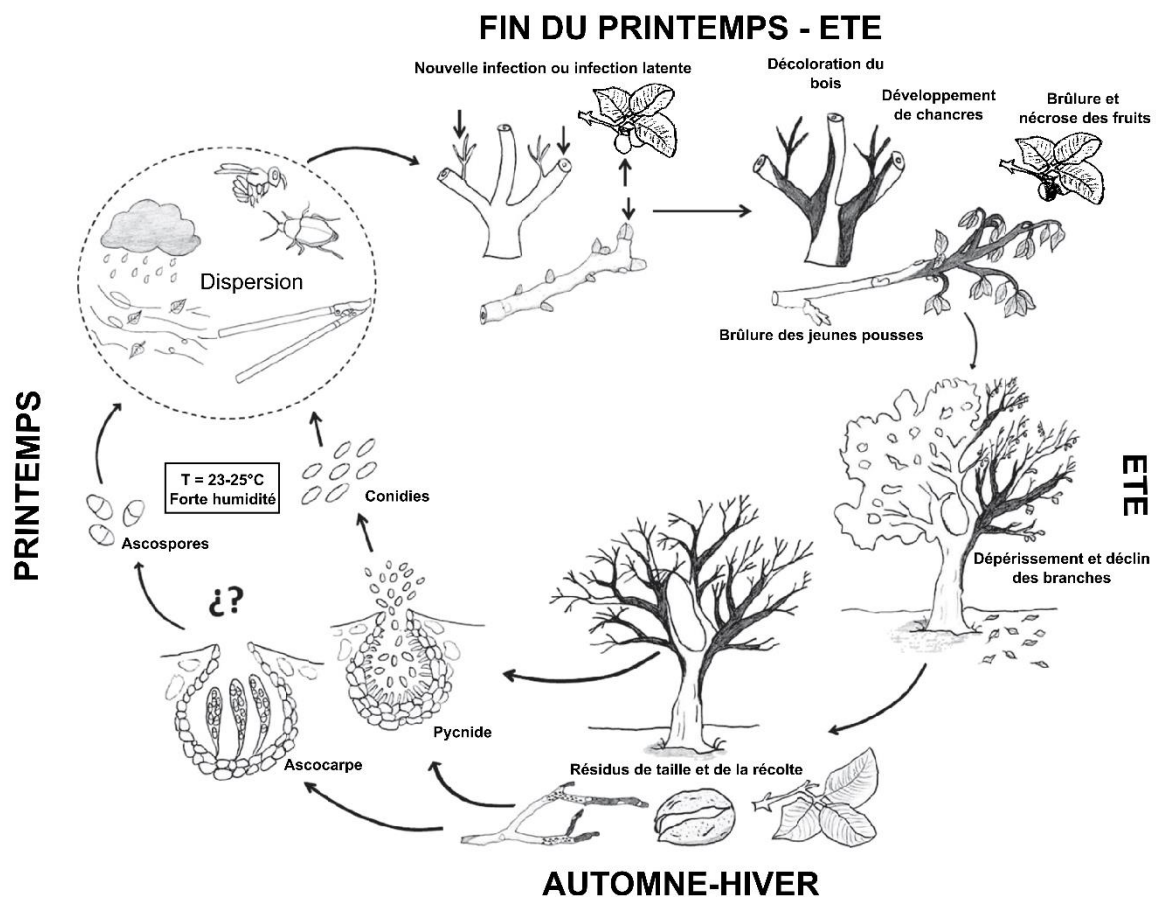


Figure 6. Cycle biologique commun aux différentes espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* sur noyer commun selon les conditions climatiques des pays à climat méditerranéen (d'après López-Moral *et al.* 2020b).

#### 2.2.3.4. Infection et développement des symptômes

L'infection des organes est étroitement liée aux différentes sources d'inoculum et voies de dispersion citées ci-dessus. En effet, les plaies de taille, de chute de feuilles et de fruits, les blessures provoquées par des ravageurs du noyer comme la mouche du brou et les cochenilles ainsi que le développement de la bactériose ou brûlure du noyer sur les fruits (**Tableau 1**) peuvent servir de point d'entrée aux spores et permettre par la suite le développement de la maladie. Une autre hypothèse suggère que l'infection débiterait sur les fruits, et se propagerait par la suite aux rameaux via le pédoncule, conduisant *in fine* au développement des symptômes du dépérissement du noyer (Michailides *et al.* 2013; Moral *et al.* 2019b). Les symptômes provoqués par le dépérissement du noyer peuvent se développer sur la quasi-totalité des organes aériens, soit aussi bien sur les fruits et les bourgeons que sur les jeunes pousses, les rameaux, les branches voire même le tronc dans le cas d'une importante infection (Gusella *et al.* 2021; Laloum *et al.* 2022; López-Moral *et al.* 2020b; Michailides *et al.* 2013; Michailides & Hasey

2010; Moral *et al.* 2019b). Les fruits et les bourgeons sont la cible de flétrissements, de déformations et de nécroses (**Figure 4G,H**), pouvant aller jusqu'à provoquer la mortalité des bourgeons. Lors d'un développement sur les organes lignifiés, les jeunes pousses, rameaux, branches et troncs peuvent être victimes d'un assèchement, d'une décoloration interne du bois, de nécroses ainsi que de chancres plus ou moins développés (**Figure 4I,J**; Gusella *et al.* 2021; Laloum *et al.* 2022; López-Moral *et al.* 2020b; Michailides & Hasey 2010; Moral *et al.* 2019b). La maladie affecte particulièrement la production de noix. Les symptômes sur les jeunes pousses et les rameaux les rendent improductifs, tandis que ceux ciblant les fruits les rendent impropres à la consommation. De même, plus la canopée d'un noyer sera atteinte par le dépérissement et le déclin de ses branches, moins il sera productif.

Ainsi, pour faire suite à la partie « 1.3 Les bio-agresseurs du noyer commun », les symptômes associés au dépérissement du noyer sur fruits et sur rameaux sont susceptibles d'être confondus avec ceux des dégâts causés par les ravageurs et maladies présentées précédemment, soit les nécroses et brûlures sur fruits provoquées par la mouche du brou, l'antracnose causée par les espèces de *Colletotrichum* et l'antracnose à *Gnomonia*, ainsi que la bactériose et la nécrose apicale du fruit (**Figure 4**). Sur rameaux, la bactériose et le dépérissement présentent des symptômes semblables, particulièrement au début du développement de la maladie. Lors de son avancement, la bactériose donne lieu à des dessèchements et provoque l'enroulement des rameaux en crosse, tandis que le dépérissement provoque principalement le noircissement et la mort du rameau (**Figure 4E,I,J**).

Le dépérissement du noyer est donc associé à divers symptômes, communs aux différents pays dans lesquels il a été rapporté. De plus, la maladie est associée à un complexe d'espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* pouvant être collectées conjointement à partir d'organes présentant des symptômes de dépérissement. Ce complexe se compose principalement de *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum*, *Dia. foeniculina* et *Dia. eres*, tandis que d'autres espèces collectées dans de moindres proportions sont aussi décrites.

#### 2.2.4. Gestion des pratiques culturales et méthodes de lutte

Du fait de l'émergence des symptômes de dépérissement en France, aucune méthode de lutte n'a à ce jour été étudiée. Les nombreuses recherches menées en Californie et en Espagne ont quant à elles permis d'établir des recommandations quant à la gestion des vergers ainsi que des moyens de lutte.

#### 2.2.4.1. Prophylaxie par les pratiques culturales

Gérer les vergers différemment peut permettre de diminuer la densité des sources d'inoculum et donc la dispersion des spores et le développement de la maladie. Ainsi, il est recommandé d'éviter l'irrigation par aspersion et de tailler le bois présentant des symptômes de dépérissement, mais aussi de réaliser une taille saisonnière (idéalement au début de l'automne) plus sélective afin de limiter au maximum la création de points d'entrée pour les spores. La protection des plaies de taille par l'application préventive de fongicides est aussi recommandée, ainsi que la désinfection régulière des outils de taille. En effet, la proportion des dégâts causés par le dépérissement dépend largement de la quantité d'inoculum initiale présente dans les vergers (Michailides *et al.* 2016; Moral *et al.* 2019a). De plus, les blessures causées par les cochenilles, la mouche du brou et la bactériose constituant une voie d'infection, il est aussi recommandé de s'attarder particulièrement sur la gestion de ces ravageurs et agents pathogènes afin de contrôler, et idéalement de réduire leur présence dans les vergers (Michailides *et al.* 2012, 2017; Moral *et al.* 2019a). La densité des vergers joue aussi un rôle important dans le cycle infectieux des espèces pathogènes responsables du dépérissement du noyer. En effet, plus le verger sera dense, plus les sources d'inoculum seront potentiellement nombreuses, et plus la transmission d'un arbre à un autre sera facilitée. En Californie, la culture en ultra-haute-densité des noyers est extensivement pratiquée, et est désignée comme facteur à risque facilitant le développement de la maladie (Moral *et al.* 2019a). Il est aussi recommandé de ne pas laisser au sol les résidus de taille et de récolte, qui font office de source d'inoculum. La transformation des résidus de taille en copeaux répartis à la surface du sol a elle aussi montré des effets importants dans la réduction de l'inoculum à leur surface lors d'expérimentations réalisées dans des vergers de Californie (Michailides *et al.* 2016; Moral *et al.* 2019a).

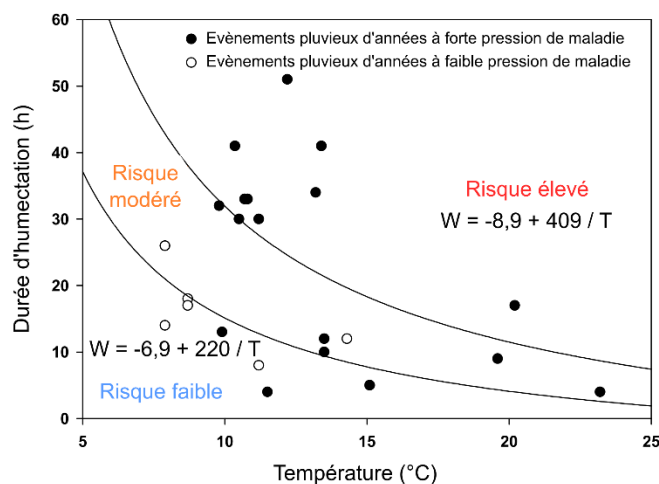
#### 2.2.4.2. Lutte chimique

La lutte chimique contre les espèces de Botryosphaeriaceae est décrite comme nécessaire dans les noyeraies californiennes et espagnoles où le dépérissement prend de l'ampleur. D'après différentes études, aucune résistance aux fongicides n'a été détectée chez les espèces de Botryosphaeriaceae responsables du dépérissement du noyer en Californie (Michailides *et al.* 2017; Moral *et al.* 2019a). L'application de fongicides pour la lutte chimique contre le dépérissement du noyer est alors recommandée dans les noyeraies californiennes et espagnoles, notamment durant la période d'infection et de développement des symptômes, soit au cours du printemps et de l'été (Moral *et al.* 2019a). Elle n'est cependant pas simple et

totale­ment efficace, du fait notamment de la production de structures de reproduction (sous la forme de stromas) dans les différentes couches externes des tissus lignifiés infectés, ce qui les rend difficile d'accès par les fongicides. De plus, la maladie étant causée par un complexe d'espèces, la sélection des produits de lutte chimique en est rendue d'autant plus complexe (Moral *et al.* 2019a).

Aucun produit phytopharmaceutique avec une action fongicide n'est à ce jour homologué pour la lutte contre les espèces fongiques principalement associées au dépérissement du noyer en France (E-Phy & ANSES 2023d). Le traitement préventif des plaies de taille mentionné par Moral *et al.* (Topsin M™) et dont l'efficacité a été démontrée contre *L. citricola* en vergers sur branches de 1 an et de 4 ans (cultivar Chandler) se compose principalement de thiophanate-méthyl, substance active non autorisée en France (E-Phy & ANSES 2022; Moral *et al.* 2019a). Un second produit phytosanitaire (Merivon®) composé d'une association de pyraclostrobine et de flyxapyroxade a aussi fait ses preuves en tant que traitement fongicide préventif dans la protection des plaies de taille contre *L. citricola* lors d'une application en vergers sur le cultivar Chandler durant l'automne, saison recommandée pour la taille. A l'inverse, ce produit ne s'est pas avéré efficace quant à la réduction du nombre de chancres et de leur longueur lors de l'inoculation de *N. parvum* dans les mêmes conditions d'expérimentation (Adaskaveg *et al.* 2017, 2022; Michailides *et al.* 2016). Ces deux composés chimiques font partie des substances actives approuvées en France (E-Phy & ANSES 2023a; b). Actuellement, une dizaine de substances actives sont homologuées en Californie pour la lutte contre le dépérissement du noyer, dont celles citées précédemment (Adaskaveg *et al.* 2017, 2022). Seulement une partie de ces substances est homologuée en France pour une utilisation sur noyers. Il s'agit de la pyraclostrobine et du boscalid, substances composant le SIGNUM® (E-Phy & ANSES 2023c) et du tébuconazole, retrouvé dans AGRITEBU®, HORIZON ARBO®, et TEBUWG®. Ces trois derniers sont homologués dans la lutte contre l'anthracnose sur noyers, mais aussi d'autres maladies fongiques d'autres arbres à fruits à coques, telles que le "chancre à champignons" sur amandiers et châtaigniers, ainsi que le dépérissement cryptogamique du noisetier (E-Phy & ANSES 2020a; b, 2021). En Californie, la fréquence recommandée des traitements homologués est d'une application par mois de mai à août, en début de mois (Michailides *et al.* 2016). Il a été mis en avant qu'une seule application réalisée au cours de la période de croissance (de mi-juin à mi-juillet) présente une grande efficacité, permettant de considérablement réduire la densité des sources d'inoculum ainsi que les fréquences de traitement (Michailides *et al.* 2016; Moral *et al.* 2019a).

La fréquence des traitements peut aussi être réduite en fonction de la densité des sources d'inoculum et des conditions météorologiques de certaines années. Un modèle prédictif du risque d'infection a été développé en Californie concernant la brûlure du pistachier (*Pistacia vera*), maladie de dépérissement aussi causée par des espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* (Chen *et al.* 2014b; Morgan *et al.* 2009). Ce modèle, nommé LWM pour Leaf Wetness Model, se base sur les températures et la durée d'humectation des feuilles lors d'événements pluvieux durant lesquels plus de 4 mm de pluie ont été relevés et après lesquels une période sèche d'une durée inférieure ou égale à 12 h a été enregistrée. A l'aide des données météorologiques et l'incidence de la maladie en Californie dans les vergers de pistachiers durant 15 années, il permet de prédire les risques d'infection des vergers en 3 catégories selon les conditions météorologiques, soit des conditions à faible risque, à risque moyen, ou à fort risque, grâce à l'équation de régression non linéaire  $W = a + b/T$ , où W représente la durée d'humectation et T représente la température (Moral *et al.* 2019a; Morgan *et al.* 2009). Des durées d'humectation et des températures élevées constituent un risque élevé d'infection, particulièrement lors d'années à forte pression de maladie (**Figure 7**). Ayant fait ses preuves dans la prédiction de la maladie dans les vergers de pistachiers, ce modèle est depuis lors utilisé par les cultivateurs afin de prédire les risques d'infection et de traiter en conséquence. Il est depuis plusieurs années en cours d'essai dans les vergers de noyers californiens (Michailides *et al.* 2016; Moral *et al.* 2019a; b).



**Figure 7. Risque d'infection des fruits du pistachier par *N. mediterraneum* d'après le modèle LWM en Californie. Les courbes de régression correspondent aux durées d'humectation et températures nécessaires au développement de nécroses sur 10 % (courbe du haut) et sur 5 % (courbe du bas) des feuilles de pistachiers inoculées artificiellement (adapté de Morgan *et al.* 2009).**



#### 2.2.4.3. Lutte biologique par utilisation de micro-organismes

Peu, voire aucune étude n'a à ce jour été réalisée concernant le développement de méthodes de lutte biologique contre les agents pathogènes responsables du dépérissement du noyer en particulier. D'autres études ont cependant été réalisées dans d'autres contextes. L'utilisation de champignons endophytes (tels que *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternata* et *Trichoderma viride*) comme agents de lutte contre l'espèce *Diplodia corticola*, responsable du dépérissement du chêne, a été étudiée. La vitesse de croissance de *D. corticola* était significativement réduite en présence d'*E. nigrum*, *A. alternata* et *T. viride*, lors de tests de confrontation *in vitro* réalisés en boîte de Petri. De plus, ces espèces ont ralenti le développement des symptômes causés par *D. corticola* lors d'essais de confrontation sur jeunes plants de chêne velu (*Quercus cerris*), tandis que les mêmes conclusions ont pu être tirées d'essais réalisés avec *A. alternata* et *E. nigrum* sur jeunes plants de chêne pubescent (*Q. pubescens*), mettant en avant l'intérêt des espèces fongiques endophytes dans la lutte biologique contre les espèces de Botryosphaeriaceae (Campanile *et al.* 2007). De la même manière, une étude menée par Holland *et al.* (2021a) en Californie s'est intéressée à la lutte biologique contre les agents associés au dépérissement de l'amandier (chancre de l'amandier ou band canker of almond; *Prunus dulcis*), dont *B. dothidea* et *N. parvum* (Holland *et al.* 2021a). Il a été démontré que le Vintec®, composé de l'agent de lutte biologique *T. atroviride* SC1, présente des capacités de protection des plaies de taille équivalente à celle du Topsin M™ (cité précédemment) dans la lutte contre *B. dothidea*, et des capacités supérieures à ce même produit dans la lutte contre *N. parvum* (Holland *et al.* 2021a). Ce produit est approuvé en France et homologué, entre autres, sur vignes dans le traitement des différentes maladies de dépérissement dont le vignoble est la cible, ainsi que sur amandiers (E-Phy & ANSES 2023e).

D'autres études ont permis d'évaluer l'intérêt de la lutte biologique contre les espèces de Botryosphaeriaceae à l'aide d'espèces bactériennes. C'est le cas de Chen *et al.* (2003), qui ont étudié la bactérie *Paenibacillus lentimorbus* isolée à partir de feuilles saines de pistachier dans le contexte de la lutte contre *B. dothidea*, espèce de Botryosphaeriaceae parmi celles responsables du dépérissement et des brûlures du pistachier. Des tests *in vitro* ont révélé que la souche de *P. lentimorbus* testée était responsable d'un taux d'inhibition de germination des spores de *B. dothidea* de 100 %. De plus, l'application d'une suspension bactérienne de manière préventive comme agent protecteur de lésions sur des rameaux de pistachiers détachés réduisait significativement la taille des lésions provoquées par *B. dothidea* inoculée à l'aide d'implants mycéliens ou de suspensions de spores 3 jours après le traitement avec la suspension protectrice.

La viabilité des cellules bactériennes a été évaluée en présence des fongicides recommandés dans la lutte contre le dépérissement du pistachier. Sur les 6 fongicides testés, 5 n'affectaient pas la viabilité des cellules bactériennes de *P. lentimorbus* à la plus forte concentration recommandée (Chen *et al.* 2003).

Ces études permettent alors d'émettre l'hypothèse que la recherche d'espèces fongiques et bactériennes endophytes du noyer dans le cadre de la lutte biologique contre le dépérissement du noyer pourrait permettre d'obtenir des candidats potentiels. Toutefois, la transposition de résultats d'efficacité *in vitro* ou sur organes détachés aux conditions réelles de production représente un enjeu considérable dans le domaine de la lutte biologique où l'efficacité de protection est souvent bien moindre lorsque les conditions ne sont plus contrôlées (Lahlali *et al.* 2022).

#### 2.2.4.4. Résistance variétale

La résistance variétale est aussi un facteur important dans la lutte contre des agents pathogènes et ravageurs. Actuellement, 34 variétés et cultivars sont inscrits au Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (GEVES 2023). Parmi ceux-ci se trouvent les variétés françaises traditionnelles telles que Corne, Franquette, Grandjean, Marbot, Mayette et Parisienne, des cultivars américains tels que Chandler, Hartley, Pedro et Serr, ou encore des cultivars français issus de programmes de sélections tels que Feradam, Ferbel, Ferjean, Fernette, Fernor, Ferouette et Fertignac (Bernard *et al.* 2018; Florilège n.d.; GEVES 2023).

Peu de données sont disponibles quant à leur résistance aux agents fongiques associés au dépérissement du noyer à l'échelle mondiale. Seules deux études s'y sont récemment intéressées, soit l'étude de Chen *et al.* (2014a) en Californie et l'étude de López-Moral *et al.* (2022) en Espagne. Le cultivar Chandler s'est avéré être le moins sensible à toutes les espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* inoculées sur branches et fruits en vergers. Particulièrement, il était le moins sensible aux symptômes provoqués par *B. dothidea* et *N. parvum* lors d'inoculations sur branches, ainsi qu'à l'inoculation de *B. dothidea* sur fruits lors d'expérimentation en vergers en Californie par rapport aux cultivars Tulare et Vina. Le cultivar Chandler s'est aussi avéré être le moins sensible à l'inoculation de ces deux espèces sur branches en vergers en Espagne mais aussi sur branches détachées en conditions *in vitro*, et ce par rapport aux cultivars Fernette, Hartley, Horward, Scharsch-Franquette, Serr, Sundland et

Tulare (López-Moral *et al.* 2022). Des sensibilités différentes ont été constatées pour d'autres cultivars en fonction des conditions d'expérimentation, soit *in vitro* ou *in natura*. Alors que les cultivars Fernette et Scharsch-Franquette étaient parmi les moins sensibles à *B. dothidea* lors d'expérimentations *in vitro*, ils étaient à l'inverse parmi les plus sensibles à cette même espèce lors d'expérimentations en vergers. A l'inverse, ces mêmes cultivars étaient parmi les plus sensibles à *N. parvum* en conditions contrôlées, mais parmi les moins sensibles *in natura*. Le cultivar Serr restait quant à lui parmi les plus sensibles à *B. dothidea* et *N. parvum* quelques soient les conditions d'expérimentation (López-Moral *et al.* 2022).

Ces résultats sont les premiers à donner des informations comparatives quant à la sensibilité de certains cultivars à l'infection par *B. dothidea* et *N. parvum*. Bien que les cultivars Chandler, Hartley, Serr et Fernette soient inscrits au catalogue national des variétés, ils ne sont pas parmi les plus cultivés. Aucune information n'est à ce jour disponible concernant la sensibilité des variétés traditionnelles françaises à ces pathogènes. Il serait alors intéressant de réaliser ces expérimentations en France, idéalement en vergers afin de se rapprocher le plus possible des conditions de développement réelles des symptômes, et ce sur différents cultivars et à l'aide d'espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe*. Par ailleurs, les essais de résistance variétale décrits dans le paragraphe précédent ne tiennent pas ou peu en compte la variabilité intraspécifique (de 1 à 3 souches testées par espèce). Or, on peut légitimement supposer que le pouvoir pathogène varie en fonction des souches et cette variabilité doit être prise en compte pour déterminer la résistance des cultivars.

### **3. Décrypter le pathobiome fongique : diversité inter et intraspécifique des micro-organismes et interactions**

#### **3.1. Le concept de pathobiome**

Le paragraphe précédent a mis en évidence la complexité de la maladie du dépérissement du noyer, probablement causée par une multitude d'espèces incluant principalement des espèces de la famille des Botryosphaeriaceae et du genre *Diaporthe*. Ce constat remet donc sérieusement en cause le paradigme "un agent pathogène - une maladie" (Mannaa & Seo 2021). En effet, la compréhension d'une maladie passe par l'identification des agents pathogènes responsables, mais aussi des interactions qui existent entre ces agents pathogènes ainsi qu'avec les espèces composant le phytomicrobiome et l'hôte dans le développement des symptômes. Ce principe est à l'origine du concept de pathobiome, défini

selon Bass *et al.* (2019), comme étant “l’ensemble des organismes associés à un état de santé réduit (ou potentiellement réduit) de l’hôte, en raison d’interactions entre ces organismes et avec l’hôte”. Le phytomicrobiome, quant à lui, correspond à l’ensemble des organismes associés à la plante, sans forcément faire de distinction entre une plante saine ou malade. Dans le cadre de cette thèse, nous avons considéré que l’ensemble des microorganismes fongiques associés à des échantillons symptomatiques constituent le pathobiome fongique. Les espèces responsables du dépérissement du noyer et les autres espèces composant le phytomicrobiome de manière large pourraient donc ainsi travailler en synergie et/ou de façon antagoniste pour créer, favoriser ou atténuer l’apparition et le développement des symptômes. Dans ce contexte, il est donc fondamental d’identifier l’ensemble des membres d’un pathobiome et leur contribution à l’expression des symptômes, en tenant aussi compte des interactions entre ces espèces pathogènes mais aussi avec le reste du phytomicrobiome. Compte tenu de la diversité et co-occurrence d’agents pathogènes associés au dépérissement du noyer, il semble primordial d’étudier cette maladie sous un angle écologiste et de s’intéresser aux potentielles interactions entre les membres qui le composent. Différentes études illustrant ce concept sont ainsi présentées dans les sous-parties suivantes. L’étude des interactions entre les membres du microbiome suppose, au préalable, d’accéder à une description fine des micro-organismes associés ou non aux symptômes, en se basant sur différentes techniques décrites ci-dessous.

## **3.2. Méthodes de description des écosystèmes : avantages et limites**

### **3.2.1. Méthodes d’identification des agents pathogènes**

Deux approches majeures sont aujourd’hui régulièrement utilisées dans l’étude des communautés composant le phytomicrobiome : l’approche culturale, ou culture-dépendante, et l’approche culture-indépendante. Comme leur nom l’indique, ces deux méthodes diffèrent majoritairement par l’existence ou non d’une étape de mise en culture sur boîte de Petri. Il s’agit, dans ce paragraphe, de décrire la mise en œuvre et la contribution de ces deux techniques, auxquelles nous avons eu recours dans le cadre de ces travaux de thèse, dans l’étude du pathobiome et du phytomicrobiome fongiques des noyers présentant des symptômes de dépérissement.

### 3.2.1.1. Approche culturelle

La méthode culture-dépendante est la méthode classiquement utilisée dans l'étude de communautés fongiques. Elle permet ainsi de s'intéresser au microbiote dit "cultivable" qui compose ces communautés. Elle consiste en la mise en culture sur boîte de Petri d'échantillons environnementaux afin d'en isoler les agents fongiques cultivables et par la suite de les identifier dans le but de déterminer la diversité fongique associée aux échantillons environnementaux ciblés. L'identification des espèces fongiques peut ensuite être effectuée à l'aide d'une caractérisation phénotypique, par l'analyse des caractères macro- et microscopiques, ainsi que par un séquençage de gènes dits code-barres permettant une identification taxonomique.

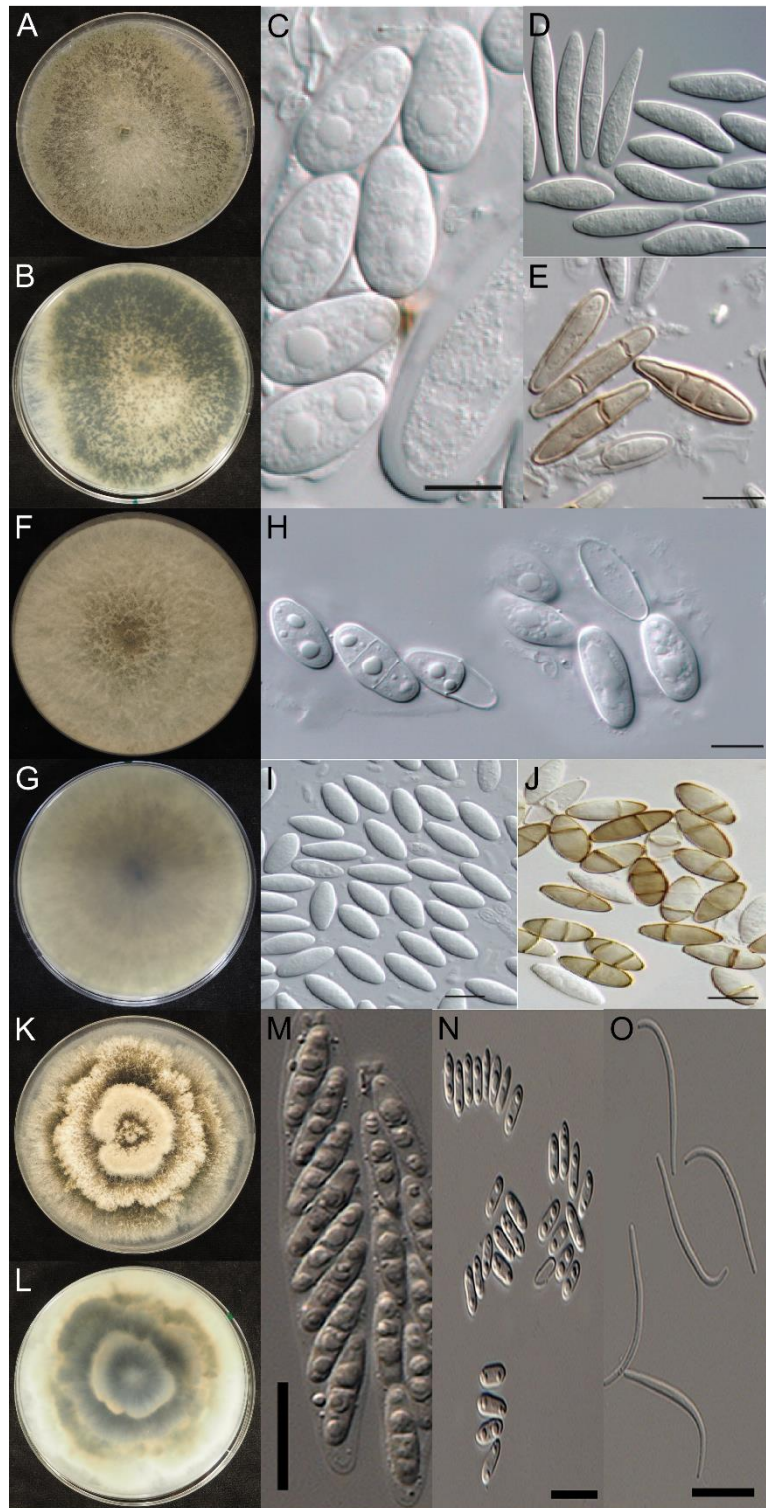
De nombreux milieux de culture peuvent être utilisés pour la mise en culture des échantillons environnementaux et l'isolement des communautés fongiques associées. En fonction de leur composition, ces milieux vont être plus ou moins favorables à la croissance de certains groupes ou genres microbiens. Ainsi, les milieux dits sélectifs vont présenter une composition particulière dont le but est de favoriser la croissance des micro-organismes ciblés mais aussi d'inhiber la croissance des micro-organismes non recherchés. La sélectivité d'un milieu peut aussi prendre en compte différents paramètres de croissance des micro-organismes tels que la durée, la température d'incubation et l'exposition à la lumière. Des milieux sélectifs génériques ont été développés, tel que le milieu Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar - SDA) dont la composition inhibe la croissance des genres bactériens et permet l'étude des agents fongiques de type levures notamment associés à des échantillons cliniques (Sandven & Lassen 1999), mais aussi des milieux ciblant des environnements particuliers, tels que le milieu AASW (Aguas Agrias Stream Water) créé pour étudier les communautés fongiques issues de la rivière du même nom, considérée comme un environnement extrême du fait de sa forte acidité et teneur en métaux (Álvarez-Pérez *et al.* 2011), ou encore le milieu Raclette de Savoie, utilisé dans le cadre de la culture d'espèces de Nectriaceae isolées à partir de matrices fromagères (Savary *et al.* 2022). Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) est le milieu non sélectif classiquement utilisé lors de la culture d'isolats fongiques et bactériens ne requérant pas de conditions de cultures particulières. Il est massivement utilisé pour l'analyse des communautés fongiques associées à des nombreux environnements, dont les échantillons issus de végétaux. Il est possible de compléter le milieu en antibiotiques antibactériens (tels que la pénicilline, la streptomycine ou encore le chloramphénicol) pour inhiber la croissance bactérienne et favoriser l'isolement des espèces fongiques. Il a par exemple été utilisé dans l'étude d'agents pathogènes fongiques

associés au colza à partir de graines (*Alternaria* spp.; Brazauskiene & Petraitiene 2006), à la vigne à partir de sarments et de bras (*D. seriata* et *N. parvum*; Morales-Cruz *et al.* 2018), aux noyers à partir de rameaux, jeunes pousses, fruits, bourgeons et feuilles (Botryosphaeriaceae spp., *Colletotrichum* spp. et *Diaporthe* spp.; Chen *et al.* 2014a; Da Lio *et al.* 2018; López-Moral *et al.* 2020b), mais aussi des espèces fongiques endophytes d'orchidées à partir de feuilles, de racines et de fleurs (comme *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. et *Trichoderma* spp.; Chowdappa *et al.* 2020) ou encore de noyers à partir de racines, branches, feuilles et fruits (*Alternaria* spp., *Diaporthe* spp., *Dothiorella* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp. et *Phomopsis* spp. entre autres; Wang *et al.* 2020). Malgré la diversité des genres fongiques qu'il est possible de cultiver sur ce milieu, la méthode culturale présente la limite de favoriser seulement une partie des micro-organismes présents, en particulier les plus abondants et/ou se développant rapidement sur milieu de culture, entraînant ainsi un biais dans l'évaluation de la diversité des communautés. L'utilisation simultanée de plusieurs milieux de culture peut alors être réalisée pour tenter de pallier cette limite. La sélection du milieu de culture est un facteur d'autant plus important dans l'étape de caractérisation phénotypique que les caractères morphologiques des champignons peuvent évoluer en fonction du milieu de culture utilisé (Ermel *et al.* 2020; Griffith *et al.* 2007; Savary *et al.* 2022). Cette technique présente toutefois un avantage *de facto* sur les méthodes culture-indépendantes dans la mesure où les cultures fongiques sont obtenues et peuvent donc faire l'objet d'une identification plus poussée.

Suite à l'isolement et la purification des isolats après la mise en culture des échantillons, l'identification repose dans un premier temps sur l'analyse des caractères morphologiques macro- et microscopiques afin d'orienter le diagnostic. Les six espèces majoritaires étudiées dans ces travaux de thèse font l'objet ci-après d'une rapide description des caractères macro- et microscopiques (**Figure 8** et **9** et **Tableau 3**). Les descriptions macroscopiques sont basées sur une mise en culture sur milieu PDA :

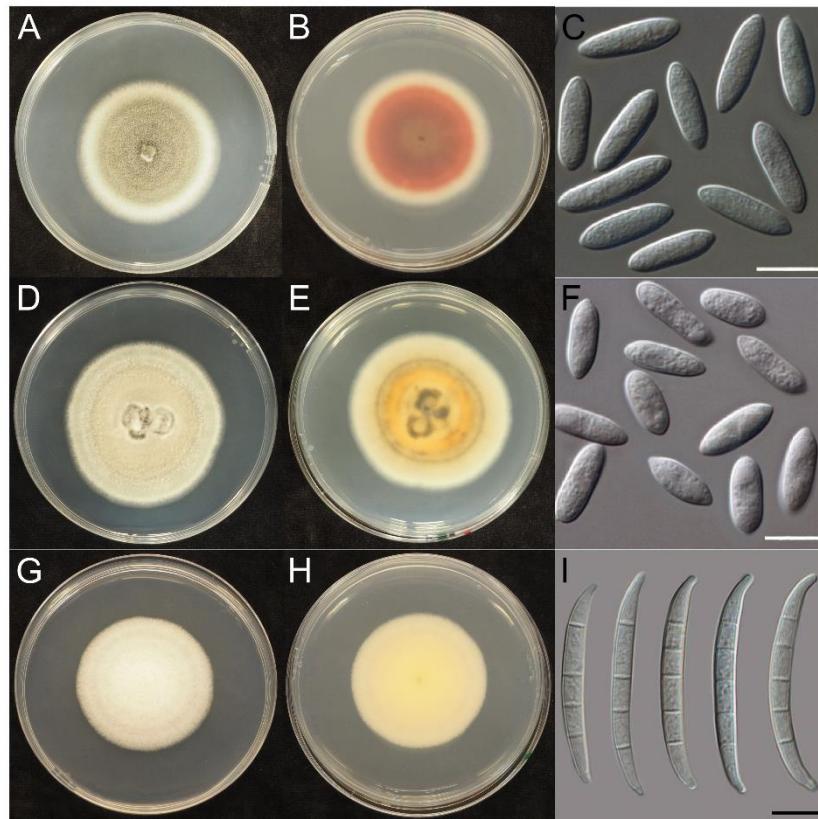
- *B. dothidea* présente un mycélium faiblement dense aérien blanchâtre prenant une coloration olivâtre à noire en vieillissant et présentant des pigmentations noires. Lorsque le mycélium est jeune, il se compose d'hyphes hyalins prenant une teinte brune en vieillissant. De même, les ascospores et les conidies, hyalines et aseptées, prennent une couleur brune à olivâtre en vieillissant et présentent des cloisons. Sa croissance est particulièrement rapide.

- *N. parvum* présente un mycélium faiblement dense aérien et blanchâtre lorsqu'il est jeune, difficilement différenciable de *B. dothidea* à cette étape, de croissance particulièrement rapide. En vieillissant, le mycélium devient particulièrement dense et présente une coloration grise à noire. Le mycélium de cette espèce est hyalin et branché, et présente une coloration brune en vieillissant. Les ascospores et les conidies jeunes, hyalines et aseptées deviennent septées en vieillissant. De plus, les conidies âgées peuvent présenter une couleur brune.
- L'espèce *D. eres* présente un mycélium blanchâtre duveteux avec une pigmentation grise à marron au centre sur la face inférieure lorsqu'il est jeune, puis une pigmentation grisée répartie sur tout le mycélium ainsi que des stromas noirs lorsqu'il est âgé.
- *C. fioriniae* présente un mycélium blanc duveteux lorsque jeune, puis un mycélium dense de coloration verdâtre à grise en vieillissant entouré de marges blanches nettes. La face inférieure présente une coloration rose à rouge foncé en vieillissant. La face supérieure peut présenter des acervules orangés dans lesquels se développent les conidiophores.
- L'apparence de *C. godetiae* est blanche à gris clair lorsqu'il est jeune, et prend une coloration gris foncé en vieillissant ainsi que des marges blanches nettes. Il présente une coloration orangée sur la face inférieure ainsi que des pigmentations grises. La face supérieure peut présenter des acervules oranges.
- *F. juglandicola* est une espèce nouvellement décrite, isolée de bourgeons de noyers en 2021 (Crous *et al.*, 2021). Sa croissance est particulièrement lente. Son mycélium est aérien cotonneux blanc à rose pâle lorsque jeune. En vieillissant, il prend des teintes rosées à orange clair sur la face supérieure et inférieure. Cette espèce de *Fusarium* présente la caractéristique de ne pas produire de microconidies aériennes, ni de chlamydospores.



**Figure 8. Diversité des espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* étudiées sur milieu PDA après incubation à température et lumière ambiante et structures de reproduction sexuée et asexuée (d'après Phillips *et al.* 2013; Udayanga *et al.* 2014a, respectivement). A-E. *B. dothidea* ; F-J. *N. parvum* ; K-O. *D. eres*. A-B. Face supérieure et inférieure de *B. dothidea* à 10 jours. C. Ascospores. D. Conidies. E. Conidies âgées. F-G. Face supérieure et inférieure de *N. parvum* à 10 jours. H. Ascospores. I. Conidies. J. Conidies âgées. K-L. Face supérieure et inférieure de *D. eres* à 7 jours. M. Ascospores dans asques. N.  $\alpha$ -conidies. O.  $\beta$ -conidies. Barres d'échelle : C-E = 10  $\mu$ m, H = 10  $\mu$ m, I-J = 5  $\mu$ m, M-N = 15  $\mu$ m, O = 10  $\mu$ m.**





**Figure 9.** Diversité des espèces de *Colletotrichum* et de *Fusarium* étudiées sur milieu PDA après incubation à température et lumière ambiante et structures de reproduction asexuée (d'après Damm *et al.* 2012; Crous *et al.* 2021, respectivement). A-C. *C. fioriniae* ; D-F. *C. godetiae* ; G-I. *F. juglandicola* UBOCC-A-119001. A-B. Face supérieure et inférieure de *C. fioriniae* à 7 jours. C. Conidies. D-E. Face supérieure et inférieure de *C. godetiae* à 10 jours. F. Conidies. G-H. *F. juglandicola* UBOCC-A-119001 à 7 jours. I. Conidies. Barres d'échelle : C, F, I = 10 µm.

**Tableau 3. Caractéristiques des principales espèces pathogènes étudiées.**

Classification	Genre	Forme anamorphe	Forme téléomorphe	Mycélium	Ascospores	Conidies	Référence
<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Botryosphaeria</i>	<i>Fusicoccum aesculi</i>	<i>B. dothidea</i>	Hyphe ramifié et septé hyalin, brun en vieillissant	Ovoïdes-fusoïdes-ellipsoïdes hyalines aseptées, septées et brunes en vieillissant	Fusoïdes-ellipsoïdes hyalines aseptées, septées et olivâtres en vieillissant	Phillips <i>et al.</i> 2013
	<i>Neofusicoccum</i>	<i>N. parvum</i>	<i>B. parva</i>	Hyphe branché et hyalin, brun en vieillissant	Fusoïdes-ellipsoïdes hyalines aseptées, septées en vieillissant	Ellipsoïdes hyalines aseptées, septées et brunes en vieillissant	Philips <i>et al.</i> 2013
<i>Diaporthaceae</i>	<i>Diaporthe</i>	<i>Phomopsis oblonga</i>	<i>D. eres</i>	-	Ellipsoïdes allongées hyalines bicellulaires	Type $\alpha$ : Ovoïdes-ellipsoïdes aseptées hyalines. Type $\beta$ : Fusoïdes crochues hyalines aseptées.	Udayanga <i>et al.</i> 2014a
<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>C. fioriniae</i>	<i>Glomerella fioriniae</i>	Hyphe ramifié septé hyalin à brun	Fusoïdes droites hyalines	Fusoïdes cylindriques hyalines aseptées	Damm <i>et al.</i> 2012; Marcelino <i>et al.</i> 2008
		<i>C. godetiae</i>	-	Hyphe ramifié septé hyalin à brun	-	Fusoïdes cylindriques hyalines aseptées	Damm <i>et al.</i> 2012
<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>F. juglandicola</i>	-	Hyphe ramifié hyalin	-	Macroconidies : droites à incurvées hyalines septées. Cellule apicale incurvée à crochue. Cellule basale en forme de pied.	Crous <i>et al.</i> 2021

Dans la mesure où les observations macro et microscopiques peuvent facilement conduire à des erreurs d'identification, le séquençage multigénique reste la méthode de référence dans l'identification d'espèces fongiques cultivées. Elle consiste en l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN et le séquençage des gènes d'intérêts cibles dont la séquence est caractéristique des genres ou espèces étudiées. En effet, bien que l'Internal Transcribed Spacer (ITS) soit considéré comme le marqueur génétique universel des champignons (Schoch *et al.* 2012), sa résolution taxonomique peut s'avérer insuffisante pour discriminer certains genres ou espèces phylogénétiquement proches. De nombreuses études ont alors permis d'identifier des gènes plus appropriés en fonction des genres et des espèces lorsque l'ITS n'est pas suffisant. Ainsi, en plus de l'ITS, les gènes codant l'ARNr 28S (LSU), l'ARNr 18S (SSU), le facteur d'élongation 1 alpha (EF1- $\alpha$ ), la  $\beta$ -tubuline (TUB) et la sous-unité RPB2 de l'ARN polymérase II ont été largement utilisés pour discriminer les genres et les espèces au sein de la famille des Botryosphaeriaceae (Crous *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2008; Sakalidis *et al.* 2011; Yang *et al.* 2017; **Figure 10**). Concernant le genre *Diaporthe* et les espèces qui le composent, les gènes codant le facteur d'élongation alpha (EF1- $\alpha$ ), la  $\beta$ -tubuline, la calmoduline (CAL) et l'histone H3 (HIS) sont classiquement utilisés (Fan *et al.* 2018; Santos *et al.* 2017; Udayanga *et al.* 2012; **Figure 11**). Ainsi, différentes études se sont intéressées aux séquences ITS, EF1- $\alpha$  et  $\beta$ -tubuline pour l'étude phylogénétique des différentes espèces de Botryosphaeriaceae et *Diaporthe* associées au dépérissement du noyer en Californie, Espagne et Italie (Chen *et al.* 2014a; Gusella *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2020b). Dans le même objectif, Li *et al.* (2016) ont ciblé les séquences ITS et EF1- $\alpha$  pour analyser les isolats de *B. dothidea* et *L. theobromae* isolés de symptômes du dépérissement en Chine. L'identification moléculaire des espèces du genre *Fusarium* est préférentiellement réalisée par le séquençage de l'EF1- $\alpha$ , mais aussi des sous-unités RPB1 et RPB2 de l'ARN polymérase II (O'Donnell *et al.* 2022; **Figure 12**). Enfin, de nombreuses régions sont recommandées pour l'identification et la discrimination des espèces du complexe *Colletotrichum actutatum* auquel appartiennent *C. fioriniae* et *C. godetiae*, tels que l'ITS, l'histone 3, la  $\beta$ -tubuline, mais aussi les gènes codant pour l'actine (ACT), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la chitine synthase 1 (CHS-1; Damm *et al.* 2012).

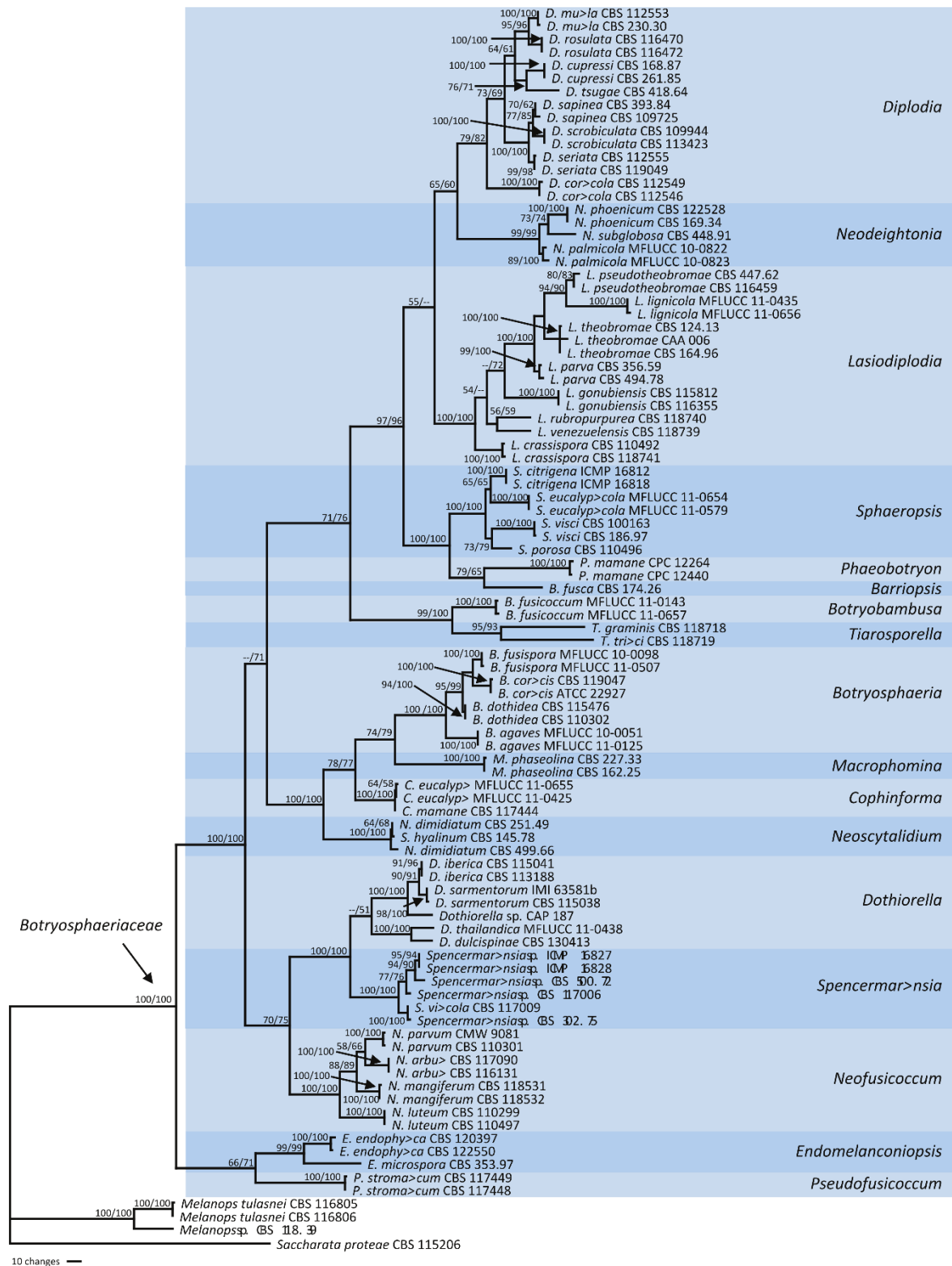


Figure 10. Arbre phylogénétique de genres de la famille des Botryosphaeriaceae obtenu à l'aide des loci SSU, LSU, ITS, EF1- $\alpha$  et TUB combinés, et enraciné par *Saccharata proteae* CBS 1125206 (Philips *et al.* 2013).

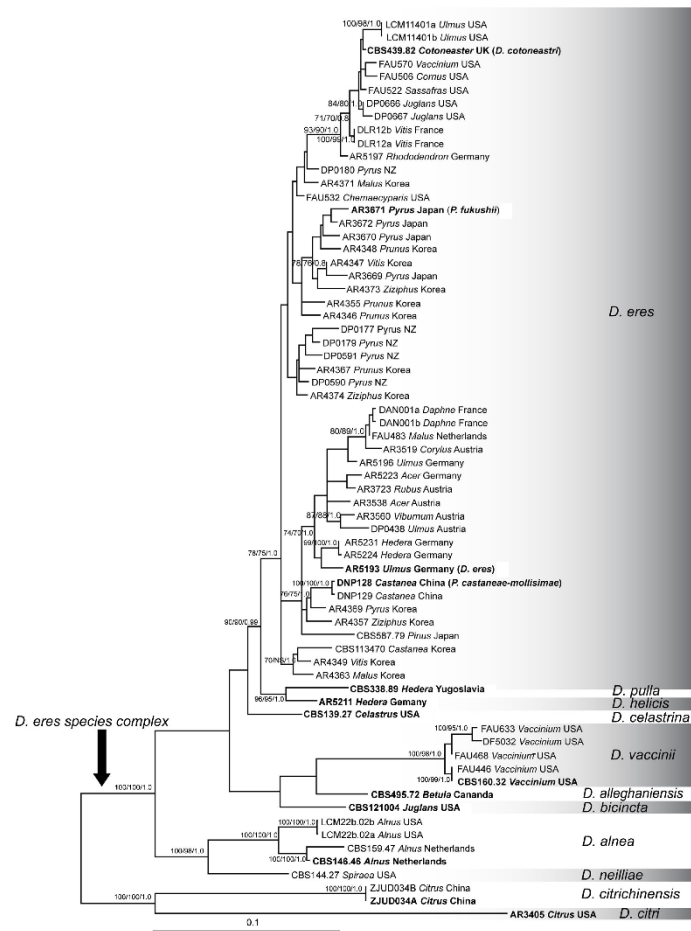


Figure 11. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Diaporthe* obtenu à l'aide des loci ACT, Apn2, CAL, EF1- $\alpha$ , HIS, FG1093 (protéine ribosomique L37) et TUB combinés, et enraciné par *D. citri* AR3405 (Udayanga *et al.* 2014a).

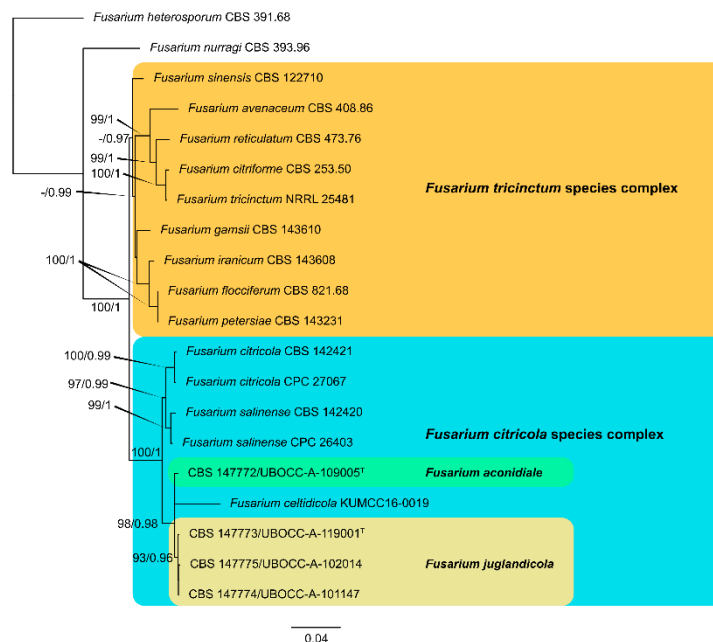


Figure 12. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Fusarium* obtenu à l'aide des loci EF1- $\alpha$ , RPB1 et RPB2 combinés, et enraciné par *F. heterosporum* CBS 391.68 (Crous *et al.* 2021).

### 3.2.1.2. Approche par métabarcoding

L'analyse culture-indépendante repose sur l'analyse de l'ADN total présent dans les échantillons environnementaux, sans mise en culture préalable. De nombreuses technologies de séquençage massives appelées Next Generation Sequencing (NGS) ont été développées ces dernières années, et parmi elles, la métagénomique. Cette dernière, aussi appelée métabarcoding, désigne l'étude de communautés suite à l'extraction de la totalité de l'ADN présent dans un échantillon donné. Après une première étape d'amplification de la région code barre ciblée, le séquençage massif permet d'identifier les communautés bactériennes, virales, ou fongiques dans notre cas. Lors de la réalisation du séquençage métabarcoding, le choix de la région ciblée, la sélection des amorces et le choix du pipeline bioinformatique pour l'analyse des résultats sont des points cruciaux. En effet, de nombreux biais peuvent survenir lors de l'étape d'amplification du fait des caractéristiques des amorces et de la région cible. La formation de chimères, ou séquences artefacts, peut aussi survenir lors de cette étape. De plus, lors des étapes de PCR, les amplicons de plus petite taille sont préférentiellement amplifiés, ce qui peut résulter en une sur-estimation des espèces associées à ces amplicons, et, de manière corollaire, une sous-estimation de celles présentant des amplicons de plus grande taille, la taille des gènes cibles, notamment l'ITS, pouvant grandement varier d'une espèce à l'autre (Yang *et al.* 2018b). Du fait de ces PCR, cette méthode permet uniquement d'accéder à une quantification relative des communautés et non absolue. Les données sont dites compositionnelles, permettant de déterminer l'abondance des taxons les uns par rapport aux autres.

Enfin, lors de l'analyse bioinformatique, la sélection des outils et paramètres peut fortement faire varier les résultats, et principalement entraîner de fortes pertes d'informations. Par exemple, le choix du seuil de pourcentage d'identité trop élevé pour la classification des séquences obtenues peut générer une perte de données (Nilsson *et al.* 2019). Il existe différentes technologies de séquençage NGS, telles que la technologie Illumina, Nanopore ou encore PacBio. Dans le contexte de la métagénomique, la technologie Illumina MiSeq est la plus utilisée à ce jour. Elle permet le séquençage de séquences courtes de 250 ou 300 paires de bases. La région ITS est également le marqueur moléculaire universel le plus utilisé pour l'étude des communautés fongiques par séquençage métabarcoding. Du fait de la taille limitée des amplicons, les régions ITS1 ou ITS2 qui composent l'ITS sont préférentiellement séquencées. Une mise au point méthodologique semble donc appropriée pour la réalisation de séquençage métabarcoding, afin d'évaluer et de corriger dans la mesure du possible les différents biais pouvant intervenir.

Actuellement, seules deux études dédiées au décryptage du pathobiome du noyer par une approche métagénomique ont été publiées dans le contexte de l'antracnose causée par *Colletotrichum*. La première porte sur l'analyse comparative du phytomicrobiome associé à des feuilles de noyers d'apparence saine et des feuilles présentant des symptômes d'antracnose en Chine par séquençage métabarcoding de la région ITS1 (Wang *et al.* 2022). Les résultats ont mis en évidence une très large diversité fongique avec la prédominance des genres *Cercospora*, *Vishniacozyma* et *Ramularia* tandis que les espèces du genre *Colletotrichum*, ont également été retrouvés aussi bien dans les échantillons symptomatiques qu'asymptomatiques (bien qu'en plus faibles proportions), en association avec d'autres genres pathogènes moins abondants (*Alternaria*, *Diaporthe* et *Fusarium*). *Vishniacozyma* est le principal genre significativement plus prédominant dans les échantillons asymptomatiques que symptomatiques. Par ailleurs, les feuilles symptomatiques présentaient une richesse, une abondance et une équitabilité croissante au cours du développement des symptômes, phénomène généralement admis et suggérant que le développement des espèces pathogènes est croissant au cours du temps, et que la présence de symptômes favoriserait l'apparition et le développement de nouveaux taxons (Wang *et al.* 2022).

Da Lio *et al.* (2018) ont démontré que *C. godetiae* et *C. fioriniae* sont les espèces majoritairement associées aux symptômes d'antracnose du noyer en France, en s'appuyant sur une approche culturale et par séquençage métabarcoding de la région ITS. Bien que ceux-ci ne soient pas décrits, le séquençage de l'ITS a également permis l'amplification d'un grand nombre d'autres taxons fongiques. De manière surprenante, il s'avère que seuls 2,64 % des lectures totales obtenues par le séquençage métabarcoding correspondent aux espèces de *Colletotrichum*, soit une part infime de la richesse et diversité fongique détectée dans les échantillons de bourgeons. Il n'est cependant pas possible de déterminer si ce faible pourcentage est dû à une sous-estimation des *Colletotrichum* du fait de l'utilisation d'amorces peu appropriées à ce genre fongique, aucun contrôle de type communautés synthétiques n'ayant été utilisé dans cette étude.

Ainsi, les deux approches présentées ci-dessus sont donc deux méthodes d'analyse complémentaires du phytomicrobiome d'échantillons environnementaux. Elles apportent à la fois des informations concordantes, ce qui vient renforcer les analyses, ainsi que des informations supplémentaires propres à chacune sur les communautés étudiées. Dans notre cas, l'approche culture-dépendante est essentielle pour évaluer l'étendue de la maladie au sein des échantillons, par l'estimation de la prévalence, soit le nombre d'organes infectés par une espèce

donnée par rapport au nombre total d'organes étudiés. Cette approche est de plus indispensable à la création d'une collection de travail ainsi qu'à la préservation de la biodiversité isolée, et à la caractérisation des espèces étudiées. L'une des principales limites de cette méthode est qu'elle ne permet d'étudier que la partie "cultivable" et prédominante des champignons associés aux échantillons, limite en grande partie palliée par le métabarcoding qui permet d'étudier la totalité de l'ADN fongique présent. Cette dernière présente toutefois des limites, particulièrement celles liées à la résolution taxonomique souvent au genre voire à l'espèce et à l'obtention de données de quantification relative.

L'analyse des communautés par le séquençage métabarcoding permet donc une description plus large des membres composant le phytomicrobiome, mais aussi de les quantifier en termes d'abondance relative et d'étudier leur structure en fonction de différents facteurs (par exemple, en fonction des types d'organe, facteurs climatiques, géographiques, pratiques culturales, etc.). Cependant, le séquençage métabarcoding ne permet pas de déterminer la contribution des membres dans le développement des symptômes. Il est dans ce cas nécessaire, soit d'être en possession des isolats obtenus grâce à l'approche culturale afin d'évaluer leur potentiel pouvoir pathogène, par la réalisation de tests de pathogénicité ou par le séquençage de leur génome afin d'évaluer leur teneur en gènes associés aux facteurs de pathogénicité, soit d'avoir recours à d'autres types d'approches permettant d'obtenir une représentation plus fonctionnelle du développement des symptômes telles que la métagénomique, la métatranscriptomique ou encore la métaprotéomique (Gutleben *et al.* 2018; Scholz *et al.* 2012). Par exemple, l'étude menée par Morales-Cruz *et al.* sur certains agents pathogènes fongiques associés à différentes maladies du bois de la vigne a mis en avant la complémentarité des analyses culture-dépendante, métagénomique et métatranscriptomique dans l'identification de la richesse taxonomique fongique d'échantillons de vigne mais aussi des mécanismes de pathogénicité (Morales-Cruz *et al.* 2018). L'analyse du transcriptome a permis de révéler la surexpression de gènes associés à la pathogénicité par les agents pathogènes étudiés (notamment les CAZymes - Carbohydrate-Active Enzymes et les transporteurs), mais aussi des différences d'expression en fonction des symptômes présents sur les échantillons traités. Dans une seconde étude portant sur l'analyse métatranscriptomique des communautés microbiennes dans des échantillons de bois dégradé ou asymptomatique de vigne, le rôle de ces communautés dans le développement des symptômes et en particulier celui des communautés virales a été démontré (Nerva *et al.* 2022). Ces études mettent toutes les deux en avant l'importance de s'intéresser à la partie fonctionnelle du pathobiome et du phytomicrobiome dans l'amélioration de la compréhension du développement de maladies.



### 3.3. Evaluation de la pathogénicité

Les approches présentées précédemment permettent d'identifier les espèces fongiques composant le phytomicrobiome et le pathobiome associés avec l'échantillon environnemental cible. La caractérisation de la pathogénicité d'une espèce est une étape clé dans l'étude de l'étiologie d'une maladie. En effet, la présence d'une espèce dans un échantillon symptomatique ne présume pas de son caractère pathogène. Pour vérifier cela, il faut s'assurer que cette espèce est capable de reproduire les symptômes étudiés par inoculations artificielles tout en ré-isolant l'espèce étudiée à partir des symptômes.

#### 3.3.1. Les facteurs de pathogénicité

La pathogénicité se traduit comme la capacité d'un organisme à provoquer une maladie et/ou à causer des dommages à un hôte. L'agressivité est une variable quantitative qui représente le degré de la pathogénicité, soit l'importance des symptômes et dommages causés par l'organisme (Manawasinghe *et al.* 2016). Les mécanismes moléculaires responsables de l'agressivité mettent en jeu ce qu'on appelle des facteurs de pathogénicité. Ces facteurs peuvent être des petites protéines sécrétées (ou Small Secreted Proteins, SPP) de type effecteurs, des molécules résultant du métabolisme secondaire tels que les toxines, des transporteurs, ou encore des enzymes telles que les enzymes de dégradation des parois cellulaires (ou Cell Wall Degrading Enzymes, CWDE). De nombreuses fonctions leur sont associées, telles que la pénétration dans l'hôte, la manipulation voire la suppression des défenses de l'hôte ou encore l'absorption de nutriments (Doehleermann *et al.* 2017; Peng *et al.* 2021).

Le développement des nombreuses techniques de séquençage dites de nouvelle génération (ou Next-Generation Sequencing) a permis d'étudier massivement les facteurs de pathogénicité chez de nombreux organismes notamment grâce au séquençage des génomes et des transcriptomes, dont des espèces de Botryosphaeriaceae. De nombreuses études ont ainsi mis en avant que les génomes d'espèces de Botryosphaeriaceae sont riches en enzymes de dégradation des hydrates de carbone, protéases, lipases ainsi que des gènes de biosynthèse de métabolites secondaires (Nagel *et al.* 2021).

La revue "*Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses*" (DOI 10.3390/pathogens11080951) a été publiée le 22 août 2022 dans le journal Pathogens, volume 11:8 (**Annexe 1**). Après une description des gènes associés aux facteurs de pathogénicité dans

le génome de principales espèces de Botryosphaeriaceae associées au dépérissement à Botryosphaeria de la vigne et de leur expression, elle présente les effets de ces facteurs sur le métabolisme de la vigne et les réponses défensives associées. Dans la mesure où très peu d'études ont mis en évidence les mécanismes de pathogénicité de ces espèces sur noyers, le modèle vigne semblait le plus pertinent pour réaliser une veille bibliographique sur le sujet.

### 3.3.2. Les postulats de Koch et leur application dans le contexte d'une maladie complexe

Les postulats de Koch présentés ci-après ont été définis dans le cadre du paradigme "un agent pathogène - une maladie". Ils doivent être vérifiés afin de pouvoir déterminer qu'un organisme cible est pathogène de l'hôte étudié :

1. L'organisme suspecté d'être responsable de la maladie doit être présent dans tous les organes symptomatiques étudiés ;
2. L'organisme suspecté doit être isolé à partir d'organes symptomatiques, cultivé et purifié ;
3. Quand une culture pure de l'organisme suspecté est inoculée à un hôte sain, les symptômes étudiés doivent être reproduits ;
4. L'organisme suspecté doit pouvoir être ré-isolé à partir des organes symptomatiques de l'hôte artificiellement infecté et doit présenter les mêmes caractéristiques que l'organisme isolé lors de la première étape et inoculé.

Ces postulats sont actuellement revisités, car le concept de pathobiome, illustrant l'implication d'un complexe d'espèces dans le développement d'une maladie et l'importance de ses interactions avec les autres microorganismes présents, est à prendre en considération pour certaines maladies. Ce complexe d'espèces peut impliquer des interactions entre espèces dont le pouvoir pathogène en tant que tel est établi mais aussi avec d'autres micro-organismes, non pathogènes en soi, composant le phytomicrobiome mais dont la présence peut faciliter ou inhiber le développement des symptômes. Les espèces du phytomicrobiome mises en jeu dans ces différentes interactions doivent aussi être considérées comme des actrices du développement ou non de la maladie (Mannaa & Seo 2021). Leur rôle dans le développement des symptômes peut être d'autant plus important dans le cas de maladies causées par des agents pathogènes dont une partie du cycle de vie se réalise sous une forme endophyte ne causant pas de symptômes visibles, comme c'est le cas pour le dépérissement du noyer. Ceci ne permet donc pas de valider les deux premiers postulats de Koch. L'intégration des méthodes omiques dans les postulats de Koch permet d'avoir une représentation plus globale des micro-organismes

présents, et par la suite de procéder à une mise en culture plus précise afin de vérifier leur pathogénicité (Byrd & Segre 2016). En outre, le développement d'une maladie ne dépend pas seulement des micro-organismes composant le phytomicrobiome, mais aussi d'autres facteurs tels que les pratiques culturales appliquées, la potentielle résistance ou sensibilité génétique de l'hôte à la maladie, l'âge de l'hôte ou encore les conditions météorologiques pouvant par exemple affaiblir son système immunitaire. Enfin, comme indiqué précédemment, il ne faut pas négliger les interactions entre les différents agents pathogènes et certaines espèces du phytomicrobiome, pouvant permettre de limiter leur développement et donc les symptômes, en lien avec l'évolution récente du postulat de Koch de "un agent pathogène, une maladie" à sa définition plus écologique proposée par Vonaesch *et al.* (2018): "un microbiote dysfonctionnel, une maladie". Les postulats de Koch ont particulièrement été réévalués dans le domaine de la biologie clinique et des maladies infectieuses et en particulier les maladies intestinales. Cette nouvelle interprétation des postulats de Koch prend en compte l'écosystème intestinal comme entité à part entière jouant un rôle dans le développement ou non de la maladie.

Bien qu'insuffisantes pour totalement valider la pathogénicité d'espèces participant à des maladies complexes, la réalisation d'inoculations artificielles reste indispensable pour évaluer le pouvoir pathogène des agents fongiques d'intérêt, mais aussi leur agressivité sur l'hôte en question. Dans le contexte du dépérissement du noyer, cela passe principalement par la mesure des nécroses provoquées sur branches ou sur fruits en fonction du modèle testé, en laboratoire (*in vitro*), sur plants en serre (*in planta*) ou directement en verger (*in natura*). Les tests au laboratoire sont à consolider par des analyses *in planta* et idéalement *in natura*, car la mise en place de réactions de défenses par la plante sont à prendre en compte dans l'établissement de la maladie (van Wyk *et al.* 2010).

### 3.3.3. Agressivité des espèces d'intérêt sur noyers

Il a ainsi été démontré que les espèces *B. dothidea*, *N. parvum*, *D. eres*, *C. godetiae* et *C. fioriniae* sont des agents pathogènes du noyer, capables de provoquer des symptômes de type brûlure et nécrose sur fruits et sur branches pour les trois premières, et des symptômes d'anthracnose sur fruits pour les deux dernières (**Tableau 4**). De plus, Varjas *et al.* (2020) ont constaté des brûlures de rameaux causées par *C. godetiae* et se sont donc intéressés à son pouvoir pathogène sur ce type de modèle. Ils ont ainsi démontré sa capacité à provoquer des symptômes sur des rameaux en vergers. Du fait de sa récente découverte, aucune information n'est à ce jour disponible concernant le pouvoir pathogène de *F. juglandicola* sur noyer (Crous *et al.* 2021). De plus, quelles que soient les études, *N. parvum* est toujours ou quasiment

toujours plus agressif que *B. dothidea* sur fruits et rameaux (**Tableau 4**), provoquant des nécroses plus sévères lorsque les inoculations sont réalisées à partir d'implants mycéliens par rapport à des suspensions de spores. Les espèces de *Colletotrichum* et *D. eres* semblent quant à elles présenter un pouvoir pathogène plus faible sur rameaux et sur fruits (**Tableau 4**). Il a en effet déjà été démontré que les espèces de ces deux genres sont associées à un pouvoir pathogène plus faible que certaines espèces de la famille des Botryosphaeriaceae (Jiménez Luna *et al.* 2022a; Mang *et al.* 2022; Moral *et al.* 2017).

Les variations d'agressivité qui peuvent être observées lors de réalisation de tests de pathogénicité peuvent résulter de différents facteurs, tels que la méthode d'inoculation (implant mycélien, suspension de spores, type d'incision, etc.), les conditions d'inoculation (âge de la culture, âge du modèle, tests réalisés en vergers ou sur organes détachés, cultivar, etc.), la durée de l'expérimentation, mais surtout de la grande diversité génétique et variabilité de virulence des différentes espèces et isolats (Antony *et al.* 2023; Chen *et al.* 2014a; Da Lio *et al.* 2018; López-Moral *et al.* 2022; Sohrabi *et al.* 2020). La méthode d'inoculation ayant un rôle important dans l'évaluation de la pathogénicité, des études se sont intéressées à la comparaison d'inoculations par implant mycélien et par suspension de spores. Alors que Chen *et al.* (2014a) ont démontré que *B. dothidea* et *N. parvum* ne présentaient pas de capacité à développer des symptômes sur fruits et sur branches de 2 ans en vergers lors d'inoculations avec une suspension de conidies de concentration  $1,0 \times 10^6$  conidies/mL, López-Moral *et al.* (2022) ont quant à eux démontré que *N. parvum* provoquait des nécroses sur branches détachées de 1 an en conditions contrôlées lors d'inoculation avec une suspension de concentration  $5,0 \times 10^4$  conidies/mL. Les deux études ont mis en évidence une taille de nécroses supérieure lorsque l'inoculation était réalisée à partir d'implants mycéliens. Ceci vient mettre en avant les nombreux facteurs intervenant dans l'évaluation de la pathogénicité et dans la variabilité d'agressivité constatée entre et au sein des espèces. En effet, il est possible de considérer que des essais réalisés en vergers et à l'aide de suspensions de conidies sont plus proches de la réalité du terrain dans laquelle se développe la maladie que des essais *in vitro* à partir d'implants mycéliens. Il a ainsi été démontré qu'il n'existait pas de corrélation linéaire entre la longueur des lésions provoquées sur branches détachées et sur branches en vergers (López-Moral *et al.* 2022). De plus, il est difficilement possible de comparer l'inoculation par implant mycélien et par suspension de spores, la première dépendant de l'âge de la culture et n'étant pas quantifiable, contrairement à la seconde.

Ces tests de pathogénicité sont traditionnellement réalisés en n'incluant qu'une seule espèce afin de satisfaire les postulats de Koch traditionnels, voire en intégrant plusieurs isolats appartenant à une espèce afin de tenir compte de la diversité intraspécifique. Cela ne permet toutefois pas de prendre en compte les interactions entre les différents membres du pathobiome, comme indiqué dans le paragraphe « 3.3.2. Les postulats de Koch et leur application dans le contexte d'une maladie complexe ». Il semble donc indispensable d'évaluer la pathogénicité en s'intéressant à différentes espèces composant le complexe d'espèces suspecté d'être responsable des symptômes, qui peuvent être inoculées au même moment ou encore de manière séquentielle. Ces dernières permettraient de mettre en avant de potentielles interactions facilitatrices ou compétitrices entre les espèces inoculées et détaillées dans le paragraphe suivant.

**Tableau 4. Longueur et diamètre des nécroses moyens après inoculation de Botryosphaeriaceae sp., Colletotrichum sp. et Diaporthe eres selon la méthode, le modèle, les conditions d'inoculation et le cultivar de *J. regia*.**

Méthode d'inoculation	Modèle	Cultivar de <i>Juglans regia</i>	Espèce inoculée	Conditions d'inoculation	Nécrose (mm)	Délai d'observation (jours)	Référence
Implant mycélien	Scion 1 an et demi	Chandler	<i>N. parvum</i>	<i>in natura</i> (Chili) Cultures âgées de 7 jours	100	90	Jiménez Luna <i>et al.</i> 2022a
	Plant 1 an	Apollo	<i>Dia. eres</i>	<i>in natura</i> (République tchèque) Cultures âgées de 7 à 20 jours	24	180	Eichemeier <i>et al.</i> 2020
		-	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i> Cultures âgées de 13 jours	9 33	30	Gusella <i>et al.</i> 2021
	Branches 2 ans	Chandler	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in natura</i> (Californie) Cultures âgées de 7 jours	26,10 ± 5,22	21	Chen <i>et al.</i> 2014a
					98 ± 17,02	21	
		Tulare	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	38,30 ± 5,08 134,17 ± 54,09	21 21		
	Vina	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	39,50 ± 16,45 146,00 ± 37,72	21 21			
	Milotai 10	<i>C. godetiae</i>	<i>in natura</i> (Hongrie)	12-17	14	Varjas <i>et al.</i> 2020	
	Branches 1 an	Chandler	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in natura</i> (Espagne) Cultures âgées de 10 jours	10,9 90,5	120 120	López-Moral <i>et al.</i> 2020b
		Chandler	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in natura</i> (Espagne) Cultures âgées de 10 jours	10,9 ± 2,2 90,8 ± 22,2	90 90	López-Moral <i>et al.</i> 2022

**Tableau 4. Suite.**

Méthode d'inoculation	Modèle	Cultivar de <i>Juglans regia</i>	Espèce inoculée	Conditions d'inoculation	Nécrose (mm)	Délai d'observation (jours)	Référence
Implant mycélien	Branches 1 an	Fernette	<i>B. dothidea</i>	<i>in natura</i> (Espagne)	23,2 ± 2,2	90	López-Moral <i>et al.</i> 2022
			<i>N. parvum</i>	Cultures âgées de 10 jours	40,8 ± 11,0	90	
		Hartley	<i>B. dothidea</i>		20,0 ± 1,4	90	
			<i>N. parvum</i>		105,0 ± 33,3	90	
		Howard	<i>B. dothidea</i>		19,7 ± 1,6	90	
			<i>N. parvum</i>		138,7 ± 24,3	90	
		Scharsch-Franquette	<i>B. dothidea</i>		20,3 ± 2,1	90	
	<i>N. parvum</i>		49,6 ± 17,3	90			
Serr	<i>B. dothidea</i>		20,9 ± 2,7	90			
	<i>N. parvum</i>		109,5 ± 28,7	90			
Sundland	<i>B. dothidea</i>		22,4 ± 1,7	90			
	<i>N. parvum</i>		170,8 ± 23,1	90			
Tulare	<i>B. dothidea</i>		25,4 ± 3,7	90			
	<i>N. parvum</i>		96,5 ± 6,2	90			
Branches détachées 1 an	Chandler	<i>B. dothidea</i>	<i>in vitro</i>	130,7	21	López-Moral <i>et al.</i> 2020b	
		<i>N. parvum</i>	Cultures âgées de 10 jours	134,3	21		
	Chandler	<i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i>	118	42	Antony <i>et al.</i> 2023	
	Chandler	<i>B. dothidea</i>	<i>in vitro</i>	35,6 ± 9,6	14	López-Moral <i>et al.</i> 2022	
		<i>N. parvum</i>	Cultures âgées de 10 jours	50,4 ± 6,3	14		
Fernette	<i>B. dothidea</i>		40,3 ± 6,8	14			
	<i>N. parvum</i>		101,3 ± 4,5	14			
Hartley	<i>B. dothidea</i>		51,2 ± 11,3	14			
	<i>N. parvum</i>		68,3 ± 5,3	14			

**Tableau 4. Suite.**

Méthode d'inoculation	Modèle	Cultivar de <i>Juglans regia</i>	Espèce inoculée	Conditions d'inoculation	Nécrose (mm)	Délai d'observation (jours)	Référence
Implant mycélien	Branches détachées 1 an	Howard	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i> Cultures âgées de 10 jours	47,6 ± 8,2 84,7 ± 3,6	14 14	López-Moral <i>et al.</i> 2022
		Scharsch-Franquette	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		36,9 ± 8,0 101,8 ± 13,1	14 14	
		Serr	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		79,2 ± 15,4 118,3 ± 4,7	14 14	
		Sundland	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		65,0 ± 4,7 73,1 ± 4,9	14 14	
		Tulare	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		73,8 ± 10,9 57,7 ± 0,6	14 14	
	Chandler	<i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i> Cultures âgées de 10 jours	154,1 ± 16,4	14	Lopez-Moral <i>et al.</i> 2022	
Branches détachées	-	<i>B. dothidea</i>	<i>in vitro</i>	74	10	Li <i>et al.</i> 2016	
	-	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i> Cultures âgées de 10 à 16 jours	49 175,40	40 40	Sohrabi <i>et al.</i> 2020	
Fruits	Chandler	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>	<i>in natura</i> (Californie) Cultures âgées de 7 jours	36,53 ± 0,90 56,33 ± 2,08	21 21	Chen <i>et al.</i> 2014a	
	Tulare	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		47,03 ± 4,30 56,00 ± 6,93	21 21		
	Vina	<i>B. dothidea</i> <i>N. parvum</i>		54,70 ± 2,38 60	21 21		



**Tableau 4. Suite.**

Méthode d'inoculation	Modèle	Cultivar de <i>Juglans regia</i>	Espèce inoculée	Conditions d'inoculation	Nécrose (mm)	Délai d'observation (jours)	Référence
Implant mycélien	Fruits	-	<i>C. fioriniae</i>	<i>in natura</i> (Hongrie)	10-19	14	Varjas <i>et al.</i> 2019
		Milotai 10	<i>C. godetiae</i>	<i>in natura</i> (Hongrie)	9-17	14	Varjas <i>et al.</i> 2020
	Fruits détachés	-	<i>B. dothidea</i>	<i>in vitro</i>	33	7	Gusella <i>et al.</i> 2021
			<i>N. parvum</i>	Cultures âgées de 14 jours	51	7	
		Lara	<i>C. fioriniae</i>	<i>in vitro</i>	27,0	19	Da Lio <i>et al.</i> 2018
			<i>C. godetiae</i>	-	39,0	19	
-	<i>C. fioriniae</i>	<i>in vitro</i>	10-19	14	Varjas <i>et al.</i> 2019		
-	-	-	-	-	-	-	
Suspension de spores	Branches détachées 1 an	Chandler	<i>N. parvum</i>	<i>in vitro</i> 5,0 x 10 <sup>4</sup> conidies/mL	63,3 ± 11,7	14	Lopez-Moral <i>et al.</i> 2022

### 3.4. Pathobiome et interactions

L'étude des interactions est un point essentiel de l'étude du pathobiome associé à une maladie. En effet, les approches culture-dépendante et -indépendante présentées ci-dessus (paragraphe « 3.2.1 Méthodes d'identification des agents pathogènes ») apportent des informations cruciales concernant la composition en espèces fongiques des échantillons environnementaux étudiés et la dynamique des communautés. Par ailleurs, ces résultats peuvent être exploités afin d'évaluer certaines corrélations et co-occurrences entre les membres composant ces communautés. Ces études peuvent ainsi mettre en avant de potentielles interactions positives (par exemple facilitatrices) et négatives (par exemple compétitrices ou antagonistes) qui peuvent par la suite être évaluées à l'aide de tests de pathogénicité. Il est indispensable de chercher à reproduire et observer ces interactions lors d'expérimentations, les analyses *in silico* n'étant pas suffisantes pour démontrer l'existence de ces interactions. En effet, une corrélation ne signifie pas qu'il existe une relation de cause à effet. Deux taxons peuvent être corrélés positivement sans que cela ne soit forcément lié à une interaction de type facilitatrice mais tout simplement parce qu'ils partagent les mêmes besoins trophiques et/ou le même habitat. A l'inverse, deux taxons corrélés négativement ne signifient pas forcément une interaction de type antagoniste mais peut être le reflet d'une spécificité d'hôtes ou de niches, ou celui d'une succession des communautés au cours de la maturation du fruit par exemple. Il est donc nécessaire de comparer des échantillons qui proviennent du même type d'organes et à un même stade de développement (notamment pour les fruits). Malgré ces limites, ces différentes analyses peuvent permettre de dégager des hypothèses sur de potentielles interactions mutualistes, neutres ou encore compétitrices entre différentes espèces pathogènes, mais aussi entre ces espèces pathogènes et d'autres espèces non pathogènes, permettant ainsi d'identifier des taxons potentiellement d'intérêt en lutte biologique. Différents types d'interaction mettant en jeu des agents pathogènes entre eux ou avec d'autres membres du phytomicrobiome ont d'ores et déjà été décrites, illustrant le concept de pathobiome et sont précisées ci-après.

Silva-Valderrama *et al.* (2021) se sont ainsi intéressés aux espèces endophytes de la vigne comme potentiels agents de lutte biologique contre certains agents pathogènes responsables de maladies du bois de la vigne, dont *N. parvum*, s'appuyant ainsi sur le paradigme "1 pathogène + 1 communauté = 0 maladie" (Byrd & Segre 2016). Parmi les 6 espèces endophytes testées (*Trichoderma* sp., *Clonostachys rosea*, *Cladosporium* sp., *Epicoccum*

*nigrum*, *Purpureocillium lilacinum* et *Chaetomium* sp.), toutes ont présenté une activité antagoniste et une capacité à réduire la croissance de *N. parvum* en dual-culture (Silva-Valderrama *et al.* 2021). La co-inoculation d'espèces pathogènes sur matériel végétal permet aussi d'évaluer de potentielles interactions de type synergiques ou antagonistes entre ces espèces. Lors de co-inoculations séquentielles d'*Ilyonectria macrodidyma*, responsable de la maladie du pied noir de la vigne, et de *D. seriata* par immersion de racines de ceps de Chardonnay dans une suspension de conidies et de mycélium d'*I. macrodidyma* puis le dépôt d'une suspension de conidies de *D. seriata* à la surface de la terre à 7 semaines d'intervalle, l'association des deux espèces entraînait un développement de symptômes, de type nécroses sur le porte-greffe, supérieur à celui observé lors d'inoculations simples d'*I. macrodidyma*, sans que l'on sache attribuer ce développement de symptômes accrus à un meilleur développement de l'une et/ou l'autre espèce (Whitelaw-Weckert *et al.* 2013). En outre, il a été démontré que l'inoculation de *N. mediterraneum* 4 jours après *Dia. rhusicola* (syn. *Dia. foeniculina*) entraînait le développement de nécroses significativement plus longues que lors de l'inoculation de *Dia. rhusicola* seule mais moins longues que celles provoquées par *N. mediterraneum* seul. Ces résultats ont été constatés sur branches détachées mais aussi en vergers et sur fruits détachés de noyer. L'hypothèse émise face à ces résultats est que le délai de croissance (4 jours de différence) peut être responsable de cette différence, et qu'un délai d'expérimentation plus long pourrait potentiellement permettre d'obtenir des nécroses plus longues que celles provoquées par *N. mediterraneum* seul (Agustí-Brisach *et al.* 2019).

L'analyse de réseaux d'interaction et de co-occurrence présente l'intérêt d'étudier les interactions au sein de la communauté microbienne la plus large possible obtenue à partir de données de séquençage d'ADN total. Bekris *et al.* (2021) ont mené une étude sur le phytomicrobiome du bois de la vigne et les schémas de co-occurrence entre les principaux genres fongiques responsables de maladies du bois de la vigne et les autres genres fongiques et bactériens présents dans des échantillons asymptomatiques et symptomatiques. Une co-occurrence significativement négative, c'est-à-dire une présence moindre d'un agent lorsque l'autre était présent, a été mise en avant entre le genre *Alternaria* et les genres *Phaeoacremonium* et *Phaeomoniella* (tous les deux associés aux maladies du bois de la vigne) dans des échantillons asymptomatiques. Ces co-occurrences, absentes dans les échantillons symptomatiques et associées à la présence systématique du genre *Alternaria* dans les échantillons asymptomatiques, suggèrent soit, que ce genre pourrait présenter un rôle de suppression dans le développement des maladies du bois de la vigne et potentiellement des

interactions négatives sur le développement des genres fongiques pathogènes, soit qu'il est un faible compétiteur et est moins capable de se développer en présence des deux autres genres (Bekris *et al.* 2021). Dans le noyer, la forte présence d'espèces du genre *Alternaria* dans des échantillons asymptomatiques (à la fois de racines, feuilles, rameaux et de fruits) a également été constatée (Wang *et al.* 2020, 2022; Yabaneri & Sevim 2023), un effet antagoniste de ce genre ayant déjà été démontré contre *O. leptostyla* (Yabaneri & Sevim 2023). Des co-occurrences négatives ont aussi été constatées entre les genres pathogènes fongiques *Phaeomoniella* et *Seimatosporum* et le genre bactérien *Bacillus*, ainsi qu'entre *Phaeoacremonium* et le genre bactérien *Streptomyces* dans les échantillons asymptomatiques. Ces deux genres bactériens ayant déjà été étudiés pour leur potentiel intérêt en tant qu'agents de lutte biologique contre les espèces pathogènes associées aux maladies du bois de la vigne (Cobos *et al.* 2022), la détection de ces co-occurrences négatives dans les échantillons asymptomatiques conforte leur potentiel suppresseur des genres fongiques cités (Bekris *et al.* 2021). Une co-occurrence négative a aussi été mise en évidence entre le genre *Diaporthe* et le genre *Fomitiporia*, pouvant indiquer une certaine compétition entre ces deux agents pathogènes et un développement préférentiel de l'une ou de l'autre maladie dont ils sont chacun responsables en fonction de l'abondance de ces deux genres dans les échantillons (Bekris *et al.* 2021).

### **3.5. Étude de la diversité intraspécifique et apport de la génétique des populations sur les questions en lien avec l'épidémiologie**

L'analyse des communautés fongiques peut être approfondie par une analyse moléculaire permettant d'évaluer la diversité génétique existant au sein d'une même espèce. Cette étude de la diversité intraspécifique permet d'obtenir des informations essentielles sur le degré de diversité, la répartition et l'évolution des populations en fonction des zones géographiques de l'hôte ou encore du type d'organe, mais contribue aussi à déterminer les potentielles sources d'inoculum, les voies d'introduction des agents pathogènes et transmission entre hôtes ainsi que le degré de recombinaison sexuée versus asexuée, points cruciaux dans le cas de maladies émergents. Enfin, il est important de considérer la variabilité de l'agressivité des souches pour caractériser la participation d'une espèce dans le développement d'une maladie.

L'étude de la génétique des populations repose principalement sur la sélection de marqueurs moléculaires polymorphes au niveau intraspécifique. Les marqueurs microsatellites

(SSR ou Simple Sequence Repeats) et SNP (Single Nucleotide Polymorphism) font partie des marqueurs de référence les plus communément utilisés à l'heure actuelle (Guichoux *et al.* 2011), tandis que les méthodes basées sur l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou encore la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) font désormais partie des méthodes plus obsolètes de par leur manque de reproductibilité et de comparaison des résultats obtenus de différentes études. De plus, ces méthodes présentent aussi un certain manque de précision dans la lecture des résultats, la différenciation d'amplicons de taille proche ainsi que la numération des amplicons dans le cas d'un très grand nombre étant particulièrement difficile lors de la migration sur gel d'électrophorèse (Borah *et al.* 2018; Oliveira & Azevedo 2022; Tsedaley 2015).

Les études présentées ci-après s'appuient sur l'utilisation des méthodes RAPD, MP-PCR, ainsi que sur le séquençage de régions microsatellites. La méthode RAPD se base sur l'amplification aléatoire de régions polymorphes de l'ADN (Bardakci 2001), tandis que la MP-PCR consiste en l'amplification de régions de l'ADN située à une distance amplifiable entre deux séquences microsatellites identiques (Weising *et al.* 1995). L'analyse des résultats de ces deux méthodes consiste principalement en la révélation par électrophorèse. Le SSR-seq, ou séquençage de marqueurs microsatellites, consiste à développer des amorces spécifiques à partir de génomes disponibles afin de cibler les régions les plus polymorphes au sein des espèces étudiées. L'obtention des génotypes est ensuite permis par le séquençage des régions microsatellites amplifiées (Lepais *et al.* 2020). Ces régions sont des séquences d'ADN ubiquitaires des génomes eucaryotes, hautement polymorphes et reproductibles, co-dominantes, et se caractérisent par la répétition en tandem de motifs variant de 1 à 6 bases (Guichoux *et al.* 2011; Jarne & Lagoda 1996; Tautz & Renz 1984).

De nombreux outils d'empreinte génétique ont été développés et appliqués à l'étude de populations de *B. dothidea* et *N. parvum* soutenant ainsi l'hypothèse de transmission entre différents hôtes et différents pays. Ma *et al.* (2001) ont réalisé une étude comparative de populations de *B. dothidea* collectés dans différents comtés de Californie à partir de pistachiers, mûriers, eucalyptus, pacaniers, saules et noyers, associée à une combinaison des techniques RAPD et MP-PCR pour un total de 23 marqueurs étudiés (Ma *et al.* 2001). Les populations associées à des hôtes natifs (saules, mûriers et noyers de Californie) présentaient une diversité génétique supérieure à celles associées à des hôtes relativement nouvellement introduits (pacaniers, pistachiers et eucalyptus) sans mettre en évidence de forte différenciation génétique

en fonction de l'hôte, mettant ainsi en avant une potentielle transmission entre ces différents types d'hôtes (Ma et al., 2001). Les profils génétiques de *B. dothidea* isolés de pistachiers ont ensuite été comparés sur 11 ans, entre 1990 et 2001 par MP-PCR sur la base de 116 marqueurs. Les résultats ont montré une stabilité spatio-temporelle au sein des populations étudiées du fait d'une identité génétique particulièrement élevée entre les populations des différents vergers échantillonnés et entre les différentes années de prélèvement (Ma et al. 2003). Il serait toutefois intéressant de s'assurer que cette stabilité se vérifie en ayant recours aux marqueurs de référence actuels.

Plus récemment, Manawasinghe *et al.* (2018) ont réalisé une étude comparative de populations de *B. dothidea* de vignes provenant de différentes régions de Chine, d'Australie, du Canada, de Thaïlande et d'Italie, ainsi que d'isolats provenant d'autres hôtes (pommier, poirier, pêcher et théier) par séquençage de 6 régions microsatellites ou SSR. La totalité des isolats de cette étude provenaient de matériel végétal présentant des symptômes de dépérissement, afin d'améliorer la compréhension de l'émergence du dépérissement du vignoble en Chine. Cette étude a permis de mettre en avant un mode de reproduction majoritairement clonal au sein des différentes populations étudiées ainsi qu'une très faible différenciation génétique en fonction de l'hôte et des zones géographiques. Sur la base de ces résultats, trois voies possibles d'émergence du dépérissement sur vignes en Chine ont été suggérées : la transition d'un mode de vie endophyte à pathogène sous l'effet de stress abiotiques subis par l'hôte, la transmission par l'introduction de matériel végétal, et la transmission de proche en proche à partir d'autres hôtes (Manawasinghe *et al.* 2018; Marsberg *et al.* 2017). En utilisant la même méthode, Mehl *et al.* (2017) ont également montré une faible différenciation génétique entre des populations de *N. parvum* provenant de d'un hôte natif (le marula) et d'un hôte cultivé (le manguier) de différentes localités d'Afrique du Sud, en accord avec la capacité de *N. parvum* à coloniser une large diversité d'hôtes.

En résumé, ces études concernant les espèces *B. dothidea* et *N. parvum* permettent de dégager des conclusions communes, et ce malgré la diversité des marqueurs utilisés. Les populations étudiées présentent majoritairement un mode de reproduction principalement clonal et un faible niveau de diversité génétique sans différenciation géographique ni en fonction de l'hôte, hormis lors de développement sur des hôtes non cultivés et dans des environnements sauvages. Elles confirment la caractérisation d'une faible spécificité d'hôtes chez ces espèces et vraisemblablement une capacité de transmission d'hôte en hôte, et ce à l'échelle mondiale compte tenu de la détection de génotypes communs à différentes zones géographiques.

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la diversité génétique et de la structure des populations de *B. dothidea* et de *N. parvum* provenant de noyers. Ainsi, seules les études génétiques concernant ces deux espèces ont fait l'objet de cette partie, en intégrant les résultats associés aux méthodes plus anciennes (RAPD et MP-PCR) compte tenu du faible nombre d'études de la structure génétique de populations de Botryosphaeriaceae basées sur les marqueurs SSR et l'absence d'études basées sur les marqueurs SNPs.

## RESULTATS





CHAPITRE I - Mise au point méthodologique du séquençage  
métabarcoding pour son application aux échantillons  
environnementaux de noyer



# I. Introduction des travaux

Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, l'analyse des écosystèmes par une approche de séquençage métabarcoding apporte une vision plus large et plus fine des communautés fongiques. Toutefois, de nombreux biais méthodologiques sont associés à ces techniques, qu'il convient d'évaluer. Tout d'abord, le séquençage d'un seul gène barcode, tel que la région ITS et ses sous-régions ITS1 et ITS2, n'étant généralement pas suffisant pour une identification précise à l'échelle de l'espèce voire du genre, il est important de s'assurer de la résolution taxonomique des amorces utilisées. De plus, la diversité des outils et des paramètres disponibles pour l'analyse bioinformatique des résultats de séquençage peut fortement impacter l'analyse des données. Il est donc important de comparer et d'évaluer la performance des pipelines d'analyses et de vérifier qu'ils sont adaptés à l'écosystème analysé. Ces constats nous ont conduits à comparer les différentes paires d'amorces, ciblant tout ou une partie de la région ITS, et outils d'analyse bioinformatique vis-à-vis de leur spécificité et application concernant les principales espèces fongiques ciblées durant ces travaux. Pour ce faire, nous avons eu recours à des communautés fongiques synthétiques de composition et de concentration connues, ou mock, afin (i) de s'assurer de la bonne amplification des espèces d'intérêt par les amorces, (ii) d'évaluer les potentielles sur- ou sous-estimation de l'abondance relative de ces espèces, et (iii) d'évaluer la résolution taxonomique de ces amorces en fonction des différents outils bioinformatiques utilisés.

Après avoir cherché dans la littérature des amorces potentiellement adaptées au sujet d'étude, puis testé *in silico* leur capacité à amplifier et différencier des genres/espèces fongiques classiquement isolées de noyers (travail non présenté dans l'article), une paire d'amorces ciblant la région ITS, une paire d'amorces ciblant la région ITS1 et 3 paires d'amorces amplifiant la région ITS2 (dont une modifiée pour ces travaux sur la base d'amorces publiées ; Morales-Cruz *et al.* 2018) ont été utilisées pour amplifier l'ADN de mocks, puis comparées. Enfin, l'analyse des communautés fongiques d'échantillons de brous de noix et de rameaux symptomatiques a été réalisée à l'aide des paires d'amorces les plus adaptées et d'une analyse bioinformatique incluant ou non l'outil ITSx.

**Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Plants*, présenté en partie II du présent chapitre.**

## II. Article publié dans *Plants*

**Belair, M.**, Pensec, F., Jany, J.-L., Le Floch, G., Picot, A. Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding. *Plants* **2023**, *12*, 2383. doi: 10.3390/plants12122383.

Article

# Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding

Marie Belair , Flora Pensec , Jean-Luc Jany, Gaétan Le Floch  and Adeline Picot \*

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, INRAE, University Brest, F-29280 Plouzané, France

\* Correspondence: [adeline.picot@univ-brest.fr](mailto:adeline.picot@univ-brest.fr)

**Abstract:** Walnut dieback can be caused by several fungal pathogenic species, which are associated with symptoms ranging from branch dieback to fruit necrosis and blight, challenging the one pathogen–one disease concept. Therefore, an accurate and extensive description of the walnut fungal pathobiome is crucial. To this end, DNA metabarcoding represents a powerful approach provided that bioinformatic pipelines are evaluated to avoid misinterpretation. In this context, this study aimed to determine (i) the performance of five primer pairs targeting the ITS region in amplifying genera of interest and estimating their relative abundance based on mock communities and (ii) the degree of taxonomic resolution using phylogenetic trees. Furthermore, our pipelines were also applied to DNA sequences from symptomatic walnut husks and twigs. Overall, our results showed that the ITS2 region was a better barcode than ITS1 and ITS, resulting in significantly higher sensitivity and/or similarity of composition values. The ITS3/ITS4\_KYO1 primer set allowed to cover a wider range of fungal diversity, compared to the other primer sets also targeting the ITS2 region, namely, GTAA and GTAAm. Adding an extraction step to the ITS2 sequence influenced both positively and negatively the taxonomic resolution at the genus and species level, depending on the primer pair considered. Taken together, these results suggested that Kyo set without ITS2 extraction was the best pipeline to assess the broadest fungal diversity, with a more accurate taxonomic assignment, in walnut organs with dieback symptoms.

**Keywords:** metabarcoding; internal transcribed spacer (ITS); mock communities; environmental DNA (eDNA); walnut dieback; fungal pathogens



**Citation:** Belair, M.; Pensec, F.; Jany, J.-L.; Le Floch, G.; Picot, A. Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding. *Plants* **2023**, *12*, 2383. <https://doi.org/10.3390/plants12122383>

Academic Editor: Hazem Salaheldin Elshafie

Received: 3 May 2023

Revised: 6 June 2023

Accepted: 12 June 2023

Published: 20 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Walnut (*Juglans regia* L.) cultivation is one of the most important cultivations of nut crops worldwide, reaching more than 3.5 billion tons and 1.1 million hectares in 2021 [1]. China is the leading walnut producer, followed by the United States and Iran, while Europe ranks 5th [1]. Walnut orchards are usually affected by various pathogens, including *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*, which causes walnut blight, *Ophiognomonia leptostyla* and species from the *Colletotrichum acutatum* species complex, both responsible for walnut anthracnoses, as well as *Geosmithia morbida*, the causal agent of the “Thousand canker disease” [2–5]. Walnut dieback has also been frequently reported in California [6] as well as in Mediterranean-climate countries such as Spain [6,7], Italy [8], Turkey [9], and Czech Republic [10] over the past decade and more recently in France [11]. This fungal disease is characterized by symptoms such as fruit necrosis and blight, twig defoliation and dieback as well as branch canker up to host death [6–11]. The *Botryosphaeriaceae* family, mainly represented by the *Botryosphaeria*, *Diplodia* and *Neofusicoccum* genera, and *Diaporthe* spp. (teleomorph of *Phomopsis* spp.) were described as the causal agents in these countries; however, other pathogenic fungi such as *Colletotrichum* spp. and *Fusarium* spp. could be present in smaller proportions and participate in walnut decay and twig dieback [6,7,11–13]. Walnut dieback is thus likely to be caused by complexes of species working synergistically

and/or antagonistically to create, foster or mitigate disease onset and development as it has been demonstrated for dieback diseases affecting other tree crops such as vines [14]. As such, this disease is an excellent illustration of the pathobiome concept that can be defined as “the set of host-associated organisms associated with reduced (potentially reduced) health status, as a result of interactions between members of that set and the host” [15]. It is therefore important to investigate and thoroughly describe the fungal pathogens associated with these new symptoms in walnut orchards without neglecting the contribution of other members of the microbiota to disease development. To do so, environmental DNA (eDNA) metabarcoding represents a powerful culture-independent technique to decipher the mycobiota of affected walnut organs as well as their associations and thus gain access to the pathobiome functioning [16–20].

Metabarcoding has been extensively used to assess microbial diversity of various agroecosystems [21–24]. Recently, this method has been used to evaluate fungal diversity associated with leaves [25] and buds [5] of diseased walnut trees. Metabarcoding success and accuracy depend on the selection of the targeted region, the design of primer pairs, and the choice of adapted bioinformatic analysis pipelines [26–29]. It is then important to define an adapted and tailored analysis method for each ecosystem, considering the biases that may arise at each step of eDNA metabarcoding [26] from polymerase chain reaction (PCR) parameters and amplification [30–33] to taxonomic assignment of final reads during bioinformatic analysis [34]. The internal transcribed spacer (ITS) region is the universal barcode used to study fungal communities [35], and many studies have designed universal primers for the amplification of this region for a large number of fungal species [36–45].

In order to validate an analysis method, a mock community control is highly recommended [26,46]. It is composed of DNA solutions of known organisms, likely to be encountered in the targeted ecosystem, and mixed in known proportions. This positive control enables to evaluate and estimate numerous experimental, sequencing and bioinformatic analysis biases during sample preparation and DNA extraction, PCR sequence amplification (e.g., over- or under-representation of taxa and chimera formation), and taxonomic assignment [28,46–49].

To the best of our knowledge, our study is the first to validate metabarcoding protocols and assess fungal pathogen diversity associated with walnut diseases based on mock communities. The aim of this study was to define a metabarcoding methodology enabling the characterization of walnut fungal pathobiome associated with walnut dieback disease with an accurate taxonomic resolution up to the genus or species level. The validated method was subsequently applied on symptomatic husk and twig samples from walnut orchards.

## 2. Results

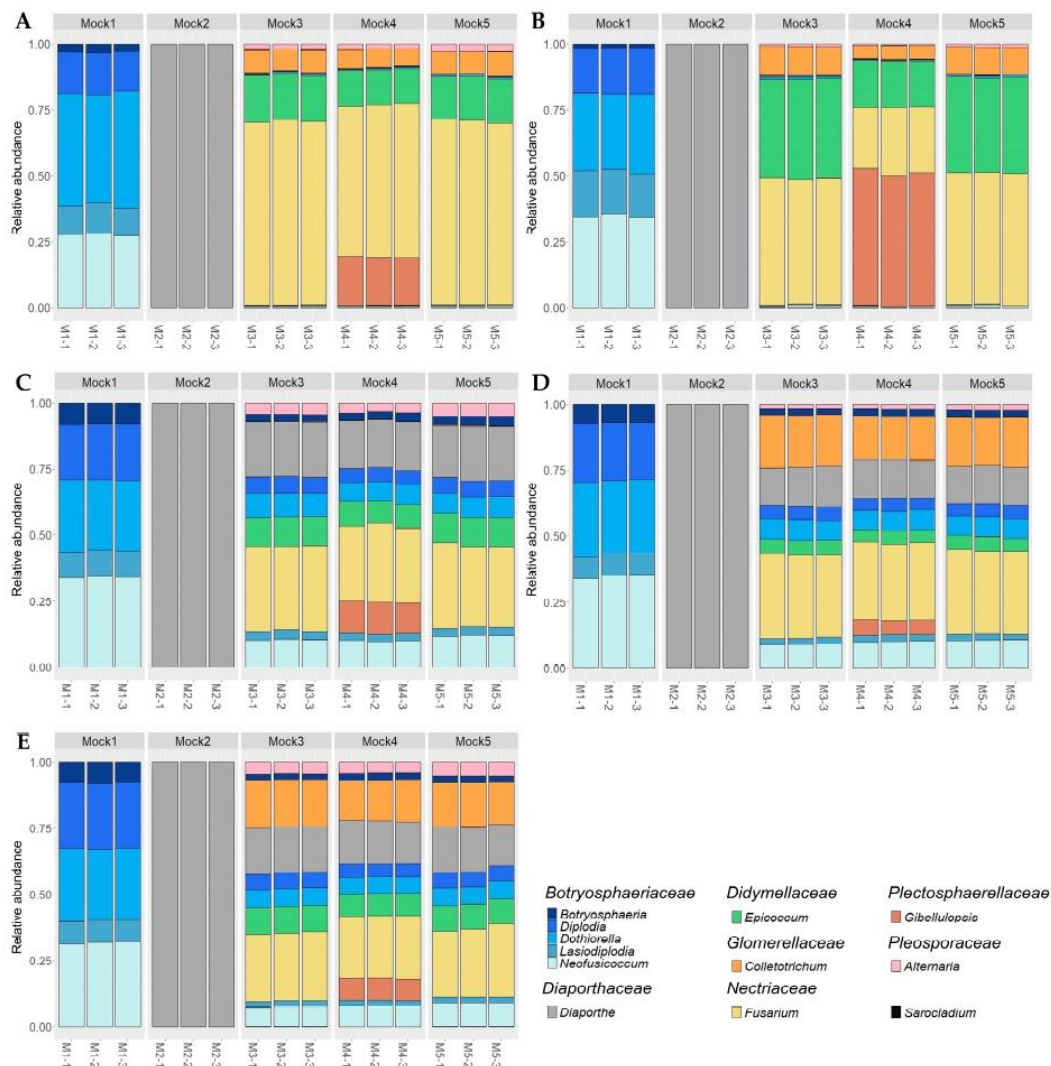
### 2.1. Analysis of Mock Communities and Identification of the Best Primer Sets

To evaluate the performance of each combination of primer pairs and pipelines in characterizing fungal mycobiota associated with symptomatic walnut organs, five mock communities, comprising between 5 to 18 fungal pathogenic and endophytic/saprophytic walnut-associated DNA species, were sequenced using Illumina MiSeq metabarcoding.

After read filtering, a total number of 3,509,971 sequence reads were obtained from 15 mock community samples (5 mocks  $\times$  3 replicates) and all primer pairs, with a mean number of sequences per sample ranging from  $32,318 \pm 5232$  (GTAAm) to  $78,792 \pm 18,049$  (Kyo) and a retention percentage of at least 41.6% after read trimming and filtering (Table S1). Rarefaction curves plotting the sequencing depth against the number of ASVs showed that the plateau phase was reached for every community and every primer set (Figure S1).

The distribution of genera showed a high repeatability between replicates irrespective of the mock and primer set (Figure 1). In addition, walnut DNA did not affect the quality of metabarcoding sequencing as shown by the similar distribution between Mock3 and Mock5 (Figure 1). Furthermore, similarity of composition values were not significantly different between these two mock communities ( $p = 0.2997$ , Kruskal-Wallis test).





**Figure 1.** Histograms showing the relative abundance at the genus level for each replicate (−1, −2, −3) of mock communities (M1, M2, M3, M4, M5) according to metabarcoding sequencing based on the five primer sets: ITS (A), ITS1 (B), GTAA (C), GTAAm (D) and Kyo (E). Genera are ordered by family taxonomic rank in the legend. The *Sarocladium* genus is shown separately because it is not a component taxon of the mock communities and is identified as a contaminant genus.

All primer sets demonstrated the ability to detect *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species when these species were not mixed with others (Mock1 and Mock2) as shown by the high sensitivity values (Tables 1 and 2). However, they did not detect the complete diversity of Mock3, Mock4 and Mock5. The ITS1 primer set detected the lowest number of genera (up to 8 species out of 18 in at least one replicate of Mock4), and GTAA failed to amplify *Colletotrichum godetiae*, and its ability to detect *C. fioriniae* was relatively low (between 60 and 116 reads depending on replicate; Table 1). Moreover, considering the most diverse mock community (Mock4), no significant correlations were found between obtained and expected relative abundances for ITS ( $R = 0.012$  and  $p = 0.95$ ) and ITS1 sets ( $R = -0.17$  and  $p = 0.35$ ) mainly because of an overrepresentation of *Fusarium*, *Epicoccum* and *Gibellulopsis* genera and an underrepresentation of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species (Figures 1 and 2).



**Table 1.** Genus recovery and primer sensitivity on mock communities. Cells were subdivided when results differed between replicates. Green cells correspond to True Positive (TP) ASVs (i.e., detected and well assigned at the genus level), blue and red cells to False Negative (FN) ASVs (i.e., detected but inaccurately assigned at the genus level, or not detected, respectively) and gray cells to species not involved in the mock community.

Fungal Species Included in Mock Communities	Mock1					Mock2					Mock3					Mock4					Mock5				
	ITS	ITS1	GTAA	GTAAM	Kyo	ITS	ITS1	GTAA	GTAAM	Kyo	ITS	ITS1	GTAA	GTAAM	Kyo	ITS	ITS1	GTAA	GTAAM	Kyo	ITS	ITS1	GTAA	GTAAM	Kyo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Diplodia seriata</i>	Blue	Blue	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Blue	Blue	Green	Green	Green	Blue	Blue	Green	Green	Green	Blue	Blue	Green	Green	Green
<i>Dothiorella omnivora</i>	Green	Green	Green	Green	Blue	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Blue	Green	Green	Green	Green	Blue	Green	Green	Green	Green	Blue
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>N. parvum</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Diaporthe amygdali</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Dia. eres</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Dia. foeniculina</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Dia. novem</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Dia. rudis</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Epicoccum nigrum</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>C. godetiae</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green
<i>Fusarium juglandicola</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>F. solani</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Blue	Blue	Blue
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Blue	Blue	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray
<i>Alternaria alternata</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

**Table 2.** Sensitivity, precision and similarity of composition values and number of ASVs for each mock community and each primer pair. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation over the three technical replicates when they showed different values. ASVs assigned to *Sarocladium* were not taken into account for the calculation of the performance criteria.

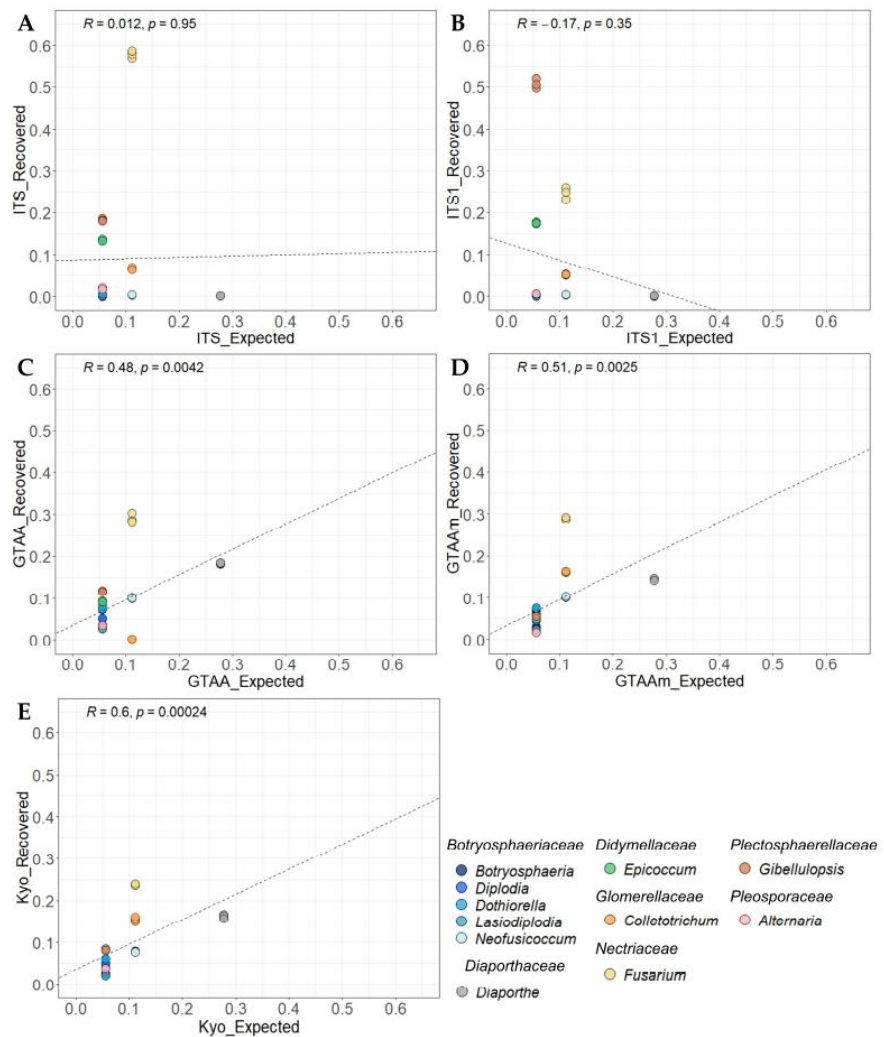
Sample (Number of Expected ASVs)	Primer Set	Sensitivity	Precision	Similarity of Composition	Number of Obtained ASVs
Mock1 (6 ASVs)	ITS	0.833 <sup>b</sup>	0.045 <sup>c</sup> $\pm$ 0.001	0.739 <sup>c</sup> $\pm$ 0.016	113 $\pm$ 3.6
	ITS1	0.833 <sup>b</sup>	0.242 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.007	0.845 <sup>a</sup> $\pm$ 0.003	21.7 $\pm$ 0.6
	GTAA	1 <sup>a</sup>	0.500 <sup>a</sup>	0.846 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.001	12
	GTAAm	1 <sup>a</sup>	0.250 <sup>ab</sup>	0.820 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.002	24
	Kyo	0.833 <sup>b</sup>	0.114 <sup>bc</sup>	0.814 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.004	45
Mock2 (5 ASVs)	ITS	1 <sup>a</sup>	0.099 <sup>b</sup> $\pm$ 0.002	1 <sup>a</sup>	50.3 $\pm$ 1.1
	ITS1	1 <sup>a</sup>	0.341 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.014	1 <sup>a</sup>	14.7 $\pm$ 0.6
	GTAA	1 <sup>a</sup>	0.500 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	10
	GTAAm	1 <sup>a</sup>	0.278 <sup>abc</sup>	1 <sup>a</sup>	18
	Kyo	1 <sup>a</sup>	0.135 <sup>bc</sup>	1 <sup>a</sup>	37
Mock3 (17 ASVs)	ITS	0.941 <sup>a</sup>	0.178 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.003	0.301 <sup>c</sup> $\pm$ 0.007	90.7 $\pm$ 1.5
	ITS1	0.804 <sup>b</sup> $\pm$ 0.068	0.518 <sup>b</sup> $\pm$ 0.032	0.324 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.005	27.3 $\pm$ 0.6
	GTAA	0.882 <sup>ab</sup>	0.454 <sup>ab</sup>	0.710 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.003	34
	GTAAm	0.941 <sup>a</sup>	0.253 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.002	0.702 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.010	64.3 $\pm$ 0.6
	Kyo	0.882 <sup>ab</sup>	0.115 <sup>c</sup>	0.749 <sup>b</sup> $\pm$ 0.005	132
Mock4 (18 ASVs)	ITS	0.870 <sup>b</sup> $\pm$ 0.032	0.154 <sup>b</sup> $\pm$ 0.011	0.325 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.003	103.7 $\pm$ 4.9
	ITS1	0.685 <sup>b</sup> $\pm$ 0.085	0.457 <sup>a</sup> $\pm$ 0.056	0.292 <sup>c</sup> $\pm$ 0.001	28
	GTAA	0.889 <sup>ab</sup>	0.453 <sup>a</sup> $\pm$ 0.015	0.707 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.006	36.3 $\pm$ 1.1
	GTAAm	0.944 <sup>a</sup>	0.260 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.002	0.751 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.006	66.3 $\pm$ 0.6
	Kyo	0.889 <sup>ab</sup>	0.115 <sup>b</sup>	0.769 <sup>b</sup> $\pm$ 0.007	140.7 $\pm$ 0.6
Mock5 (17 ASVs)	ITS	0.941 <sup>a</sup>	0.178 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.007	0.312 <sup>c</sup> $\pm$ 0.006	91 $\pm$ 3.5
	ITS1	0.706 <sup>b</sup> $\pm$ 0.059	0.495 <sup>b</sup> $\pm$ 0.025	0.327 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.020	25.3 $\pm$ 3.0
	GTAA	0.882 <sup>ab</sup>	0.454 <sup>ab</sup>	0.731 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.009	34
	GTAAm	0.941 <sup>a</sup>	0.255 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.002	0.718 <sup>abc</sup> $\pm$ 0.005	63.7 $\pm$ 0.6
	Kyo	0.882 <sup>ab</sup>	0.117 <sup>c</sup> $\pm$ 0.004	0.764 <sup>b</sup> $\pm$ 0.009	129.7 $\pm$ 4.0

Lowercase letters indicate significant differences at 0.05 threshold based on Dunn's test. Statistical comparisons were performed by mock and by column.

Compared to ITS and ITS1 primer pairs, the three other sets targeting the ITS2 barcode showed overall better performance in terms of sensitivity and/or similarity of composition; however, Kyo was associated with the lowest precision values along with ITS. This discrepancy is mainly caused by metabarcoding sequencing with these primer pairs that generated supernumerary ASVs, thus overestimating the number of ASVs obtained compared to the expected number of ASVs and leading to low precision values at the ASV scale. First, GTAAm degenerated primer pair permitted the amplification and detection of *Colletotrichum* in addition to other genera of interest when compared with GTAA (Figure 1C,D). GTAAm was also associated with significantly higher sensitivity values than ITS1 when considering Mock4 (Table 2). Overall, both GTAAm and Kyo showed the highest positive and significant correlation coefficients between observed and expected relative abundances for Mock4 ( $R = 0.51$ ;  $p = 2.5 \times 10^{-3}$  and  $R = 0.6$ ;  $p = 2.4 \times 10^{-4}$  respectively; Figure 2). Nonetheless, both primer pairs underestimated or overestimated the relative abundance of a few studied genera. In particular, relative abundance of *Lasiodiplodia* was underestimated by both GTAAm and Kyo (with a ratio of expected to recovered relative abundances of  $2.254 \pm 0.079$  and  $2.603 \pm 0.009$ , respectively) as well as the *Botryosphaeria* ( $1.838 \pm 0.047$  and  $2.080 \pm 0.058$ , respectively) and *Diaporthe* relative abundances ( $1.908 \pm 0.041$  and  $1.711 \pm 0.050$ , respectively). *Alternaria* was underestimated by GTAAm ( $3.183 \pm 0.146$ ),

and *Fusarium* was overestimated by both GTAAm ( $0.383 \pm 0.003$ ) and Kyo ( $0.468 \pm 0.005$ ; Figures 1 and 2).

Given that GTAA failed to amplify *Colletotrichum* species, which are important pathogens of interest in walnut, while ITS and ITS1 provided poor similarity of composition values, only GTAAm and Kyo were utilized for the following steps, i.e., optimization of bioinformatic analyses and analysis of environmental samples.



**Figure 2.** Recovered relative abundances plotted against expected ones at the genus level obtained for Mock4 for each primer set: ITS (A), ITS1 (B), GTAA (C), GTAAm (D) and Kyo (E). Pearson’s correlation coefficients were calculated based on the relative abundance values of the three replicates.

### 2.2. Evaluation of the Taxonomic-Level Resolution

The genus- and species-level resolution of regions targeted by GTAAm and Kyo was assessed using phylogenetic trees based on ITS2 sequences of wood and fruit-associated pathogens.

First, phylogenetic trees with Bayesian posterior probabilities (BPP) were constructed based on our local amplicon databases, subjected or not to an extraction of the ITS2 region, in order to evaluate the impact of an extraction step with ITSx software on the quality of taxonomic resolution. Taxonomy of the fungal species included in mock communities was



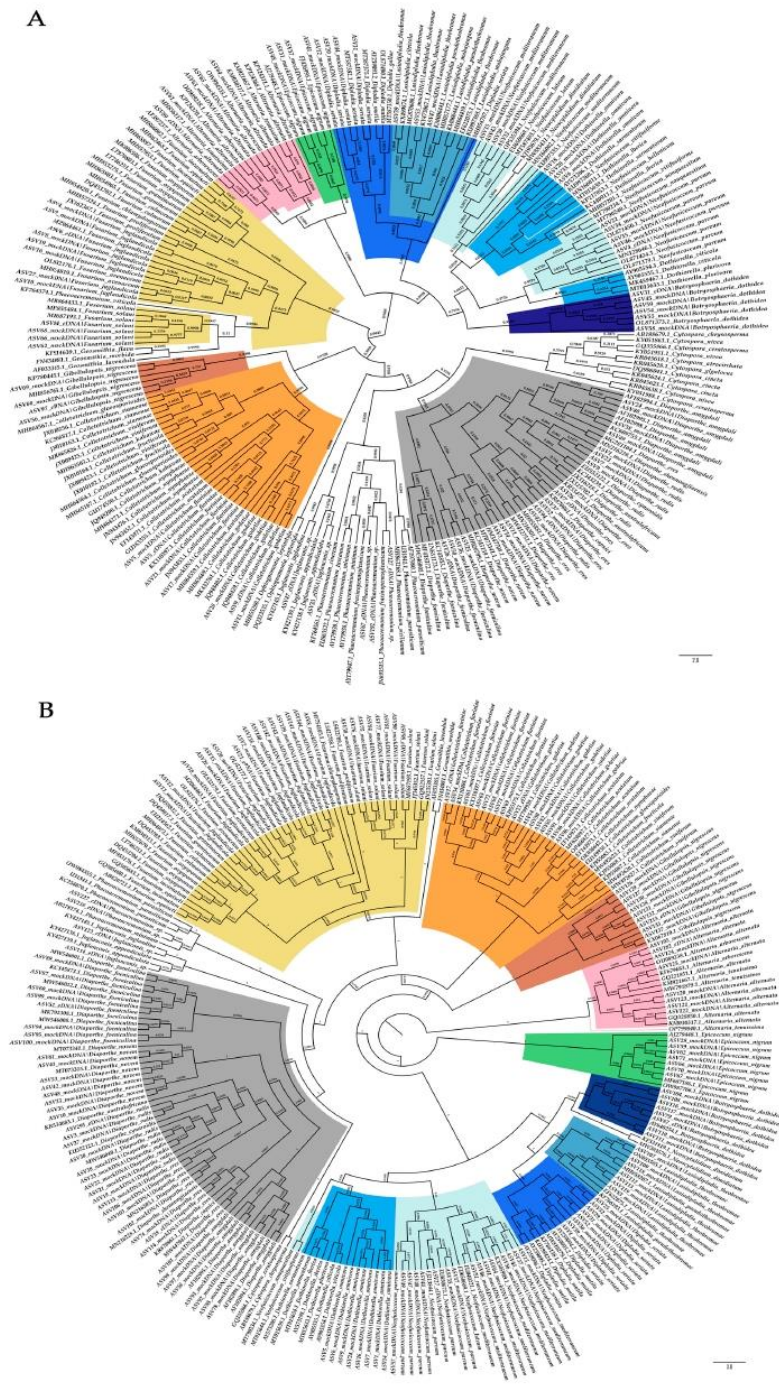
manually inspected and validated up to the species or genus level if nodes before clade containing targeted species or genus were supported by relatively strong BPP values (>0.70, considering that the analysis is based only on 1 locus; Table 3). At the species level, the highest assignment rates with both primer pairs were obtained without ITS2 extraction for Kyo (9 out of 18 species included in mock communities) and with ITS2 extraction for GTAAM (5 out of 18; Table 3). The main issues resulted from a few *Dothiorella* species and *N. mediterraneum* that were clustered together (in all conditions), *N. parvum* that was often clustered with the previous ones (except for Kyo without ITSx extraction condition) and *B. dothidea* that could not be differentiated from *Neoscytalidium dimidiatum* in most conditions (except for GTAAM with ITSx extraction condition; Table 3). These species were therefore given new assignments considering their possible multiple assignments (e.g., *N. parvum* was reassigned as *Neofusicoccum/Dothiorella* and *B. dothidea* as *Botryosphaeria/Neoscytalidium* for the relevant conditions). Moreover, *L. theobromae* sequences were always mixed with other *Lasiodiplodia* species, while *F. juglandicola* sequences were mixed with *F. avenaceum* ones.

**Table 3.** Determination of the genus- and species-level resolutions obtained with GTAAM and Kyo with (w/) or without (wo/) ITSx extraction after DADA2 sequence pre-processing and following validation of taxonomic assignment with phylogenetic trees. Green cells correspond to a correct assignment at the genus or species level, blue cells correspond to an inaccurate assignment and gray cells to fungal species absent from our local databases.

Fungal Species Included in Mock Communities	GTAAM				Kyo			
	w/		wo/		w/		wo/	
	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>Diplodia seriata</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Dothiorella omnivora</i>	Blue	Gray	Blue	Gray	Blue	Gray	Blue	Gray
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>N. parvum</i>	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>Diaporthe amygdali</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Dia. eres</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Dia. foeniculina</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Dia. novem</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Dia. rudis</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Epicoccum nigrum</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>C. godetiae</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Fusarium juglandicola</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>F. solani</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue
<i>Alternaria alternata</i>	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue

Second, additional phylogenetic trees were built by adding ASVs sequences (from metabarcoding of mock samples) to our local database to determine their taxonomic placement within the tree and whether it was in accordance with their assignment after a blast against our ITS local database. We found that ASVs were generally grouped with the corresponding reference sequences at the genus or species level, regardless of the combination of primer pairs and pipelines (Figure 3).

The manually-corrected taxonomy of ASVs, as described above, was also used to compare the performance criteria of the two selected primer pairs depending on the addition of an extraction step of the ITS2 sequence. This step did not affect the mean number of reads after filtering for all mock communities for the two primer pairs, suggesting that no aspecific amplifications occurred (Table S1). Thus, the average number of ASVs using mock community remained the same as well as the similarity of composition at the genus and species level, which was significantly higher with Kyo for Mock3 to Mock5 (Table 4).



**Figure 3.** Bayesian inference phylogenetic consensus cladogram gathering ASVs from mock communities (mockDNA) and from environmental samples (eDNA) obtained from metabarcoding sequencing with GTAAM with ITSx extraction (A) and Kyo without ITSx extraction (B). Bayesian posterior probabilities values are represented at branches. Taxonomic assignment of ASVs from mock communities was based on the local ITS database, and taxonomic assignment of supplementary environmental ASVs (i.e., for *Juglanconis* and *Phaeoacremonium* genera) was based on BLASTn results. Phylogenetic cladograms were rooted with *Alternaria*.



**Table 4.** Sensitivity, precision and similarity of composition values for GTAA182f/GTAA526r (GTAAm) and ITS3/ITS4\_KYO1 (Kyo) primer pairs with (w/) or without (w/o) ITS2 extraction at the genus (Gen) and species level (Sp) after manual inspection of taxonomic assignment. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation over the three replicates. ASVs assigned to *Sarocladium* were not taken into account for the calculation of the performance criteria.

Sample	Primer Set	Sensitivity				Precision				Similarity of Composition	
		Genus		Species		Genus		Species		Genus	Species
		w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o		
Mock1	GTAAm	0.5 <sup>a</sup>	0.333 <sup>b</sup>	0.167 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0.143 <sup>a</sup>	0.1 <sup>ab</sup>	0.053 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0.820 <sup>A</sup> $\pm$ 0.002	0.822 <sup>A</sup> $\pm$ 0.004
	Kyo	0.333 <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.167 <sup>a</sup>	0.167 <sup>a</sup>	0.049 <sup>c</sup>	0.071 <sup>bc</sup>	0.025 <sup>ab</sup>	0.025 <sup>ab</sup>	0.814 <sup>B</sup> $\pm$ 0.004	0.826 <sup>A</sup> $\pm$ 0.006
Mock2	GTAAm	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.278 <sup>a</sup>	0.278 <sup>a</sup>	0.133 <sup>a</sup>	0.133 <sup>a</sup>	1 <sup>A</sup>	0.790 <sup>A</sup> $\pm$ 0.004
	Kyo	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.6 <sup>b</sup>	0.135 <sup>b</sup>	0.135 <sup>b</sup>	0.059 <sup>b</sup>	0.086 <sup>ab</sup>	1 <sup>A</sup>	0.817 <sup>B</sup> $\pm$ 0.004
Mock3	GTAAm	0.823 <sup>a</sup>	0.765 <sup>b</sup>	0.235 <sup>ab</sup>	0.176 <sup>a</sup>	0.228 <sup>a</sup> $\pm$ 0.002	0.215 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.002	0.078 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.060 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.001	0.702 <sup>A</sup> $\pm$ 0.010	0.655 <sup>A</sup> $\pm$ 0.008
	Kyo	0.765 <sup>b</sup>	0.823 <sup>a</sup>	0.236 <sup>ab</sup>	0.470 <sup>b</sup>	0.101 <sup>c</sup>	0.108 <sup>bc</sup>	0.034 <sup>b</sup>	0.065 <sup>ac</sup>	0.749 <sup>B</sup> $\pm$ 0.005	0.745 <sup>B</sup> $\pm$ 0.001
Mock4	GTAAm	0.833 <sup>a</sup>	0.779 <sup>b</sup>	0.278 <sup>ab</sup>	0.222 <sup>a</sup>	0.237 <sup>a</sup> $\pm$ 0.002	0.225 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.002	0.094 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.076 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.001	0.751 <sup>A</sup> $\pm$ 0.006	0.710 <sup>A</sup> $\pm$ 0.003
	Kyo	0.778 <sup>b</sup>	0.833 <sup>a</sup>	0.245 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>b</sup>	0.102 <sup>c</sup>	0.109 <sup>bc</sup>	0.039 <sup>c</sup>	0.068 <sup>bc</sup>	0.769 <sup>B</sup> $\pm$ 0.007	0.770 <sup>B</sup> $\pm$ 0.008
Mock5	GTAAm	0.823 <sup>a</sup>	0.765 <sup>b</sup>	0.235 <sup>ab</sup>	0.176 <sup>a</sup>	0.229 <sup>a</sup>	0.219 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.002	0.078 <sup>a</sup>	0.060 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.001	0.718 <sup>A</sup> $\pm$ 0.005	0.672 <sup>A</sup> $\pm$ 0.004
	Kyo	0.765 <sup>b</sup>	0.823 <sup>a</sup>	0.235 <sup>ab</sup>	0.470 <sup>b</sup>	0.103 <sup>c</sup> $\pm$ 0.003	0.111 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.003	0.034 <sup>b</sup> $\pm$ 0.001	0.066 <sup>ac</sup> $\pm$ 0.002	0.764 <sup>B</sup> $\pm$ 0.009	0.765 <sup>B</sup> $\pm$ 0.010

w/: with ITSx extraction; w/o: without ITSx extraction; Genus: genus level; Species: species level. Lowercase letters indicate significant differences at 0.05 threshold based on Dunn's test. Statistical comparisons were performed by level (genus or species) between primer sets for sensitivity and precision values with and without ITSx extraction for each mock community. Uppercase letters indicate significant differences at 0.05 threshold based on Wilcoxon's test. Statistical comparisons were performed by level (genus or species) and by mock between primer sets for compositional similarity values.

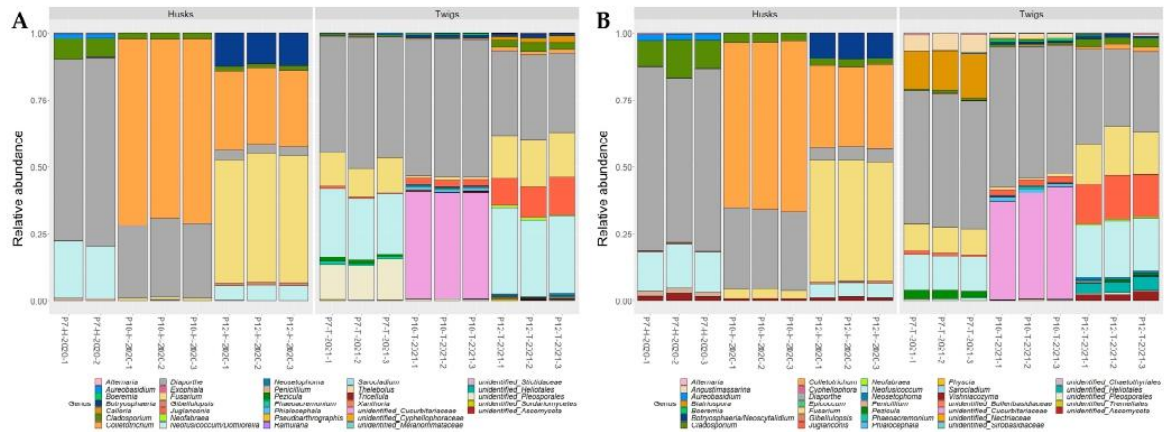
In contrast, sensitivity at the genus level was significantly higher with GTAAm than with Kyo when a step of ITS2 extraction was added, while the opposite was found without the ITS2 extraction step (Table 4). In any case, at the species level, the highest sensitivity rate was obtained with Kyo without ITS2 extraction, further confirming that these conditions were the best to correctly assign the fungi of interest at this taxonomic rank (Table 4). Nonetheless, the precision criterion at the genus level remained significantly higher with GTAAm with ITS2 extraction than with Kyo (with ( $p = 3.2 \times 10^{-4}$ ) and without ( $p = 0.008$ ) ITS2 extraction).

### 2.3. Application on Environmental Samples

Based on these results, the two combinations GTAAm with ITS2 extraction and Kyo without ITS2 extraction were then applied on symptomatic environmental samples. The samples were collected from three French walnut orchards (P7, P10 and P12) and matched with symptomatic twigs (T) or husks (H). Taxonomic assignment of ASVs corresponding to phytopathogenic fungi of interest (i.e., fungal taxa introduced in mock communities) was manually inspected and modified as described above. Taxonomic assignment of the other fungal taxa was manually corrected at the genus level, or family level when necessary, based on the first 150 hits obtained with BLASTn.

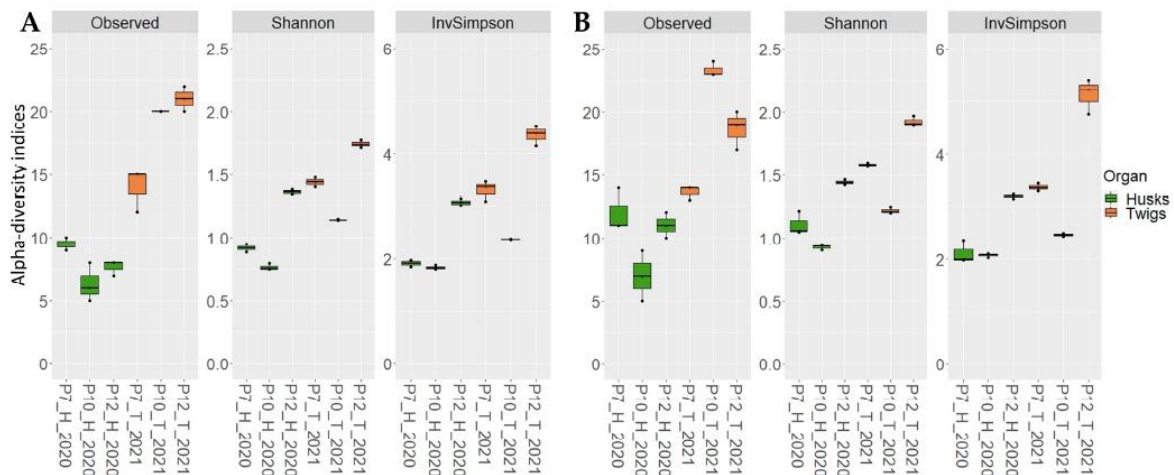
After read filtering, ITS2 metabarcoding sequencing of the three replicates of six walnut samples yielded a total of 1,151,054 read sequences with Kyo ( $63,947 \pm 33,362$  mean reads per sample clustered into  $108 \pm 23$  ASVs), while 693,700 read sequences ( $38,539 \pm 10,832$  mean reads per sample clustered into  $49 \pm 17$  ASVs) were obtained with GTAAm. Replicate P7-H-2020-3 was associated with only 173 raw sequence reads when amplified with GTAAm and was discarded from further analysis. Combining results from husks and twigs, 25 and 24 genera were obtained for GTAAm and Kyo, respectively, of which 18 were in common. Each combination of primer pair and pipeline enabled the detection of the pathogenic genera in walnut trees, i.e., *Botryosphaeria/Neoscytalidium*, *Neofusicoccum/Dothiorella*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Juglanconis* and *Phaeoacremonium* (Figures 3 and 4). Unlike Kyo, GTAAm did not permit the detection of *Epicoccum* genus as well as *Basidiomycota* taxa (*Bulleribasidiaceae* family mainly represented by *Vishniacozyma* genus and to a lesser extent unidentified genera of *Sirobasidiaceae* family and *Tremellales* order). Moreover, Kyo showed a better taxonomic resolution for certain genera within the *Pleosporales* order than GTAAm. The genera *Angustimassarina* and *Biatrispora* were

identified with Kyo but were reassigned at the order level (unidentified\_Pleosporales) with GTAAM (Figure 4).



**Figure 4.** Histograms showing the relative abundance of fungal genera in environmental samples collected in 2020 and 2021 in replicates (−1, −2, −3) of walnut husks (H) and twigs (T) from three orchards (P7, P10, P12). Relative abundances were obtained with metabarcoding sequencing after amplification with GTAAM with ITS2 region extraction (A) and Kyo without ITS2 region extraction (B).

For both primer sets, alpha-diversity indices, including Shannon and InvSimpson indices calculated at the genus level, were not significantly different irrespective of the index and the type of organ studied. Nonetheless, the number of detected genera (observed index) associated with environmental husk samples was significantly higher with Kyo than with GTAAM, further highlighting a better capacity of Kyo to cover a wider range of diversity ( $p = 0.004$ ; Figure 5).



**Figure 5.** Alpha-diversity indices calculated at the genus level on the rarefied dataset in environmental samples (Husks: H and Twigs: T) from three orchards (P7, P10 and P12) obtained with GTAAM (A) and Kyo (B) combinations.



### 3. Discussion

The aim of this study was to define both metabarcoding parameters and bioinformatic pipeline to profile the fungal pathobiome associated with walnut dieback symptoms in eDNA samples. In order to choose the best combination of barcode and pipeline, we assessed the ability of five primer pairs to detect, assign and accurately estimate the relative abundance of fungal strains commonly associated with walnut or walnut dieback included in mock communities using Illumina MiSeq PE 300 bp sequencing. The selection of targeted barcodes, primers and bioinformatic pipelines is crucial in light of their significant influence on the resolution of taxonomic assignment [29,50–53]. The five primer pairs, all targeting whole or a part of the ITS region designated as the fungal universal barcode [35], i.e., ITS1, ITS2 and ITS, were compared using the DADA2 bioinformatic tool. Here, targeting the ITS2 region was shown to improve similarity of composition and/or sensitivity compared to ITS and ITS1. In addition, the quality of the analysis also depends largely on bioinformatic pipelines that must be tailored according to the fungal taxa expected to be associated with the considered ecosystem. Many studies have compared various barcodes for optimal fungal community analyses, which evidenced a lack of consensus in the choice of the best barcode between ITS1, ITS2 or the whole ITS region probably because it notably depends on the fungal taxa that are being considered [20,54–58]. For instance, the GTAA primer pair was set aside in this study because of its inability to amplify *Colletotrichum* species, which were not part of the tested fungal species by Morales-Cruz et al. [20]. The degeneration of the forward primer of this barcode enabled to solve this issue as suggested by Tedersoo et al. (2016) to minimize primer bias [29].

Interestingly, two primer pairs targeting the ITS2 region, GTAA182fm/GTAA526r and ITS3/ITS4\_KYO1, provided the most accurate identifications and estimations of relative abundances and were selected for further analyses. On the basis of phylogenetic trees, both sets showed the same overall ability in distinguishing fungi of interest at the genus level, while Kyo showed better taxonomic resolution at the species level without the use of ITSx. This manual inspection step showed that care should be taken with the ASVs assignment just after bioinformatic pre-processing as it strongly depends on the taxonomic assignment algorithm as well as on the database even when UNITE database, the largest curated database dedicated to ITS sequences, is used [53,59]. Note that the same analyses were performed with the UNITE+INSDC non-redundant fungal ITS database v8.3 (1,039,010 ITS fungal sequences) before the latest version was released. The accuracy of the taxonomic assignment was much lower than those obtained with the v9.0 database (6,441,764 ITS fungal sequences). Thus, the number of sequences in the database, the diversity it covers, and the quality of the sequences are other crucial parameters in the quality of metabarcoding sequencing bioinformatic analyses [60–62]. The use of the latest version of a reference database seems to be essential, especially in view of the increase of knowledge about microbial diversity and of available sequences. The manual curation step allowed for the reassignment of ASVs to a more rightful taxonomic rank, notably those initially assigned to *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum* spp. that were found clustered with a few other genera in the phylogenetic tree and therefore reassigned accordingly (Table 3).

Although Kyo and GTAAm provided high similarity of composition values, there were a few discrepancies between expected and observed relative abundances, up to a factor of 3. This has been consistently reported in many studies, and it was hypothesized that ITS length polymorphism likely accounted for such differences [63,64]. In other words, shorter amplicons are more likely to amplify during PCR [65] resulting in overrepresented taxa and, consequently, due to the compositional nature of metabarcoding data, underrepresented taxa [66]. Additional polymorphism form that could lead to an overestimation of taxa is the copy number variation (CNV) of the targeted region. Recently, Lofgren et al. (2019) inferred using in silico analysis of fungal genomes that the CNV of ribosomal DNA containing the ITS region could vary from 14 to 1442 copies among 91 fungal taxa belonging to *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Mucoromycota* and *Zoopagomycota* phyla [67]. Another main bias associated with PCR is that more abundant taxa are more likely to be



amplified [66], which was actually not evaluated in our mock communities mixed in even proportions. Nanopore and PacBio sequencing technologies do not require a PCR step and may thus overcome these issues. In addition, sequencing longer reads allow a more accurate taxonomic assignment. However, the use of these technologies are still limited probably because of their high cost.

Furthermore, extraction of the variable ITS1 or ITS2 regions from raw sequences is recommended in many pipelines in order to discard conserved flanking sequences and thus improve species identification [51,68,69]. Based on this study, the interest of adding an extraction step depended on the primer set tested. Actually, extraction of the ITS2 region improved sensitivity with GTAAM, while the opposite was found with Kyo, and most probably was because of the loss of genetic information in sequences obtained with Kyo in the 28S region. Finally, we evaluated the capacity of the combinations of the two selected primer pairs with and without ITS2 extraction to describe well the symptomatic environmental samples. All conditions tested successfully permitted the detection and amplification of the major fungal phytopathogens and endophytes or saprophytes associated with walnut dieback and trunk diseases worldwide, namely, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Neofusicoccum*, *Juglanconis* and *Phaeoacremonium* genera [5,10,25,70–72]. Alpha-diversity indices were not significantly different between the two primer pairs except for the number of detected genera associated with walnut husk samples, which was significantly higher with Kyo. Note that only Kyo led to the amplification of *Basidiomycota* sequences, providing a broader view of fungal diversity of the pathobiome in the environmental samples [38].

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Identification of Primer Sets Targeting Walnut Pathogens

The internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA region was chosen as target barcode to identify fungal communities. A local database was built with full length ITS sequences of 78 species from 17 genera commonly isolated from walnut, almond, pistachio and olive trees worldwide, i.e., *Geosmithia*, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasioidiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Ophiognomonia*, *Juglanconis*, *Fusarium*, *Gibellulopsis*, *Alternaria*, *Phaeoacremonium* and *Cytospora* (Table 5). The database was generated by downloading ITS sequences from the Genbank database [73] of National Center for Biotechnology Information [74] (accessed on 21 May 2021) for each fungal species using the query word ‘internal transcribed spacer’. Up to 10 sequences per species were retrieved as well as the species reference sequence (RefSeq) when available [75].

Three universal primer sets amplifying the whole ITS region (ITS1F/ITS4, hereafter ITS [36,37]), the ITS1 region (ITS1F/ITS2, hereafter ITS1 [36,37]) and the ITS2 region (ITS3/ITS4\_KYO1, hereafter Kyo [36,38]) regions were selected. Two primer sets were added because of their ability to specifically amplify part of the pathogens of interest (GTAA182f/526r and GTAA182fm/526r, hereafter GTAA and GTAAM, respectively) (Table 6 and Figure 6). GTAA was designed by Morales-Cruz et al. [20] to amplify grapevine-associated pathogens using metabarcoding sequencing, and some of which are common to those isolated from nut crops (i.e., *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasioidiplodia*, *Neofusicoccum*, *Diaporthe* and *Phaeoacremonium*). In silico amplification of the local ITS database with the GTAA182f/526r primer pair was performed using Geneious Prime 2021.1.1 (settings: pairs only anywhere on the sequences and two mismatches allowed except within 15 bp of 3' end; <https://www.geneious.com> (accessed on 21 May 2021)). Since primers GTAA182f/526r failed to amplify the targeted region in *Colletotrichum* spp. because of a mismatch in the forward primer sequence, it was modified by replacing the C base in the 9th position by Y and renamed GTAA182fm.

Table 5. Fungal species associated with wood and fruit diseases among nut and olive trees.

Classification	Species	Host (Species)				References
		Walnut ( <i>Juglans regia</i> )	Almond ( <i>Prunus dulcis</i> )	Pistachio ( <i>Pistacia vera</i> )	Olive ( <i>Olea europaea</i> )	
Bionectriaceae	<i>Geosmithia flava</i>			X		[76]
	<i>G. lavendula</i>			X		[76]
	<i>G. morbida</i>	X				[77,78]
Botryosphaeriaceae	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	X	X	X	X	[11,12,79–85]
	<i>Diplodia gallae</i>	X				[70]
	<i>D. mutila</i>	X	X	X	X	[80,83,84,86–88]
	<i>D. seriata</i>	X	X	X	X	[7,80–83,86,87,89–91]
	<i>Dothiorella iberica</i>	X	X	X	X	[80,83,87,91]
	<i>Dot. omnivora</i>	X				[10,70]
	<i>Dot. plurivora</i>	X				[70]
	<i>Dot. samentorum</i>	X	X	X		[7,70,81,91]
	<i>Dot. viticola</i>	X	X			[70,87]
	<i>Lasiodiplodia citricola</i>	X		X		[70,80,91]
	<i>L. mahajangana</i>	X		X		[70,92]
	<i>L. pseudotheobromae</i>	X		X		[85,93]
	<i>L. theobromae</i>	X	X	X	X	[70,81,83,84,87]
	<i>Neofusicoccum hellenicum</i>			X		[92]
	<i>N. luteum</i>				X	[83,84]
	<i>N. mediterraneum</i>	X	X	X	X	[7,80,81,83,85,87,88,91]
	<i>N. nonquaesitum</i>	X	X			[80,81]
	<i>N. parvum</i>	X	X	X	X	[7,11,80–82,84–87]
	<i>N. vitifusiforme</i>	X	X	X	X	[80,83,87,90,91]
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	X	X	X	X	[80,87,94–96]	
Diaporthaceae	<i>Diaporthe amygdali</i>	X	X			[7,82,97,98]
	<i>Dia. australafricana</i>	X	X			[86,87]
	<i>Dia. biguttulata</i>	X				[99]
	<i>Dia. capsici</i>	X				[100]
	<i>Dia. cynaroidis</i>	X				[86]
	<i>Dia. eres</i>	X	X			[10,11,87,99]
	<i>Dia. foeniculina</i>	X	X	X	X	[7,11,80,85,90,98]
	<i>Dia. juglandicola</i>	X				[101]
	<i>Dia. novem</i>	X	X			[87], this study
	<i>Dia. rudis</i>	X		X	X	[83,91,102], this study
<i>Dia. shennongjiaensis</i>	X				[103]	
Didymellaceae	<i>Epicoccum nigrum</i>	X			X	[11,84]
Glomerellaceae	<i>Colletotrichum acutatum</i>	X	X	X	X	[104–108]
	<i>C. fioriniae</i>	X	X	X	X	[5,11,105,107,109–111]
	<i>C. fructicola</i>	X				[112]
	<i>C. gloeosporioides</i>	X		X	X	[5,107,109,113,114]
	<i>C. godetiae</i>	X	X		X	[5,11,106,107,109,110]
	<i>C. kahawae</i>	X			X	[109,114]
	<i>C. nymphaeae</i>	X	X		X	[5,109,115–117]
<i>C. siamense</i>	X		X	X	[108,113,114]	
<i>C. viniferum</i>	X				[104]	
Gnomoniaceae	<i>Ophiognomonium leptostyla</i>	X				[118,119]
Juglanconidaceae	<i>Juglanconis appendiculata</i>	X				[71]
	<i>J. juglandina</i>	X				[71,120]
Nectriaceae	<i>Fusarium avenaceum</i>	X	X	X		[121–125]
	<i>F. chlamydosporum</i>			X	X	[125,126]
	<i>F. culmorum</i>	X		X		[121,123,125]
	<i>F. equiseti</i>			X		[125]
	<i>F. graminearum</i>	X				[123]
	<i>F. incarnatum</i>	X		X		[123,125,127]
	<i>F. juglandicola</i>	X				[128]
	<i>F. oxysporum</i>	X		X	X	[121,123,125,126]
<i>F. proliferatum</i>	X		X		[123,129]	
<i>F. solani</i>	X	X	X	X	[11,124–126,130,131]	
Plectosphaerellaceae	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	X				[11]
Pleosporaceae	<i>Alternaria alternata</i>	X	X	X	X	[79,84,121,132,133]
	<i>A. arborescens</i>		X	X		[132,133]
	<i>A. tenuissima</i>	X	X	X	X	[79,84,130,132,133]

Table 5. Cont.

Classification	Species	Host (Species)				References
		Walnut ( <i>Juglans regia</i> )	Almond ( <i>Prunus dulcis</i> )	Pistachio ( <i>Pistacia vera</i> )	Olive ( <i>Olea europaea</i> )	
Togniniaceae	<i>Phaeoacremonium cinereum</i>	X		X		[70]
	<i>P. fraxinopennsylvanicum</i>	X				[70]
	<i>P. italicum</i>	X	X		X	[70,134]
	<i>P. minimum</i>	X	X	X	X	[70,85,90]
	<i>P. panstictum</i>	X	X	X	X	[70,90,134]
	<i>P. sicilianum</i>	X			X	[10,134]
	<i>P. tuscanum</i>	X				[70]
Valsaceae	<i>P. viticola</i>	X	X	X	X	[70,135]
	<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	X				[136,137]
	<i>Cyt. californica</i>	X	X	X		[87,88,136]
	<i>Cyt. ceratosperma</i>	X				[137]
	<i>Cyt. chrysosperma</i>	X				[136,138]
	<i>Cyt. cincta</i>	X				[138]
	<i>Cyt. gigalocus</i>	X				[136,137]
	<i>Cyt. joaquinensis</i>	X		X		[88,136]
	<i>Cyt. nivea</i>	X				[139]
	<i>Cyt. plurivora</i>	X	X	X	X	[87,136]

Table 6. Summary of PCR primers used in this study for metabarcoding sequencing. Amplicon sizes are based on the ITS region of *N. parvum* (OL639139.1) presented in Figure 1.

Barcode	Primer Name	Set Name	Direction	Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)	Primer Reference
ITS	ITS1F	ITS	Forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	617	[37]
	ITS4		Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC		[36]
ITS1	ITS1F	ITS1	Forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	295	[37]
	ITS2		Reverse	GCTGCGTTCCTCATCGATGC		[36]
ITS2	GTAA182f	GTAA	Forward	AAAACCTTTCACAACCGGATC	337	[20]
	GTAA526r		Reverse	TYCCTACCTGATCCGAGGTC		[20]
	<b>GTAA182fm</b>	GTAAm	Forward	AAAACCTTYYACAACCGGATC	337	This study [20]
	<b>GTAA526r</b>		Reverse	TYCCTACCTGATCCGAGGTC		
ITS3	ITS3	Kyo	Forward	GCATCGATGAAGAACGCAGC	342	[36]
	ITS4_KYO1		Reverse	TCCTCCGCTTWTGWTWTC		[38]

In bold, the two primer pairs selected to compare the performance of taxonomic assignment and applied to metabarcoding sequencing of environmental samples.

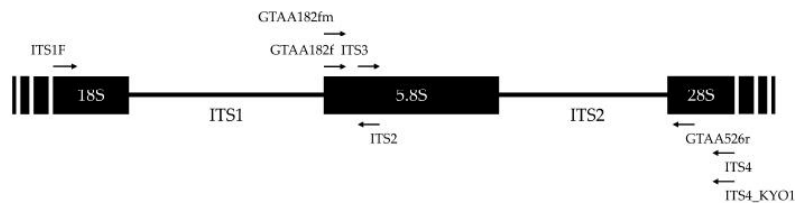


Figure 6. Schematic representation of the fixation sites of forward and reverse primers listed in Table 6 on the ITS region of *N. parvum* (OL639139.1) as an example. Forward primers are represented by right-pointing arrows, and reverse primers by left-pointing arrows.

4.2. Fungal Mock Communities

Taxonomic identity of isolates used to construct mock communities were preliminarily checked by amplifying the region targeted by the ITS4/ITS5 primer pair, following PCR conditions described in White et al. [36]. Sanger sequencing of amplicons was performed by Eurofins Genomics platform (Cologne, Germany). Contig assembly and taxonomic assignment were performed with Geneious Prime 2021.1.1.

Five mock communities (Mock1–Mock5) were generated by combining DNA solutions in equal concentrations from pure cultures of walnut fungal pathogens isolated from symp-



tomatic walnut husks and twigs collected in French walnut orchards. In addition, cultures from the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS collection, Utrecht, Netherlands) and the University of Western Brittany Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France) were also included to cover the range of pathogenic fungal species associated with walnut decay and necrotic twigs reported in several countries (Table 7). DNA extracted from asymptomatic walnut husks was added in Mock5 to evaluate the potential matrix effect on species amplification during PCR given the high levels of potential PCR inhibitors, including polyphenols, in husks [140,141] (Table 7). Besides known walnut pathogens, mock communities were also composed of DNA from non-phytopathogenic fungi frequently isolated in symptomatic organs during preliminary tests, i.e., *Gibellulopsis nigrescens* and *Epicoccum nigrum*. Pure fungal cultures and mock communities DNA concentrations were quantified with a Quantus™ Fluorometer and a QuantiFluor® ONE ds DNA System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Three replicates were prepared for each mock community.

**Table 7.** Species included in mock communities and their origin. Each mock community was composed of DNA solutions of the same concentration in the same proportion.

Classification	Species	Strain No.	DNA Solutions Included in Mocks				
			Mock1 <sup>e</sup>	Mock2 <sup>f</sup>	Mock3 <sup>g</sup>	Mock4 <sup>h</sup>	Mock5 <sup>i</sup>
<i>Plant</i>							
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i>	-					X
<i>Fungi</i>							
Botryosphaeriaceae	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	P12N112_2020 <sup>a</sup>	X		X	X	X
	<i>Diplodia seriata</i>	CBS112555 <sup>b</sup>	X		X	X	X
	<i>Dothiorella omnivora</i>	CBS140349 <sup>b</sup>	X		X	X	X
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS164.96 <sup>b</sup>	X		X	X	X
	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	CBS121718 <sup>b</sup>	X		X	X	X
	<i>N. parvum</i>	P12N111_2020 <sup>a</sup>	X		X	X	X
Diaporthaceae	<i>Diaporthe amygdali</i>	CBS126679 <sup>b</sup>		X	X	X	X
	<i>Dia. eres</i>	P12N213_2020 <sup>a</sup>		X	X	X	X
	<i>Dia. foeniculina</i>	UBOCC-A-122019 <sup>c</sup>		X	X	X	X
	<i>Dia. novem</i>	UBOCC-A-122020 <sup>c</sup>		X	X	X	X
	<i>Dia. rudis</i>	P9N311_2020 <sup>a</sup>		X	X	X	X
Didymellaceae	<i>Epicoccum nigrum</i>	P12N518_2020 <sup>a</sup>			X	X	X
Glomerellaceae	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	UBOCC-A-122017 <sup>c</sup>			X	X	X
	<i>C. godetiae</i>	UBOCC-A-122016 <sup>c</sup>			X	X	X
Nectriaceae	<i>Fusarium juglandicola</i>	UBOCC-A-119001 <sup>d</sup>			X	X	X
	<i>F. solani</i>	UBOCC-A-122023 <sup>c</sup>			X	X	X
Plectosphaerellaceae	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	UBOCC-A-122024 <sup>c</sup>				X	
Pleosporaceae	<i>Alternaria alternata</i>	UBOCC-A-122015 <sup>c</sup>			X	X	X

<sup>a</sup> Strains isolated from environmental samples and long-time conserved in 20% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$  at LUBEM laboratory; <sup>b</sup> Strains from the CBS collection; <sup>c</sup> Strains isolated from environmental samples and added in UBOCC for this study; <sup>d</sup> Strain from the UBOCC; <sup>e</sup> Six fungal species—equivalent to 16.67% volume each; <sup>f</sup> Five fungal species—equivalent to 20% volume each; <sup>g</sup> Seventeen fungal species—equivalent to 5.89% volume each; <sup>h</sup> Eighteen fungal species—equivalent to 5.56% volume each; <sup>i</sup> Seventeen fungal species and one plant species—equivalent to 5.56% volume each.

#### 4.3. Sampling and Total DNA Extraction

Symptomatic walnut husks (five per orchard) and twigs (12 per orchard) from different trees were collected from three French orchards (P7, P10 and P12) located in the Southwest of France in September 2020 and May 2021, respectively. Symptoms on walnut husks were characterized by blight and necrosis, while symptomatic twigs showed necrosis and dieback symptoms. Organs were surface-sterilized as follows: 1 min in a 2% active chlorine bleach solution and 1 min in two sterile distilled water baths before drying in sterile filters. Bark of twigs was removed, and the border between healthy and necrotic tissues was cut from twigs

and walnut husks using scalpel. Then, samples were pooled by orchard and by sample type (husk or twig) before being lyophilized for 48 h (Freeze-dryer Alpha 1-4 LDplus©, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) and ground in steel jars using Retsch MM400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) until fine powder was obtained. Environmental DNA extractions were performed in triplicate using FastDNA™ SpinKit (MP Biomedicals, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions and quantified with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To monitor potential contamination, extraction blanks were prepared alongside the samples.

#### 4.4. Illumina MiSeq Sequencing and Sequence Analyses

Prior to sequencing, evaluation of success of PCR amplification was performed on DNA from mock communities and from walnut husks and twigs using the GTAA182f/526r, GTAA182fm/526r and ITS3/ITS4\_KYO1 primer pairs. PCR stages were based on the protocol described in Morales-Cruz et al. [20] for the two initial primer pairs and in Toju et al. [38] for the latter, with a volume of 0.2 µL of DNA solution at a concentration of 20 ng/µL. All PCR were performed with a Doppio thermal cycler (VWR™) and GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase kit (Promega Corporation) but without BSA. The quality of the PCR products was checked using electrophoresis on 1% agarose gels with Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer 1X (Promega Corporation) and Midori Green Advance® stain (Nippon Genetics Co. Europe GmbH, Düren, Germany). No PCR products were detected for extraction blanks.

Amplicon libraries and Illumina MiSeq PE 300 bp sequencing were performed in the same run at the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montréal, Canada) with same adapter FLD\_ill (forward sequence: ACACTCTTCCCTACACGACGC-TCTTCCGATCT; reverse sequence: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT), and the PCR conditions are listed in Table S2.

Sequence analysis workflow is depicted in Figure 7. First, we used FIGARO [142] to determine optimal trimming parameters of forward and reverse reads with the best percentage of read retention [143] (estimated amplicon length set to 450 bp and minimum overlap length of 20 bases; Table S3) followed by the DADA2 R package [144] for read truncation with no ambiguous bases allowed, read denoising and filtering. Quality profiles were also inspected with DADA2 R package and reads were trimmed according to Figaro parameters allowing the inclusion of bases with a minimum Qscore of 30 (corresponding to a probability of an incorrect base call 1 in 1000 times). In the case of ITS, forward and reverse reads were non-overlapping. Therefore, optimal trimming parameters of the forward and reverse reads were assessed using FIGARO with an estimated simulated amplicon length of 450 bp without minimum overlap length (Table S3). Sequences were then concatenated by adding N bases between forward and reverse reads.

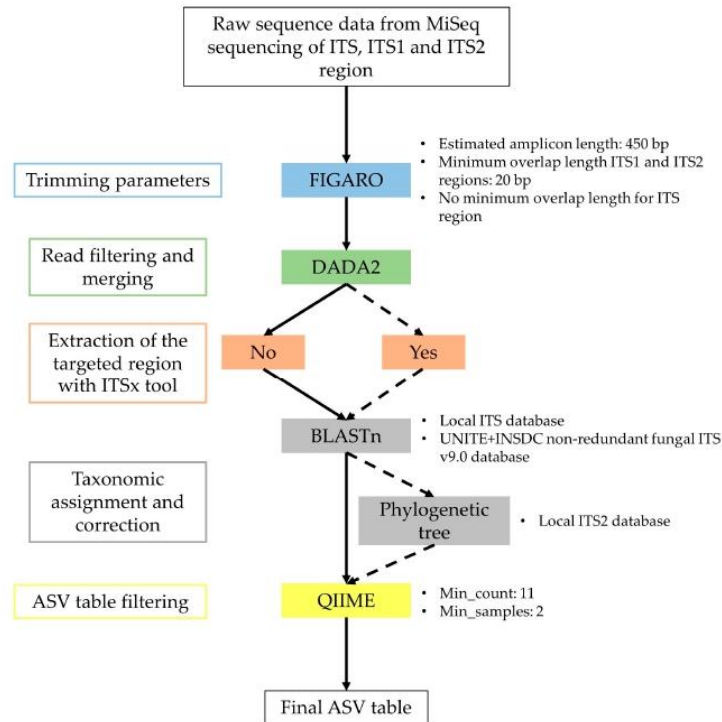
For all primer pairs, amplicon sequence variants (ASVs) were independently inferred from the forward and reverse reads of each sample using the run-specific error rates, and read pairs were merged with an overlap setting of 12 bases minimum, except for ITS reads which were concatenated using the "*justConcatenate = TRUE*" argument. Then, taxonomic assignment was performed with BLASTn command line [145] against the UNITE+INSDC non-redundant fungal ITS v9.0 database [59], and the first hit was extracted [35], and then, taxonomic assignment was manually checked and corrected by checking the first 150 hits for each ASV. In addition, a BLASTn against the ITS local database was performed for ASVs associated with species included in mock communities (details in Section 2.1). To avoid overrepresentation of rare ASVs, only those represented in at least two samples and with sequence count greater than 10 were included in community analysis [27,31,146] using the *filter\_otus\_from\_otu\_table.py* QIIME [147] script.

In order to improve taxonomic resolution, the interest of extracting ITS2 region was evaluated for both GTAAm and Kyo by adding an ITSx [68] extraction step after read merging (Figure 7).



Blank PCR samples provided by the metabarcoding sequencing platform were added to the analyses, and no sequences were detected after the pre-processing step.

Processing analyses were performed using Phyloseq R package [148]. For the alpha-diversity indexes, rarefaction was applied to normalize all datasets at the same read counts based on the smallest samples across all datasets (sample size of 18,201 reads).



**Figure 7.** Workflow of bioinformatic steps and tools used in this study during data pre-processing. Parameters are listed at the right of each step. Solid arrows correspond to the basic pipeline initially followed for the five primer pairs used to sequence mock communities. Dashed arrows correspond to optional steps for GTAAM and Kyo for the sequencing of mock communities and environmental samples.

#### 4.5. Comparative Evaluation of Primer Pairs

Four performance criteria, namely, sensitivity, precision and similarity of composition and number of ASVs were used to evaluate the performance of the five primer pairs [28]. Sensitivity was defined as the ability of a primer pair to assign well an ASV at genus level and was calculated as  $TP/(TP + FN)$ , where TP corresponds to the number of true positive and FN the number of false negative ASVs (i.e., either not detected or detected but wrongly assigned at the genus level). Precision was defined as the quality of detection of fungal species and was calculated as  $TP/(TP + FP)$ , where FP indicates the number of false positive ASVs (i.e., either supernumerary ASVs or ASVs assigned to unexpected genera). Similarity of composition between the recovered community and the expected community was defined as  $1-BC$ , where BC is the Bray–Curtis similarity index and calculated as in Pauvert et al. [28]. To calculate this last criterion, taxonomic assignment obtained against the local ITS database was used. Last, the mean number of ASVs obtained for each combination of primer pair and pipeline was also determined.

#### 4.6. Evaluation of the Taxonomic-Level Resolution

A database targeting the ITS2 region (and including 5.8S ribosomal RNA and large subunit (LSU) RNA) was constructed for GTAAM and Kyo. This local database was generated by downloading culture collection sequences from the Genbank database [73] of National Center for Biotechnology Information [74] (accessed on 17 February 2023) for each pathogenic fungal species commonly isolated from nut crops and olives (Table 5) using the query word '5.8S' with a sequence length from 200 to 5000 bp. The final database was composed of 3596 sequences for a total of 77 species. The total number of sequences per species was listed in Table S4.

To assess the taxonomic resolution of the ITS2 region targeted by GTAAM and Kyo primer pairs, phylogenetic trees were then built using this local database. First, amplicons were extracted for each primer pair following the same settings in Geneious Prime 2021.1.1, as described previously. If no amplicons were obtained in silico with these parameters, mismatches were allowed anywhere on the primer sequences (settings: pairs only anywhere on the sequences and two mismatches allowed). For each species, only unique sequences were retained by removing duplicate sequences. These selected sequences, in which taxonomic identification was manually checked using Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 10 November 2021)), were used to build phylogenetic trees. The Kyo amplicon database contained a smaller number of species because of the difficulty in retrieving sequences long enough for reverse primer attachment. Moreover, no long enough ITS sequences of *Dothiorella omnivora* from culture collections were available to allow amplification by the two primer pairs (Table S4).

Then, final databases were aligned using MAFFT version 7 online service [149] with the Auto algorithm for alignment strategy. The resulting alignments were edited using Gblocks 0.91b [150,151] with all the options to allow less stringent selection. To evaluate the effect of ITS region extraction on primer pair resolution, the ITS2 region was extracted from amplicons of GTAAM and Kyo using ITSx [68], and phylogenetic trees were built based on extracted or non-extracted local databases. Phylogenetic trees were then constructed based on Bayesian inference with the Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees 2 (BEAST2) version 2.6.1 package [152]. The best models were estimated for each amplicon database using the bModelTest add-on in Bayesian Evolutionary Analysis Utility (BEAUti2) simultaneously with the Bayesian inference analysis [153]. The analysis was performed using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method by performing seven independent repetitions of 100,000,000 generations, and each sampling a tree at every 1000 generations.

Convergence of the independent Bayesian inference analyses was checked using Tracer v1.7.1 software [154] and the obtained files were combined with the LogCombiner program (frequency of resampling of 100,000 and burn-in fixed at 10%). Posterior probabilities of consensus trees were determined using the Treeannotator program and visualized using FigTree v1.4.4 [155].

Finally, taxonomic placement of ASVs from mock communities and environmental samples was checked using phylogenetic reconstructions performed following the same steps after adding the ASVs sequences to the local databases.

#### 4.7. Statistical Analyses

Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test were used to compare performance criteria obtained with the different primer sets and to evaluate the interest of ITSx extraction at the genus and the species level for each primer pair. Wilcoxon test without *p*-value correction was used to compare similarity of composition values between the two ITS2 region targeting primer pairs (GTAAM and Kyo) for each mock community. Expected and recovered relative abundances were calculated at the genus level by dividing the expected and recovered abundances by the total abundance obtained for each replicate. Simple linear regression between recovered and expected relative abundances were determined and Pearson correlation coefficient (R) and *p*-value were calculated. Alpha-diversity indices,



after rarefaction based on the lowest number of reads (see Section 4.4) were compared using Wilcoxon test without *p*-value correction.

## 5. Conclusions

In conclusion, these results indicate that targeted barcode and primer pairs greatly differ in their ability and accuracy to assess the relative abundance of fungi in a metabarcoding-sequenced community. This study provided recommendations on bioinformatic analyses and primer performance for metabarcoding sequencing of environmental samples of walnut and other nut and olive trees. Depending on the targeted species, the desired taxonomic resolution (at the genus or species level) and the scale within fungal communities (the pathobiome or the phytomicrobiome), the two GTAAm and Kyo primer sets associated with the DADA2 tool and the ITSx software are good candidates. Further work could involve a metabarcoding sequencing of other environmental samples from walnut trees to better characterize fungal communities and particularly pathobiome among different locations and assess the interactions between these fungi and the associated phytomicrobiome. Although our study was tailored for walnut samples, it could certainly be applied to almond, pistachio and olive trees and also any plant samples contaminated by these pathogens provided that local database is enriched with the plant-associated fungi of interest that were not included here.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants12122383/s1>. Figure S1: Rarefaction curves of high-quality sequence reads for each mock community replicate. A: ITS primer set. B: ITS1 primer set. C: GTAA primer set. D: GTAAm primer set. D: Kyo primer set; Table S1: Amplification conditions for metabarcoding sequencing. Conditions are common to all primer sets. Final volume of reaction was 25  $\mu$ L. Conditions were determined by Génome Québec Innovation Center; Table S2: Optimal trimming parameters of mock and environmental samples indicated by FIGARO for each primer pair; Table S3: Number of sequences for each species composing our local ITS2 database. The total number of sequences corresponds to the sequences retrieved from the Genbank database. Number of GTAAm and Kyo amplicons are the in silico amplicons obtained with the GTAA182fm/526r and ITS3/ITS4\_KYO1 primer pairs. A total of 55 species and 71 species were represented in Kyo and GTAAm final databases respectively; Table S4: Total number of sequence reads obtained for each primer set and each mock replicate (−1, −2, −3) after read pre-processing step with and without the ITS2 region extraction additional step.

**Author Contributions:** F.P., A.P. and G.L.F. acquired funding and supervised the scientific management of the PhD work. M.B., F.P., A.P. and G.L.F. analyzed the datasets. J.-L.J. provided valuable information on phylogenetic analyses. M.B. performed sampling, metabarcoding and phylogenetic analyses and generated all tables and figures. M.B. wrote the manuscript in collaboration with A.P. and F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** PhD fellowship of M.B. is financed by the French Brittany region (ARED Grant #1797 SHERWOOD project) and the French ministry of Higher Education, Research and Innovation (2020 CDE EGAAL). This project was also supported by the French ministry of Agriculture and Food under CASDAR funds (AAP RT 2020 CARIBOU project coordinated by the CTIFL).

**Data Availability Statement:** The data presented in this study have been deposited at the NCBI and are openly available under the Bioproject PRJNA951625.

**Acknowledgments:** We would like to thank Cyrielle Masson (SENuRA, Isère, France) and Marie-Neige Hébrard (Walnut experimental station of Creysse, Lot, France) for sampling and sending us the environmental samples from walnut orchards as well as for their expertise in walnut dieback symptoms. We are also thankful to Agnès Verhaeghe (CTIFL) for her expertise in walnut cultures and to Yohana Laloum (CTIFL, Lanxade, France) for coordinating the CARIBOU project.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. FAOSTAT Statistical Database—Production. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed on 1 February 2023).
2. Radix, P.; Seigle-Murandi, F.; Charlot, G. Walnut Blight: Development of Fruit Infection in Two Orchards. *Crop. Prot.* **1994**, *13*, 629–631. [[CrossRef](#)]
3. Yabaneri, C.; Sevim, A. Endophytic Fungi from the Common Walnut and Their in Vitro Antagonistic Activity against *Ophiognomonia leptostyla*. *Biologia* **2023**, *78*, 361–371. [[CrossRef](#)]
4. Daniels, D.A.; Nix, K.A.; Wadl, P.A.; Vito, L.M.; Wiggins, G.J.; Windham, M.T.; Ownley, B.H.; Lambdin, P.L.; Grant, J.F.; Merten, P.; et al. Thousand Cankers Disease Complex: A Forest Health Issue That Threatens *Juglans* Species across the U.S. *Forests* **2016**, *7*, 260. [[CrossRef](#)]
5. Da Lio, D.; Cobo-Díaz, J.F.; Masson, C.; Chalopin, M.; Kebe, D.; Giraud, M.; Verhaeghe, A.; Nodet, P.; Sarrocco, S.; Le Floch, G.; et al. Combined Metabarcoding and Multi-Locus Approach for Genetic Characterization of *Colletotrichum* Species Associated with Common Walnut (*Juglans regia*) Anthracnose in France. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Moral, J.; Morgan, D.; Trapero, A.; Michailides, T.J. Ecology and Epidemiology of Diseases of Nut Crops and Olives Caused by *Botryosphaeriaceae* Fungi in California and Spain. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 1809–1827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. López-Moral, A.; Lovera, M.; Raya, M.D.C.; Cortés-Cosano, N.; Arquer, O.; Trapero, A.; Agustí-Brisach, C. Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* Species in Southern Spain. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 533–550. [[CrossRef](#)]
8. Gusella, G.; Giambra, S.; Conigliaro, G.; Burruano, S.; Polizzi, G. *Botryosphaeriaceae* Species Causing Canker and Dieback of English Walnut (*Juglans regia*) in Italy. *For. Path.* **2021**, *51*, e12661. [[CrossRef](#)]
9. Yildiz, A.; Benlioglu, S.; Benlioglu, K.; Korkom, Y. Occurrence of Twig Blight and Branch Dieback of Walnut Caused by *Botryosphaeriaceae* Species in Turkey. *J. Plant Dis. Prot.* **2022**, *129*, 687–693. [[CrossRef](#)]
10. Eichmeier, A.; Pecenká, J.; Spetik, M.; Necas, T.; Ondrasek, I.; Armengol, J.; León, M.; Berlanas, C.; Gramaje, D. Fungal Trunk Pathogens Associated with *Juglans regia* in the Czech Republic. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 761–771. [[CrossRef](#)]
11. Laloum, Y.; Verhaeghe, A.; Moronvalle, A.; Masson, C.; Hebrard, M.-N.; Picot, A.; Pensec, F.; Belair, M. Projet CARIBOU: Élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer. *Infos. Ctifl.* **2022**, *386*, 48–58.
12. Moral, J.; Muñoz-Diez, C.; González, N.; Trapero, A.; Michailides, T.J. Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Collected from Olive and Other Hosts in Spain and California. *Phytopathology* **2010**, *100*, 1340–1351. [[CrossRef](#)]
13. Michailides, T.J.; Chen, S.; Morgan, D.; Felts, D.; Nouri, M.T.; Puckett, R.; Luna, M.; Hasey, J.; Anderson, K.; Coates, W.; et al. *Managing Botryosphaeria/Phomopsis Cankers and Anthracnose Blight of Walnut in California*; Walnut Research Reports; California Walnut Board: Folsom, CA, USA, 2013; pp. 325–346.
14. Azevedo-Nogueira, F.; Rego, C.; Gonçalves, H.M.R.; Fortes, A.M.; Gramaje, D.; Martins-Lopes, P. The Road to Molecular Identification and Detection of Fungal Grapevine Trunk Diseases. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 960289. [[CrossRef](#)]
15. Bass, D.; Stentiford, G.D.; Wang, H.-C.; Koskella, B.; Tyler, C.R. The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends Ecol. Evol.* **2019**, *34*, 996–1008. [[CrossRef](#)]
16. Abdelfattah, A.; Malacrino, A.; Wisniewski, M.; Cacciola, S.O.; Schena, L. Metabarcoding: A Powerful Tool to Investigate Microbial Communities and Shape Future Plant Protection Strategies. *Biol. Control.* **2018**, *120*, 1–10. [[CrossRef](#)]
17. Agler, M.T.; Ruhe, J.; Kroll, S.; Morhenn, C.; Kim, S.-T.; Weigel, D.; Kemen, E.M. Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002352. [[CrossRef](#)]
18. Busby, P.E.; Peay, K.G.; Newcombe, G. Common Foliar Fungi of *Populus Trichocarpa* Modify *Melampsora* Rust Disease Severity. *New Phytol.* **2016**, *209*, 1681–1692. [[CrossRef](#)]
19. Cobo-Díaz, J.F.; Baroncelli, R.; Le Floch, G.; Picot, A. A Novel Metabarcoding Approach to Investigate *Fusarium* Species Composition in Soil and Plant Samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2019**, *95*, fiz084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Morales-Cruz, A.; Figueroa-Balderas, R.; García, J.F.; Tran, E.; Rolshausen, P.E.; Baumgartner, K.; Cantu, D. Profiling Grapevine Trunk Pathogens in *Planta*: A Case for Community-Targeted DNA Metabarcoding. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Cobo-Díaz, J.F.; Baroncelli, R.; Le Floch, G.; Picot, A. Combined Metabarcoding and Co-Occurrence Network Analysis to Profile the Bacterial, Fungal and *Fusarium* Communities and Their Interactions in Maize Stalks. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ruppert, K.M.; Kline, R.J.; Rahman, M.S. Past, Present, and Future Perspectives of Environmental DNA (eDNA) Metabarcoding: A Systematic Review in Methods, Monitoring, and Applications of Global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* **2019**, *17*, e00547. [[CrossRef](#)]
23. Vanga, B.R.; Panda, P.; Shah, A.S.; Thompson, S.; Woolley, R.H.; Ridgway, H.J.; Mundy, D.C.; Bulman, S. DNA Metabarcoding Reveals High Relative Abundance of Trunk Disease Fungi in Grapevines from Marlborough, New Zealand. *BMC Microbiol.* **2022**, *22*, 126. [[CrossRef](#)]
24. Chi, W.-C.; Chen, W.; He, C.-C.; Guo, S.-Y.; Cha, H.-J.; Tsang, L.M.; Ho, T.W.; Pang, K.-L. A Highly Diverse Fungal Community Associated with Leaves of the Mangrove Plant *Acanthus Illicifolius* var. *Xiamenensis* Revealed by Isolation and Metabarcoding Analyses. *PeerJ* **2019**, *7*, e7293. [[CrossRef](#)]



25. Wang, S.; Tan, Y.; Li, S.; Zhu, T. Structural and Dynamic Analysis of Leaf-Associated Fungal Community of Walnut Leaves Infected by Leaf Spot Disease Based Illumina High-Throughput Sequencing Technology. *Pol. J. Microbiol.* **2022**, *71*, 429–441. [[CrossRef](#)]
26. Nilsson, R.H.; Anslan, S.; Bahram, M.; Wurzbacher, C.; Baldrian, P.; Tedersoo, L. Mycobiome Diversity: High-Throughput Sequencing and Identification of Fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 95–109. [[CrossRef](#)]
27. Alberdi, A.; Aizpurua, O.; Gilbert, M.T.P.; Bohmann, K. Scrutinizing Key Steps for Reliable Metabarcoding of Environmental Samples. *Methods Ecol. Evol.* **2018**, *9*, 134–147. [[CrossRef](#)]
28. Pauvert, C.; Buée, M.; Laval, V.; Edel-Hermann, V.; Fauchery, L.; Gautier, A.; Lesur, I.; Vallance, J.; Vacher, C. Bioinformatics Matters: The Accuracy of Plant and Soil Fungal Community Data Is Highly Dependent on the Metabarcoding Pipeline. *Fungal Ecol.* **2019**, *41*, 23–33. [[CrossRef](#)]
29. Tedersoo, L.; Lindahl, B. Fungal Identification Biases in Microbiome Projects. *Environ. Microbiol. Rep.* **2016**, *8*, 774–779. [[CrossRef](#)]
30. Nichols, R.V.; Vollmers, C.; Newsom, L.A.; Wang, Y.; Heintzman, P.D.; Leighton, M.; Green, R.E.; Shapiro, B. Minimizing Polymerase Biases in Metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **2018**, *18*, 927–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Oliver, A.K.; Brown, S.P.; Callahan, M.A.; Jumpponen, A. Polymerase Matters: Non-Proofreading Enzymes Inflate Fungal Community Richness Estimates by up to 15%. *Fungal Ecol.* **2015**, *15*, 86–89. [[CrossRef](#)]
32. Smith, D.P.; Peay, K.G. Sequence Depth, Not PCR Replication, Improves Ecological Inference from Next Generation DNA Sequencing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90234. [[CrossRef](#)]
33. Estensmo, E.L.F.; Maurice, S.; Morgado, L.; Martin-Sanchez, P.M.; Skrede, I.; Kausrud, H. The Influence of Intraspecific Sequence Variation during DNA Metabarcoding: A Case Study of Eleven Fungal Species. *Mol. Ecol. Resour.* **2021**, *21*, 1141–1148. [[CrossRef](#)]
34. Bazinet, A.L.; Cummings, M.P. A Comparative Evaluation of Sequence Classification Programs. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W.; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List; Bolchacova, E.; et al. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6241–6246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1990; pp. 315–322, ISBN 978-0-12-372180-8.
37. Gardes, M.; Bruns, T.D. ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes—Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Mol. Ecol.* **1993**, *2*, 113–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Toju, H.; Tanabe, A.S.; Yamamoto, S.; Sato, H. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40863. [[CrossRef](#)]
39. Turenne, C.Y.; Sanche, S.E.; Hoban, D.J.; Karlowsky, J.A.; Kabani, A.M. Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1846–1851. [[CrossRef](#)]
40. Vancov, T.; Keen, B. Amplification of Soil Fungal Community DNA Using the ITS86F and ITS4 Primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *296*, 91–96. [[CrossRef](#)]
41. Larena, I.; Salazar, O.; González, V.; Julián, M.C.; Rubio, V. Design of a Primer for Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer with Enhanced Specificity for Ascomycetes. *J. Biotechnol.* **1999**, *75*, 187–194. [[CrossRef](#)]
42. Ihrmark, K.; Bödeker, I.T.M.; Cruz-Martinez, K.; Friberg, H.; Kubartova, A.; Schenck, J.; Strid, Y.; Stenlid, J.; Brandström-Durling, M.; Clemmensen, K.E.; et al. New Primers to Amplify the Fungal ITS2 Region—Evaluation by 454-Sequencing of Artificial and Natural Communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *82*, 666–677. [[CrossRef](#)]
43. Oja, J.; Kohout, P.; Tedersoo, L.; Kull, T.; Kõljalg, U. Temporal Patterns of Orchid Mycorrhizal Fungi in Meadows and Forests as Revealed by 454 Pyrosequencing. *New Phytol.* **2015**, *205*, 1608–1618. [[CrossRef](#)]
44. Tedersoo, L.; Bahram, M.; Pölme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N.S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L.V.; Vasco-Palacios, A.M.; Thu, P.Q.; Suija, A.; et al. Global Diversity and Geography of Soil Fungi. *Science* **2014**, *346*, 1256688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Taylor, D.L.; Walters, W.A.; Lennon, N.J.; Bochicchio, J.; Krohn, A.; Caporaso, J.G.; Pennanen, T. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 7217–7226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nguyen, N.H.; Smith, D.; Peay, K.; Kennedy, P. Parsing Ecological Signal from Noise in next Generation Amplicon Sequencing. *New Phytol.* **2015**, *205*, 1389–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bakker, M.G. A Fungal Mock Community Control for Amplicon Sequencing Experiments. *Mol. Ecol. Resour.* **2018**, *18*, 541–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yamamoto, N.; Bibby, K. Clustering of Fungal Community Internal Transcribed Spacer Sequence Data Obscures Taxonomic Diversity: Taxonomic Impacts of Clustering Fungal ITS. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 2491–2500. [[CrossRef](#)]
49. Bjørnsgaard Aas, A.; Davey, M.L.; Kausrud, H. ITS All Right Mama: Investigating the Formation of Chimeric Sequences in the ITS2 Region by DNA Metabarcoding Analyses of Fungal Mock Communities of Different Complexities. *Mol. Ecol. Resour.* **2017**, *17*, 730–741. [[CrossRef](#)]
50. Op De Beeck, M.; Lievens, B.; Busschaert, P.; Declerck, S.; Vangronsveld, J.; Colpaert, J.V. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97629. [[CrossRef](#)]



51. Tedersoo, L.; Bahram, M.; Zinger, L.; Nilsson, R.H.; Kennedy, P.G.; Yang, T.; Anslan, S.; Mikryukov, V. Best Practices in Metabarcoding of Fungi: From Experimental Design to Results. *Mol. Ecol.* **2022**, *31*, 2769–2795. [CrossRef]
52. Větrovský, T.; Kolařík, M.; Žifčáková, L.; Zelenka, T.; Baldrian, P. The Rpb2 Gene Represents a Viable Alternative Molecular Marker for the Analysis of Environmental Fungal Communities. *Mol. Ecol. Resour.* **2016**, *16*, 388–401. [CrossRef]
53. Lücking, R.; Aime, M.C.; Robbertse, B.; Miller, A.N.; Ariyawansa, H.A.; Aoki, T.; Cardinali, G.; Crous, P.W.; Druzhinina, I.S.; Geiser, D.M.; et al. Unambiguous Identification of Fungi: Where Do We Stand and How Accurate and Precise Is Fungal DNA Barcoding? *IMA Fungus* **2020**, *11*, 14. [CrossRef]
54. Bokulich, N.A.; Mills, D.A. Improved Selection of Internal Transcribed Spacer-Specific Primers Enables Quantitative, Ultra-High-Throughput Profiling of Fungal Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 2519–2526. [CrossRef] [PubMed]
55. Yang, R.-H.; Su, J.-H.; Shang, J.-J.; Wu, Y.-Y.; Li, Y.; Bao, D.-P.; Yao, Y.-J. Evaluation of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS), Specifically ITS1 and ITS2, for the Analysis of Fungal Diversity by Deep Sequencing. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206428. [CrossRef] [PubMed]
56. Blaali, R.; Kumar, S.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Kirk, P.M.; Kausserud, H. ITS1 versus ITS2 as DNA Metabarcodes for Fungi. *Mol. Ecol. Resour.* **2013**, *13*, 218–224. [CrossRef] [PubMed]
57. Wang, X.-C.; Liu, C.; Huang, L.; Bengtsson-Palme, J.; Chen, H.; Zhang, J.-H.; Cai, D.; Li, J.-Q. ITS1: A DNA Barcode Better than ITS2 in Eukaryotes? *Mol. Ecol. Resour.* **2015**, *15*, 573–586. [CrossRef] [PubMed]
58. Bazzicalupo, A.L.; Bálint, M.; Schmitt, I. Comparison of ITS1 and ITS2 RDNA in 454 Sequencing of Hyperdiverse Fungal Communities. *Fungal Ecol.* **2013**, *6*, 102–109. [CrossRef]
59. Nilsson, R.H.; Larsson, K.-H.; Taylor, A.F.S.; Bengtsson-Palme, J.; Jeppesen, T.S.; Schigel, D.; Kennedy, P.; Picard, K.; Glöckner, F.O.; Tedersoo, L.; et al. The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D259–D264. [CrossRef]
60. del Campo, J.; Kolisko, M.; Boscaro, V.; Santoferrara, L.; Nenarokov, S.; Massana, R.; Guillou, L.; Simpson, A.; Berney, C.; de Vargas, C.; et al. EukRef: Phylogenetic Curation of Ribosomal RNA to Enhance Understanding of Eukaryotic Diversity and Distribution. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2005849. [CrossRef] [PubMed]
61. Arranz, V.; Pearman, W.S.; Aguirre, J.D.; Liggins, L. MARES, a Replicable Pipeline and Curated Reference Database for Marine Eukaryote Metabarcoding. *Sci. Data* **2020**, *7*, 209. [CrossRef]
62. Porter, T.M.; Hajibabaei, M. Putting COI Metabarcoding in Context: The Utility of Exact Sequence Variants (ESVs) in Biodiversity Analysis. *Front. Ecol. Evol.* **2020**, *8*, 248. [CrossRef]
63. Rué, O.; Coton, M.; Dugat-Bony, E.; Howell, K.; Irlinger, F.; Legras, J.-L.; Loux, V.; Michel, E.; Mounier, J.; Neuvéglise, C.; et al. Comparison of Metabarcoding Taxonomic Markers to Describe Fungal Communities in Fermented Foods. *bioRxiv* **2023**. bioRxiv:13.523754. [CrossRef]
64. Tedersoo, L.; Anslan, S.; Bahram, M.; Pölme, S.; Riit, T.; Liiv, I.; Kõljalg, U.; Kisand, V.; Nilsson, H.; Hildebrand, F.; et al. Shotgun Metagenomes and Multiple Primer Pair-Barcode Combinations of Amplicons Reveal Biases in Metabarcoding Analyses of Fungi. *MycKeys* **2015**, *10*, 1–43. [CrossRef]
65. Ehrlich, M.; Zoll, S.; Sur, S.; van den Boom, D. A New Method for Accurate Assessment of DNA Quality after Bisulfite Treatment. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e29. [CrossRef] [PubMed]
66. Edwards, J.E.; Hermes, G.D.A.; Kittelmann, S.; Nijse, B.; Smidt, H. Assessment of the Accuracy of High-Throughput Sequencing of the ITS1 Region of *Neocallimastigomycota* for Community Composition Analysis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2370. [CrossRef] [PubMed]
67. Lofgren, L.A.; Uehling, J.K.; Branco, S.; Bruns, T.D.; Martin, F.; Kennedy, P.G. Genome-based Estimates of Fungal RDNA Copy Number Variation across Phylogenetic Scales and Ecological Lifestyles. *Mol. Ecol.* **2019**, *28*, 721–730. [CrossRef] [PubMed]
68. Bengtsson-Palme, J.; Ryberg, M.; Hartmann, M.; Branco, S.; Wang, Z.; Godhe, A.; De Wit, P.; Sánchez-García, M.; Ebersberger, I.; de Sousa, F.; et al. Improved Software Detection and Extraction of ITS1 and ITS2 from Ribosomal ITS Sequences of *Fungi* and Other Eukaryotes for Analysis of Environmental Sequencing Data. *Methods Ecol. Evol.* **2013**, *4*, 914–919. [CrossRef]
69. Tedersoo, L.; Drenkhan, R.; Anslan, S.; Morales-Rodriguez, C.; Cleary, M. High-Throughput Identification and Diagnostics of Pathogens and Pests: Overview and Practical Recommendations. *Mol. Ecol.* **2018**, *19*, 47–76. [CrossRef]
70. Sohrabi, M.; Mohammadi, H.; León, M.; Armengol, J.; Banihashemi, Z. Fungal Pathogens Associated with Branch and Trunk Cankers of Nut Crops in Iran. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *157*, 327–351. [CrossRef]
71. Voglmayr, H.; Castlebury, L.A.; Jaklitsch, W.M. *Juglanconis* Gen. Nov. on *Juglandaceae*, and the New Family *Juglanconidaceae* (*Diaporthales*). *Persoonia* **2017**, *38*, 136–155. [CrossRef]
72. Belisario, A. Cultural Characteristics and Pathogenicity of *Melanconium juglandinum*. *Eur. J. For. Pathol.* **1999**, *29*, 317–322. [CrossRef]
73. Sayers, E.W.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Pruitt, K.D.; Schoch, C.L.; Sherry, S.T.; Karsch-Mizrachi, I. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D161–D164. [CrossRef]
74. National Center for Biotechnology Information. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 21 May 2021).
75. O’Leary, N.A.; Wright, M.W.; Brister, J.R.; Ciuffo, S.; Haddad, D.; McVeigh, R.; Rajput, B.; Robbertse, B.; Smith-White, B.; Ako-Adjei, D.; et al. Reference Sequence (RefSeq) Database at NCBI: Current Status, Taxonomic Expansion, and Functional Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D733–D745. [CrossRef]



76. Kolařík, M.; Hulcr, J.; Tisserat, N.; De Beer, W.; Kostovčík, M.; Kolaříková, Z.; Seybold, S.J.; Rizzo, D.M. *Geosmithia* Associated with Bark Beetles and Woodborers in the Western USA: Taxonomic Diversity and Vector Specificity. *Mycologia* **2017**, *109*, 185–199. [[CrossRef](#)]
77. Montecchio, L.; Fanchin, G.; Simonato, M.; Faccoli, M. First Record of Thousand Cankers Disease Fungal Pathogen *Geosmithia Morbida* and Walnut Twig Beetle *Pityophthorus Juglandis* on *Juglans regia* in Europe. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 1445. [[CrossRef](#)]
78. Yaghmour, M.A.; Nguyen, T.L.; Roubtsova, T.V.; Hasey, J.K.; Fichtner, E.J.; DeBuse, C.; Seybold, S.J.; Bostock, R.M. First Report of *Geosmithia Morbida* on English Walnut and Its Paradox Rootstock in California. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 1441. [[CrossRef](#)]
79. Zhu, Y.F.; Yin, Y.F.; Qu, W.W.; Yang, K.Q. Occurrence and Spread of the Pathogens on Walnut (*Juglans regia*) in Shandong Province, China. In *ISHS Acta Horticulturae 1050: VII International Walnut Symposium*; ISHS: Leuven, Belgium, 2014; pp. 347–351. [[CrossRef](#)]
80. Chen, S.F.; Morgan, D.P.; Hasey, J.K.; Anderson, K.; Michailides, T.J. Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English Walnut in California. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 636–652. [[CrossRef](#)]
81. Inderbitzin, P.; Bostock, R.M.; Trouillas, F.P.; Michailides, T.J. A Six Locus Phylogeny Reveals High Species Diversity in *Botryosphaeriaceae* from California Almond. *Mycologia* **2010**, *102*, 1350–1368. [[CrossRef](#)]
82. Gramaje, D.; Agustí-Brisach, C.; Pérez-Sierra, A.; Moralejo, E.; Olmo, D.; Mostert, L.; Damm, U.; Armengol, J. Fungal Trunk Pathogens Associated with Wood Decay of Almond Trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* **2012**, *28*, 1–13. [[CrossRef](#)]
83. Urbez-Torres, J.R.; Peduto, F.; Vossen, P.M.; Krueger, W.H.; Gubler, W.D. Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 231–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Carlucci, A.; Raimondo, M.L.; Cibelli, F.; Phillips, A.J.L.; Lops, F. *Pleurostomophora Richardsiae*, *Neofusicoccum Parvum* and *Phaeoacremonium Aleophilum* Associated with a Decline of Olives in Southern Italy. *Phytopathol. Mediterr.* **2013**, *52*, 517–527.
85. López-Moral, A.; del Carmen Raya, M.; Ruiz-Blancas, C.; Medialdea, I.; Lovera, M.; Arquero, O.; Trapero, A.; Agustí-Brisach, C. Aetiology of Branch Dieback, Panicle and Shoot Blight of Pistachio Associated with Fungal Trunk Pathogens in Southern Spain. *Plant Pathol.* **2020**, *69*, 1237–1269. [[CrossRef](#)]
86. Jiménez Luna, I.; Besoain, X.; Saa, S.; Peach-Fine, E.; Morales, F.C.; Riquelme, N.; Larach, A.; Morales, J.; Ezcurra, E.; Ashworth, V.E.T.M.; et al. Identity and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from *Juglans regia* in Chile. *Phytopathol. Mediterr.* **2022**, *61*, 79–94. [[CrossRef](#)]
87. Holland, L.A.; Trouillas, F.P.; Nouri, M.T.; Lawrence, D.P.; Crespo, M.; Doll, D.A.; Duncan, R.A.; Holtz, B.A.; Culumber, C.M.; Yaghmour, M.A.; et al. Fungal Pathogens Associated with Canker Diseases of Almond in California. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 346–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Nouri, M.T.; Lawrence, D.P.; Holland, L.A.; Doll, D.A.; Kallsen, C.E.; Culumber, C.M.; Trouillas, F.P. Identification and Pathogenicity of Fungal Species Associated with Canker Diseases of Pistachio in California. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 2397–2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Zhang, M.; Zhang, Y.K.; Geng, Y.H.; Zang, R.; Wu, H.Y. First Report of *Diplodia Seriata* Causing Twig Dieback of English Walnut in China. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1036. [[CrossRef](#)]
90. Spies, C.F.J.; Mostert, L.; Carlucci, A.; Moyo, P.; van Jaarsveld, W.J.; du Plessis, I.L.; van Dyk, M.; Halleen, F. Dieback and Decline Pathogens of Olive Trees in South Africa. *Persoonia* **2020**, *45*, 196–220. [[CrossRef](#)]
91. Chen, S.F.; Morgan, D.P.; Michailides, T.J. *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* Associated with Panicle and Shoot Blight of Pistachio in California, USA. *Fungal Divers.* **2014**, *67*, 157–179. [[CrossRef](#)]
92. Chen, S.; Li, G.; Liu, F.; Michailides, T.J. Novel Species of *Botryosphaeriaceae* Associated with Shoot Blight of Pistachio. *Mycologia* **2015**, *107*, 780–792. [[CrossRef](#)]
93. Li, G.; Liu, F.; Li, J.; Liu, Q.; Chen, S. Characterization of *Botryosphaeria Dothidea* and *Lasiodiplodia Pseudotheobromae* from English Walnut in China. *J. Phytopathol.* **2016**, *164*, 348–353. [[CrossRef](#)]
94. Derviş, S.; Türkölmez, Ş.; Çiftçi, O.; Ulubaş Serçe, Ç.; Dikilitas, M. First Report of *Neoscytalidium Dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight, and Root Rot of Pistachio in Turkey. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 1411. [[CrossRef](#)]
95. Güney, İ.G.; Özer, G.; Türkölmez, Ş.; Derviş, S. Canker and Leaf Scorch on Olive (*Olea europaea* L.) Caused by *Neoscytalidium Dimidiatum* in Turkey. *Crop. Prot.* **2022**, *157*, 105985. [[CrossRef](#)]
96. Derviş, S.; Türkölmez, Ş.; Çiftçi, O.; Ulubaş Serçe, Ç.; Dikilitas, M. First Report of *Neoscytalidium Dimidiatum* Causing Black Canker and Root Rot of Walnut in Turkey. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 2129. [[CrossRef](#)]
97. Meng, L.; Yu, C.; Wang, C.; Li, G. First Report of *Diaporthe Amygdali* Causing Walnut Twig Canker in Shandong Province of China. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 1859. [[CrossRef](#)]
98. Diogo, E.L.F.; Santos, J.M.; Phillips, A.J.L. Phylogeny, Morphology and Pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* Species on Almond in Portugal. *Fungal Divers.* **2010**, *44*, 107–115. [[CrossRef](#)]
99. Yang, Q.; Fan, X.-L.; Guarnaccia, V.; Tian, C.-M. High Diversity of *Diaporthe* Species Associated with Dieback Diseases in China, with Twelve New Species Described. *MycKeys* **2018**, *39*, 97–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Fang, X.; Qin, K.; Li, S.; Han, S.; Zhu, T.; Fang, X.; Qin, K. Whole Genome Sequence of *Diaporthe Capsici*, a New Pathogen of Walnut Blight. *Genomics* **2020**, *112*, 3751–3761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Fan, X.; Yang, Q.; Bezerra, J.D.P.; Alvarez, L.V.; Tian, C. *Diaporthe* from Walnut Tree (*Juglans regia*) in China, with Insight of the *Diaporthe Eres* Complex. *Mycol. Prog.* **2018**, *17*, 841–853. [[CrossRef](#)]



102. Kanematsu, S.; Minaka, N.; Kobayashi, T.; Kudo, A.; Ohtsu, Y. Molecular Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions and Comparison of Fertility in *Phomopsis* Isolates from Fruit Trees. *J. Gen. Plant Pathol.* **2000**, *66*, 191–201. [[CrossRef](#)]
103. Zhou, H.; Hou, C.-L. Three New Species of *Diaporthe* from China Based on Morphological Characters and DNA Sequence Data Analyses. *Phytotaxa* **2019**, *422*, 157–174. [[CrossRef](#)]
104. He, L.; Li, X.; Gao, Y.; Li, B.; Mu, W.; Liu, F. Characterization and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum* spp. from Different Hosts in Shandong, China. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 34–43. [[CrossRef](#)]
105. de Silva, D.D.; Mann, R.C.; Kaur, J.; Ekanayake, P.N.; Sawbridge, T.I.; McKay, S.; Taylor, P.W.J.; Edwards, J. Revisiting the *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Almond in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **2021**, *50*, 267–279. [[CrossRef](#)]
106. López-Moral, A.; Raya-Ortega, M.C.; Agustí-Brisach, C.; Roca, L.F.; Lovera, M.; Luque, F.; Arquero, O.; Traperó, A. Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Almond Anthracnose in Spain. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 2034–2045. [[CrossRef](#)]
107. Mosca, S.; Nicosia, M.G.L.D.; Cacciola, S.O.; Schena, L. Molecular Analysis of *Colletotrichum* Species in the Carposphere and Phyllosphere of Olive. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Shivas, R.G.; Tan, Y.P.; Edwards, J.; Dinh, Q.; Maxwell, A.; Andjic, V.; Liberato, J.R.; Anderson, C.; Beasley, D.R.; Bransgrove, K.; et al. *Colletotrichum* Species in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **2016**, *45*, 447–464. [[CrossRef](#)]
109. Wei, X.; Yang, S.Q.; Jiang, Z.G.; Cui, M.J.; Deng, J.X.; Zhang, Y. *Colletotrichum Juglandis* sp. nov. (Ascomycota: Glomerellaceae) Associated with Walnut Leaf Spot in China. *Phytotaxa* **2022**, *556*, 256–268. [[CrossRef](#)]
110. Liu, B.; Pavel, J.A.; Hausbeck, M.K.; Feng, C.; Correll, J.C. Phylogenetic Analysis, Vegetative Compatibility, Virulence, and Fungal Filtrates of Leaf Curl Pathogen *Colletotrichum Fioriniae* from Celery. *Phytopathology* **2021**, *111*, 751–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Lichtemberg, P.S.F.; Moral, J.; Morgan, D.P.; Felts, D.G.; Sanders, R.D.; Michailides, T.J. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum Fioriniae* and *C. Karstii* in California Pistachio Orchards. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1320. [[CrossRef](#)]
112. Wang, Q.H.; Li, D.W.; Duan, C.H.; Liu, X.H.; Niu, S.G.; Hou, L.Q.; Wu, X.Q. First Report of Walnut Anthracnose Caused by *Colletotrichum Fructicola* in China. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 247. [[CrossRef](#)]
113. Wang, Q.-H.; Fan, K.; Li, D.-W.; Han, C.-M.; Qu, Y.-Y.; Qi, Y.-K.; Wu, X.-Q. Identification, Virulence and Fungicide Sensitivity of *Colletotrichum Gloeosporioides* s.s. Responsible for Walnut Anthracnose Disease in China. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 1358–1368. [[CrossRef](#)]
114. Schena, L.; Mosca, S.; Cacciola, S.O.; Faedda, R.; Sanzani, S.M.; Agosteo, G.E.; Sergeeva, V.; Magnano di San Lio, G. Species of the *Colletotrichum Gloeosporioides* and *C. Boninense* Complexes Associated with Olive Anthracnose. *Plant Pathol.* **2014**, *63*, 437–446. [[CrossRef](#)]
115. Savian, L.G.; Muniz, M.F.B.; Poletto, T.; Maculan, L.G.; Rabuske, J.E.; Blume, E.; Sarzi, J.S. First Report of *Colletotrichum Nymphaeae* Causing Anthracnose on *Juglans regia* Fruits in Southern Brazil. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 3287. [[CrossRef](#)]
116. Varjas, V.; Szilágyi, S.; Lakatos, T. First Report of *Colletotrichum Nymphaeae* Causing Anthracnose on Almond in Hungary. *Plant Dis.* **2022**, *106*, 1527. [[CrossRef](#)]
117. Damm, U.; Cannon, P.F.; Woudenberg, J.H.C.; Crous, P.W. The *Colletotrichum acutatum* Species Complex. *Stud. Mycol.* **2012**, *73*, 37–113. [[CrossRef](#)]
118. Walker, D.M.; Castlebury, L.A.; Rossman, A.Y.; Mejia, L.C.; White, J.F. Phylogeny and Taxonomy of *Ophiognomonina* (Gnomoniaceae, *Diaporthales*), Including Twenty-Five New Species in This Highly Diverse Genus. *Fungal Divers.* **2012**, *57*, 85–147. [[CrossRef](#)]
119. Belisario, A.; Scotton, M.; Santori, A.; Onofri, S. Variability in the Italian Population of *Gnomonia Leptostyla*, Homothallism and Resistance of *Juglans* Species to Anthracnose. *For. Pathol.* **2008**, *38*, 129–145. [[CrossRef](#)]
120. Ma, R.; Ye, S.; Zhao, Y.; Michailides, T.J.; Tian, C. New Leaf and Fruit Disease of *Juglans regia* Caused by *Juglanconis Juglandina* in Xinjiang, China. *For. Path.* **2019**, *49*, e12537. [[CrossRef](#)]
121. Moya-Elizondo, E.A.; Lagos, M.J.; San Martín, J.; Ruiz, B. First Report of *Alternaria Alternata* and *Fusarium* spp. Causing Brown Apical Necrosis in Walnut Fruit in Southern Chile. *Plant Health Prog.* **2021**, *22*, 573–574. [[CrossRef](#)]
122. Wang, Y.X.; Chen, J.Y.; Xu, X.W.; Li, D.W.; Wang, Q.Z. First Report of Brown Apical Necrosis of Walnut Fruit Caused by *Fusarium Avenaceum* in Hubei, China. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 2956. [[CrossRef](#)]
123. Belisario, A.; Maccaroni, M.; Corazza, L.; Balmas, V.; Valier, A. Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. *Plant Dis.* **2002**, *86*, 599–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Marek, S.M.; Yaghmour, M.A.; Bostock, R.M. *Fusarium* spp., *Cylindrocarpon* spp., and Environmental Stress in the Etiology of a Canker Disease of Cold-Stored Fruit and Nut Tree Seedlings in California. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 259–270. [[CrossRef](#)]
125. Chen, W.; Ntahimpera, N.; Morgan, D.P.; Michailides, T.J. Mycoflora of *Pistacia Vera* in the Central Valley, California. *Mycotaxon* **2002**, *83*, 147–158.
126. Trabelsi, R.; Sellami, H.; Gharbi, Y.; Krid, S.; Cheffi, M.; Kammoun, S.; Dammak, M.; Mseddi, A.; Gdoura, R.; Triki, M.A. Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium* spp. Associated with Olive Trees Dieback in Tunisia. *3 Biotech* **2017**, *7*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Singh, B.; Kalha, C.S.; Razdan, V.K.; Verma, V.S. First Report of Walnut Canker Caused by *Fusarium Incarnatum* from India. *Plant Dis.* **2011**, *95*, 1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Crous, P.W.; Cowan, D.A.; Maggs-Kölling, G.; Yilmaz, N.; Thangavel, R.; Wingfield, M.J.; Noordeloos, M.E.; Dima, B.; Brandrud, T.E.; Jansen, G.M.; et al. Fungal Planet Description Sheets: 1182–1283. *Persoonia* **2021**, *46*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

129. Crespo, M.; Lawrence, D.P.; Nouri, M.T.; Doll, D.A.; Trouillas, F.P. Characterization of *Fusarium* and *Neocosmospora* Species Associated With Crown Rot and Stem Canker of Pistachio Rootstocks in California. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 1931–1939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Chen, W.; Swart, W.J. First Report of Stem Canker of English Walnut Caused by *Fusarium Solani* in South Africa. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Montecchio, L.; Faccoli, M.; Short, D.P.G.; Fanchin, G.; Geiser, D.M.; Kasson, M.T. First Report of *Fusarium Solani* Phylogenetic Species 25 Associated With Early Stages of Thousand Cankers Disease on *Juglans Nigra* and *Juglans regia* in Italy. *Plant Dis.* **2015**, *99*, 1183. [[CrossRef](#)]
132. Teviotdale, B.L.; Viveros, M.; Pryor, B.; Adaskaveg, J.E. First Report of Alternaria Leaf Spot of Almond Caused by Species in the *Alternaria Alternata* Complex in California. *Plant Dis.* **2001**, *85*, 558. [[CrossRef](#)]
133. Ozkilinc, H.; Sarpkaya, K.; Kurt, S.; Can, C.; Polatbilek, H.; Yasar, A.; Sevinc, U.; Uysal, A.; Konukoglu, F. Pathogenicity, Morpho-Species and Mating Types of *Alternaria* spp. Causing Alternaria Blight in *Pistacia* spp. in Turkey. *Phytoparasitica* **2017**, *45*, 719–728. [[CrossRef](#)]
134. Carlucci, A.; Lops, F.; Cibelli, F.; Raimondo, M.L. *Phaeoacremonium* Species Associated with Olive Wilt and Decline in Southern Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* **2015**, *141*, 717–729. [[CrossRef](#)]
135. Raimondo, M.L.; Lops, F.; Carlucci, A. First Report of *Phaeoacremonium Oleae* and *P. Viticola* Associated with Olive Trunk Diseases in Italy. *Plant Dis.* **2021**, *106*, 331. [[CrossRef](#)]
136. Lawrence, D.P.; Holland, L.A.; Nouri, M.T.; Travadon, R.; Abramians, A.; Michailides, T.J.; Trouillas, F.P. Molecular Phylogeny of *Cytospora* Species Associated with Canker Diseases of Fruit and Nut Crops in California, with the Descriptions of Ten New Species and One New Combination. *IMA Fungus* **2018**, *9*, 333–369. [[CrossRef](#)]
137. Fan, X.L.; Bezerra, J.D.P.; Tian, C.M.; Crous, P.W. *Cytospora* (*Diaporthales*) in China. *Persoonia* **2020**, *45*, 1–45. [[CrossRef](#)]
138. Fotouhifar, K.-B.; Hedjaroude, G.-A.; Leuchtman, A. ITS RDNA Phylogeny of Iranian Strains of *Cytospora* and Associated Teleomorphs. *Mycologia* **2010**, *102*, 1369–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Zhao, S.F.; Guo, K.F.; He, L.; Yiming, A. First Report of *Cytospora Nivea* Causing Cytospora Canker on Walnut (*Juglans regia* L.) in the Tianshan Mountains Region of Xinjiang, China. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 2640. [[CrossRef](#)]
140. Schrader, C.; Schielke, A.; Ellerbroek, L.; John, R. PCR Inhibitors—Occurrence, Properties and Removal. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 1014–1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Jahanban-Esfahlan, A.; Ostadrahimi, A.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. A Comprehensive Review on the Chemical Constituents and Functional Uses of Walnut (*Juglans* spp.) Husk. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3920. [[CrossRef](#)]
142. Sasada, R.; Weinstein, M.; Prem, A.; Jin, M.; Bhasin, J. FIGARO: An Efficient and Objective Tool for Optimizing Microbiome RRNA Gene Trimming Parameters. *J. Biomol. Tech.* **2020**, *31*, S2.
143. Edgar, R.C.; Flyvbjerg, H. Error Filtering, Pair Assembly and Error Correction for Next-Generation Sequencing Reads. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3476–3482. [[CrossRef](#)]
144. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
145. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
146. Brown, S.P.; Veach, A.M.; Rigdon-Huss, A.R.; Grond, K.; Lickteig, S.K.; Lothamer, K.; Oliver, A.K.; Jumpponen, A. Scraping the Bottom of the Barrel: Are Rare High Throughput Sequences Artifacts? *Fungal Ecol.* **2015**, *13*, 221–225. [[CrossRef](#)]
147. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1160–1166. [[CrossRef](#)]
150. Talavera, G.; Castresana, J. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564–577. [[CrossRef](#)]
151. Castresana, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540–552. [[CrossRef](#)]
152. Bouckaert, R.; Vaughan, T.G.; Barido-Sottani, J.; Duchêne, S.; Fourment, M.; Gavryushkina, A.; Heled, J.; Jones, G.; Kühnert, D.; Maio, N.D.; et al. BEAST 2.5: An Advanced Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006650. [[CrossRef](#)]
153. Bouckaert, R.R.; Drummond, A.J. BModelTest: Bayesian Phylogenetic Site Model Averaging and Model Comparison. *BMC Evol. Biol.* **2017**, *17*, 42. [[CrossRef](#)]



154. Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; Suchard, M.A. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* **2018**, *67*, 901–904. [[CrossRef](#)]
155. Rambaut, A. FigTree. Available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed on 28 November 2022).

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Figures supplémentaires



**Supplementary Table S1.** Total number of sequence reads obtained for each primer set and each mock replicate (-1, -2, -3) after read pre-processing step with and without the ITS2 region extraction additional step.

<b>Primer</b>	<b>Mock1</b>			<b>Mock2</b>			<b>Mock3</b>			<b>Mock4</b>			<b>Mock5</b>		
<b>set</b>	<b>M1-1</b>	<b>M1-2</b>	<b>M1-3</b>	<b>M2-1</b>	<b>M2-2</b>	<b>M2-3</b>	<b>M3-1</b>	<b>M3-2</b>	<b>M3-3</b>	<b>M4-1</b>	<b>M4-2</b>	<b>M4-3</b>	<b>M5-1</b>	<b>M5-2</b>	<b>M5-3</b>
ITS	35601	30814	27198	26126	27820	27587	40788	36961	32021	39048	39513	30496	42444	37605	36061
ITS1	38898	35619	36616	37986	37910	34191	50891	41730	48657	50890	52575	43680	60083	51699	37401
GTAA	49065	38493	41646	48554	55057	52562	42014	47906	39697	45967	40318	41336	43261	47527	41009
GTAAm	25062	24707	24207	41340	36624	40907	34170	35971	32265	30477	30591	29960	32809	34190	31484
Kyo	77209	141712	66163	63558	76730	78118	69227	77797	79702	75000	75652	74618	80320	73034	73046

**Supplementary Table S2.** Amplification conditions for metabarcoding sequencing. Conditions are common to all primer sets. Final volume of reaction was 25  $\mu$ L. Conditions were determined by G enome Qu ebec Innovation Center.

Master Mix Components	Final concentration	Amplification cycles
Qiagen 10X Buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 X	Denaturing 96 cycles - 15 min
Roche DMSO	5%	
dNTP mix 10 mM_NEB	0.2 mM	Annealing 96 cycles - 30 sec 52 cycles - 30 sec 72 cycles - 60 sec
Qiagen HotStarTaq 5U/ $\mu$ L	0.01 U/ $\mu$ L	
H <sub>2</sub> O	q.s. 25 $\mu$ L	Extension 72 cycles - 10 min
Forward primer	0.6 $\mu$ M	
Reverse primer	0.6 $\mu$ M	
eDNA	8 pM	

**Supplementary Table S3.** Optimal trimming parameters of mock and environmental samples indicated by FIGARO for each primer pair.

Primer set	Samples	Fwd reads trimming parameter (bp)	Rev reads trimming parameter (bp)	Maximum expected error (Fwd;Rev)	Read retention (%)	Score
ITS	Mock	292	220	4;4	78,62	60,02
ITS1	Mock	284	228	2;2	82,71	80,71
GTAA	Mock	281	229	3;4	82,78	69,78
GTAAm	Mock	282	228	3;4	82,21	69,20
	Environmental	280	230	3;4	82,8	69,80
Kyo	Mock	287	223	3;3	83,4	75,40
	Environmental	278	232	2;3	80,1	75,10

Fwd: Forward; Rev: Reverse.

Maximum expected error corresponds, for a given read, to the mean maximum number of errors that would be observed in a large collection of reads, where the error rate at each position is given by its quality score and occurs independently [142]. Score corresponds to a value assigned at the trimming parameters taking into account read retention values from which maximum expected errors values are subtracted [143].

**Supplementary Table S4.** Number (nb) of sequences for each species composing our local ITS2 database. The total number of sequences corresponds to the sequences retrieved from the GenBank database. Number of GTAAm and Kyo amplicons are the *in silico* amplicons obtained with the GTAA182fm/526r and ITS3/ITS4\_KYO1 primer pairs. A total of 55 species and 71 species were represented in Kyo and GTAAm final databases respectively.

Classification	Species	Total nb of retrieved sequences	Kyo primers			GTAAm primers		
			Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>	Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>
<i>Bionectriaceae</i>	<i>Geosmithia flava</i>	4	0	0	0	2 <sup>b</sup>	1	1
	<i>Geo. lavendula</i>	7	2	1	1	3 <sup>b</sup>	1	1
	<i>Geo. morbida</i>	3	2	1	1	3 <sup>b</sup>	1	1
<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	82	13	1	1	48	1	1
	<i>Diplodia gallae</i>	8	0	0	0	2	1	1
	<i>D. mutila</i>	33	12	5	5	22	5	2
	<i>D. seriata</i>	74	22	2	2	43	4	3
	<i>Dothiorella iberica</i>	47	15	2	2	33	6	2
	<i>Dot. omnivora</i>	3	0	0	0	0	0	0
	<i>Dot. plurivora</i>	5	1	1	1	2	2	2
	<i>Dot. sarmentorum</i>	36	7	2	2	7	2	2
	<i>Dot. viticola</i>	22	7	2	2	9	2	2
	<i>Lasiodiplodia citricola</i>	5	0	0	0	1	1	1
	<i>L. mahajangana</i>	6	0	0	0	4	2	2
	<i>L. pseudotheobromae</i>	35	2	2	2	26	2	2
	<i>L. theobromae</i>	96	51	2	2	76	4	4
	<i>Neofusicoccum hellenicum</i>	5	0	0	0	5	1	1
	<i>N. luteum</i>	47	3	2	1	38	3	2
	<i>N. mediterraneum</i>	50	2	2	2	27	5	3
	<i>N. nonquaesitum</i>	29	1	1	1	28	2	2
	<i>N. parvum</i>	95	21	3	2	60	6	4
	<i>N. vitifusiforme</i>	81	3	2	1	44	6	2
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	54	4	2	2	16	4	2

Supplementary Table S4. Continued.

Classification	Species	Total nb of retrieved sequences	Kyo primers			GTAAM primers		
			Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>	Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>
<i>Diaporthaceae</i>	<i>Diaporthe amygdali</i>	210	5	3	3	16	4	4
	<i>Dia. australafricana</i>	7	1	1	1	7	4	2
	<i>Dia. biguttulata</i>	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Dia. capsici</i>	5	5	1	1	5	1	1
	<i>Dia. cynaroidis</i>	5	1	1	1	3	1	1
	<i>Dia. eres</i>	185	5	3	2	143	10	4
	<i>Dia. foeniculina</i>	124	28	5	5	109	8	4
	<i>Dia. juglandicola</i>	4	0	0	0	0	0	0
	<i>Dia. novem</i>	52	11	4	2	33	7	4
	<i>Dia. rudis</i>	79	20	3	1	68	7	2
	<i>Dia. shennongjiaensis</i>	6	2	1	1	2	1	1
<i>Didymellaceae</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> <sup>a</sup>	52	8	3	3	46	4	2
<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	180	16	6	4	133	13	3
	<i>C. fiorinae</i>	84	3	3	3	80	2	2
	<i>C. fructicola</i>	92	32	2	1	85	3	2
	<i>C. gloeosporioides</i>	126	6	2	1	74	8	3
	<i>C. godetiae</i>	73	10	1	1	71	4	4
	<i>C. kahawae</i>	7	0	0	0	7	2	2
	<i>C. nymphaeae</i>	143	26	1	1	143	8	4
	<i>C. siamense</i>	106	8	3	2	94	6	3
	<i>C. viniferum</i>	33	8	3	3	19	7	3
<i>Gnomoniaceae</i>	<i>O. leptostyla</i>	9	0	0	0	7	3	2
<i>Juglanconidaceae</i>	<i>Juglanconis appendiculata</i>	7	7	2	2	7	2	2
	<i>J. juglandina</i>	7	6	1	1	6	1	1

Supplementary Table S4. Continued.

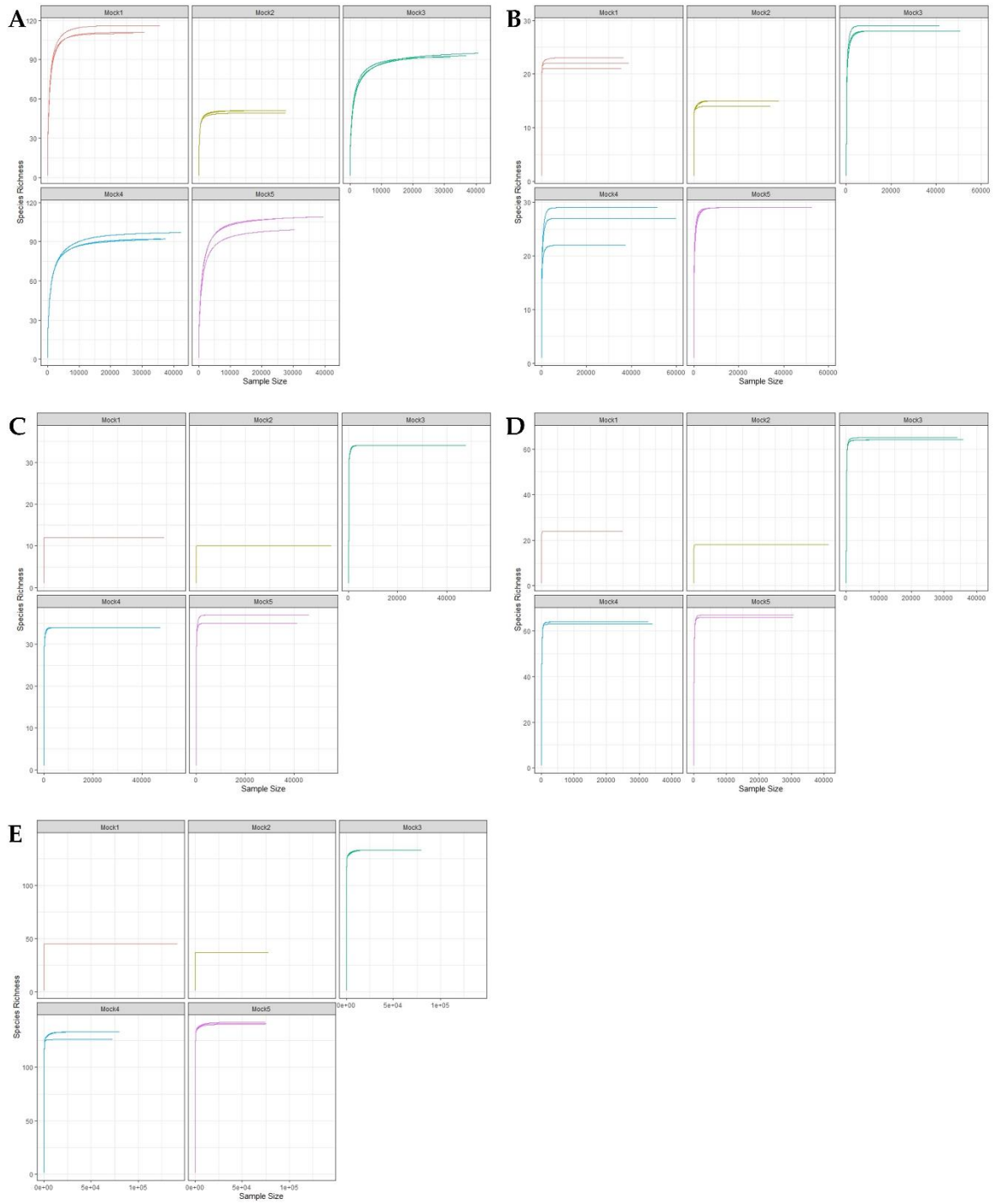
Classification	Species	Total nb of retrieved sequences	Kyo primers			GTAAM primers		
			Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>	Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>
<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	26	11	3	3	20	4	2
	<i>F. chlamyosporum</i>	11	2	2	1	6	4	1
	<i>F. culmorum</i>	18	5	4	3	11	4	2
	<i>F. equiseti</i>	22	9	2	2	21	3	2
	<i>F. graminearum</i>	232	21	2	2	227	12	2
	<i>F. incarnatum</i>	23	4	2	2	19	2	2
	<i>F. juglandicola</i>	6	4	1	1	6	1	1
	<i>F. oxysporum</i>	129	14	4	4	101	9	3
	<i>F. proliferatum</i>	70	28	3	2	53	10	2
	<i>F. solani</i>	212	26	4	4	59 <sup>a</sup>	16	3
<i>Plectosphaerellaceae</i>	<i>Gibellulopsis nigrescens</i> <sup>a</sup>	33	1	1	1	6	2	2
<i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria alternata</i>	138	5	3	3	132	7	4
	<i>A. arborescens</i>	20	3	2	2	18	3	3
	<i>A. tenuissima</i>	16	8	3	3	14	4	2
<i>Togniniaceae</i>	<i>Phaeoacremonium cinereum</i>	3	0	0	0	1	1	1
	<i>P. fraxinopennsylvanicum</i>	12	0	0	0	5	2	2
	<i>P. italicum</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. minimum</i>	55	2	1	1	37	11	2
	<i>P. parasiticum</i>	15	4	3	3	11	3	2
	<i>P. sicilianum</i>	3	0	0	0	1	1	1
	<i>P. tuscanum</i>	2	0	0	0	2	1	1
	<i>P. viticola</i>	10	1	1	0	7	2	1

Supplementary Table S4. Continued.

Classification	Species	Total nb of retrieved sequences	Kyo primers			GTAAM primers		
			Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>	Nb of amplicons	Nb of unique amplicons	Nb of retained amplicons for trees <sup>c</sup>
<i>Valsaceae</i>	<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	2	0	0	0	2	1	1
	<i>Cyt. californica</i>	29	0	0	0	0	0	0
	<i>Cyt. ceratosperma</i>	18	3	1	1	15	5	2
	<i>Cyt. chrysosperma</i>	23	1	1	1	11	1	1
	<i>Cyt. cincta</i>	3	0	0	0	3	3	3
	<i>Cyt. gigaalocus</i>	2	0	0	0	2	1	1
	<i>Cyt. joaquinensis</i>	3	0	0	0	9	6	3
	<i>Cyt. nivea</i>	18	0	0	0	0	0	0
	<i>Cyt. plurivora</i>	17	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> *E. nigrum* and *G. nigrescens* were the unique representative species of each genus ever isolated from environmental samples, so no other species of these genera were added to the databases for phylogenetic construction.

<sup>b</sup> Amplicons obtained with 2 mismatches allowed anywhere on primer sequences. <sup>c</sup> To improve clarity of trees, only some of the sequences were randomly kept.



**Supplementary Figure S1.** Rarefaction curves of high-quality sequence reads for each mock community replicate. A: ITS set. B: ITS1 set. C: GTAA set. D: GTAAM set. E: Kyo set.

CHAPITRE II - Etude de la diversité fongique associée aux  
fruits et rameaux de noyer présentant des symptômes de  
déperissement et leurs interactions





# I. Introduction des travaux

La mise au point méthodologique du séquençage métabarcoding présentée précédemment a pu être mise en œuvre pour décrypter les communautés fongiques associées aux symptômes de dépérissement du noyer et leurs interactions. Cette étude avait pour objectifs (i) d'explorer la diversité fongique associée aux brous et rameaux de noyer présentant des symptômes de dépérissement et aussi d'apparence saine à l'aide des analyses complémentaires culture-dépendante et culture-indépendante, (ii) d'évaluer la pathogénicité des principales espèces collectées suspectées d'être responsables des symptômes, (iii) d'étudier l'impact de facteurs climatiques et pratiques agronomiques sur la structure de ces communautés, et (iv) de déterminer de potentielles interactions entre les principales espèces suspectées d'être pathogènes, ainsi qu'entre ces espèces et les autres espèces composant le phytomicrobiome.

Pour ce faire, 12 noyeraies sélectionnées sur la base de leur historique de dépérissement évalué par les stations expérimentales, et réparties de manière équivalente entre les deux principaux bassins de production français (bassin du Sud-Ouest et bassin du Sud-Est) ont été échantillonnées lors de 4 campagnes de prélèvements. Ces parcelles étaient associées à différentes variétés (Franquette et Serr), mais aussi différentes pratiques agronomiques (telles que le recours ou non à l'irrigation, et l'application de traitements de types conventionnels ou de type biologique essentiellement à l'aide de produits à base de cuivre). Les campagnes consistaient à prélever des fruits symptomatiques avant la récolte (en septembre 2020 et août 2021) ainsi que des rameaux pendant la période printanière avant la fructification (mai 2020 et 2021), périodes durant lesquelles les symptômes sont bien visibles sur chacun de ces organes.

L'analyse de la composition des communautés fongiques a été réalisée à l'aide d'une approche culturale, par la mise en culture des échantillons, et aussi à l'aide d'une approche culture-indépendante par séquençage métabarcoding. L'isolement des espèces fongiques a conduit à l'obtention d'une collection de plus de 2000 isolats, dont 1873 représentant la collection de travail sur laquelle se basent les travaux présentés dans ce chapitre, composée uniquement d'un représentant de chaque espèce par organe analysé. L'identification des espèces sur la base du séquençage de la région ITS a été réalisée et le séquençage multigénique de représentants des espèces majeures est encore en cours et ne sera pas présenté dans ce manuscrit. Ces approches ont ainsi permis d'évaluer la prévalence des différentes espèces (nombre d'organes infectés par une espèce par rapport au nombre total d'organes analysés)

ainsi que leur abondance relative. L'obtention de cette collection a aussi permis la réalisation de tests de pathogénicité avec les principales espèces d'intérêt sur rameaux de 1 an détachés en conditions contrôlées. De plus, l'impact de différents facteurs, tels que l'organe d'origine, la région, l'année de prélèvement, la variété ou encore les données météorologiques a pu être évalué sur la base de ces résultats.

Nous avons ensuite cherché à identifier des éventuelles interactions entre 2 taxons de différentes façons, tout d'abord en étudiant les corrélations sur la base des données de prévalence (corrélogrammes) et d'abondance relative (en générant des réseaux de co-occurrence avec l'outil SparCC). Ces données ont permis de mettre en avant plusieurs corrélations significatives positives et négatives entre nos espèces pathogènes, suggérant de potentielles interactions de type antagoniste ou mutualiste. Pour aller plus loin, nous avons également cherché à savoir si ces associations ou exclusions étaient retrouvées à l'échelle de l'organe. Autrement dit, pour une corrélation positive mettant en jeu 2 taxons, nous avons déterminé, à l'aide de tests du Khi-2, si cette association entre ces 2 taxons était effectivement plus fréquemment retrouvée à l'échelle de l'organe que les deux taxons seuls, et inversement pour les corrélations négatives. Cette exploitation des résultats a permis de mettre en évidence des hypothèses que nous avons ensuite cherché à valider par des inoculations seules, mixtes et séquentielles sur rameaux détachés en conditions contrôlées.

**Ces travaux font l'objet d'un article en préparation, présenté en partie II du présent chapitre.**

*Au moment de l'écriture de ce manuscrit, des expérimentations et analyses sont toujours en cours afin d'amender les travaux présentement décrits. Tout d'abord, le séquençage de plusieurs gènes barcodes spécifiques de chacune des 6 espèces est en cours de réalisation, afin d'affiner l'identification taxonomique, actuellement basée exclusivement sur la région ITS. De plus, des tests de pathogénicité sont en cours de réalisation auprès des stations expérimentales. Ces tests sont réalisés sur fruits détachés et en vergers, et seront ajoutés à ce papier dès la fin de leur réalisation. Ceux-ci permettront l'obtention d'une vision plus large et plus précise de la pathogénicité des principales espèces. Enfin, pour les inoculations mixtes et séquentielles sur rameaux détachés, nous avons fait le choix de détecter et de quantifier les espèces inoculées par qPCR espèce- et genre-spécifique. Ainsi, les discussions et conclusions qui découlent des travaux présentés dans ce chapitre sont faites sur la base des données disponibles.*

## II. Article en préparation

**Belair M.**, Picot A., Masson C., Hébrard M.-N., Debled M., Morvant, L., Henri-Sanvoisin A., Tréguer S., Verhaeghe A., Laloum Y., Le Floch G., Pensec F. Etiology and epidemiology of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut associated with Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Glomerellaceae and Nectriaceae species in southern France. **Manuscript in preparation**

## **Etiology and epidemiology of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut in France**

Marie Belair<sup>1</sup>, Adeline Picot<sup>1</sup>, Cyrielle Masson<sup>2</sup>, Marie-Neige Hébrard<sup>3</sup>, Marie Debled<sup>3</sup>, Aude Moronvalle<sup>4</sup>, Léa Morvant<sup>1</sup>, Amandine Henri-Sanvoisin<sup>1</sup>, Sylvie Tréguer<sup>1</sup>, Agnès Verhaeghe<sup>2,4</sup>, Yohana Laloum<sup>4</sup>, Gaétan Le Floch<sup>1</sup>, Flora Pensec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> Station d'expérimentation Nucicole Rhône Alpes, 38160 Chatte, France

<sup>3</sup> Station Expérimentale de Creysse, Perrical 46600 Creysse, France

<sup>4</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prigonrieux, France

corresponding author : [flora.pensec@univ-brest.fr](mailto:flora.pensec@univ-brest.fr)

## Abstract

English walnut (*Juglans regia* L.) is an economically-important fruit crop worldwide, particularly in France, where it is the second most important fruit crop after apples in terms of surface area. Walnut orchards are targeted by numerous diseases, but new symptoms have been widely observed since 2015, consisting in typical branch dieback and fruit blight and necrosis. The aims of this study were to (i) identify the main fungal species composing the pathobiome using both culture-dependent and metabarcoding approach, (ii) test the pathogenicity of the main suspected fungal species on detached twigs, (iii) explore the impact of climate and agronomical practices on the structure of the pathobiome, and (iv) study the interactions between pathogenic species and members of the phytomicrobiome. From 2020 to 2022, both symptomatic and asymptomatic twigs and husks were collected from 12 commercial French walnut orchards from the 2 main production areas located in the South of France. Isolates were identified based on colony morphology and internal transcribed spacer region sequencing. Botryosphaeriaceae, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, and *Fusarium* species were consistently isolated from symptomatic husks and twigs. Among these taxa, *B. dothidea* and *C. godetiae* were significantly more associated with symptomatic husks, contrary to *D. eres* and *F. juglandicola*, more isolated from symptomatic twigs, in agreement with a significant impact of the organ type on the mycobiota structure based on ITS2 metabarcoding sequencing. The analysis of the pathobiome by metabarcoding further revealed that sampling campaign and area also significantly impacted its structure, either on twigs or husks (with  $R^2$  varying from 5% to 6.1%) while the use of irrigation and chemical versus biological treatments had lower impact. We also found that *Botryosphaeria* and *Diaporthe* were significantly more associated with warm and dry years, unlike *Colletotrichum*. Pathogenicity tests performed on detached twigs using mycelium plugs revealed that only Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species were pathogenic of variety Franquette, with *B. dothidea* and *N. parvum* being the most pathogenic species. Several significant positive and negative correlations were identified based on SparCC co-occurrence networks and correlograms based on prevalence data. In particular, the positive correlation between *D. eres* and *F. juglandicola* at the orchard and organ level was confirmed by mixed and sequential coinoculations on detached twigs, suggesting a facilitative interaction between these 2 species for symptom development. This work is the first comprehensive etiological and epidemiological study of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut in France.

**Keywords** dieback disease, fungal communities, metabarcoding, pathogenicity, interactions, *Juglans regia*

## Introduction

English walnut (*Juglans regia* L.), or common walnut, is the most cultivated species of the *Juglans* genus for its fruit production (Martínez-García *et al.* 2016). The worldwide production of walnuts is estimated to reach approximately 3.5 million tons, of which 37,000 tons are produced in France (FAOSTAT 2021). The French walnut industry is mainly concentrated in the south of France and is divided into two main production areas: the South-East area (Auvergne-Rhône-Alpes region) and the South-West area (Nouvelle-Aquitaine and Occitanie regions). Over the last thirty years, the walnut production area has increased by 148.8%, showing an increasing interest of the French producers in walnut cultivation (FAOSTAT 2021). Walnut growers have to face many challenges, including the management of pests and diseases, resulting in severe yield losses. Of these, the bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* and the anthracnose caused by *Ophiognomonia leptostyla* have been historically encountered (Radix *et al.* 1994; Verhaeghe 2014). These challenges were further compounded by the development of a form of anthracnose caused by species of the genus *Colletotrichum* and responsible for fruit losses of up to 70%, since 2007 onwards (Da Lio *et al.* 2018). More recently, in 2015, emergent symptoms, rarely observed so far in France, were reported at a nationwide level (Laloum *et al.* 2022). These new symptoms were characterized by fruit necrosis and blight, twig and shoot necrosis further leading to branch and even tree dieback associated with defoliation and dead buds, as well as branch canker (Laloum *et al.* 2022).

In a previous survey conducted in the South-West of France in 2019, fungi isolated from symptomatic walnut husks and twigs showing the latter symptoms were identified as belonging mainly to the family Botryosphaeriaceae, including *Botryosphaeria* spp., *Dothiorella* spp. and *Neofusicoccum* spp., and the genus *Diaporthe* (teleomorph of *Phomopsis* spp.), as well as to the *Colletotrichum* and *Fusarium* genera to a lesser extent (Trouillas *et al.* 2023). The symptomatology combined with the identification of species associated with symptoms suggested that the “*Botryosphaeria* and *Phomopsis* canker and blight disease”, also known as “Branch dieback and shoot blight disease”, was present in French walnut orchards, in association with other phytopathogenic species. This disease is mainly known to be widespread in California since the early 2000s (Chen *et al.* 2014), and has more recently been reported in



European countries such as the Czech Republic (Eichmeier *et al.* 2020) Spain (López-Moral *et al.* 2020b), Italy (Gusella *et al.* 2021), Romania (Mihaescu *et al.* 2021), and Hungary (Zabiák *et al.* 2023). These studies reported up to ten species of the family Botryosphaeriaceae and up to two *Diaporthe* species, isolated from samples associated with dieback symptoms of English walnut. Moreover, other species such as *Alternaria alternata*, *Cadophora* spp., *Colletotrichum acutatum*, *Cytospora* spp., *Fusarium* spp., and *Phaeoacremonium* spp. were identified, but to a lesser extent. Overall, these studies highlighted the frequent co-occurrence of species of Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* on symptomatic walnut organs.

Members of the Botryosphaeriaceae family and *Diaporthe* genus are considered to be endophytes, saprophytes and pathogens. Their ability to develop in organs without developing symptoms, leading to latent infection, and to switch to a pathogenic lifestyle is widely acknowledged (Hilário & Gonçalves 2023; Slippers & Wingfield 2007). These species are responsible for numerous diseases on a wide range of woody and herbaceous plants, such as grapevine (Guerin-Dubrana *et al.* 2019), pistachio (López-Moral *et al.* 2020a) and oak (Batista *et al.* 2020; Moricca *et al.* 2018), and are frequently found co-occurring on hosts, prompting the determination of their aggressiveness in single or mixed inoculations (Agustí-Brisach *et al.* 2019; Wallis *et al.* 2022). Overall, *B. dothidea* and *Diaporthe* species were more often associated with weak disease severity on walnut trees, whereas *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum* species were frequently associated with a higher aggressiveness (Antony *et al.* 2023; Chen *et al.* 2014; Eichmeier *et al.* 2020; Gusella *et al.* 2021; Jiménez Luna *et al.* 2022a; Li *et al.* 2016; López-Moral *et al.* 2020b).

Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* were also often reported in association with secondary genera, including *Colletotrichum* and *Fusarium*. The former genus is composed of worldwide distributed pathogenic species responsible for numerous diseases (Cannon *et al.* 2012), including anthracnose on walnut trees. Moreover, it was also identified in walnut fruits showing brown apical necrosis symptoms (Belisario *et al.* 2010; Wang *et al.* 2019), as well as in apparently healthy walnut leaves (Wang *et al.* 2022b). As for the *Fusarium* genus, it is composed of species considered as endophytes, saprophytes and pathogens. Some species have already been identified as endophytes of apparently healthy walnut organs (Belisario *et al.* 2010; Wang *et al.* 2020, 2022b), but many of them were also collected from symptomatic organs and associated with walnut diseases. This mainly includes the brown apical necrosis (BAN) disease (Belisario *et al.* 2010; Moragrega & Özaktan 2010) and twig and stem canker symptoms, mainly associated with *F. solani* (Chen & Swart 2000; Mulero-Aparicio *et al.* 2019; Polat *et al.* 2020; Tuerdi *et al.* 2023).

The emerging and widespread nature of these symptoms urged us to carry out an etiological and epidemiological study of branch dieback and fruit necrosis of English walnut on a larger scale in France. Furthermore, given the complexity of these diseases where several pathogenic species are often co-occurring, we also focused on the whole pathobiome, taking into account potential interactions. To do so, the objectives of this work were (i) to isolate and identify the main fungal species associated with branch dieback and fruit necrosis of English walnut based on morphological and molecular characterization, and evaluate their pathogenicity on walnut twigs in single inoculations, (ii) to describe more extensively the fungal pathobiome composition based on a metabarcoding approach, (iii) to study the climatic factors and agronomic practices influencing the pathobiome based on culture-dependent and -independent approaches, and (iv) to determine potential interactions between pathogenic species and with members of the phytomicrobiome based on co-occurrence networks and correlation analysis, before validation on detached twigs using single, mixed and sequential inoculations.

## **Materials and methods**

### **Sampling sites and sample collection**

From late summer 2020 to early summer 2022, field surveys were conducted to study the occurrence of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut in southern France. Twelve commercial orchards (P1 to P12) belonging to the Auvergne-Rhône-Alpes region (South-East production area, P1 to P6, variety Franquette) and the Nouvelle-Aquitaine region (South-West production area, P7 to P12, variety Franquette or cultivar Serr) were surveyed (**Table 1**). In each orchard, symptomatic and asymptomatic walnut organs were collected from different trees during four sampling campaigns. Walnut husks were collected in September 2020 and August 2021, and twigs were collected in May 2021 and June 2022. In each orchard, 5 symptomatic walnut husks were collected during September 2020, while 12 symptomatic and 3 asymptomatic walnut husks and the same number of twigs were collected during the three other campaigns, when possible. The P7 orchard could not be sampled during the sampling campaign of August 2021. All samples were stored at 4°C until analyzed within one week.

**Table 1.** Description of walnut orchards sampled for this study.

Orchard	Variety/Cultivar	Agricultural system	Irrigation	Location	Coordinates
P1	Franquette	Conventional	No	Vinay	45.201437, 5.421654
P2	Franquette	Conventional	No	Saint-Hilaire-du-Rosier	45.092966, 5.270988
P3	Franquette	Conventional	No	Saint-Lattier	45.085187, 5.190457
P4	Franquette	Conventional	Yes	Saint-Hilaire-du-Rosier	45.101075, 5.241277
P5	Franquette	Organic	No	Rochechinard	45.043283, 5.256293
P6	Franquette	Organic	No	Saint-André-en-Royans	45.082702, 5.342242
P7	Serr	Conventional	Yes	Creysse	44.9007444, 1.6100139
P8	Franquette	Organic	No	Floirac	44.9034389, 1.6474278
P9	Serr	Conventional	Yes	Nojals-et-Clotte	44.7116472, 0.7712083
P10	Franquette	Conventional	Yes	Saint-Cyprien	44.8467500, 1.0624222
P11	Franquette	Organic	Yes	Martel	44.9540528, 1.6410972
P12	Franquette	Conventional	Yes	Creysse	44.8873833, 1.6066278

## Culture-dependent analysis

### *Collection of fungal isolates*

Environmental samples were sterilized and cut into small pieces as described in Belair *et al.* (2023) and 5 pieces of each sample were placed onto potato dextrose agar (PDA) medium supplemented with 10 mL/L of a Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Fungal isolates were collected on PDA medium and grown for an incubation period of 4 days at 25°C in the dark followed by 3 days at room temperature under natural light.

The ratio of the number of organs contaminated with a species to the total number of organs analyzed (i.e. the prevalence) was assessed for each species. A chi-squared test was used

to determine whether the prevalence of each species on symptomatic organs differed from that on asymptomatic ones. Pairwise correlations between the prevalence of the 6 main species were calculated for both symptomatic walnut husks and twigs regardless of the campaign using Pearson's correlation coefficient (PCC) and plotted using the corrplot R package (Wei & Simko 2021). Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) were plotted.

The beta-diversity analysis was performed with the species' prevalence on the symptomatic organs. Statistical analysis was performed with a Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) followed by a pairwise multilevel comparison using the vegan and pairwise Adonis R packages (Arbizu 2023; Oksanen *et al.* 2022).

### ***Molecular identification of fungal isolates***

For DNA extraction, mycelium of fungal cultures was scraped directly from the medium using a sterile scalpel. Extractions were performed using FastDNA™ SpinKit (MP Biomedicals, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified using ITS4 and ITS5 primers and following White *et al.* (1990) instructions. Sequencing of the obtained amplicons was performed using the same primer pair by Eurofins Genomics platform (Cologne, Germany). Contig assembly was performed using DNA Baser software and taxonomic assignment to the closest known relatives was performed by comparing contigs with the GenBank database using the "Basic Local Alignment Search Tool" for nucleotide sequences (BlastN; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 5 September 2022); Altschul *et al.* 1990).

### **Culture-independent analysis**

#### ***DNA extraction of environmental samples***

For each collection campaign and for each of the 12 orchards, all samples with the same symptomatology were pooled before being lyophilized and ground as described in Belair *et al.* (2023), yielding a total of 282 samples (94 environmental samples  $\times$  3 replicates). Total DNA extractions were performed in triplicate using FastDNA™ Spin Kit and following manufacturer's instructions. DNA solutions were quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Extraction blanks were prepared alongside the samples to check for potential contamination.

### ***Metabarcoding sequencing and bioinformatic***

To study fungal communities, primers ITS3 and ITS4\_KYO1 were selected to amplify the ITS2 region (Toju *et al.* 2012; White *et al.* 1990). This primer pair was previously evaluated as the most appropriate for analyzing fungal communities associated with walnut samples due to its taxonomic resolution and ability to amplify a wide range of fungal diversity (Belair *et al.*, 2023). Amplicon libraries and Illumina MiSeq PE 300 bp sequencing were performed in the same run at the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montréal, Canada). Adapter and amplification conditions were the same as described in Belair *et al.* (2023).

Similarly, the workflow used for sequence analysis in this study was the one defined as the most appropriate for the analysis of fungal communities in walnut samples using this primer pair in Belair *et al.* (2023).

### ***Alpha- and beta-diversity analysis***

The calculation of three alpha-diversity indexes (Observed richness, Shannon and Simpson's inverse) for all samples was based on a rarefied dataset at the smallest read counts using the phyloseq R package (McMurdie & Holmes 2013). These indexes were further compared within and between samples by performing an ANOVA and independent sample t.test analyses with the *stat\_compare\_means* function of the ggpubr R package (Kassambara 2023). In all cases, data were tested for equality and homogeneity of variances.

Relative abundances of taxa across samples were compared after a step of normalization using the DESeq2 method (Love *et al.* 2014) as suggested by McMurdie & Holmes (2014). Differences were expressed as log<sub>2</sub> fold changes and their significance levels were tested using Wald test with an alpha threshold set at 0.05 (Love *et al.* 2014). The normalized datasets were used to produce distance matrices based on Bray-Curtis dissimilarity distance (Bray & Curtis 1957) to perform Principal Coordinates Analysis (PCoA) using ggplot2 R package (Wickham 2016). Statistical analyses were performed with a PERMANOVA followed by a pairwise multilevel comparison using the vegan and pairwiseAdonis R packages (Arbizu 2023; Oksanen *et al.* 2022).

Significant correlations between the relative abundance of the top 15 genera were established for each organ type using Sparse Correlations for Compositional data algorithm implemented in SparCC python module (Friedman & Alm 2012; Legorreta 2021). The co-occurrences networks were plotted for each symptomatic organ, regardless of the campaign, using the qgraph R package (Epskamp *et al.* 2012). Only correlations with a correlation strength

absolute value greater than 0.3 ( $|\text{coefficient correlation (=corr)}| > 0.3$ ) and p-value inferior to 0.05 were plotted.

## Pathogenicity tests

### *Fungal isolates*

Twenty-nine isolates in total were selected for pathogenicity tests on detached shoots (6 isolates of *B. dothidea*, *F. juglandicola* and *N. parvum*, 5 isolates of *D. eres*, and 3 isolates of both *C. fiorinae* and *C. godetiae*). These isolates were selected from the list of isolates collected from symptomatic walnut husks or twigs during the 4 collection campaigns (**Table 2**). All isolates were grown on PDA at 25°C in darkness. Inoculations were carried out using mycelium plugs obtained from the margins of actively growing colonies at least 2 days old.

**Table 2.** Fungal isolates used for the pathogenicity and interaction tests.

Species	Isolate	Organ	Campaign	Origin	Date of collection
Botryosphaeriaceae					
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	SHP1T12I2_2021	Twigs	May 2021	Vinay	05/17/2021
	SHP10T7I1_2021	Twigs	May 2021	Saint-Cyprien	05/10/2021
	CAP8T6I3_2021	Twigs	May 2021	Floirac	05/10/2021
	SHP5H1I2_2020	Husks	September 2020	Rochechinard	10/12/2020
	SHP3H5I2_2020	Husks	September 2020	Saint-Lattier	10/12/2020
	SHP1H10I2_2021	Husks	August 2021	Vinay	09/02/2021
<i>Neofusicoccum parvum</i>	SHP5T6I3_2021	Twigs	May 2021	Rochechinard	05/17/2021
	CAP3T15I3_2021	Twigs	May 2021	Saint-Lattier	05/17/2021
	CAP12T4I1_2021 <sup>a</sup>	Twigs	May 2021	Creysse	05/17/2021
	SHP4H4I1_2020	Husks	September 2020	Saint-Hilaire-du-Rosier	10/12/2020
	SHP7H1I1_2020	Husks	September 2020	Creysse	10/09/2020

<sup>a</sup> Isolates used for the *in vitro* evaluation of interactions.

**Table 2.** Continued.

Species	Isolate	Organ	Campaign	Origin	Date of collection
Botryosphaeriaceae					
<i>Neofusicoccum parvum</i>	SHP9H4I2_2021	Husks	August 2021	Nojals-et-Clotte	08/11/2021
Diaporthaceae					
<i>Diaporthe eres</i>	SHP10T12I2_2021	Twigs	May 2021	Saint-Cyprien	05/10/2021
	SHP2T8I6_2021	Twigs	May 2021	Saint-Hilaire-du-Rosier	05/17/2021
	SHP5T15I4_2021 <sup>a</sup>	Twigs	May 2021	Rochechinard	05/17/2021
	SHP11H5I6_2020	Husks	September 2020	Martel	10/09/2020
	SHP4H4I5_2020	Husks	September 2020	Saint-Hilaire-du-Rosier	10/12/2020
Glomerellaceae					
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	SHP6T7I2_2021	Twigs	May 2021	Floirac	05/10/2021
	SHP10T10I1_2021	Twigs	May 2021	Saint-Cyprien	05/10/2021
	SHP1T1I5_2022	Twigs	May 2021	Vinay	01/07/2022
<i>C. godetiae</i>	SHP8T11I2_2021	Twigs	May 2021	Floirac	05/10/2021
	SHP11T14I2_2021	Twigs	May 2021	Martel	05/10/2021
	SHP3T11I9_2021	Twigs	May 2021	Saint-Lattier	05/17/2021
Nectriaceae					
<i>Fusarium juglandicola</i>	SHP4T5I7_2021	Twigs	May 2021	Saint-Hilaire-du-Rosier	05/17/2021
	SHP6T6I8_2021	Twigs	May 2021	Saint-André-en-Royans	05/17/2021
	SHP10T7I3_2021 <sup>a</sup>	Twigs	May 2021	Saint-Cyprien	05/10/2021
	SHP12H2I6_2020	Husks	September 2020	Creysse	10/09/2020

<sup>a</sup> Isolates used for the *in vitro* evaluation of interactions.



**Table 2.** Continued.

Species	Isolate	Organ	Campaign	Origin	Date of collection
Nectriaceae					
<i>Fusarium juglandicola</i>	SHP2H2I5_2020	Husks	September 2020	Saint-Hilaire-du-Rosier	10/12/2020
	SHP8H13I2_2021	Husks	August 2021	Floirac	08/11/2021

<sup>a</sup> Isolates used for the *in vitro* evaluation of interactions.

### ***Inoculation of detached twigs***

One-year-old detached twigs of walnut variety Franquette were collected in February 2023 from an experimental orchard belonging to the walnut experimental station (SENuRA) located in Chatte (Isère department, Auvergne-Rhône-Alpes region). Twigs approximately 1 m long were stored at 4°C up to 15 days before being processed. To carry out the tests on fresh wood only, the two ends were cut off (about 10 cm) to remove any potentially dried parts. Then, segments of approximately 20 cm including 2 nodes were cut. Prior to inoculation, the bark surface was disinfected with a 70% ethanol solution. A 6-mm-diameter drill bit was used to drill segments down to the pith. Subsequently, they were inoculated with a 6-mm-diameter mycelium plug which was deposited in contact with the pith, and the inoculated point was immediately covered with petroleum jelly and wrapped with Parafilm. Both ends were sealed with melted paraffin to prevent desiccation and segments were placed in humidity chambers (plastic containers, 27 × 20.5 × 7 cm) filled with sterile filter paper (Grosseron, Couëron, France) and 90 mL sterile distilled water. A total of thirteen segments were placed in each humidity chamber, i.e. ten segments inoculated with one isolate and three control segments including a drilled segment without a PDA plug and petroleum jelly, a drilled segment without a PDA plug and covered with petroleum jelly, and a drilled segment inoculated with a PDA plug and covered with petroleum jelly. The humidity chambers were incubated in a climatic chamber (Fitotron<sup>®</sup> SGC 120, Weiss Technik France S.A.S., Eragny, France) at 25°C with a constant humidity level of 40% and in darkness. The development of the lesion was checked every 10 days in one twig segment and was recorded for all segments when the lesion was almost as long as the segment in case of rapid development (10 days for *B. dothidea*, 11 days for *N. parvum* and 12 days for *D. eres*), or after 31 days in the case of slow development (*Colletotrichum* species and *F. juglandicola*). The size of the necrotic lesion was measured after removing the outer bark along the entire length of the segment with a sterile scalpel. The lesion

length of controls was recorded at the same time as the segments of the species with which they were incubated. The rate of lesion development per day was then calculated (mm/day). In order to check for the presence of the inoculated isolates in the observed necroses, the margins of the lesion were cut and placed onto PDA supplemented with antibiotics and incubated at 25°C in the dark as described above. The percentage of reisolation for each isolate was then calculated.

In all cases, mean lesion rate were compared according to Tukey's HSD test at  $\alpha = 0.05$ . There were no significant differences between the necrosis rate of the three control treatments based on Tukey's HSD test ( $\alpha = 0.05$ ), therefore these data were combined for statistical analyses. Statistical comparisons were performed between all tested species and controls (regardless of isolates) and then between all isolates of a species and controls.

### ***Evaluation of interactions between fungal species in detached twigs***

Interactions were assessed between *D. eres* and *N. parvum* and between *D. eres* and *F. juglandicola* on 1-year-old detached twigs obtained from the same batch of twigs used for pathogenicity tests. The inoculation and incubation processes were the same as described previously. For inoculum preparation, all the isolates were grown on a sterile cellulose nitrate membrane filter (pore size: 0.2  $\mu\text{m}$ , Sartorius, Göttingen, Germany) placed on PDA at 25°C in darkness, in order to facilitate the introduction of both species into the drilled segments. Inoculations were performed using small pieces (4 × 4 mm) of filter covered with actively growing mycelium. Inoculations involving either *D. eres* and *N. parvum*, or *D. eres* and *F. juglandicola* isolates (**Table 2**), were conducted as follows: (i) single inoculations of one of the 2 isolates, (ii) inoculations with both isolates at the same time, and (iii) sequential inoculations with the second isolate inoculated 4 days after the first one in the same hole and vice-versa. Inoculations were performed on 10 segments for each condition. Ten control segments were included and inoculated with a piece of non-inoculated sterile cellulose nitrate membrane filter. All inoculation points were wrapped with Parafilm and both ends of the twig were sealed with melted paraffin. All segments corresponding to the same treatment with the same isolates as well as control segments were placed in humidity chambers filled with filter paper and 90 mL sterile distilled water and incubated as described previously. The lesion length was recorded after 8 days for all segments inoculated with *D. eres* and/or *N. parvum* and after 10 days for all segments inoculated with *D. eres* and/or *F. juglandicola* and for controls.

The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test were used to compare the lesion length (mm) to determine the differences in aggressiveness between fungal species used for single-

and co-inoculations on detached twigs. The control segments were removed from the analysis as no necrosis had developed.

### Meteorological data

The meteorological data were retrieved from Meteo France (Meteo France 2023). The mean daily temperature and rainfall were collected from the 6 weather stations closest to the studied orchards (**Table 3**). Three stations were located in the Auvergne-Rhône-Alpes region, in the South-East production area, while the three others were located in the Nouvelle-Aquitaine region, in the South-West production area. The data were statistically compared using ANOVA followed by Tukey's HSD test.

**Table 3.** Description and location of weather stations used in this study.

Name	INSEE number <sup>a</sup>	Region	Coordinates	Associated orchard
CHATTE_SAPC	38095001	Auvergne-Rhône-Alpes	45.1401, 5.306	P2, P3, P4
SERRE-NERPOL_SAPC	38275002		45.2845, 5.353	P1
ST-JEAN-EN-ROYANS	26307001		45.0091, 5.2925	P5, P6
LES-EYZIES-DE-TAYAC	24172001	Nouvelle-Aquitaine	44.9351, 1.0195	P10
MONPAZIER	24280001		44.684, 0.8916	P9
SALIGNAC-EYVIGUES	24516002		44.9366, 1.3646	P7, P8, P11, P12

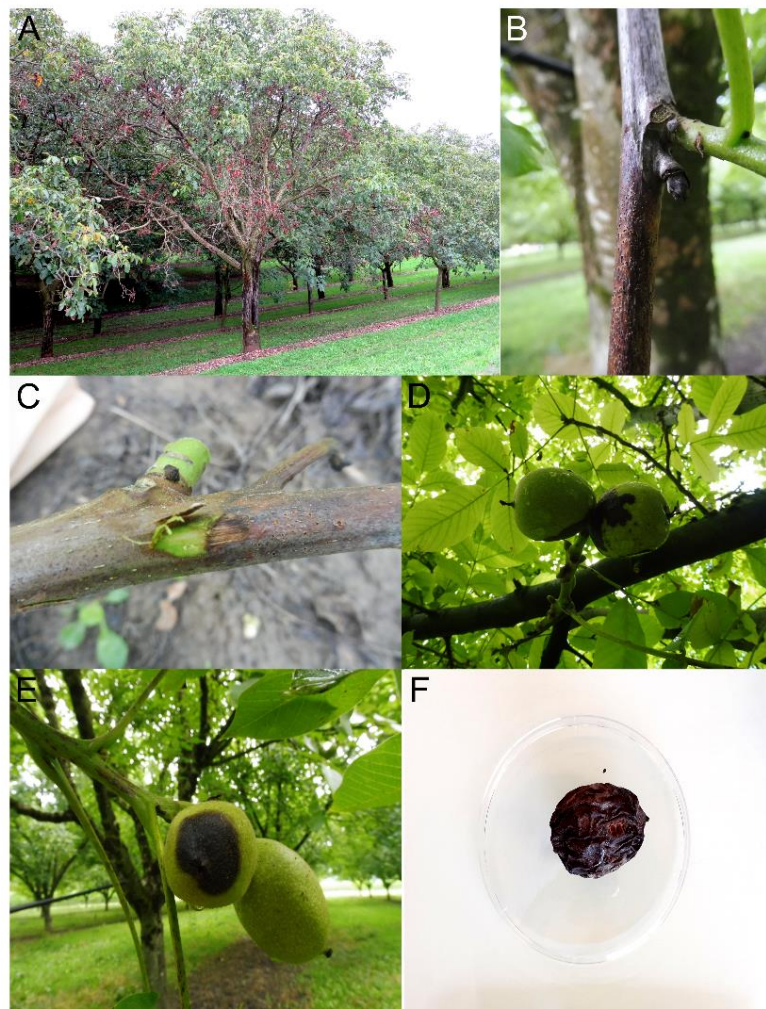
<sup>a</sup>INSEE: Institut National de la Statistique et des Études Économiques.

## Results

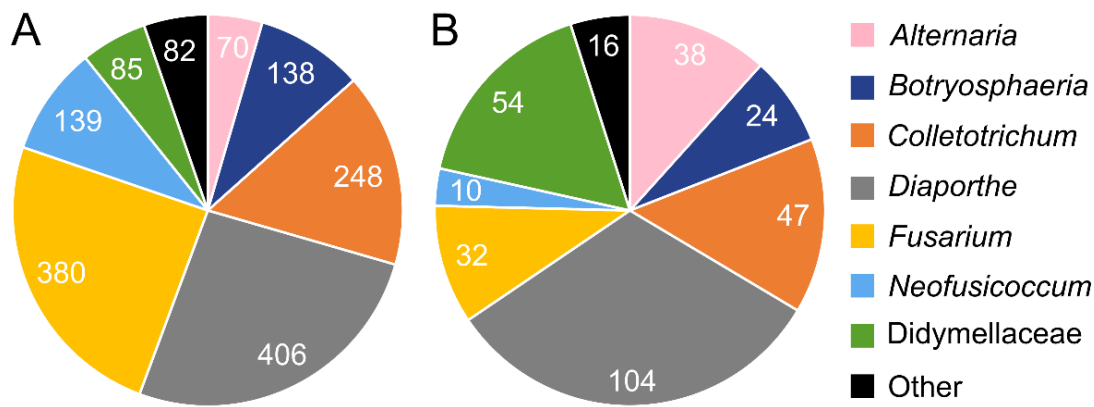
### Field surveys and fungal isolation

Samples with typical dieback symptoms were collected during the four sampling campaigns and included blighted and necrosed fruits (mummified in some cases), and defoliation and necrosis on shoots and twigs as well as cankers with internal discoloration (**Figure 1**). Fungal cultures were obtained from all the 476 symptomatic samples (188 walnut husks and 288 twigs), as well as 95 out of 105 asymptomatic samples (33 walnut husks and 72 twigs), yielded to a collection of 1873 fungal isolates excluding isolates from the same species collected from the same organ. A total of 95% of isolates collected from symptomatic samples

were represented by 6 endophytic/pathogenic fungal genera and the Didymellaceae family. The *Diaporthe* genus was the most collected one, representing 26.2% of the isolates, followed by the *Fusarium* (24.5%) and the *Colletotrichum* genera (16.0%). The isolation of members of the family Botryosphaeriaceae, represented by the two *Botryosphaeria* (8.9%) and *Neofusicoccum* (9%) genera, was less significant. Finally, the Didymellaceae family and the *Alternaria* genus represented 5.5% and 4.5% of the fungal collection, respectively (**Figure 2A**). The same 7 taxa were also found predominant in asymptomatic samples (309 isolates out of 325). The most represented genus was *Diaporthe* (32%), followed by the Didymellaceae family (16.6%), *Colletotrichum* (14.5%), *Alternaria* (11.7%) and *Fusarium* (9.8%). Finally, the two Botryosphaeriaceae genera were represented by only 10.5% of the collected isolates (**Figure 2B**).



**Figure 1.** Symptoms of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut in southern France. A. Walnut tree showing decayed branches and necrotic foliage. B. Typical symptoms of twig blight on young twig and dead bud. C. Wood discoloration of blighted twig. D, E. Typical fruit necrosis symptoms. F. Mummified fruit.



**Figure 2.** Distribution of species collected from symptomatic (A) and asymptomatic (B) twigs and husks over the four sampling campaigns. Values indicate the total number of isolates assigned to each taxa.

Each genus was mainly represented by up to two species in both symptomatic and asymptomatic organs, including *A. alternata/tenuissima*, *B. dothidea*, *C. fioriniae* and *C. godetiae*, *D. eres* and *D. foeniculina*, *F. juglandicola* and *F. solani*, and *N. parvum*. *C. godetiae* was the major species of the *Colletotrichum* genus (242 out of the 295 collected isolates), as well as *D. eres* belonging to the *Diaporthe* genus (351 out of the 510 collected isolates), and *F. juglandicola* belonging to the *Fusarium* genus (249 out of the 412 collected isolates). Interestingly, *B. dothidea* and *N. parvum* were the only species belonging to the Botryosphaeriaceae family. As the ITS region was insufficient to assign the major part of the isolates belonging to the Didymellaceae family at the genus level, only the *Boeremia* and *Epicoccum* genera were identified, representing 38.1% and 18% of the isolates, respectively.

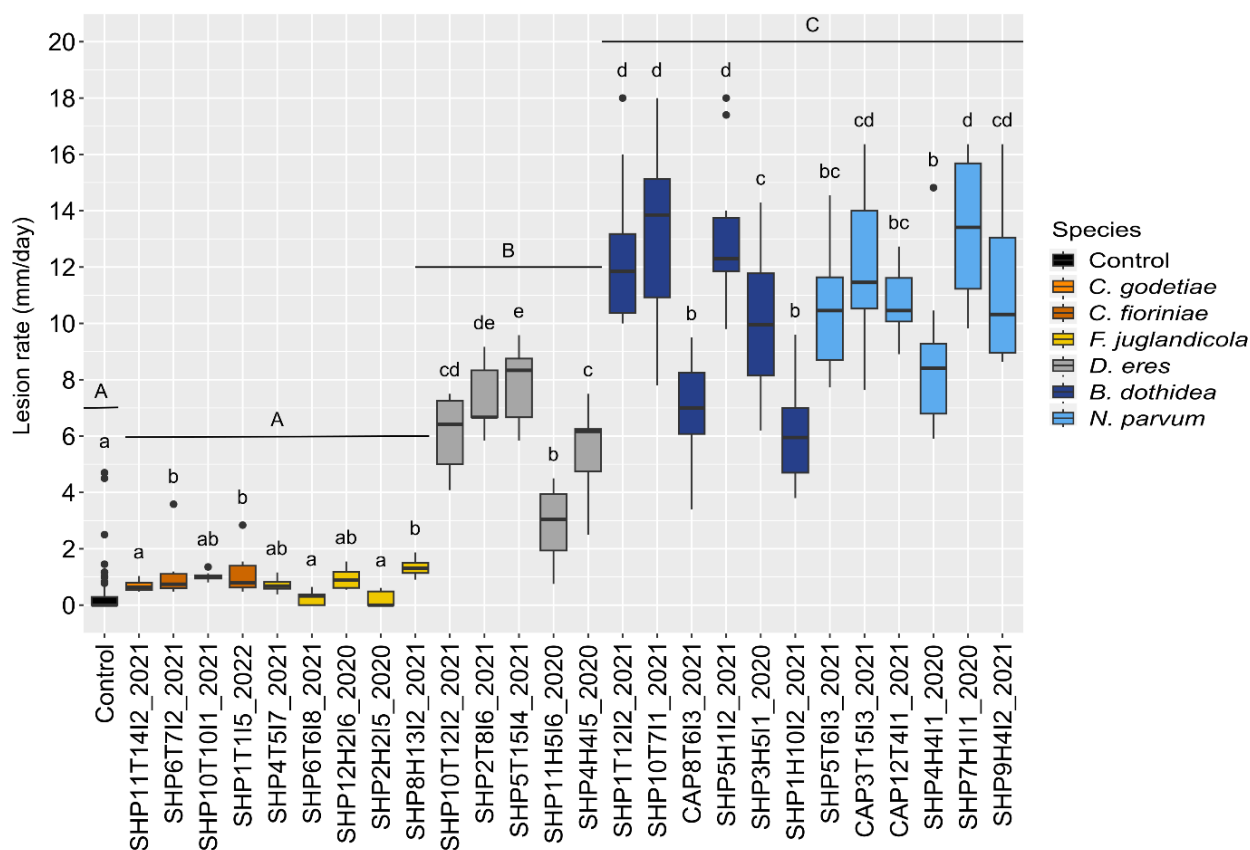
Following these results, we chose to determine the aggressiveness of the 6 predominant species (*B. dothidea*, *N. parvum*, *D. eres*, *F. juglandicola*, *C. godetiae* and *C. fioriniae*), which are known for their pathogenicity either on wood and/or fruits, except for *F. juglandicola* for which no information was available due to its recent characterization (Crous *et al.* 2021).

## Pathogenicity tests

### *Single inoculation on detached twigs*

After inoculation on 1-year-old detached twigs of the walnut cultivar Franquette, 20 isolates out of 29 (**Table 2**) were able to induce significantly longer necrotic lesions compared to control (**Figure 3**). The SHP8T11I2\_2021 and SHP3T11I9\_2021 isolates of *C. godetiae*, and the SHP10T7I3\_2021 isolate of *F. juglandicola* were only reisolated from one single inoculated segment out of 8 and 9 segments, respectively, thus invalidating Koch's postulate. These

isolates were therefore removed from the analysis and lesion development rates were not calculated. In addition, lesions caused by *C. godetiae*, one isolate of *C. fioriniae* and four isolates of *F. juglandicola*, although reisolated, were not significantly different from controls.



**Figure 3.** Lesion rate (mm/day) of the isolates of *Colletotrichum godetiae*, *C. fioriniae*, *Fusarium juglandicola*, *Diaporthe eres*, *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* inoculated with mycelium plugs on 1-year-old detached shoots of walnut variety Franquette under laboratory conditions. Boxes with the same letter do not differ significantly according to Tukey’s HSD test ( $\alpha = 0.05$ ). Upper case letters correspond to comparisons at the species level regardless of isolates. Lower case letters correspond to comparisons between isolates and the control within a species.

Among the considered pathogenic isolates (i.e. *C. fioriniae* SHP6T7I2\_2021 and SHP1T1I5\_2022, *F. juglandicola* SHP8H13I2 and all isolates of *D. eres*, *B. dothidea* and *N. parvum*), significant differences in aggressiveness in terms of necrotic lesion development were observed within species, with mean lesion rate varying from 0.2 to 13.3 mm per day (see **Supplementary Table S1**). Although significant differences could be found between isolates of a species, the ranking by species or family was generally respected. Overall, the *Colletotrichum* and *Fusarium* isolates induced the shortest lesions, similar to control conditions (between 2 and 3.5 cm on average after 31 days of incubation, corresponding to a mean rate

between 0.2 and 1.3 mm/day), followed by *D. eres* isolates (mean lesion rate ranging from 6 to 13.3 mm/day) while the Botryosphaeriaceae isolates exhibited the significantly highest aggressiveness (mean lesion rate ranging from 6 to 13.3 mm/day). All fungal isolates were reisolated from the margins of the lesion, with a percentage of reisolation ranging from 44.4 to 100%. No positive reisolations were obtained from control segments (**Table 4**).

**Table 4.** Frequency of reisolation (%) of fungal isolates used in pathogenicity tests on 1-year-old detached shoots of walnut variety Franquette under laboratory conditions.

Species	Isolate	Frequency of reisolation (%)
Botryosphaeriaceae		
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	SHP1T12I2_2021	100
	SHP10T7I1_2021	100
	CAP8T6I3_2021	100
	SHP5H1I2_2020	100
	SHP3H5I2_2020	100
	SHP1H10I2_2021	100
<i>Neofusicoccum parvum</i>	SHP5T6I3_2021	100
	CAP3T15I3_2021	100
	CAP12T4I1_2021	100
	SHP4H4I1_2020	100
	SHP7H1I1_2020	100
	SHP9H4I2_2021	100

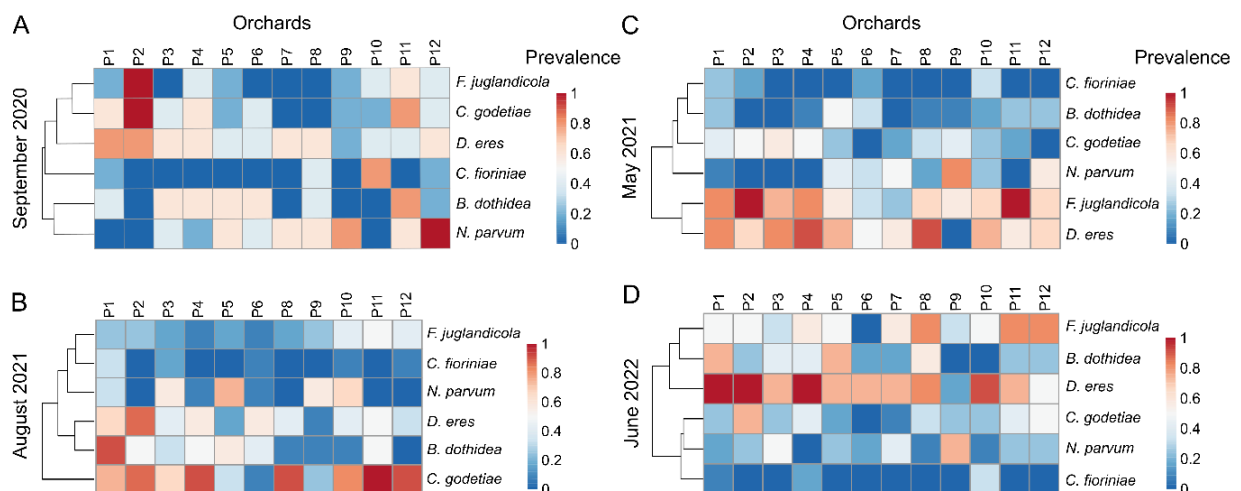


**Table 4.** Continued.

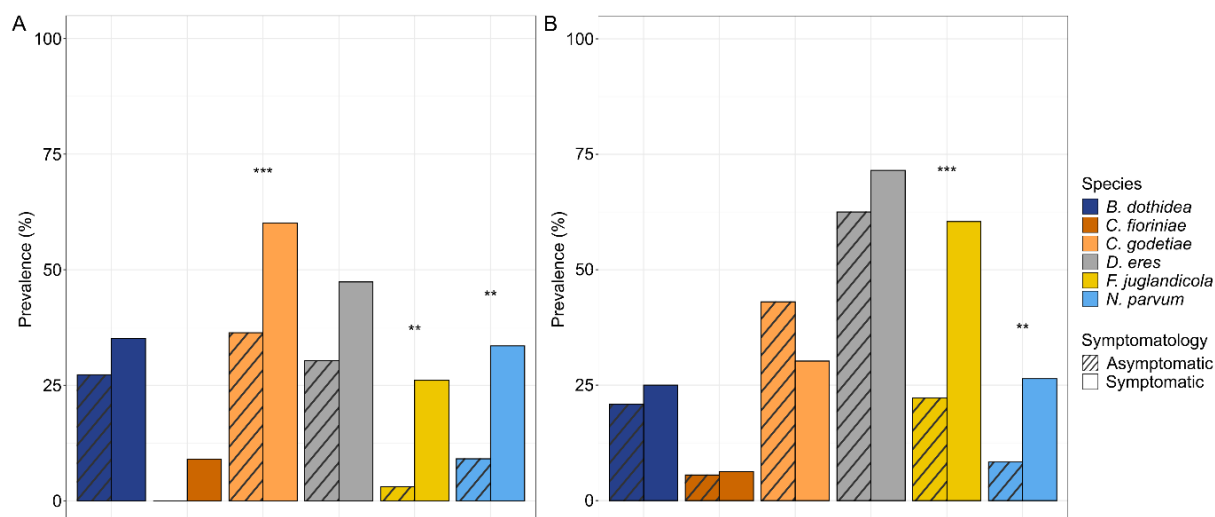
Species	Isolate	Frequency of reisolation (%)
Diaporthaceae		
<i>Diaporthe eres</i>	SHP10T12I2_2021	100
	SHP2T8I6_2021	55.5
	SHP5T15I4_2021	100
	SHP11H5I6_2020	44.4
	SHP4H4I5_2020	100
Glomerellaceae		
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	SHP6T7I2_2021	66.7
	SHP10T10I1_2021	88.9
	SHP1T1I5_2022	66.7
<i>C. godetiae</i>	SHP11T14I2_2021	50
Nectriaceae		
<i>Fusarium juglandicola</i>	SHP4T5I7_2021	44.4
	SHP6T6I8_2021	77.8
	SHP12H2I6_2020	77.8
	SHP2H2I5_2020	88.9
	SHP8H13I2_2021	66.7
Control	-	0

## Factors impacting the prevalence of pathogenic species

The prevalence in husks and twigs as well as in symptomatic and asymptomatic samples was determined for the 6 main endophytic/pathogenic species previously described, i.e. *B. dothidea*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *D. eres*, *F. juglandicola* and *N. parvum*. *C. godetiae* and *C. fioriniae*, although associated with null or low aggressiveness on detached branches, were nevertheless included as they are known pathogens on fruits. The prevalence of these species significantly varied depending on the organ type and the campaign (**Figure 4**). *C. godetiae* and *B. dothidea* were significantly more prevalent in symptomatic walnut husks (ranging from 40% to 70% and 35% in both campaigns, respectively) than in twigs (around 30% and ranging from 17% to 33% in both campaigns;  $p = 1.95 \times 10^{-10}$  and  $p = 0.02$ , respectively). Conversely, *D. eres* and *F. juglandicola* were significantly more associated with symptomatic twigs (ranging from 67% to 76% and from 53% to 68% in both campaigns, respectively) than with husks (ranging from 44% to 53% and from 25% to 28% in both campaigns;  $p = 1.81 \times 10^{-07}$  and  $p = 4.22 \times 10^{-13}$ , respectively). *N. parvum* and *C. fioriniae* were equally associated with both types of organ. Interestingly, when considering symptomatic and asymptomatic samples, the prevalence of both *F. juglandicola* and *N. parvum* species differed, with significantly higher values in symptomatic than asymptomatic organs whatever the organ type (**Figure 5**). The same observation was made for *C. godetiae* but only in walnut husks while the prevalence did not differ significantly between symptomatic and asymptomatic organs for the three other species (**Figure 5**).



**Figure 4.** Heatmaps of the prevalence of the 6 main pathogenic species collected from symptomatic walnut husks during September 2020 (A) and August 2021 (B) and from twigs during May 2021 (C) and June 2022 (D) with the culture-dependent method.



**Figure 5.** Percentage of asymptomatic and symptomatic walnut husks (A) and twigs (B) contaminated by the 6 main pathogenic species out of the total number of organs analyzed. Statistical comparisons were performed per species and per organ type. “\*\*\*” and “\*\*” represent highly significant and very highly significant differences based on chi-squares test ( $\alpha = 0.05$ ).

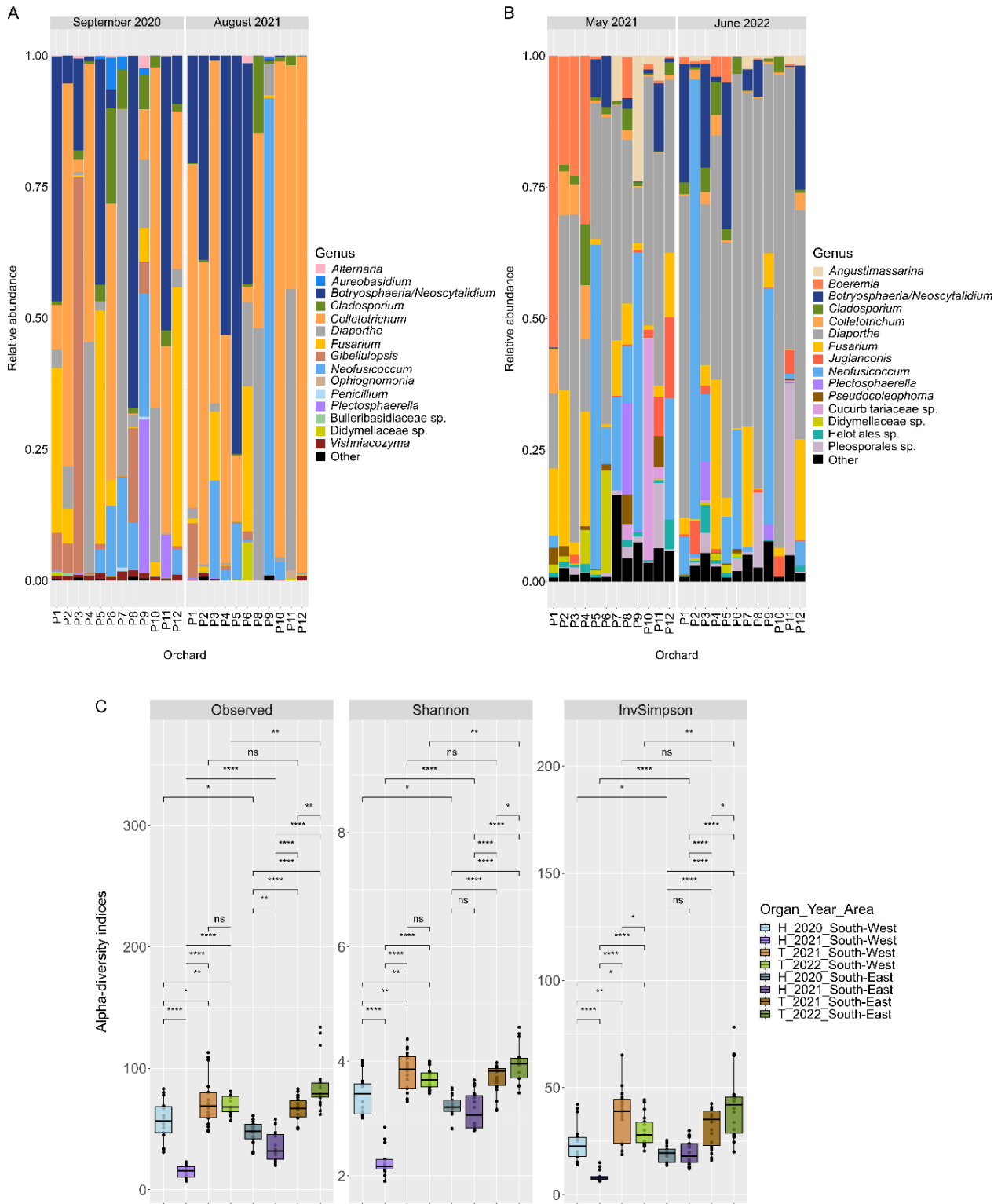
The PERMANOVA, based on Bray-Curtis distance matrices of prevalence profiles of the 6 species, showed a significant effect of, primarily, the organ type (Husk versus Twig;  $R^2 = 14.7\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-4}$ ), followed by the sampling area (South-East versus South-West;  $R^2 = 8.8\%$ ,  $p = 2.3 \times 10^{-2}$ ). Conversely, the year of sampling did not impact significantly prevalence profiles ( $p > 0.05$ ).

### Description of the fungal pathobiome by ITS2 metabarcoding

A total of 11,706,886 raw reads of ITS2 were obtained for 282 samples (12 orchards  $\times$  3 campaigns  $\times$  2 organs’ symptomatology  $\times$  3 replicates, and 11 orchards  $\times$  1 campaign  $\times$  2 organs’ symptomatology  $\times$  3 replicates). After read filtering, a large proportion of samples associated with asymptomatic organs were removed from the dataset due to the absence of fungal reads and a high number of plant reads (i.e. 48 asymptomatic samples preserved out of 141 samples). After this step, a total of 3,887,112 high-quality ITS2 fungal sequences were obtained and clustered into 656 AVSs from 187 samples, including replicates.

Fungal communities of both symptomatic walnut husks and twigs were dominated by Ascomycota (99.1% and 99.7%, respectively) followed by Basidiomycota. Although the taxonomic resolution of ITS2 does not allow differentiating between *Botryosphaeria* and *Neoscytalidium* (Belair *et al.* 2023), results of the culture-dependent analysis, with the unique isolation of *Botryosphaeria dothidea*, strongly suggest that ASVs assigned to the

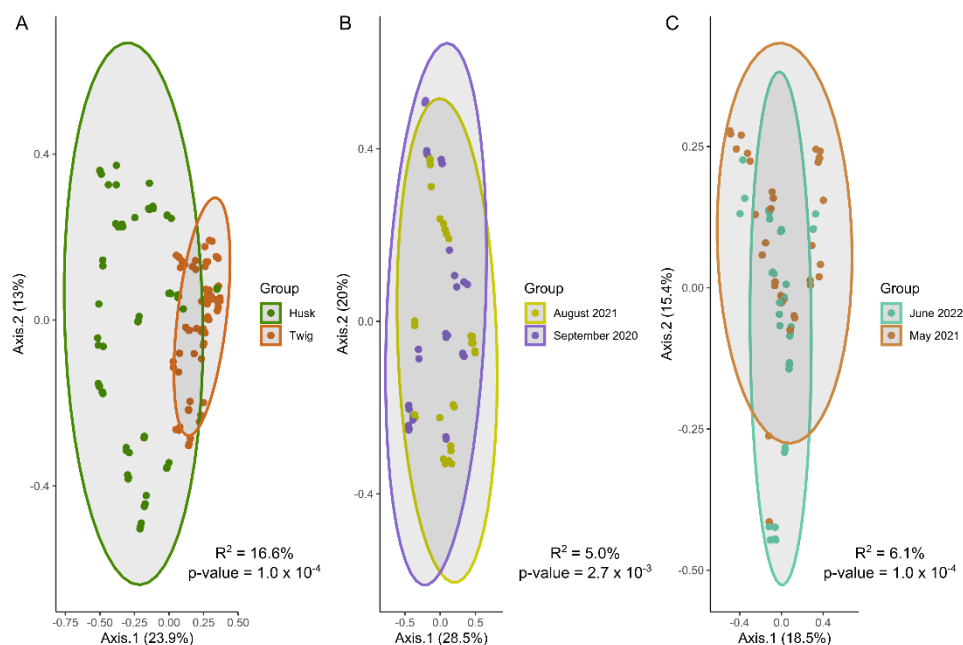
*Botryosphaeria/Neoscytalidium* genus very likely belong to *Botryosphaeria* and not *Neoscytalidium*. The main endophytic/pathogenic genera (*Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium* and *Neofusicoccum*), identified by culture-dependent approach, were also found predominant by metabarcoding in symptomatic samples (**Figure 6**). These genera represented between 20.9% and 99.3% of total reads in symptomatic walnut husks and twigs in an orchard- and campaign-dependent manner (**Figure 6**). The *Plectosphaerella* genus also belonged to the top 15 fungal genera in walnut husks even if associated with few orchards (four orchards collected in 2020 and two collected in 2021, respectively), as well as *Gibellulopsis* which was represented in the majority of orchards collected in both years by less than 1% to 75% relative abundance, and *Vishniacozyma*, represented by relatively low relative abundance in all the orchards collected in 2020 (from less than 1% to 1.7% of relative abundance) and in only four orchards collected in 2021 (P1, P2, P10 and P12). In symptomatic twigs, the *Boeremia* and *Angustimassarina* genera were also abundant (from less than 1% to 57.3%, and less than 1% to 25.3%, respectively) in the majority of the orchards in both years. These genera, as well as the major part of the less abundant genera (e.g. *Cladosporium*, *Ophiognomonia* and *Juglanconis*) have never been collected with the culture-dependent method, or only to a very small extent. Interestingly, when comparing relative abundances in symptomatic husks versus twigs, *Aureobasidium* (log<sub>2</sub> fold change |3|,  $p < 0.01$ ), *Botryosphaeria* (log<sub>2</sub> fold change |3|,  $p < 0.001$ ), *Colletotrichum* (log<sub>2</sub> fold change |6|,  $p < 0.001$ ), *Gibellulopsis* (log<sub>2</sub> fold change |6|,  $p < 0.001$ ), and *Vishniacozyma* (log<sub>2</sub> fold change |1|,  $p < 0.05$ ) were significantly more abundant in husks. Conversely, relative abundance was significantly higher in symptomatic walnut twigs than in husks for *Juglanconis* (log<sub>2</sub> fold change |10|,  $p < 0.001$ ), *Diaporthe* (log<sub>2</sub> fold change |1|,  $p < 0.001$ ), *Boeremia* (log<sub>2</sub> fold change |7|,  $p < 0.001$ ) and *Angustimassarina* (log<sub>2</sub> fold change |10|,  $p < 0.001$ ). Noteworthy, the *Colletotrichum* genus also appeared to be significantly more present in symptomatic walnut husks collected in August 2021 than in those collected in September 2020 (log<sub>2</sub> fold change |2|,  $p < 0.001$ ). The analysis of the few asymptomatic samples led also to the detection of *Colletotrichum*, *Diaporthe* and *Ophiognomonia* and *Vishniacozyma* genera in husks and *Angustimassarina*, *Boeremia*, *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Fusarium* and *Neofusicoccum* in twigs (**data not shown**).



**Figure 6.** Relative abundance of the 15 predominant genera from symptomatic walnut husks (A) and twigs (B) based on ITS2 metabarcoding. Alpha diversity indices of the combination of symptomatic organ type (H: Husks, T: Twigs), sampling year and area calculated based on the rarefied dataset (C). “ns”, “\*”, “\*\*\*” and “\*\*\*\*” represent non-significant, significant, highly significant and very highly significant differences based on independent t.test ( $\alpha = 0.05$ ).

Alpha-diversity indices, that is, observed richness, Shannon and Simpson's inverse (InvSimpson), were significantly higher in symptomatic twigs compared to symptomatic husks, regardless of sampling campaign or areas (**Figure 6C**). These indices were also significantly different according to sampling campaigns and areas. In particular, walnut husks collected in the South-West in September 2020 showed significantly higher richness, diversity and equitability than those collected in the same region in August 2021 while twigs collected in June 2022 showed significantly higher indices values than those collected in May 2021. Overall, walnut husks or twigs were significantly more diverse and richer in the South East than their counterparts collected in the South West, except for husks collected in September 2020 (**Figure 6C**).

The PERMANOVA, based on Bray-Curtis distances, showed that fungal communities in symptomatic samples were first impacted by organ types ( $R^2 = 16.6\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-4}$ ; **Figure 7A**), followed by year of sampling ( $R^2 = 11.6\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-3}$ ) and sampling area ( $R^2 = 4.6\%$ ,  $p = 2.0 \times 10^{-4}$ ). Likewise, when analyzing symptomatic husks and twigs separately, differences between sample composition were first explained by sampling campaigns (5.0% and 6.1%, respectively; **Figure 7B,C**) then by sampling area (5.0%,  $p = 3.9 \times 10^{-3}$  and 2.0%,  $p > 0.05$ , respectively).



**Figure 7.** Principal Coordinate Analysis (PCoA) of the dissimilarity of fungal community composition between symptomatic walnut husks and twigs (A), and between the two sampling campaigns of walnut husks (B) and twigs (C) based on Bray-Curtis distances. Statistical differences are based on a PERMANOVA ( $\alpha = 0.05$ ).

## Effect of agronomic practices on fungal pathobiome composition and structure

A PERMANOVA was also used to determine the effect of agronomic practices such as the cultivar/variety (Serr, Franquette), the agricultural system (organic, conventional) and the use of irrigation (**Table 1**) on the composition and structure of fungal communities, using ITS2 metabarcoding data but also prevalence profile of the 6 main species, as determined by the culture-dependent approach.

The cultivar/variety effect impacted the most the mycobiota composition and structure in both symptomatic husks and twigs ( $R^2 = 13.1\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-4}$ ; and  $R^2 = 7.2\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-4}$ , respectively) based on the metabarcoding dataset (**Table 5**). For both organ types, *Colletotrichum* and *Botryosphaeria* species were significantly more predominant in samples collected from variety Franquette than from cultivar Serr (log2 fold change |6|,  $p < 0.001$  and log2 fold change |8|,  $p < 0.001$  in husks, respectively; and log2 fold change |3|,  $p < 0.001$  and log2 fold change |2|,  $p < 0.05$  in twigs, respectively). Among the cultivation practices studied, cultivar/variety was the only one to have a significant effect on species' prevalence profiles in both organs ( $R^2 = 22.2\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-3}$  in symptomatic husks, and  $R^2 = 26.4\%$ ,  $p = 5.0 \times 10^{-4}$  in symptomatic twigs). In particular, *C. godetiae* and *B. dothidea* were significantly more prevalent in Franquette ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively) while, *N. parvum* showed a significantly higher prevalence in symptomatic organs collected from cultivar Serr ( $p < 0.001$ ). In husks, the use of irrigation accounted for 10.3% dissimilarity between fungal communities ( $p = 1.0 \times 10^{-4}$ ), associated with a significantly higher predominance of *Diaporthe* genus in samples collected from irrigated orchards (log2 fold change |2.3|,  $p > 0.001$ ), while the impact of irrigation on mycobiota composition was reduced by 2-fold in twigs (4.8%,  $p = 3.0 \times 10^{-4}$ ; **Table 5**). Agricultural systems (conventional versus organic) weakly impacted the mycobiota composition either in husks or twigs ( $R^2 = 5.6\%$ ,  $p = 1.8 \times 10^{-3}$ ; and  $R^2 = 6.5\%$ ,  $p = 1.0 \times 10^{-4}$ ; **Table 5**).



**Table 5.** PERMANOVA and pairwise Adonis analyses ( $\alpha = 0.05$ ) on metabarcoding data of symptomatic walnut husks and twigs. The categories are detailed in **Tables 16 and 17.**

Factor	Variables	Organ type	R <sup>2</sup> (p)	Comparisons between temperature or rainfall categories	R <sup>2</sup> (p)	Differentially-abundant genera of interest (log2 fold change; p)
Variety/cultivar	Franquette vs Serr	Walnut husks	13.1% ***			
		Twigs	7.2% ***			
Agricultural system	Conventional vs Organic	Walnut husks	5.6% **			
		Twigs	6.5% ***			
Irrigation	Irrigation_Yes vs Irrigation_No	Walnut husks	10.3% ***			
		Twigs	4.8% ***			
Median monthly temperature	April-May 2020 vs April-May 2021	Walnut husks	5.0% **	A vs B		<i>Colletotrichum</i> (2; **); <i>Diaporthe</i> (-2; **); <i>Fusarium</i> (-2; **)
	June 2020 vs June 2021	Walnut husks	4.6% **	A vs B		<i>Diaporthe</i> (2; **); <i>Fusarium</i> (2; **)
	July-August 2020 versus July-August 2021	Walnut husks	4.6% **	A vs B		<i>Colletotrichum</i> (1.5; *); <i>Diaporthe</i> (-2; **); <i>Fusarium</i> (-2; **)
	April-May 2021 vs April-May 2022	Twigs	6.1% ***	A vs B		<i>Colletotrichum</i> (1.3; **); <i>Diaporthe</i> (-1; ***)
Monthly cumulative rainfall	April 2020 vs April 2021	Walnut husks	14.5% ***	A vs B	8.0% *	-
				A vs C	7.7%	-
				A vs D	16.0% *	-
				B vs C	5.6%	-
				B vs D	8.0% *	-
				C vs D	21.5%	-

\*\*\*: p-value < 0.001; \*\*: p-value < 0.01; \*: p-value < 0.05; ‘’: p-value > 0.05

**Table 5.** Continued.

Factor	Variables	Organ type	R <sup>2</sup> (p)	Comparisons between temperature or rainfall categories	R <sup>2</sup> (p)	Differentially-abundant genera of interest (log2 fold change; p)
Monthly cumulative rainfall	May (2020/2021)	Walnut husks	10.6% ***	A vs B	7.3%	-
				A vs C	12.3% *	<i>Diaporthe</i> (3; **)
				A vs D	9.2% *	-
				B vs C	6.1%	-
				B vs D	3.8%	-
				C vs D	4.1%	-
	June-July-August 2020 vs June-July-August 2021	Walnut husks	10.6% ***	A vs B	6.7% *	-
				A vs C	7.0%	-
				A vs D	10.0% **	<i>Botryosphaeria</i> (-4; ***)
				B vs C	5.0%	-
				B vs D	5.8%	-
				C vs D	6.6%	-
	April 2021 vs April 2022	Twigs	14.3% ***	A vs B	10.0% *	<i>Colletotrichum</i> (3; ***)
				A vs C	8.0%	-
				A vs D	12.9% **	<i>Colletotrichum</i> (-3.2; **); <i>Diaporthe</i> (-1.1; *)
				B vs C	10.0% *	<i>Colletotrichum</i> (2; ***)
				B vs D	6.8%	-
				C vs D	11.9% **	<i>Colletotrichum</i> (-2.5; ***)
	May 2021 vs May 2022	Twigs	15.7% ***	A vs B	6.5%	-
				A vs C	15.0% **	<i>Botryosphaeria</i> (6; **); <i>Colletotrichum</i> (-3; ***)
				A vs D	9.4% *	-
B vs C				12.2% **	<i>Botryosphaeria</i> (5.4; **); <i>Colletotrichum</i> (-2; **); <i>Diaporthe</i> (1.2; **)	
B vs D				8.8% *	<i>Diaporthe</i> (1.2; **)	
C vs D				12.9% **	<i>Botryosphaeria</i> (-5; **); <i>Colletotrichum</i> (3; ***)	

\*\*\*: p-value < 0.001; \*\*: p-value < 0.01; \*: p-value < 0.05; ‘: p-value > 0.05

## Effect of climatic factors on fungal pathobiome composition and structure

For meteorological data, daily temperatures and rainfall were retrieved from 6 weather stations, evenly located in the South-East and in the South-West (**Table 3**). The data were collected from March to September in 2020, 2021 and 2022, that is from early springs to late summers. Since mean temperature or rainfall did not differ significantly between the three weather stations within a production area, regardless of the month and year, data from the three weather stations were combined. Overall, whatever the production area, April, May, July and/or August were associated with significantly lower mean temperatures in 2021 than in 2020 or 2022, while June was significantly hotter in 2021 than in 2020. In addition, mean accumulated rainfall was significantly higher in May and in July 2021 than in 2020 or 2022, regardless of the production area (**Figures S1 and S2 and Table 6**). At the geographic level, mean temperature and rainfall were generally higher in the South-West than in the South-East, with significant differences in terms of mean temperature in April 2021, May 2020 and May 2022, and mean rainfall in April 2020 (**Table 6**).

**Table 6.** Mean temperature (°C) and mean cumulative rainfall (mm) for each month from April to August in 2020, 2021 and 2022 in both South-West (SW) and South-East (SE) production areas.

Month	Year	Area	Mean temperature (°C)	Mean cumulative rainfall (mm)
April	2020	SW	14.4 <sup>a</sup>	87.9 <sup>a</sup>
		SE	13.2 <sup>ab</sup>	49.6 <sup>bc</sup>
	2021	SW	11.2 <sup>c</sup>	31.4 <sup>c</sup>
		SE	9.2 <sup>d</sup>	81.3 <sup>ab</sup>
	2022	SW	11.7 <sup>bc</sup>	71.9 <sup>ab</sup>
		SE	10.4 <sup>cd</sup>	49.2 <sup>bc</sup>

Statistical comparisons were performed to compare separately mean temperature and mean accumulated rainfall of the year for each month. Lowercase letters indicate a significant difference at 0.05 threshold according to Tukey's HSD test.

**Table 6.** Continued.

Month	Year	Area	Mean temperature (°C)	Mean cumulative rainfall (mm)
May	2020	SW	17.6 <sup>a</sup>	42.3 <sup>bc</sup>
		SE	15.6 <sup>b</sup>	82.5 <sup>b</sup>
	2021	SW	13.5 <sup>c</sup>	135.6 <sup>a</sup>
		SE	12.9 <sup>c</sup>	149.1 <sup>a</sup>
	2022	SW	18.0 <sup>a</sup>	38.2 <sup>c</sup>
		SE	17.3 <sup>a</sup>	35.3 <sup>c</sup>
June	2020	SW	17.6 <sup>c</sup>	110.5 <sup>a</sup>
		SE	18.0 <sup>c</sup>	104.7 <sup>a</sup>
	2021	SW	19.5 <sup>b</sup>	136.6 <sup>a</sup>
		SE	19.6 <sup>b</sup>	115.6 <sup>ab</sup>
	2022	SW	20.4 <sup>ab</sup>	131.0 <sup>ab</sup>
		SE	21.5 <sup>a</sup>	86.1 <sup>b</sup>
July	2020	SW	21.8 <sup>b</sup>	9.8 <sup>b</sup>
		SE	21.8 <sup>b</sup>	35.6 <sup>b</sup>
	2021	SW	19.7 <sup>c</sup>	43.5 <sup>b</sup>
		SE	19.6 <sup>c</sup>	169.9 <sup>a</sup>
	2022	SW	23.1 <sup>a</sup>	9.2 <sup>b</sup>
		SE	23.4 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>
August	2020	SW	21.7 <sup>b</sup>	68.3 <sup>ab</sup>
		SE	21.7 <sup>b</sup>	77.3 <sup>a</sup>
	2021	SW	19.3 <sup>c</sup>	34.8 <sup>b</sup>
		SE	19.0 <sup>c</sup>	63.2 <sup>ab</sup>
	2022	SW	23.5 <sup>a</sup>	53.8 <sup>ab</sup>
		SE	22.8 <sup>ab</sup>	94.1 <sup>a</sup>

Statistical comparisons were performed to compare separately mean temperature and mean accumulated rainfall of the year for each month. Lowercase letters indicate a significant difference at 0.05 threshold according to Tukey's HSD test.

To go further and assess a potential effect of climate on fungal communities, categories of climate conditions were created: 2 classes based on the median for monthly temperatures and 4 classes based on quartiles (Q1, median, Q3 and maximum) for monthly cumulative rainfall, regardless of sampling areas and years (**Tables 7 and 8**). The mean temperature of April-May, June and July-August similarly impacted the fungal communities associated with husks and twigs (**Table 5**). Among genera of interest, *Colletotrichum* was significantly predominant in samples associated with lower mean temperature whatever the organ type (**Table 5**). Conversely, *Fusarium* was significantly more predominant in husks collected in warmer conditions. *Botryosphaeria* and *Diaporthe* genera were also significantly more abundant in husks and twigs collected in such conditions (**Table 5**). The mean cumulative rainfall also impacted similarly the fungal communities of both organs (**Table 5**). Interestingly, *Colletotrichum* was significantly more abundant in samples associated with relatively high rainfall, while *Botryosphaeria* and *Diaporthe* were more predominant in samples associated with lower rainfall (**Table 5**).

**Table 7.** Categorization of mean temperatures for analysis of symptomatic walnut husks and twigs according to median. Category A represents orchards associated with mean monthly temperature less than or equal to the median; category B represents orchards associated with mean monthly temperature greater than the median.

Months included	Median monthly temperature (°C)	Temperature category	Number of associated orchards (area/year)	Symptomatic organ type
from April to May 2020 and 2021	13.398	A	5 (SW/2021) + 6 (SE/2021)	Walnut husks
		B	6 (SW/2020) + 6 (SE/2020)	
June 2020 and 2021	19.00	A	6 (SW/2020) + 6 (SE/2020) + 1 (SE/2021)	Walnut husks
		B	5 (SW/2021) + 5 (SE/2021)	
from July to August 2020 and 2021	20.80	A	5 (SW/2021) + 6 (SE/2021)	Walnut husks
		B	6 (SW/2020) + 6 (SE/2020)	
from April to May 2021 and 2022	12.8	A	6 (SW/2021) + 6 (SE/2021)	Twigs
		B	6 (SW/2022) + 6 (SE/2022)	

SE: South-East production area; SW: South-West production area

**Table 8.** Categorization of monthly cumulative rainfall for analysis of symptomatic walnut husks and twigs according to 1st quartile (Q1), median, 3rd quartile (Q3) and maximum value (Max.).

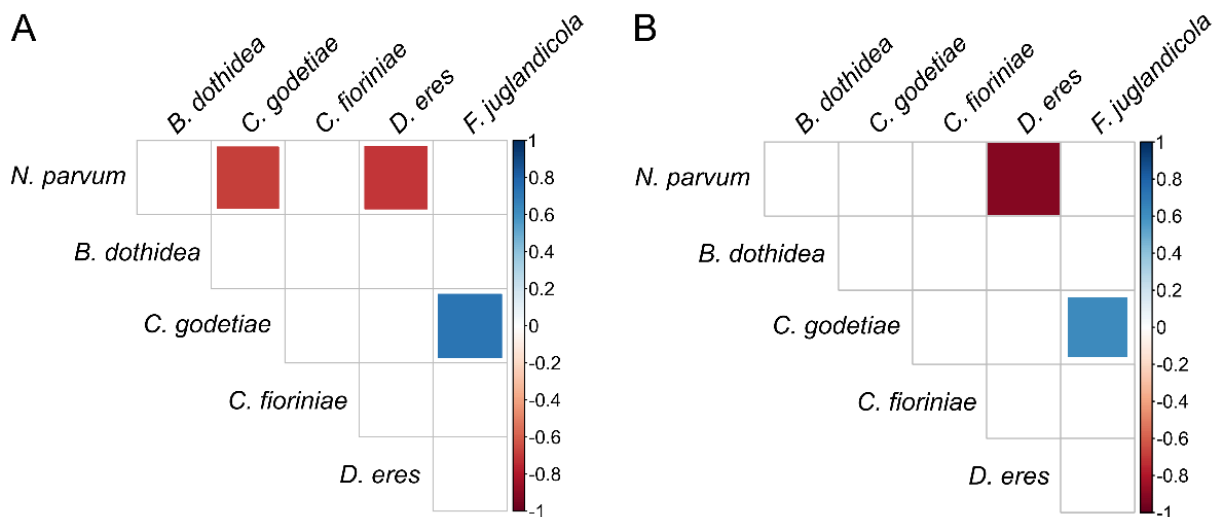
Months included	Monthly cumulative rainfall (mm)	Rainfall category	Number of associated orchards (area/year)	Symptomatic organ type
April 2020 and 2021	Q1: 48.1	A	5 (SW/2021) + 1 (SE/2020)	Walnut husks
	Median: 62.7	B	4 (SW/2020) + 5 (SE/2020)	
	Q3: 78.8	C	4 (SE/2021)	
	Max.: 102.9	D	2 (SW/2020) + 2 (SE/2021)	
May 2020 and 2021	Q1: 66.3	A	6 (SW/2020)	Walnut husks
	Median: 84.6	B	6 (SE/2020)	
	Q3: 147.0	C	2 (SW/2021) + 3 (SE/2021)	
	Max.: 162.3	D	3 (SW/2021) + 3 (SE/2021)	
from June to August 2020 and 2021	Q1: 214.4	A	2 (SW/2020) + 4 (SW/2021) + 1 (SE/2020)	Walnut husks
	Median: 232.5	B	4 (SW/2020) + 3 (SE/2020)	
	Q3: 273.9	C	1 (SW/2021) + 2 (SE/2020)	
	Max.: 391.0	D	6 (SE/2021)	
April 2021 and 2022	Q1: 33.0	A	5 (SW/2021) + 1 (SE/2022)	Twigs
	Median: 71.2	B	1 (SW/2021) + 4 (SE/2022) + 1 (SW/2022)	
	Q3: 76.3	C	4 (SW/2022) + 2 (SE/2022)	
	Max.: 95.30	D	1 (SW/2022) + 5 (SE/2021)	
May 2021 and 2022	Q1: 35.45	A	4 (SW/2022) + 2 (SE/2022)	Twigs
	Median: 89.45	B	2 (SW/2022) + 4 (SE/2022)	
	Q3: 152.68	C	2 (SW/2021) + 4 (SE/2021)	
	Max.: 162.30	D	4 (SW/2021) + 2 (SE/2021)	

SE: South-East production area; SW: South-West production area

## Analysis of the co-occurrence and association patterns within the phytomicrobiome

### *Culture-dependent based analyses*

First, pairwise Pearson's correlations were calculated based on the prevalence of the 6 main species isolated from symptomatic husks and twigs. In both organs, *N. parvum* and *D. eres* were significantly negatively correlated (PCC = -0.71 and PCC = -0.91, respectively; **Figure 8A,B**) while *C. godetiae* and *F. juglandicola* were significantly positively correlated (PCC = 0.73 and PCC = 0.63, respectively; **Figure 8A,B**) although we must bear in mind that *C. godetiae* was not frequently isolated from twigs. Finally, a significant negative correlation was evidenced between *N. parvum* and *C. godetiae* in symptomatic walnut husks (PCC = -0.68; **Figure 8A**).



**Figure 8.** Correlograms representing Pearson's correlation coefficient (PCC) between the 6 main pathogenic species based on their prevalence on symptomatic walnut husks (A) and symptomatic twigs (B). Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are plotted.

Second, chi-square tests were computed to determine whether a species was more frequently encountered alone or in association at the organ level. Interestingly, all the species of interest were more frequently found in association with at least 1 species than alone (from 2 times to 16 times more in symptomatic organs and from 1 time to 14.5 times in asymptomatic ones). In symptomatic husks, among all species, *N. parvum* was the most frequently species isolated alone (33.3% of husks contaminated with *N. parvum* were uniquely contaminated with this species), followed by *C. godetiae* (12.5%). In symptomatic twigs it was also the case for *N. parvum* (30.3%), followed by *D. eres* (17.4%). Interestingly, *B. dothidea* and *F. juglandicola* were detected alone in only 1.4% and 6.4% of symptomatic twigs associated with these species, respectively. Furthermore, the most frequent dual association was that of *C. godetiae* and *D. eres* in symptomatic husks (12.9% of husks were contaminated with *C. godetiae* and *D. eres* exclusively), and that of *F. juglandicola* and *D. eres* in symptomatic twigs (13.8%). Moreover, the latter association was significantly more detected in symptomatic twigs than in husks (51% vs 21%,  $p = 2.5 \times 10^{-6}$ ), and, in symptomatic twigs, the two species were significantly more associated with each other regardless of the presence of other species (51% than without each other (31% with *D. eres* and without *F. juglandicola*,  $p = 2.1 \times 10^{-4}$ ; and 18% with *F. juglandicola* and without *D. eres*,  $p = 2.1 \times 10^{-13}$ ). Interestingly, the tripartite association of *D. eres*, *C. godetiae* and *F. juglandicola* was also frequently encountered in symptomatic twigs, this association represented in 8.2% of symptomatic twigs. The significant positive correlation between *C. godetiae* and *F. juglandicola* in both twigs and husks detected based on prevalence

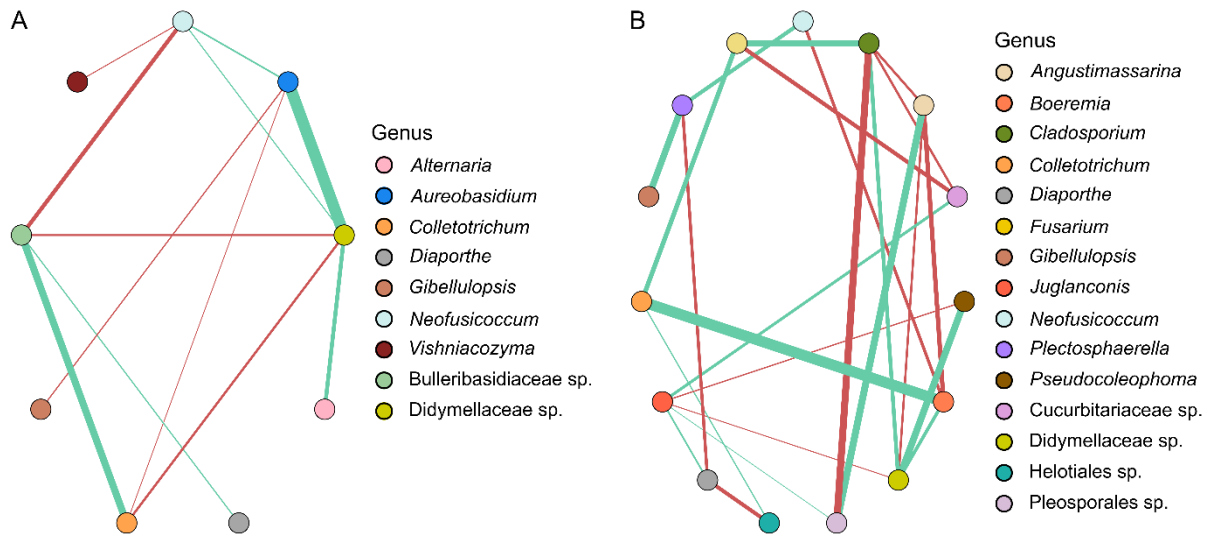


data (**Figure 8A and B**) was confirmed at the organ level for twigs only, meaning that the two species were more frequently found associated with each other regardless of the presence of the other species (34.7%) than *C. godetiae* without *F. juglandicola* (10.4%) on symptomatic twigs ( $p = 3.1 \times 10^{-7}$ ). Likewise, the negative correlations between *N. parvum* and *D. eres* in twigs and husks was confirmed at the organ level for husks only since *D. eres* (53.7%) and *N. parvum* (34.6%) were significantly more found without than associated with each other (11.7%) on symptomatic husks ( $p = 6.8 \times 10^{-12}$  and  $p = 2.4 \times 10^{-4}$ , respectively). Finally, *C. godetiae* was significantly more frequently found without *N. parvum* (58%) than in association with *N. parvum* (16.7%) on symptomatic husks whatever the other species ( $p = 9.9 \times 10^{-13}$ ), confirming the negative correlation between *C. godetiae* and *N. parvum* in symptomatic husks (**Figure 8A**). Interestingly, *N. parvum* was significantly more frequently found alone in symptomatic husks (33.3%) and twigs (30.3%) than in association with *B. dothidea* alone (3.2%,  $p = 9.7 \times 10^{-7}$  in husks; and 2.1%,  $p = 7.1 \times 10^{-8}$  in twigs) or with *B. dothidea* and other species (8%,  $p = 1.4 \times 10^{-3}$  in twigs).

#### ***Culture-independent based analyses***

In total, 6 positive and 6 negative significant correlations were evidenced between 9 genera out of the 15 top genera associated with symptomatic walnut husks (**Figure 9A**). No positive or negative significant correlations were found between the main pathogenic genera of interest (i.e. *Colletotrichum*, *Diaporthe* and *Neofusicoccum*). Nevertheless, a positive significant correlation was highlighted between *Neofusicoccum* and *Aureobasidium* (corr = 0.33), as well as a negative significant correlation between *Neofusicoccum* and *Vishniacozyma* (corr = -0.31; **Figure 9A**).

In twigs, 13 out of 24 correlations were significantly positive (**Figure 9B**). Interestingly, a positive significant correlation was detected between *Colletotrichum* and *Fusarium* (corr = 0.43). Moreover, *Colletotrichum* was also significantly positively correlated with *Boeremia* (corr = 0.64), while *Diaporthe* was significantly positively correlated with *Juglanconis* (corr = 0.33; **Figure 9B**).



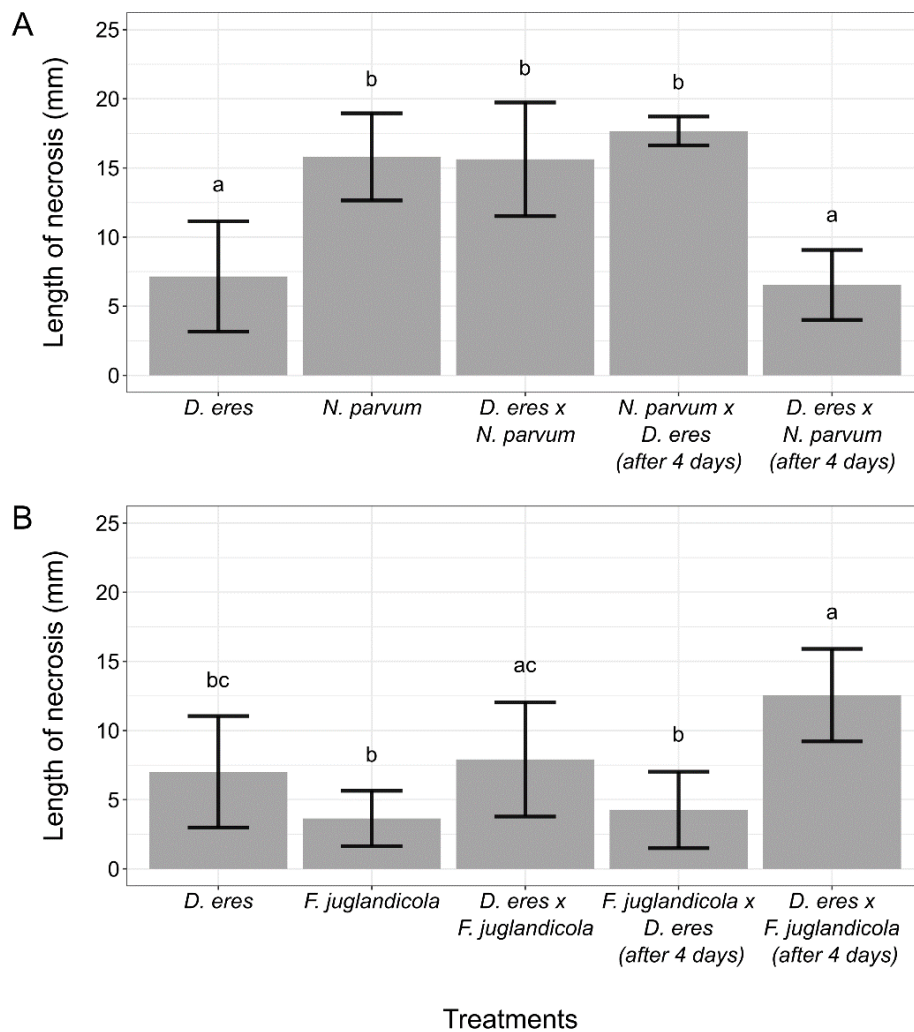
**Figure 9.** SparCC correlation networks observed between the main genera associated with symptomatic walnut husks (A) and symptomatic twigs (B) based on metabarcoding sequencing. The relative abundance of each genus was calculated by summing the abundance of each corresponding ASV. Nodes correspond to genera, and connecting edges indicate correlation between them. Only nodes associated with a correlation strength value greater than 0.3 (positive correlation, green edges) and less than -0.3 (negative correlation, red edges) were plotted. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) were plotted.

### *Evaluation of interactions in detached twigs*

Since we previously evidenced negative correlations between the prevalence of *N. parvum* and *D. eres* in symptomatic twigs while *F. juglandicola* and *D. eres*, the predominant species in twigs, were the most frequent pairwise associations, we further examined the nature of their interactions, based on single, mixed and sequential inoculations on twigs, by hypothesizing that *N. parvum* and *D. eres* were antagonistic, while *F. juglandicola* and *D. eres* were mutualistic in twigs.

Considering the interaction between *N. parvum* and *D. eres*, single inoculations with *N. parvum*, mixed inoculations with *N. parvum* and *D. eres*, and sequential inoculation when *N. parvum* was inoculated first (i.e. 4 days before *D. eres*) caused the longest necrosis ranging from 15.8 mm to 17.7 mm 8 days after inoculation. Conversely, single inoculations with *D. eres*, and sequential inoculations with first *D. eres* and *N. parvum* 4 days later, induced the shortest lesion length (7.1 mm and 6.5 mm, respectively; **Figure 10A**).

Single inoculation with *F. juglandicola* and the inoculation of *D. eres* 4 days after *F. juglandicola* yielded the shortest lesion length. Interestingly, inoculation of *F. juglandicola* 4 days after *D. eres* caused longer necrosis length than single inoculation with *D. eres* and mixed inoculation with both species (**Figure 10B**).



**Figure 10.** Length of necrosis (mm) 8 days (A) and 10 days (B) after inoculations with cellulose nitrate membrane filters covered with mycelium on 1-year-old detached shoots of walnut variety Franquette under laboratory conditions. Columns with common letters do not differ significantly according to Dunn's test ( $\alpha = 0.05$ ).

## Discussion

A total of 12 walnut orchards from the two main production areas in France, selected on the basis of frequent observation of dieback symptoms on English walnut trees, were surveyed during 4 sampling campaigns. The observed symptoms included defoliation of twigs, dead buds and internal wood discoloration, as well as fruit necrosis, blight and mummification. This research represents the first comprehensive study providing the etiology and analysis of fungal communities and their interactions in walnut trees displaying these symptoms in France, using both cultural and metabarcoding approaches.

The major part of the isolates recovered from walnut husks and twigs, either symptomatic or asymptomatic, were identified based on their morphological characteristics and the sequencing of ITS region. *Diaporthe* and *Fusarium* isolates, mainly represented by *D. eres* and *F. juglandicola* respectively, were consistently the most frequently isolated fungi from symptomatic organs, followed by *Colletotrichum* isolates (mainly represented by *C. fioriniae* and *C. godetiae*) and isolates from the Botryosphaeriaceae family, exclusively represented by *B. dothidea* and *N. parvum*. These results were confirmed by metabarcoding, revealing the presence of the same genera in both symptomatic walnut husks and twigs. This diversity of fungal genera associated with the disease was also evidenced in Californian walnut orchards (Michailides *et al.* 2013). However, only Botryosphaeriaceae and/or *Diaporthe* species were reported in symptomatic walnut organs displaying the same symptoms in others studies conducted in Australia (Antony *et al.* 2023), California (Agustí-Brisach *et al.* 2019; Chen *et al.* 2014), Chile (Jiménez Luna *et al.* 2022a), China (Li *et al.* 2016), Italy (Gusella *et al.* 2021) and Hungary (Zabiák *et al.* 2023). Interestingly, a higher level of diversity was found in Spain where *Cytospora* species were also isolated in addition to these two fungal groups (López-Moral *et al.* 2020b), as well as Diatrypaceae, Togniniaceae and *Cadophora* species in the Czech Republic (Eichmeier *et al.* 2020). Moreover, most of these studies indicate that the Botryosphaeriaceae isolates were more frequently collected than the *Diaporthe* ones (Antony *et al.* 2023; Chen *et al.* 2014; Eichmeier *et al.* 2020; Jiménez Luna *et al.* 2022a; López-Moral *et al.* 2020b), unlike what we found during the four collection campaigns in France. Additionally, in this study, only two genera of Botryosphaeriaceae were identified with both culture-dependent and -independent approaches. In contrast, a much higher level of diversity was found in California where the disease was first observed in the early 2000s and where 6 genera are consistently reported (Chen *et al.* 2014), and to a lesser extent in Spain (4 genera; López-Moral *et al.* 2020b). The two Botryosphaeriaceae species as well as *D. eres* have been previously reported to cause walnut branch dieback and fruit necrosis and blight worldwide (Chen *et al.* 2014; Eichmeier *et al.* 2020; Gusella *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2020b; Novak *et al.* 2018; Yildiz *et al.* 2022; Zabiák *et al.* 2023). The three other species reported in French walnut orchards were not commonly associated with walnut dieback in other countries. The *Colletotrichum* species are mainly associated with walnut anthracnose disease on fruits (Da Lio *et al.* 2018), but one recent study has reported twig blight symptoms caused by *C. godetiae* in Hungary (Varjas *et al.* 2020). *F. juglandicola* being a recently-described species isolated from walnut buds (Crous *et al.* 2021), no study has currently indicated its involvement in branch dieback and fruit necrosis and blight of walnut trees.

Among the six main species associated with the symptoms, only three were able to cause bigger necrotic lesions than control when inoculated with mycelium plugs on detached shoots under laboratory conditions. The Botryosphaeriaceae species were the most aggressive ones, followed by *D. eres*, while necrosis caused by *C. fiorinae*, *F. juglandicola* and *C. godetiae* were not significantly different from control except for three isolates. No significant difference in aggressiveness was evidenced between *B. dothidea* and *N. parvum*, as obtained by López-Moral *et al.* (2020b) by inoculating detached shoots. Nevertheless, numerous studies have already shown that *N. parvum* is one of the most aggressive Botryosphaeriaceae species and *B. dothidea* one of the least aggressive when inoculated *in planta* (Chen *et al.* 2014; Gusella *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2020b). In agreement with our results, *Diaporthe* are mainly associated with less disease severity than Botryosphaeriaceae (Eichmeier *et al.* 2020; Jiménez Luna *et al.* 2022a; López-Moral *et al.* 2020b). The study conducted by Varjas *et al.* (2020) reported necrotic lesion length caused by *C. godetiae* between 12 and 17 mm after 14 days of experimentation, i.e. between 0.8 and 1.2 mm per day, which is broadly of the same order of magnitude as what we noticed. The pathogenicity tests suggest that the Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species may participate the most to symptom development on twigs, although pathogenicity tests performed *in natura*, i.e. under field conditions, are required to confirm this assessment. All these species were collected from both symptomatic and asymptomatic organs, highlighting a potential endophytic lifestyle and latent infection, as consistently reported by many studies. The significantly higher prevalence on symptomatic than on asymptomatic walnut husks of *C. godetiae*, *F. juglandicola* and *N. parvum* indicate that these species could play a primary role in symptom development on husks. For example, *Colletotrichum*, responsible for walnut anthracnose, could create lesions that would enable other species to penetrate inside the fruit. In twigs, *F. juglandicola* and *N. parvum* were significantly more prevalent in symptomatic than asymptomatic samples, although the lowest disease severity of *F. juglandicola* likely suggests its secondary role in disease development. Concerning *D. eres*, its prevalence of over 60% in both symptomatic and asymptomatic twigs in addition to its moderate to high aggressiveness suggest a participation of this species to symptom development in twigs as well as its potential endophyte lifestyle. The absence of significant difference of prevalence in asymptomatic and symptomatic organs contaminated by *B. dothidea* associated with a known moderate aggressiveness (although not evidenced under our experimental conditions) rather suggest a moderate involvement in disease development.

Our study revealed that the main factor influencing the prevalence profile of the 6 main species in symptomatic organs was the organ type. *B. dothidea* and *C. godetiae* were

significantly more associated with husks, while *D. eres* and *F. juglandicola* were more frequently associated with twigs, in agreement with our metabarcoding-based results. The year of sampling also contributed to the variation of mycobiota composition, based on both prevalence and relative abundance. Although the experimental design of our study was not large enough to reach clear-cut conclusions, the effect of some factors on the structure of fungal communities was nevertheless assessed on the basis of information about the agricultural system applied to each orchard. Thus the choice of specific varieties/cultivars (Franquette and Serr, represented by 10 and 2 orchards respectively in this study) that could be differentially sensitive to pathogens, may be an important factor explaining the differences in both prevalence and relative abundance (although our experimental was not designed to study this effect in particular). Indeed, it has been shown that the walnut cultivar Serr was part of the most sensitive cultivars to Botryosphaeriaceae infections among the cultivars tested (i.e. Chandler, Fernette, Hartley, Howard, Scharsch-Franquette, Serr Sundland and Tulare; López-Moral *et al.* 2022). In our study, only *N. parvum* was significantly more prevalent on cultivar Serr than on variety Franquette. It could be interesting to perform pathogenicity tests *in planta* with the variety Franquette and the cultivar Serr to assess their sensitivity to Botryosphaeriaceae, but also *Diaporthe*, *Colletotrichum* and *Fusarium* species under the meteorological conditions of southern France and on both husks and twigs. Among the other factors evaluated, the use of irrigation was shown to have a greater impact on mycobiota composition in husks than in twigs. In particular, *Diaporthe* was significantly more associated with samples collected from irrigated orchards.

The sampling area also showed an impact on fungal community structure, as well as meteorological conditions, such as temperatures and rainfall. Thus, the terroir could also play a role in the composition of fungal communities. Overall, the differences in meteorological conditions between the three years studied highlighted a significantly higher relative abundance of *Diaporthe* and *Botryosphaeria* in samples collected during warmer and dryer years, contrary to *Colletotrichum*, in both organ types. It has been shown that infections caused by *Colletotrichum* species generally occur in rainy, humid and warm weather (Estrada *et al.* 2000; Hall *et al.* 2016; Kamle & Kumar 2016; Salotti *et al.* 2023). Interestingly, in other studies, the Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species infections have also been associated with warm temperatures and abundant rainfall (González-Domínguez *et al.* 2021; Moral *et al.* 2019). However, the optimal growth temperature is reported to be generally lower for *Diaporthe* and *Colletotrichum* than for Botryosphaeriaceae species, (Arciuolo *et al.* 2021; Chen *et al.* 2014; López-Moral *et al.* 2020b; Salotti *et al.* 2022). Meteorological conditions are also known to

play a role in spore dissemination of Botryosphaeriaceae, *Diaporthe* and *Colletotrichum* species, mainly via rail-disseminated spores (Moral *et al.* 2019; Penet *et al.* 2014), and to affect plants' physiological state, notably during hot periods, which could also facilitate the development of pathogenic species and thus diseases (Velásquez *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2020).

This study also highlighted potential interactions between the main fungal pathogenic species. First, we found that the prevalence of *N. parvum* was negatively correlated to that of *D. eres* in both symptomatic husks and twigs, suggesting that the presence of one of the species may be unfavorable to the presence of the second one. This was also confirmed by the analysis of species association at the organ level: *D. eres* and *N. parvum* were significantly more frequently detected alone than in association with each other. However, we failed to clearly demonstrate any competitive interaction on detached twigs. First, mixed inoculations of both species or sequential inoculation of *D. eres* 4 days after *N. parvum* resulted in the same necrotic lesion length than single inoculation with *N. parvum*, as if the presence of *D. eres* had no impact whatsoever on *N. parvum* competitiveness. Second, sequential inoculations of *N. parvum* 4 days after *D. eres* resulted in significantly lower necrosis than *N. parvum* alone (but similar to *D. eres* alone) although the timing of our measurements does not allow to properly compare both conditions given that *N. parvum* was incubated for 6 days in the former and 10 days in the latter. It would nevertheless be interesting to estimate *N. parvum* and *D. eres* growth (by quantitating DNA of each species using species-specific qPCR for instance) to determine whether *D. eres* had a chance to grow in the presence of *N. parvum* or when *N. parvum* was inoculated 4 days after *D. eres*. Interactions between one species of *Neofusicoccum* (*N. mediterraneum*) and one species of *Diaporthe* (*D. rhusicola*, syn. *D. foeniculina*) was previously investigated by Agustí-Brisach *et al.* (2019). The inoculation of *N. mediterraneum* 4 days after *D. rhusicola* resulted in lower lesion length than *N. mediterraneum* alone or mixed inoculations, in agreement with our observations. They demonstrated an inhibition of the germination of *D. rhusicola* spores by the spores of *N. mediterraneum* and suggested that this phenomenon could partially be responsible for this lower lesion length. In addition, they suggest that the development of *D. rhusicola*, resulting in the death of plant tissues, could negatively affect the pathogenicity of *N. mediterraneum*, lowering its aggressiveness to switch to a potentially preferential saprophytic lifestyle. However, it would have been interesting to measure the necrosis length again 4 days later in their study (as well as in ours), to have similar incubation time with the *Neofusicoccum* strain. An additional negative correlation was highlighted between *N. parvum* and *C. godetiae* on symptomatic walnut husks, in which the latter was significantly more frequently isolated without *N. parvum* than in association. This negative correlation is indeed most likely explained

by climatic conditions favorable to *Colletotrichum* in 2021 and to Botryosphaeriaceae in 2020. Finally, based on the fact that *D. eres* and *F. juglandicola* were significantly more frequently associated with each other than without each other on symptomatic twigs, *in vitro* co-inoculations of the two species were also performed. Surprisingly, the inoculation of *F. juglandicola* 4 days after *D. eres* resulted in significantly longer lesions than single inoculation of either of the two species, highlighting a potential facilitating interaction. *Fusarium* species are commonly being described as saprophytic species, *D. eres* could then facilitate the development of *F. juglandicola* on twigs. It would be interesting to investigate the interaction at the microscopic level in order to understand why the association of these species seems to facilitate symptom development in the wood. Given that the prevalence data also showed a positive correlation between *C. godetiae* and *F. juglandicola* on both symptomatic walnut husks and twigs, also highlighted on twigs by SparCC networks, we can also hypothesize that the presence of one species facilitates the development of the other or that some specific conditions may favor their simultaneous development.

Additional correlations were highlighted between the main pathogenic species and other members of the pathobiome. Among them, a positive correlation was detected by the SparCC network between *Neofusicoccum* and *Aureobasidium* genera on symptomatic walnut husks. This positive correlation could be explained by two main hypotheses. First, given that the genus *Aureobasidium*, in particular the endophytic species *Aureobasidium pullulans*, has proven useful as a biocontrol agent against many fungal pathogens such as *Botrytis cinerea* (Iqbal *et al.* 2023), *Colletotrichum acutatum* (Iqbal *et al.* 2023) and *Diplodia seriata* (Pinto *et al.* 2018), this positive correlation could be due to an increase in the growth of *Aureobasidium* in response to infection by *Neofusicoccum*. A transcriptomic study conducted on liquid co-cultures of *A. pullulans* and *Fusarium oxysporum* highlighted the up-regulation of many genes of *A. pullulans* potentially involved in a biocontrol activity in response to *F. oxysporum* presence according to the authors (Rueda-Mejia *et al.* 2021). Secondly, *Aureobasidium* could also play a role in symptom development, as hypothesized by Nerva *et al.* (2022). Analysis of transcriptomes in grapevine wood evidenced an up-regulation of genes involved in carbohydrate degradations and in transporters together with a high abundance of *N. parvum* and *A. pullulans*, which could suggest an involvement of these two species in symptom development (Nerva *et al.* 2022). A negative correlation was also highlighted between *Neofusicoccum* and *Vishniacozyma* in symptomatic walnut husks, potentially associated with the antagonistic effect of *Vishniacozyma* already demonstrated against phytopathogenic fungi (Gorordo *et al.* 2022; Nian *et al.* 2023). In symptomatic walnut twigs, positive correlations were detected between *Colletotrichum* and



*Boeremia*, as well as between *Diaporthe* and *Juglanconis*. These positive correlations involved the main genera of our study, and secondary pathogens, identified with the culture-independent method. Indeed, *Boeremia* species (family Didymellaceae), mainly *B. exigua*, was already reported as responsible for branch blight (Cai *et al.* 2021) and leaf spot (Wang *et al.* 2022a; b). In the same way, *Juglanconis* species, mainly *J. juglandina*, were also reported as walnut-canker associated pathogens (Ma *et al.* 2019; Pourfaraj *et al.* 2019). Thus, the development and infections caused by some pathogens of walnut trees could facilitate the development of others, as illustrated previously. These results highlight how crucial it is to deepen our knowledge of the interactions between members of the pathobiome, this disease resulting from a complex of fungal pathogenic species.

## **Conclusion**

To our knowledge, this study is the first to explore the fungal pathobiome associated with branch dieback and fruit blight and necrosis of walnut trees using complementary cultural and metabarcoding approaches. The 6 main species *B. dothidea*, *C. fiorinae*, *C. godetiae*, *D. eres*, *F. juglandicola* and *N. parvum* were identified as associated with these symptoms, although only Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae species were able to induce symptoms on detached twigs. Based on a comprehensive analysis of observation data under field conditions, this study also provides first clues towards a better understanding of the meteorological conditions enhancing fungal development as well as the interactions between members of the fungal pathobiome.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Funding**

M.B. PhD fellowship is financed by the French Brittany region (ARED Grant #1797 SHERWOOD project) and the French ministry of Higher Education, Research and Innovation (2020 CDE EGAAL). This project was also supported by the French ministry of Agriculture and Food under CASDAR funds (AAP RT 2020 CARIBOU project coordinated by the CTIFL and AAP “Connaissances” 2022 MAGIC project coordinated by the SENURA).

## **Acknowledgements**

We would like to thank the growers who have agreed to include their orchards in this project.

## References

- Agustí-Brisach, C., Moral, J., Felts, D., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2019) Interaction Between *Diaporthe rhusicola* and *Neofusicoccum mediterraneum* Causing Branch Dieback and Fruit Blight of English Walnut in California, and the Effect of Pruning Wounds on the Infection. *Plant Disease* 103: 1196–1205. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1118-RE>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Antony, S., Billones-Baaijens, R., Stodart, B.J., Steel, C.C., Lang, M.D. & Savocchia, S. (2023) Incidence and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with dieback in walnut orchards in Australia. *Plant Pathology* 72: 610–622. <https://doi.org/10.1111/ppa.13685>
- Arbizu, P.M. (2023) pairwiseAdonis: Pairwise Multilevel Comparison using Adonis.
- Arciuolo, R., Camardo Leggieri, M., Chiusa, G., Castello, G., Genova, G., Spigolon, N. & Battilani, P. (2021) Ecology of *Diaporthe eres*, the causal agent of hazelnut defects. *PLoS ONE* 16: e0247563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247563>
- Batista, E., Lopes, A. & Alves, A. (2020) Botryosphaeriaceae species on forest trees in Portugal: diversity, distribution and pathogenicity. *European Journal of Plant Pathology* 158: 693–720. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02112-8>
- Belair, M., Pensec, F., Jany, J.-L., Floch, G.L. & Picot, A. (2023) Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding. *Plants* 12: 2383. <https://doi.org/10.3390/plants12122383>
- Belisario, A., Santori, A., Potente, G., Fiorin, A., Saphy, B., Reigne, J.L., Pezzini, C., Bortolin, E. & Valier, A. (2010) Brown apical necrosis (BAN): a fungal disease causing fruit drop of English walnut. *Acta Horticulturae* 861: 449–452. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.63>
- Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 326–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Cai, F., Yang, C., Ma, T., Jin, M. & Cui, L. (2021) First report of *Boeremia exigua* var. *exigua* causing branch blight on walnut in China. *Plant Disease* 105: 3291. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0382-PDN>
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R. & Weir, B.S. (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Chen, S., Morgan, D.P., Hasey, J.K., Anderson, K. & Michailides, T.J. (2014) Phylogeny,

Morphology, Distribution, and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant Disease* 98: 636–652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>

Chen, W. & Swart, W.J. (2000) First Report of Stem Canker of English Walnut Caused by *Fusarium solani* in South Africa. *Plant Disease* 84: 592–592. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.5.592A>

Crous, P.W., Cowan, D.A., Maggs-Kölling, G., Yilmaz, N., Thangavel, R., Wingfield, M.J., Noordeloos, M.E., Dima, B., Brandrud, T.E., Jansen, G.M., Morozova, O.V., Vila, J., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Bishop-Hurley, S., Lacey, E., Marney, T.S., Larsson, E., Le Floch, G., Lombard, L., Nodet, P., Hubka, V., Alvarado, P., Berraf-Tebbal, A., Reyes, J.D., Delgado, G., Eichmeier, A., Jordal, J.B., Kachalkin, A.V., Kubátová, A., Maciá-Vicente, J.G., Malysheva, E.F., Papp, V., Rajeshkumar, K.C., Sharma, A., Spetik, M., Szabóová, D., Tomashevskaya, M.A., Abad, J.A., Abad, Z.G., Alexandrova, A.V., Anand, G., Arenas, F., Ashtekar, N., Balashov, S., Bañares, Á., Baroncelli, R., Bera, I., Biketova, A.Yu., Blomquist, C.L., Boekhout, T., Boertmann, D., Bulyonkova, T.M., Burgess, T.I., Carnegie, A.J., Cobo-Díaz, J.F., Corriol, G., Cunnington, J.H., da Cruz, M.O., Damm, U., Davoodian, N., de A. Santiago, A.L.C.M., Dearnaley, J., de Freitas, L.W.S., Dhileepan, K., Dimitrov, R., Di Piazza, S., Fatima, S., Fuljer, F., Galera, H., Ghosh, A., Giraldo, A., Glushakova, A.M., Gorczak, M., Gouliamova, D.E., Gramaje, D., Groenewald, M., Gansch, C.K., Gutiérrez, A., Holdom, D., Houbaken, J., Ismailov, A.B., Istel, Ł., Iturriaga, T., Jeppson, M., Jurjević, Ž., Kalinina, L.B., Kapitonov, V.I., Kautmanova, I., Khalid, A.N., Kiran, M., Kiss, L., Kovács, Á., Kurose, D., Kusan, I., Lad, S., Læssøe, T., Lee, H.B., Luangsa-ard, J.J., Lynch, M., Mahamedi, A.E., Malysheva, V.F., Mateos, A., Matočec, N., Mešić, A., Miller, A.N., Mongkolsamrit, S., Moreno, G., Morte, A., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Naseer, A., Navarro-Ródenas, A., Nguyen, T.T.T., Noisripoom, W., Ntandu, J.E., Nuytinck, J., Ostrý, V., Pankratov, T.A., Pawłowska, J., Pecenka, J., Pham, T.H.G., Polhorský, A., Posta, A., Raudabaugh, D.B., Reschke, K., Rodríguez, A., Romero, M., Rooney-Latham, S., Roux, J., Sandoval-Denis, M., Smith, M.Th., Steinrücken, T.V., Svetasheva, T.Y., Tkalčec, Z., van der Linde, E.J., v.d. Vegte, M., Vauras, J., Verbeken, A., Visagie, C.M., Vitelli, J.S., Volobuev, S.V., Weill, A., Wrzosek, M., Zmitrovich, I.V., Zvyagina, E.A. & Groenewald, J.Z. (2021) Fungal Planet description sheets: 1182–1283. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 46: 313–528. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.11>

Da Lio, D., Cobo-Díaz, J.F., Masson, C., Chalopin, M., Kebe, D., Giraud, M., Verhaeghe, A., Nodet, P., Sarrocco, S., Le Floch, G. & Baroncelli, R. (2018) Combined Metabarcoding and Multi-locus approach for Genetic characterization of *Colletotrichum* species associated with

- common walnut (*Juglans regia*) anthracnose in France. *Scientific Reports* 8: 10765.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29027-z>
- Eichmeier, A., Pecenka, J., Spetik, M., Necas, T., Ondrasek, I., Armengol, J., León, M., Berlanas, C. & Gramaje, D. (2020) Fungal Trunk Pathogens Associated With *Juglans regia* in the Czech Republic. *Plant Disease* 104: 761–771. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1308-RE>
- Epskamp, S., Cramer, A.O.J., Waldorp, L.J., Schmittmann, V.D. & Borsboom, D. (2012) qgraph: Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. *Journal of Statistical Software* 48: 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v048.i04>
- Estrada, A.B., Dodd, J.C. & Jeffries, P. (2000) Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49: 608–618.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00492.x>
- FAOSTAT (2021) Statistical database - World and France total production. Walnut with shell.  
License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>  
(February 1, 2023)
- Friedman, J. & Alm, E.J. (2012) Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. *PLOS Computational Biology* 8: e1002687. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002687>
- González-Domínguez, E., Caffi, T., Languasco, L., Latinovic, N., Latinovic, J. & Rossi, V. (2021) Dynamics of *Diaporthe ampelina* Conidia Released from Grape Canes that Overwintered in the Vineyard. *Plant Disease* 105: 3092–3100. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2639-RE>
- Gorordo, M.F., Lucca, M.E. & Sangorrín, M.P. (2022) Biocontrol Efficacy of the *Vishniacozyma Victoriae* in Semi-Commercial Assays for the Control of Postharvest Fungal Diseases of Organic Pears. *Current Microbiology* 79: 259. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02934-1>
- Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F. & Mugnai, L. (2019) Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 49–71.  
[https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-25153](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-25153)
- Gusella, G., Giambra, S., Conigliaro, G., Burrano, S. & Polizzi, G. (2021) Botryosphaeriaceae species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy. *Forest Pathology* 51: e12661. <https://doi.org/10.1111/efp.12661>
- Hall, B.H., Pederick, S.J. & McKay, S.F. (2016) Understanding infection of pistachio by *Colletotrichum acutatum*. *Acta Horticulturae* 1109: 215–222.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1109.35>

- Hilário, S. & Gonçalves, M.F.M. (2023) Mechanisms Underlying the Pathogenic and Endophytic Lifestyles in *Diaporthe*: An Omics-Based Approach. *Horticulturae* 9: 423. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040423>
- Iqbal, M., Broberg, A., Andreasson, E. & Stenberg, J.A. (2023) Biocontrol potential of beneficial fungus *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 113: 1428–1438. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-23-0067-R>
- Jiménez Luna, I., Besoain, X., Saa, S., Peach-Fine, E., Cadiz Morales, F., Riquelme, N., Larach, A., Morales, J., Ezcurra, E., Ashworth, V.E.T.M. & Rolshausen, P.E. (2022) Identity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from *Juglans regia* in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 79–94. <https://doi.org/10.36253/phyto-12832>
- Kamle, M. & Kumar, P. (2016) *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of Anthracnose Disease in Mango (*Mangifera indica* L.). In: P. Kumar, V. K. Gupta, A. K. Tiwari, & M. Kamle (eds.) *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*. Fungal Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 207–219.
- Kassambara, A. (2023) ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots.
- Laloum, Y., Verhaeghe, A., Moronvalle, A., Masson, C., Hebrard, M.-N., Picot, A., Pensec, F. & Belair, M. (2022) Projet CARIBOU : Élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer. *INFOS CTIFL* 386: 48–58.
- Legorreta, D. (2021) SparCC.
- Li, G., Liu, F., Li, J., Liu, Q. & Chen, S. (2016) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasioidiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China. *Journal of Phytopathology* 164: 348–353. <https://doi.org/10.1111/jph.12422>
- López-Moral, A., del Carmen Raya, M., Ruiz-Blancas, C., Medialdea, I., Lovera, M., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2020a) Aetiology of branch dieback, panicle and shoot blight of pistachio associated with fungal trunk pathogens in southern Spain. *Plant Pathology* 69: 1237–1269. <https://doi.org/10.1111/ppa.13209>
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B.I., Gámiz, A.M., Michailides, T.J., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2022) Effects of Cultivar Susceptibility, Branch Age, and Temperature on Infection by Botryosphaeriaceae and Diaporthe Fungi on English Walnut (*Juglans regia*). *Plant Disease* 106: 2920–2926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2042-RE>
- López-Moral, A., Lovera, M., del Carmen Raya, M. del C., Cortés-Cosano, N., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2020b) Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Species in Southern Spain. *Plant*

*Disease* 104: 533–550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0545-RE>

- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ma, R., Ye, S., Zhao, Y., Michailides, T.J. & Tian, C. (2019) New leaf and fruit disease of *Juglans regia* caused by *Juglanconis juglandina* in Xinjiang, China. *Forest Pathology* 49: e12537. <https://doi.org/10.1111/efp.12537>
- Martínez-García, P.J., Crepeau, M.W., Puiu, D., Gonzalez-Ibeas, D., Whalen, J., Stevens, K.A., Paul, R., Butterfield, T.S., Britton, M.T., Reagan, R.L., Chakraborty, S., Walawage, S.L., Vasquez-Gross, H.A., Cardeno, C., Famula, R.A., Pratt, K., Kuruganti, S., Aradhya, M.K., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., Salzberg, S.L., Wegrzyn, J.L., Langley, C.H. & Neale, D.B. (2016) The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. *The Plant Journal* 87: 507–532. <https://doi.org/10.1111/tpj.13207>
- McMurdie, P.J. & Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8: e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P.J. & Holmes, S. (2014) Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLOS Computational Biology* 10: e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Meteo France (2023) METEO-FRANCE : Publiothèque.
- Michailides, T.J., Chen, S., Morgan, D., Felts, D., Nouri, M.T., Puckett, R., Luna, M., Hasey, J., Anderson, K., Coates, W., Fichtner, E., Buchner, R. & Bentley, W. (2013) *Managing Botryosphaeria/Phomopsis cankers and anthracnose blight of walnut in California*. California Walnut Board, Folsom, CA., 325–346pp.
- Mihaescu, C., Dunea, D., Bășa, A.G. & Frasin, L.N. (2021) Characteristics of *Phomopsis juglandina* (Sacc.) Hohn. Associated with Dieback of Walnut in the Climatic Conditions of Southern Romania. *Agronomy* 11: 46. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010046>
- Moragrega, C. & Özaktan, H. (2010) Apical Necrosis of Persian (english) Walnut (*Juglans regia*): An Update. *Journal of Plant Pathology* 92: S67–S71. <https://www.jstor.org/stable/41998757>
- Moral, J., Morgan, D., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2019) Ecology and Epidemiology of Diseases of Nut Crops and Olives Caused by Botryosphaeriaceae Fungi in California and Spain. *Plant Disease* 103: 1809–1827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>

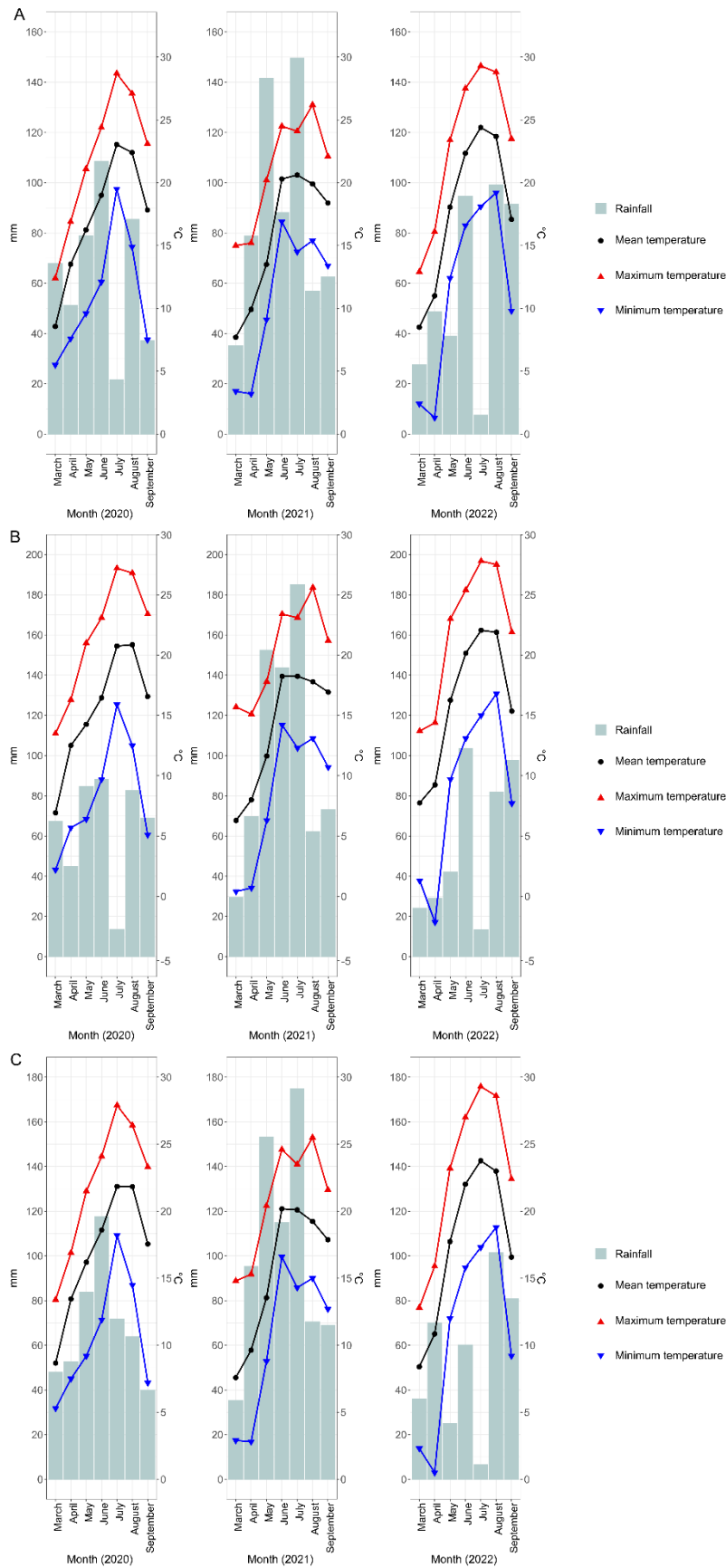
- Moricca, S., Innocenti, G. & Ragazzi, A. (2018) Epidemiological Investigations Shed Light on the Ecological Role of the Endophyte *Phomopsis quercina* in Mediterranean Oak Forests. In: A. M. Pirttilä & A. C. Frank (eds.) *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Forestry Sciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 207–227.
- Mulero-Aparicio, A., Agustí-Brisach, C., Raya, M. del C., Lovera, M., Arquer, O. & Traper, A. (2019) First Report of *Fusarium solani* Causing Stem Canker in English Walnut in Spain. *Plant Disease* 103: 3281–3281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1163-PDN>
- Nerva, L., Garcia, J.F., Favaretto, F., Giudice, G., Moffa, L., Sandrini, M., Cantu, D., Zanzotto, A., Gardiman, M., Velasco, R., Gambino, G. & Chitarra, W. (2022) The hidden world within plants: metatranscriptomics unveils the complexity of wood microbiomes. *Journal of Experimental Botany* 73: 2682–2697. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac032>
- Nian, L., Xie, Y., Zhang, H., Wang, M., Yuan, B., Cheng, S. & Cao, C. (2023) *Vishniacozyma victoriae*: An endophytic antagonist yeast of kiwifruit with biocontrol effect to *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry* 411: 135442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135442>
- Novak, A., Ivić, D., Sever, Z., Fazinić, T. & Šimunac, K. (2018) Botryosphaeria canker of walnut in Croatia. *Glasiło biljne zaštite* 18: 316–321. <https://hrcak.srce.hr/236900>
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M.D., Durand, S., Evangelista, H.B.A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M.O., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M.-H., Cunha, E.R., Smith, T., Stier, A., Braak, C.J.F.T. & Weedon, J. (2022) *vegan*: Community Ecology Package.
- Penet, L., Guyader, S., Pétero, D., Salles, M. & Bussière, F. (2014) Direct Splash Dispersal Prevails over Indirect and Subsequent Spread during Rains in *Colletotrichum gloeosporioides* Infecting Yams. *PLOS ONE* 9: e115757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115757>
- Pinto, C., Custódio, V., Nunes, M., Songy, A., Rabenoelina, F., Courteaux, B., Clément, C., Gomes, A.C. & Fontaine, F. (2018) Understand the Potential Role of *Aureobasidium pullulans*, a Resident Microorganism From Grapevine, to Prevent the Infection Caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology* 9: 3047. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03047>
- Polat, Z., Gültekin, M.A., Palacıoğlu, G., Bayraktar, H., Özer, N. & Yılmaz, S. (2020) First report of *Neocosmospora solani* causing stem canker on *Juglans regia* in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 102: 1289–1289. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00570-x>
- Pourfaraj, A., Arzanlou, M. & Abed-Ashtiani, F. (2019) *Juglanconis juglandina* a new record for the

- mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica* 6: 119–123. <https://doi.org/10.22043/mi.2020.121260>
- Radix, P., Seigle-Murandi, F. & Charlot, G. (1994) Walnut blight: development of fruit infection in two orchards. *Crop Protection* 13: 629–631. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90010-8)
- Rueda-Mejia, M.P., Nägeli, L., Lutz, S., Hayes, R.D., Varadarajan, A.R., Grigoriev, I.V., Ahrens, C.H. & Freimoser, F.M. (2021) Genome, transcriptome and secretome analyses of the antagonistic, yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* to identify potential biocontrol genes. *Microbial Cell* 8: 184–202. <https://doi.org/10.15698/mic2021.08.757>
- Salotti, I., Ji, T. & Rossi, V. (2022) Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953760>
- Salotti, I., Liang, Y.-J., Ji, T. & Rossi, V. (2023) Development of a model for *Colletotrichum* diseases with calibration for phylogenetic clades on different host plants. *Frontiers in Plant Science* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1069092>
- Slippers, B. & Wingfield, M.J. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S. & Sato, H. (2012) High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE* 7: e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Trouillas, F.P., Hébrard, M.-N., Aurelle, V., Jargeat, P. & Tranchand, E. (2023) Etiology of walnut fruit rot, spur and twig dieback in Southwestern France. *Acta Horticulturae*. in press.
- Tuerdi, M., Lv, C., Dan, H., Shan, L., Zhang, R. & Chen, X. (2023) First Report of *Fusarium solani* Associated with Twig Canker of English Walnut (*Juglans regia*) in Xinjiang, China. *Plant Disease* 107: 2858. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0430-PDN>
- Varjas, V., Lakatos, T., Tóth, T. & Kovács, C. (2020) First Report of *Colletotrichum godetiae* Causing Anthracnose and Twig Blight on Persian Walnut in Hungary. *Plant Disease* 105: 702–702. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0607-PDN>
- Velásquez, A.C., Castroverde, C.D.M. & He, S.Y. (2018) Plant and pathogen warfare under changing climate conditions. *Current biology* 28: R619–R634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>
- Verhaeghe, A. (2014) *Anthracnose* - *Gnomonia leptostyla*. . Plaquette anthracnose
- Wallis, C.M., Gorman, Z., Galarneau, E.R.-A. & Baumgartner, K. (2022) Mixed infections of fungal trunk pathogens and induced systemic phenolic compound production in grapevines. *Frontiers*

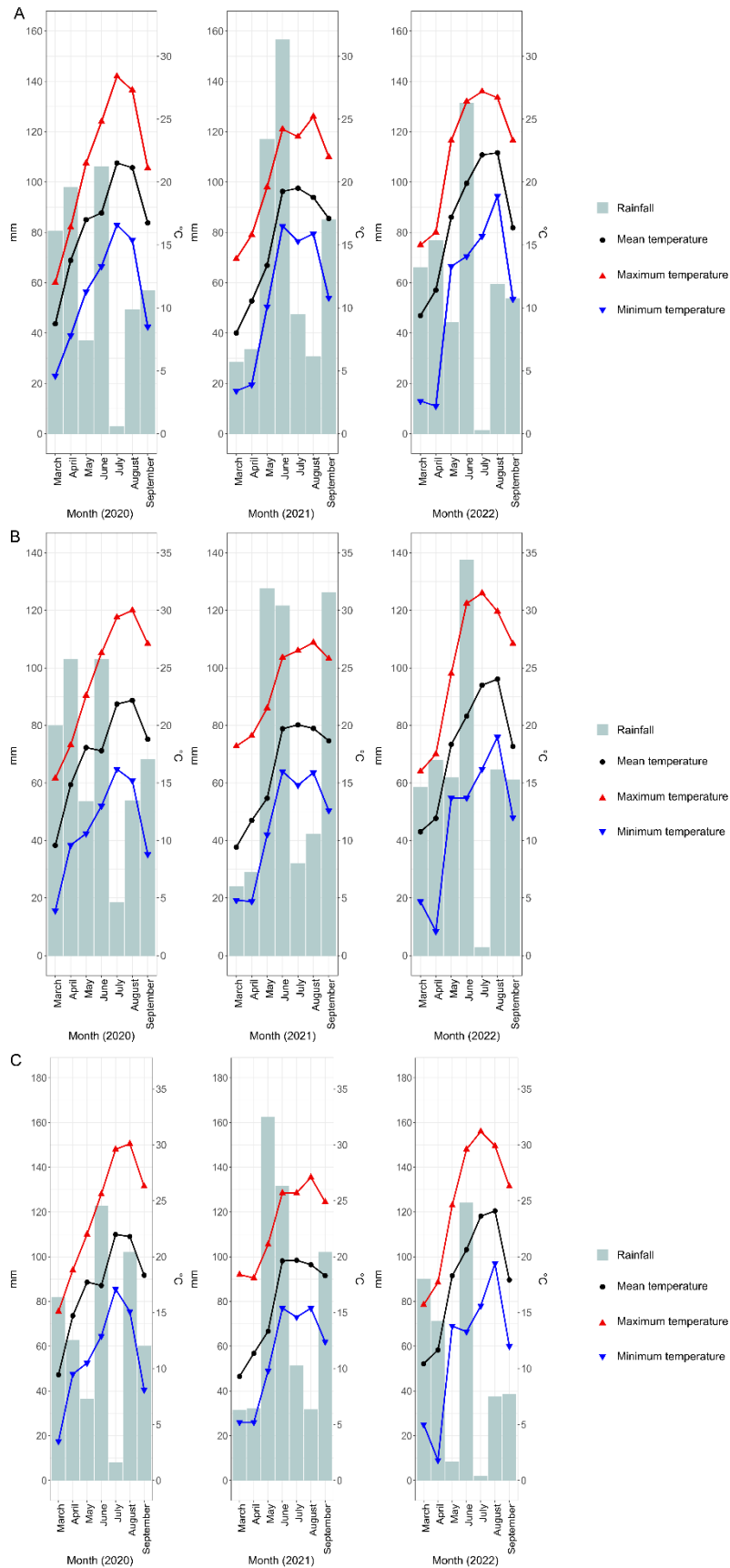


- in Fungal Biology* 3. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1001143>
- Wang, F., Dun, C., Tang, T., Duan, Y., Guo, X. & You, J. (2022a) *Boeremia exigua* Causes Leaf Spot of Walnut Trees (*Juglans regia*) in China. *Plant Disease* 106: 1993. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2304-PDN>
- Wang, S., Tan, Y., Li, S. & Zhu, T. (2022b) Structural and Dynamic Analysis of Leaf-Associated Fungal Community of Walnut Leaves Infected by Leaf Spot Disease Based Illumina High-Throughput Sequencing Technology. *Polish Journal of Microbiology* 71: 429–441. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-038>
- Wang, X., Li, K., Han, M., Zhang, W., Li, X., Ma, D., Wang, F., Pang, M. & Qi, J. (2020) Isolation and identification of endophytic fungi in walnut. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 508: 012138. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/508/1/012138>
- Wang, Y.X., Chen, J.Y., Xu, X.W., Li, D.W. & Wang, Q.Z. (2019) First Report of Brown Apical Necrosis of Walnut Fruit Caused by *Fusarium avenaceum* in Hubei, China. *Plant Disease* 103: 2956. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0954-PDN>
- Wei, T. & Simko, V. (2021) corrplot: A visual exploratory tool on correlation matrix.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and amplifications*. Academic Press, pp. 315–322.
- Wickham, H. (2016) *ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer International Publishing, New-York
- Yildiz, A., Benlioglu, S., Benlioglu, K. & Korkom, Y. (2022) Occurrence of twig blight and branch dieback of walnut caused by Botryosphaeriaceae species in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129: 687–693. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00591-x>
- Zabiák, A., Kovács, C., Takács, F., Pál, K., Peles, F., Fekete, E., Karaffa, L., Mihály, K., Flipphi, M. & Sándor, E. (2023) *Diaporthe* and *Diplodia* Species Associated with Walnut (*Juglans regia* L.) in Hungarian Orchards. *Horticulturae* 9: 205. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020205>
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L. & Jin, B. (2020) Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 117. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>

Figures supplémentaires



**Supplementary Figure S1.** Summary of the meteorological data (rainfall and temperature) from the meteorological station of CHATTE\_SAPC (A), SERRE-NERPOL\_SAPC (B) and ST-JEAN-EN-ROYANS (C). The meteorological data are represented from March to September in 2020, 2021 and 2022.



**Supplementary Figure S2.** Summary of the meteorological data (rainfall and temperature) from the meteorological station of LES-EYZIES-DE-TAYAC (A), MONPAZIER (B) and SALIGNAC-EYVIGUES (C). The meteorological data are represented from March to September in 2020, 2021 and 2022

**Supplementary Table S1.** Mean lesion length (mm) for each isolates of *B. dothidea*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *D. eres*, *F. juglandicola* and *N. parvum* inoculated on 1-year-old detached shoots of walnut variety Franquette under laboratory conditions and the respective experimental timescales (days) for each species.

Species	Isolate	Duration of experiment (days)	Mean lesion length (cm)
Botryosphaeriaceae			
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	SHP1T12I2_2021	10	12.5
	SHP10T7I1_2021	10	13.2
	CAP8T6I3_2021	10	7.0
	SHP5H1I2_2020	10	13.2
	SHP3H5I2_2020	10	10.1
	SHP1H10I2_2021	10	6.0
<i>Neofusicoccum parvum</i>	SHP5T6I3_2021	11	11.4
	CAP3T15I3_2021	11	13.3
	CAP12T4I1_2021	11	11.8
	SHP4H4I1_2020	11	9.6
	SHP7H1I1_2020	11	14.6
	SHP9H4I2_2021	11	12.3
Diaporthaceae			
<i>Diaporthe eres</i>	SHP10T12I2_2021	12	7.3
	SHP2T8I6_2021	12	8.8
	SHP5T15I4_2021	12	9.4
	SHP11H5I6_2020	12	3.4
	SHP4H4I5_2020	12	6.7

**Supplementary Table S1.** Continued.

Species	Isolate	Duration of experiment (days)	Mean lesion length (cm)
Glomerellaceae			
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	SHP6T7I2_2021	31	3.8
	SHP10T10I1_2021	31	3.6
	SHP1T1I5_2022	31	3.1
<i>C. godetiae</i>	SHP11T14I2_2021	31	2.1
Nectriaceae			
<i>Fusarium juglandicola</i>	SHP4T5I7_2021	31	2.2
	SHP6T6I8_2021	31	0.8
	SHP12H2I6_2020	31	2.9
	SHP2H2I5_2020	31	0.7
	SHP8H13I2_2021	31	4.1



CHAPITRE III - Etude de la diversité intraspécifique des  
populations de *B. dothidea* et *N. parvum*





# I. Introduction des travaux

Comme expliqué dans la partie introductive de ce manuscrit, le dépérissement du noyer, à l'échelle mondiale, est principalement associé aux espèces de la famille des Botryosphaeriaceae. Dans le chapitre II, nous avons montré que ces champignons, représentés quasi-exclusivement par deux espèces (*N. parvum* et *B. dothidea*), contribuaient, en partie, aux symptômes causés sur rameaux et sur brous dans les noyeraies en France. Malgré une prévalence moyenne de ces deux espèces plus faible que celle de *D. eres* dans les rameaux (51 % versus 71 %), nos résultats tendent à démontrer qu'elles sont plus agressives sur rameaux détachés. Par ailleurs, *N. parvum*, est également associée au dépérissement d'autres hôtes ligneux en France, en particulier la vigne depuis de nombreuses années et est également prédominante dans les noyeraies d'autres pays à climat méditerranéen, à commencer par la Californie et l'Espagne. Nous avons donc fait le choix d'étudier la génétique des populations de cette espèce et de la comparer avec une espèce proche dont l'implication dans le dépérissement semblait moindre (*B. dothidea*). Les objectifs de cette étude étaient donc (i) d'étudier la diversité génétique et génotypique et le mode de reproduction majeur des populations de *B. dothidea* et *N. parvum* isolées de noyers en France, (ii) de s'intéresser aux facteurs influençant la structure de ces populations, et (iii) de comparer les populations de noyers françaises avec d'autres populations provenant de divers hôtes (amandier, noyer, vigne) et zones géographiques (Californie, Espagne, France) afin de mieux comprendre l'origine et le potentiel de dissémination de *N. parvum* et *B. dothidea*, acteurs importants de cette maladie en France.

Pour ce faire, une collection de 181 isolats de *B. dothidea* et de 200 isolats de *N. parvum* obtenue à l'aide de la mise en culture des échantillons environnementaux prélevés en 2020 et 2021 a été utilisée afin de réaliser un génotypage par le séquençage de régions microsatellites. La recherche de régions microsatellites dans le génome de chacune des espèces, le design des amorces, l'amplification des séquences, le séquençage et enfin l'obtention des génotypes ont été réalisés à la Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux. La définition des populations a été basée sur l'origine des isolats (Sud-Est et Sud-Ouest de la France).

**Ces travaux font l'objet d'un article en préparation, présenté en partie II du présent chapitre.**

## II. Article en préparation

**Belair M.**, Picot A., Lepais O., Masson C., Hébrard M.-N., Moronvalle A., Comont G., Gabri Martin V. M., Tréguer S. Laloum Y., Corio-Costet M.-F., Michailides T. J., Le Floch G., Pensec, F. Genetic diversity and population structure of *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* on English walnut (*Juglans regia* L.) in France. **Manuscript in preparation**

**Genetic diversity and population structure of *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* on English walnut (*Juglans regia* L.) in France**

Marie Belair<sup>1</sup>, Adeline Picot<sup>1</sup>, Olivier Lepais<sup>2</sup>, Cyrielle Masson<sup>3</sup>, Marie-Neige Hébrard<sup>4</sup>, Aude Moronvalle<sup>5</sup>, Gwénaëlle Comont<sup>6</sup>, Victor M. Gabri Martin<sup>7</sup>, Sylvie Tréguer<sup>1</sup>, Yohana Laloum<sup>5</sup>, Marie-France Corio-Costet<sup>6</sup>, Themis J. Michailides<sup>7</sup>, Gaétan Le Floch<sup>1</sup>, Flora Pensec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France

<sup>3</sup> Station d'expérimentation Nucicole Rhône Alpes, 38160 Chatte, France

<sup>4</sup> Station Expérimentale de Creysse, Perrical 46600 Creysse, France

<sup>5</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prignonrieux, France

<sup>6</sup> INRAE, UMR Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, Labex Cote, CS 20032, 33882 Villenave d'Ormon, France

<sup>7</sup> University of California Davis, Department of Plant Pathology, Kearney Agricultural Research and Extension Center, Parlier, CA, 93648, USA

corresponding author : [flora.pensec@univ-brest.fr](mailto:flora.pensec@univ-brest.fr)

## Abstract

Botryosphaeriaceae species are known to cause many diseases on a wide host range worldwide. Of these, *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* are the main Botryosphaeriaceae species associated with walnut dieback in France. Due to the recent emergence of this disease in France, little is known about the diversity of pathogenic populations, their structure, origin and dispersion in walnut orchards. Genetic diversity of a total of 381 isolates of both species collected from asymptomatic and symptomatic walnut husks and twigs during three sampling campaigns in the two main French walnut production regions were analyzed using recently developed sequence-based microsatellite genotyping (SSR-seq) method. Our results demonstrated a low genetic diversity and a high rate of clonality, consistent with the clonal mode of reproduction commonly described for these species. The genetic similarity observed among populations regardless of the organ type and the presence of symptoms provides additional support for the hypothesis that these pathogens can move between fruits and twigs and display both endophytic and pathogenic lifestyles. The genetic differentiation of *B. dothidea* populations according to French regions indicates putative distinct origins, possibly shared with populations from French grapevines, in particular in the South-West of France. Comparison with populations of *N. parvum* from Californian and Spanish almond and walnut orchards evidenced a globally distinct genetic pattern, suggesting that there is no conclusive evidence for pathogen transmission from infected materials but rather from French grapevines which *N. parvum* populations shared high genetic similarity with those from French walnut orchards. Finally, this study provides important insight into the epidemiology of two important pathogens involved in an emergent dieback disease in French walnut orchards, including their distribution, potential to mate, putative origin and disease pathways.

**Keywords:** Botryosphaeriaceae, *Juglans regia*, microsatellites, genetic diversity, emerging disease

## Introduction

Botryosphaeriaceae is a large family of fungi that are either saprophytes, endophytes or pathogens and mainly associated with woody hosts (Slippers & Wingfield 2007). Presently, based on their morphological and genetic characteristics, 23 genera and over 100 species belong to the Botryosphaeriaceae family (Dissanayake 2016; Slippers *et al.* 2017). Within this family, most genera (notably *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, and *Pseudofusicoccum*) can develop within plants as latent pathogens, infecting healthy tissues and remaining dormant before being able to switch to a pathogenic lifestyle leading to symptom development. This behavior shift has been described to be mainly caused by biotic and/or abiotic stress conditions such as environmental changes, wounds caused by humans or insects as well as disease development caused by other microorganisms (Manawasinghe *et al.* 2016; Marsberg *et al.* 2017; Slippers & Wingfield 2007). Species belonging to the Botryosphaeriaceae family show a worldwide distribution as well as low host-specificity (Batista *et al.* 2021; Slippers & Wingfield 2007), and are responsible for diseases in both forest and agricultural environments, in particular in woody plants because of their pathogenesis arsenal (reviewed in Belair *et al.* 2022). Some species are known to be highly ubiquitous, such as *B. dothidea* which is associated with 500 different host species, *D. sapinea* (128) and *D. seriata* (158), *Dot. sarmentorum* (114), *L. pseudotheobromae* (161) and *L. theobromae* (788), *Macrophomina phaseolina* (551), *N. australe* (110), *N. parvum* (294) and *N. ribis* (273) (Batista *et al.* 2022). Zlatković *et al.* (2018) further identified 10 Botryosphaeriaceae species associated with 47 species of ornamental and forest trees belonging to Gymnosperms and Angiosperms in Western Balkans (Zlatković *et al.* 2018). In agroecosystems, Botryosphaeriaceae affect numerous economically-important fruit and nut trees, such as citrus (Bezerra *et al.* 2021), mango (Aiello *et al.* 2022), litchi (Aiello *et al.* 2022), apple (Díaz *et al.* 2022), cocoa (Huda-Shakirah *et al.* 2022), vine (Úrbez-Torres 2011), pistachio (Gusella *et al.* 2022), almond (Inderbitzin *et al.* 2010), olive (Hernández-Rodríguez *et al.* 2022) and walnut trees (Chen *et al.* 2014; Laloum *et al.* 2022).

English walnut (*Juglans regia* L.) is the most widely cultivated species in the world for nut production (Martínez-García *et al.* 2016). It was historically cultivated in Central Asia but the crop is now broadly cultivated in all continents, mainly in Asia, America and Europe (McGranahan & Leslie 2012). The top three largest producers in the world are China, followed by the United-States and Iran. With a production of 37,740 tons associated with about 27,000 hectares in 2021, French walnut culture belongs to the top three European countries (FAOSTAT 2021). French walnut orchards are historically affected by walnut blight,

anthracnose and brown apical necrosis diseases, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*, *Ophiognomonia leptostyla* and a fungal complex of *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. respectively (Belisario *et al.* 2002; Giraud *et al.* 2007; Giraud & Verhaeghe 2015). Nevertheless, during the past 10 to 15 years, new fungal diseases targeting walnut trees have been frequently reported in France, associated with significant yield losses, most probably related to the twofold increase of dedicated areas since the 2000s and climate change, reflected by the unusual succession of hot summers in France (European Environment Agency 2023; FAOSTAT 2021; Singh *et al.* 2023; World Meteorological Organization 2022). In particular, walnut dieback symptoms were extensively reported in France since 2015 (Bressolier 2021; Giraud & Verhaeghe 2015; Laloum *et al.* 2022) including twig necrosis, defoliation and cankers as well as fruit necrosis and blight up to complete host dieback already described in Mediterranean-climate areas, such as California, Spain or Italy (Gusella *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2020; Moral *et al.* 2019b). While Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species are mainly reported in symptomatic samples in these regions, in France fungal isolations from symptomatic walnut fruits and twigs resulted in the identification of a fungal complex, primarily represented by *Diaporthe* and Botryosphaeriaceae species, along with *Colletotrichum* and *Fusarium* (Laloum *et al.* 2022). These emergent symptoms and causal agents, although widespread in tree nut orchards abroad as well as in other French crops such as vineyards, encouraged us to explore the source and pathways of such biological invasion, which is a key to understanding the origin of the pathogen (Robert *et al.* 2012). Human-mediated introduction of pathogen agents in new environments as well as host jump are one of the main causes for disease emergence (Billones-Baaijens *et al.* 2015; Dunn & Hatcher 2015; Frankel *et al.* 2020; Na *et al.* 2022; Thines 2019), which is even more likely for these species considering their wide host range and low host specificity (Mehl *et al.* 2017; Thines 2019). In order to try to identify origin and pathways of biological invasion, population genetics appears as a useful tool to provide relevant insights into the diversity and origin of Botryosphaeriaceae populations newly isolated from French walnut trees.

Several recent molecular markers have been used so far to study the genetic diversity and structure of *B. dothidea* and *N. parvum* populations from many hosts, including inter-simple sequence repeats (ISSR; Slippers *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2001) and simple sequence repeats (SSR; Manawasinghe *et al.* 2018; Mehl *et al.* 2017; Nagel *et al.* 2020; Pavlic-Zupanc *et al.* 2015; Sakalidis *et al.* 2013; Zlatković *et al.* 2019). Microsatellite markers, or SSR, are powerful genetic markers widely used in fungal population genetic studies. These ubiquitous DNA sequences of eukaryotic genomes are highly polymorphic, co-dominant and their sequencing is

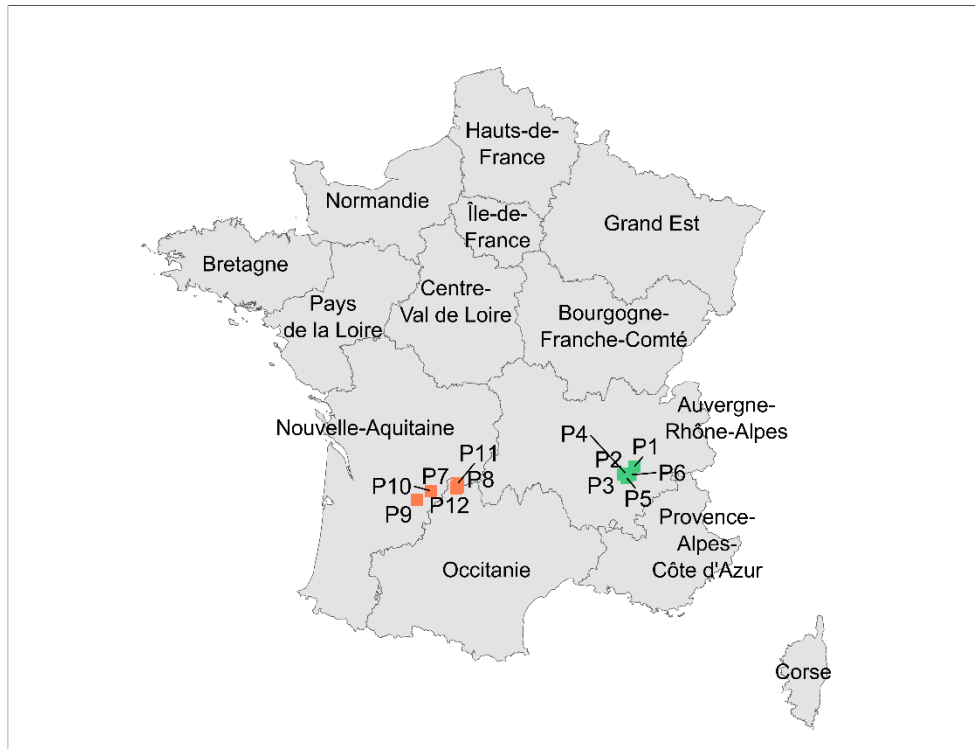
highly reproducible (Jarne & Lagoda 1996; Tautz & Renz 1984). Overall, these studies consistently revealed low genetic diversity of *B. dothidea* and *N. parvum* populations in cultivated hosts while fairly high levels of genetic diversity could be found when isolates originated from native hosts. Populations from native hosts tend to have greater genetic diversity, as well as populations that have been well developed for a long time on cultivated hosts (Manawasinghe *et al.* 2018; Pavlic-Zupanc *et al.* 2015), than emergent and introduced populations (Mehl *et al.* 2017; Nagel *et al.* 2020; Sakalidis *et al.* 2013; Zlatković *et al.* 2019).

In this study, microsatellite markers were developed and genotyped using microsatellite sequencing (SSR-seq; Lepais *et al.* 2020) for both *B. dothidea* and *N. parvum* species. Our objectives were to (i) assess the diversity of the main Botryosphaeriaceae populations newly isolated from French walnut orchards, (ii) compare with populations originated from countries and crops characterized by a moderate (Spanish walnut orchards) to a long history of disease implantation, including Californian walnut and almond orchards as well as French vineyards and, (iii) study genetic differentiation of populations according to geographic location, host and disease development stage.

## **Materials and methods**

### **Collection of fungal isolates**

Symptomatic and asymptomatic walnut organs were collected from different trees in 12 French orchards (P1 to P12) during September 2020 and August 2021 for husks, and during May 2021 for twigs. A total of 6 orchards were surveyed in the South-East (SE; P1 to P6, mainly Auvergne-Rhône-Alpes region) and 6 orchards in the South-West (SW; P7 to P12, mainly Nouvelle-Aquitaine region; **Figure 1**). Two orchards were cultivated with the cultivar Serr (P7 and P9) while the remaining orchards were cultivated with the variety Franquette. Symptoms targeted on walnut husks were characterized by blights and necrosis, while symptomatic twigs showed necrosis, defoliation and cankers. In each orchard, 5 symptomatic husks were sampled during September 2020, while 24 symptomatic and 6 asymptomatic husks and the same number of twigs were sampled during the two other campaigns when possible. All samples were stored at 4°C until analyzed.



**Figure 1.** Sampling location of *B. dothidea* and *N. parvum* isolates from French walnut orchards in the South-East (green) and in the South-West (orange) walnut-producing areas.

Environmental samples were sterilized and cut as described in Belair *et al.* (2023) and 5 pieces of each sample were placed onto potato dextrose agar (PDA) supplemented with 10 mL/L of a Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Fungal isolates were collected on PDA medium and grown for a 4-day incubation period at 25°C in the dark and a 3-day incubation period at room temperature under natural light.

Botryosphaeriaceae isolates were identified based on internal transcribed spacer (ITS) sequencing. DNA extractions were performed using KingFisher Duo Prime System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and Mag-Bind® Universal Pathogen DNA extraction kit (Omega Bio-Tek Inc., VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) following the manufacturer's instructions. DNA solutions were quantified with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). PCR amplifications were performed with ITS5/ITS4 primer pair and following White *et al.* (1990) instructions. Sanger sequencing was performed by Eurofins Genomics platform (Cologne, Germany). Contig assembly and taxonomic assignment was performed with Geneious Prime 2021.1.1.

In order to compare the prevalence (defined as the percentage of husks or twigs contaminated by a given species out of the total number of organs analyzed) of the two species



between the two types of organs and the two sampled areas as well as between asymptomatic and symptomatic organs, a chi-squared test was performed using the *chisq.test()* R function to compare the equality of proportions (R Core Team 2022).

### Fungal isolates purification and DNA extraction

All isolates were single-thallus purified from 14 day-old cultures. Mycelial suspensions were produced by scraping surface mycelium with sterile rakes and 5 mL of a solution of sterile distilled water and Tween<sup>®</sup> 80 (2 drops of Tween<sup>®</sup> 80 for 1 L of solution; Sigma Aldrich). Serial dilutions in sterile distilled water and Tween<sup>®</sup> 80 down to 10<sup>-3</sup> were performed before surface-plating (100 µL of 10<sup>-2</sup> and 10<sup>-3</sup> mycelial solutions) onto PDA medium. Petri dishes were incubated at 25°C in the dark and single-thallus growth was observed using binocular loupe after 24 hours of incubation and then collected and isolated onto a new PDA medium and incubated at 25°C in the dark for 7 days. Of our collection of 300 *N. parvum* isolates, 200 isolates were further selected for SSR-sequencing, by covering the range of origin and using the same number of isolates for each sampling condition. Also, if an organ was infected with a high number of isolates, two to four randomly-selected isolates were genotyped (**Table 1**).

Fungal isolates from French vineyards from UMR SAVE (Santé et Agroécologie du Vignoble) as well as from Californian walnut and almond trees and Spanish walnut trees from Kearney Agricultural Research and Extension Center were added to the analysis and were purified as described previously.

DNA extractions of purified isolates were performed as described previously before being diluted to a final concentration of 15 ng/µL for SSR-sequencing.

**Table 1.** Number of isolates of *B. dothidea* and *N. parvum* collected from French walnut orchards, genotyped using SSR-seq and used in the population study after manual clone-correction of datasets as described in **SSR quality filtering**.

Sampling (nb of samples)	<i>B. dothidea</i> isolates			<i>N. parvum</i> isolates		
	Collected	Genotyped	Population study	Collected	Genotyped	Population study
<b>South-East</b>	<b>124</b>	<b>124</b>	<b>94</b>	<b>96</b>	<b>69</b>	<b>49</b>
<b>2020</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>7</b>
<i>Husk</i>	18	18	15	14	10	7
- Symptomatic (30)	18	18	15	14	10	7

**Table 1.** Continued.

Sampling (nb of samples)	<i>B. dothidea</i> isolates			<i>N. parvum</i> isolates		
	Collected	Genotyped	Population study	Collected	Genotyped	Population study
<b>South-East</b>	<b>124</b>	<b>124</b>	<b>94</b>	<b>96</b>	<b>69</b>	<b>49</b>
<b>2021</b>	<b>106</b>	<b>106</b>	<b>79</b>	<b>82</b>	<b>59</b>	<b>42</b>
<i>Husk</i>	79	79	61	50	40	30
- Asymptomatic (15)	16	16	12	4	4	3
- Symptomatic (68)	63	63	49	46	36	27
<i>Twig</i>	27	27	18	32	19	12
- Asymptomatic (15)	5	5	3	2	1	1
- Symptomatic (72)	22	22	15	30	18	11
<b>South-West</b>	<b>58</b>	<b>57</b>	<b>39</b>	<b>227</b>	<b>131</b>	<b>107</b>
<b>2020</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>34</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<i>Husk</i>	9	8	6	34	21	19
- Symptomatic (30)	9	8	6	34	21	19
<b>2021</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>33</b>	<b>193</b>	<b>110</b>	<b>88</b>
<i>Husk</i>	20	20	16	54	35	27
- Asymptomatic (15)	1	1	1	0	0	0
- Symptomatic (60)	19	19	15	54	35	27
<i>Twig</i>	29	29	17	139	75	61
- Asymptomatic (15)	0	0	0	5	5	5
- Symptomatic (72)	29	29	17	134	70	56
<b>Total isolates</b>	<b>182</b>	<b>181</b>	<b>133</b>	<b>323</b>	<b>200</b>	<b>156</b>

### **Sequence-based microsatellite genotyping**

Microsatellite markers genotyping, from whole-genome microsatellite detection to primer design as well as microsatellite sequencing and bioinformatic analyses, were performed at the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (PGTB, Bordeaux, France). Global description of the workflow is available in the publication of Lepais *et al.* (2020). Briefly, the QDD v3.1 pipeline (Megléczy *et al.* 2014) was used to detect microsatellites and design associated primer pairs based on genome sequences retrieved from NCBI (accession number in National Center for Biotechnology Information: GCA\_011503125.2 for *B. dothidea* and GCA\_020912385.1 for *N. parvum*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 08 April 2022). A total of 60 microsatellite primer pairs were tested for amplification in a simplex PCR, before the amplification of the successful locus in a multiplex PCR. Amplicons were indexed and sequenced in a portion of a P1 flowcell of an Illumina NextSeq 2000 sequencer in a paired-end 2 x 150 pb configuration. Then, data analyses were performed using a bioinformatic pipeline (Lepais *et al.* 2020) integrating the FDSTools analysis toolkit (Hoogenboom *et al.* 2017), leading to complete genotypic profiles for each strain integrating allelic polymorphism of 35 loci and 34 loci for *N. parvum* and *B. dothidea* respectively. Moreover, sequences of 95 strains of each species were amplified and sequenced twice to ensure reproducibility of sequenced SSR, estimate allelic error rate and compute the overall missing data rate for each locus.

### **SSR quality filtering**

First, loci with more than 20% missing data and/or more than 3% allelic error were discarded. In addition, since both species are haploid, loci with more than 20% heterozygosity, suggesting a sequencing error, were also discarded. Genotypes of strains that were repeated were compared and a representative was conserved for further analyses provided that both genotypes were identical. If genotypes were not identical (due to heterozygous loci), the homozygous genotype was retained. Strains with more than 20% heterozygosity or missing data were also discarded. Finally, isolates from French walnut orchards were clone-corrected by discarding strains isolated from the exact same organ with the same multilocus genotype (MLG) in order to retain only one representative per sample (hereafter uncorrected datasets; **Table 1**).

### **Population genetic diversity**

GenAlEx v6.503 (Peakall & Smouse 2012) was used to determine characteristics of each dataset and population, e.g. unbiased haploid genetic diversity (uh) and percentage of polymorphic loci (%P), as well as Mantel test (Mantel 1967). Moreover, the allelic richness (AR) at the smallest population size across combinations of populations and locus were

assessed using the *PopGenReport* v3.0.7 R package (Adamack & Gruber 2014). The *poppr* v2.9.4 R package (Kamvar *et al.* 2015) was also used to assess complementary estimators such as the number of multilocus genotypes (MLG), the number of expected MLGs (eMLG) at the smallest sample size, Shannon (H; Shannon 1948) and corrected Simpson's indices ( $\lambda_c$ ; Simpson 1949), and the evenness of MLGs (E.5, which corresponds to MLGs distribution among populations; Pielou 1975). Simpson's corrected index was calculated by multiplying by  $N/(N-1)$ , N representing the total number of individuals of the given population. Shannon index and the evenness were estimated with a bootstrap value of 1000 and a rarefaction at the smallest population size as indicated in Grünwald *et al.* (2003). Clone-correction was applied for each population using *poppr* to retain only one representative strain for each MLG in each population (hereafter clone-corrected datasets). Linkage disequilibrium was estimated using the index of association and its standardized form (Ia; Brown *et al.* 1980, and *rbarD*; Agapow & Burt 2001), respectively), for both uncorrected and clone-corrected datasets, with 999 permutations. Genotype accumulation curves were produced to ensure that loci used in the analysis were sufficiently numerous and discriminative to assess the genotypic diversity of *B. dothidea* and *N. parvum* populations with a resampling without replacement value of 1000.

### **Population structure and differentiation**

Analyses of MOlecular VAriance (AMOVA) were performed using the *ade4* R package (Dray & Dufour 2007) implemented in *poppr* on both uncorrected and clone-corrected datasets. Minimum spanning networks were performed based on Bruvo's distance (Bruvo *et al.* 2004) using the two R packages *poppr* and *magrittr* v2.0.3 (Bache & Wickman 2022). Discriminant Analyses of Principal Components (DAPC) were conducted with the *adegenet* v2.1.10 R package in *poppr* (Jombart *et al.* 2010; Jombart & Ahmed 2011). The optimal number of principal components (PCs) was assessed using a cross-validation with the *xvalDapc()* function. Dendrogram of genetic distance among populations of *N. parvum* was constructed using unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method and Nei's distance (Nei 1972, 1978) with *poppr* and *adegenet* R packages. The number of bootstrap was set to 1000 and missing data were treated using the "mean" method.

## Results

### Distribution of *B. dothidea* and *N. parvum* isolates in walnut orchards from the two main French production regions

A total of 182 *B. dothidea* and 323 *N. parvum* isolates were collected from 326 walnut husks and 315 twigs from the two French production regions during three sampling campaigns, including a few isolates that originated from the same organ. Prevalence of *N. parvum* was significantly higher in the South-West than in the South-East ( $p = 0.003$ ), contrary to *B. dothidea*, regardless of the campaigns ( $p < 0.001$ ; **Table 2**). Considering organs, *B. dothidea* was significantly more prevalent in walnut husks than in twigs, regardless of campaigns and production areas (28.5% versus 11.1% in total, respectively,  $p < 0.001$ ; **Table 2**) while *N. parvum* infected husks and twigs similarly (26.1% in husks and 21.9% twigs in total,  $p = 0.25$ ) (**Table 2**). Interestingly, *B. dothidea* was similarly prevalent in symptomatic and asymptomatic organs whatever the organ type while *N. parvum* was significantly more prevalent in symptomatic samples (**Table 2**).

**Table 2.** Prevalence of *B. dothidea* and *N. parvum* species in the two geographical areas and the two organ types in 2020 and 2021. Prevalence in symptomatic and asymptomatic organs was only evaluated in 2021.

Criterion	Condition	<i>B. dothidea</i> (%)	<i>N. parvum</i> (%)
Geographical origin	South-East	31.7 <sup>a</sup>	18.1 <sup>b</sup>
	South-West	10.8 <sup>b</sup>	28.6 <sup>a</sup>
Organ type	Husks	28.5 <sup>a</sup>	26.1 <sup>a</sup>
	Twigs	11.1 <sup>b</sup>	21.9 <sup>a</sup>
Presence of symptoms on husks (2021)	Asymptomatic husks	22.2 <sup>a</sup>	7.4 <sup>b</sup>
	Symptomatic husks	28.3 <sup>a</sup>	25.9 <sup>a</sup>
Presence of symptoms on twigs (2021)	Asymptomatic twigs	4.8 <sup>a</sup>	11.1 <sup>b</sup>
	Symptomatic twigs	12.7 <sup>a</sup>	24.6 <sup>a</sup>

Lowercase letters indicate significant differences at 0.05 threshold based on chi-squared test. Statistical comparisons were performed between conditions of the same criterion by species.

## Genetic diversity and genotypic variations of French populations of *B. dothidea* and *N. parvum*

A total of 11 and 27 loci and 138 and 223 strains were respectively retained for *B. dothidea* and *N. parvum* population analysis (**Table 3**). *B. dothidea* isolates were divided into *a priori* populations based on French production areas, leading to two distinct populations, namely Bd\_SW for the South-West production area (N = 39) and Bd\_SE for the South-East production area (N = 94). The *N. parvum* population was similarly divided (Np\_SW, N = 107; and Np\_SE, N = 49). Descriptive statistics and diversity indices are summarized in **Table 3**.

Among the 11 SSR loci used for *B. dothidea* population analysis, the number of alleles ranged from 1 to 4 with an average of 2.272 alleles per locus (regardless of production area), with 3 monomorphic loci in the Bd\_SE population and 4 in the Bd\_SW one. Overall, the two populations showed a high level of polymorphic loci, and similar allelic richness values. Moreover, they showed low levels of genetic diversity, unevenly distributed among MLGs, although the distribution was more homogeneous in the southwestern population than in the southeastern one ( $E_s = 0.61$  and  $0.42$ , respectively; **Table 3**). The rate of clonality (percentage of strains that share a MLG) within the two populations ranged from more than 75% (Bd\_SW) to 86% (Bd\_SE), further illustrating a relatively moderate genotypic diversity and equitability although still slightly higher in the former than in the latter population ( $H = 1.54$  and  $0.92$ , and  $\lambda_c = 0.69$  and  $0.38$ , respectively; **Table 3**). Indeed, more than 75% isolates belonged to only one MLG in the Bd\_SE versus two MLGs in the Bd\_SW population. Interestingly, no MLG was found to be shared by strains of the two populations, indicating that the 10 and 12 MLGs associated with Bd\_SW and Bd\_SE populations were uniquely associated with a production area.

*N. parvum* isolates were genotyped based on 27 SSR loci with allele counts ranging from 1 to 5 (mean number of alleles per locus of 2.815, regardless of production area). The Np\_SW population showed a higher rate of polymorphic loci (23 loci vs 10 loci, respectively) and a higher allelic richness ( $AR = 2.59$  vs  $1.54$ ; **Table 3**). Overall, the number of isolates belonging to MLGs was much more evenly distributed in the Np\_SW than in the Np\_SE population ( $E_s = 0.73$  and  $0.39$ , respectively), further confirmed by a considerable higher unbiased haploid genetic diversity and  $\lambda_c$  values in the Np\_SW population ( $u_h = 0.148$  and  $0.040$ ; and  $\lambda_c = 0.91$  and  $0.29$ , respectively; **Table 3**). Indeed, the same MLG was shared by 41 out of 49 strains of the Np\_SE population, whereas 86 out of 107 strains from the Np\_SW population belonged to 12 different MLGs (from 2 strains to 19 strains per MLG). The Np\_SE

population was represented by more than 85% clonal strains, highlighted by relatively low diversity indices ( $H = 0.73$ ). The second population was much more diverse ( $H = 2.68$ ) and thus associated with a lower rate of clonal strains (69%; **Table 3**). Interestingly, two MLGs were shared by the two production regions but were only shared by one isolate from the other population.

### ***B. dothidea* population analysis revealed partial sexual reproduction although clonality was high for both species**

Linkage disequilibrium was explored to assess the extent of clonal versus sexual reproduction within both populations. In addition to the uncorrected dataset, the clone-corrected dataset was also taken into account to correct for the clonality effect caused by a high rate of clonal strains for each MLG. As shown by the high number of isolates sharing the same MLG for most of the populations, clonality was hypothesized to be the main reproduction mode for both *B. dothidea* and *N. parvum*.

Considering *B. dothidea*, the uncorrected dataset showed significant p-value for the two  $I_A$  and  $r_{barD}$  indices for both SW and SE populations, but not the clone-corrected ones, thus failing to reject the null hypothesis of random mating. This may evidence a potential sexual reproduction within the two populations (**Table 3**). Note that negative values were obtained for the Bd\_SE population with the clone-corrected dataset. These values indicated that the observed variance of the distance between strains was lower than the expected variance under the assumption of panmixia.

Conversely, *N. parvum* populations all showed clonal reproduction as the main mode of reproduction regardless of the dataset, highlighted by relatively high  $r_{barD}$  values and significant p-values at a threshold of 0.05 (**Table 3**).

**Table 3.** Descriptive statistics and indices of genetic diversity of *B. dothidea* and *N. parvum* populations collected from the two main French walnut production regions.

Species	Population	Nb of individuals	Nb of loci	AR	uh (s.d.)	%P	MLG	eMLG	H	$\lambda_c$	E <sub>5</sub>	Uncorrected dataset		Clone-corrected dataset	
												I <sub>A</sub>	rbarD	I <sub>A</sub>	rbarD
<i>B. dothidea</i>	Bd_SW	39	11	2.08	0.142 (0.060)	63.64	10	10	1.54	0.71	0.61	1.08 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>
	Bd_SE	94		1.62	0.077 (0.028)	72.73	12	7.35	0.92	0.39	0.42	1.34 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	-0.15 <sup>b</sup>	-0.03 <sup>b</sup>
<i>N. parvum</i>	Np_SW	107	27	2.59	0.148 (0.034)	85.19	33	20.58	2.68	0.92	0.73	1.14 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>
	Np_SE	49		1.64	0.040 (0.012)	37.04	7	7	0.73	0.30	0.39	2.96 <sup>a</sup>	0.35 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>

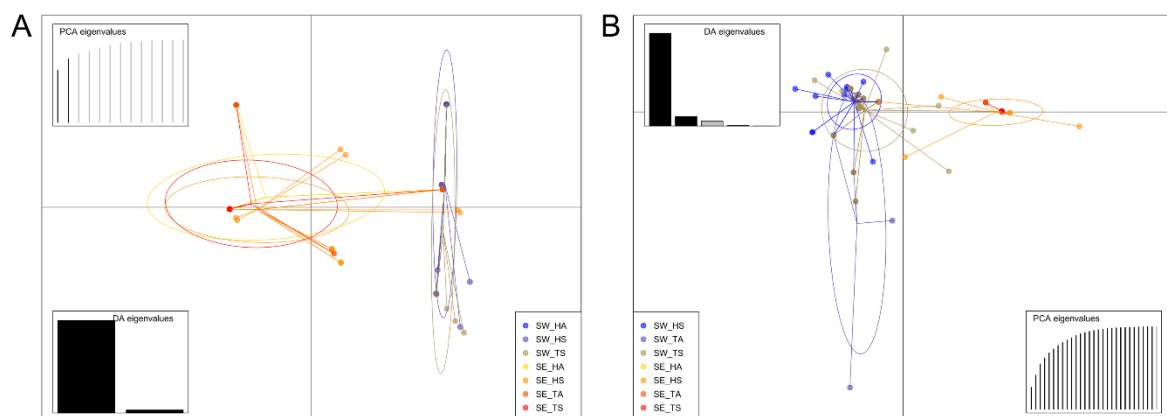
s.d.: standard deviation; AR: allelic richness; uh: unbiased haploid genetic diversity; %P: % of polymorphic loci; MLG: number of observed multilocus genotypes; eMLG: number of multilocus genotypes expected at the smallest sample size; H: Shannon-Wiener index;  $\lambda_c$ : corrected Simpson's index; E<sub>5</sub>: Evenness; I<sub>A</sub>: Index of association; rbarD: standardized index of association.  
<sup>a</sup>p-value < 0.05; <sup>b</sup>p-value > 0.05.



## Geographical origin impacted the structure of *B. dothidea* populations but not that of *N. parvum* populations

The AMOVA performed on the uncorrected and clone-corrected datasets for *B. dothidea* populations led to opposite results. The uncorrected dataset showed that the genetic differentiation was more structured according to regions (64.66%) than to strains (35.34%), while the opposite was found for the clone-corrected dataset (79.26% of the genetic diversity was associated with strains vs 20.74% with regions; **Table S1**). Nonetheless, the impact of the geographical origin was further evidenced with the DAPC (**Figure 2**) and the Mantel test that detected significant association between genetic and geographic distances of *B. dothidea* isolates ( $R^2 = 0.42$  and  $p = 0.01$ ). This was consistent with the absence of shared MLGs between the two populations, as described previously.

The AMOVA performed on *N. parvum* populations based on geographical origin indicated that the genetic diversity was mainly explained by strains (77.69% of variation with the uncorrected data set and 93.39% of variation with the clone-corrected one; **Table S1**). For this species, no significant relationship between genetic and geographic distances was noticed and was confirmed by both the Mantel test ( $R^2 = 0.0004$  and  $p = 0.250$ ) and the DAPC, showing a relatively high genetic proximity between MLGs from the two production areas (**Figure 2**).



**Figure 2.** Discriminant Analysis of Principal Components of *B. dothidea* (A) and *N. parvum* (B) populations based on geographical origin (South-West -SW and South-East -SE), organ (Husk -H and Twig -T) and symptoms (Asymptomatic -A and Symptomatic -S). The SW\_HA population of *B. dothidea* and SE\_TA population of *N. parvum* were not represented because they were represented by only one individual.

## **Population structure was not impacted by the organ type, the presence of symptoms or over time**

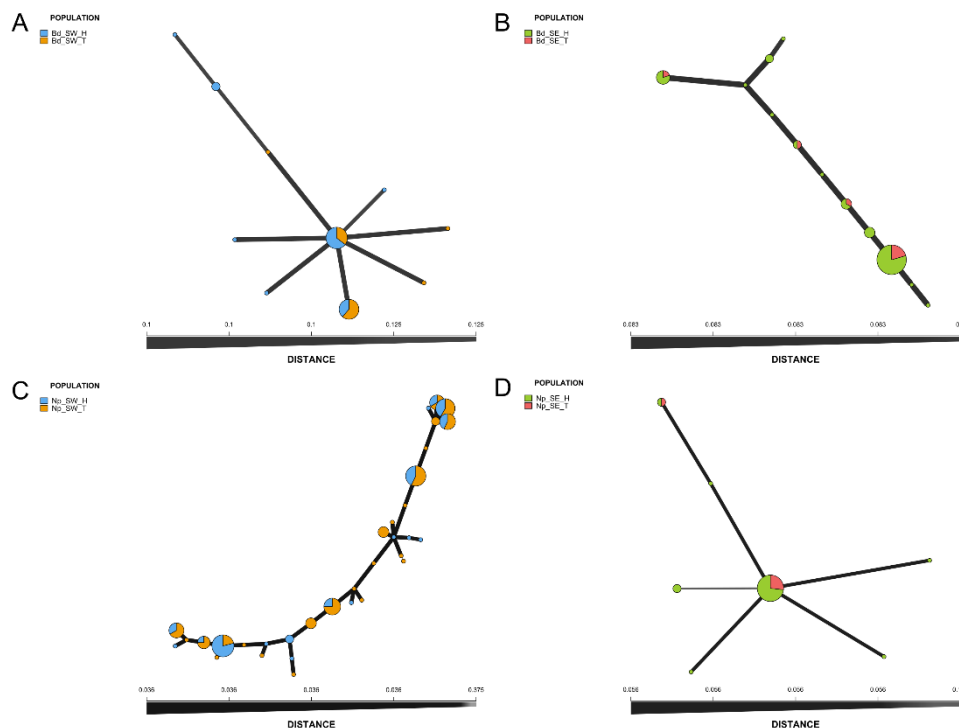
Further analyses were conducted to compare MLGs associated with isolates from walnut husks (H) and twigs (T) in the two production areas for both *B. dothidea* and *N. parvum* species, as well as isolates from asymptomatic (A) and symptomatic (S) organs.

Overall, husk-associated populations displayed more MLGs than twig-associated ones (**Table S2**). Minimum spanning networks showed that the majority of the MLGs associated with husks were also identified in twigs for the two species in both regions (**Figure 3**). This was consistent with the low percentage of variation observed between organs with the AMOVA analysis (**Table S3**) and the overlap of ellipses between twig and husk populations as shown by the DAPC (**Figure 2**). The number of MLGs was higher in twigs than in husks in the Np\_SW population (**Figure 3C** and **Table S2**). All the MLGs that were shared between husks and twigs-based populations were predominant for both species in the two areas (**Figure 3**). Unlike the South-East, a few MLGs from the South-West were uniquely isolated from twigs (3 out of 10 MLGs for *B. dothidea* and 16 out of 33 MLGs for *N. parvum*). Unbiased genetic diversity values (uh) were relatively low, indicating that all organ-based populations displayed relatively uneven and heterogeneous MLGs repartition and high level of clonality (**Table S2**).

Concerning the distribution of populations associated with symptomatic and asymptomatic husks and twigs, isolates from both species sharing the same MLG could be isolated from both types of organs. In addition, MLGs from symptomatic and asymptomatic organs were genetically closely-related (**Figure 2**). Interestingly, for both species, the four SE populations (based on organs and symptoms) shared the same predominant MLG; it was also the case for the three South-West *B.dothidea* populations while Np\_SW were more genotypically differentiated. Interestingly, one highly represented MLG from *N. parvum* strains collected from symptomatic husks and twigs was not present in asymptomatic samples in the South-West. Conversely, two MLGs, represented by only one individual each, were only found in asymptomatic twigs of the Np\_SW population.

Moreover, comparisons between isolates collected from walnut husks in 2020 and 2021 showed that these populations were relatively close. More than 60% *B. dothidea* isolates from walnut husks in 2020 and 2021 in the South-West shared the same two MLGs, versus more than 75% in the South-East. These similarities between populations were confirmed by the DAPC (**Figure S1A,B**). Likewise, more than 40% *N. parvum* isolates from walnut husks in 2020 and 2021 in the South-West shared the same two MLGs, versus more than 80% in the

South-East. This higher similarity between isolates from the southeastern French production region over time was also confirmed by the DAPC (**Figure S1C,D**).

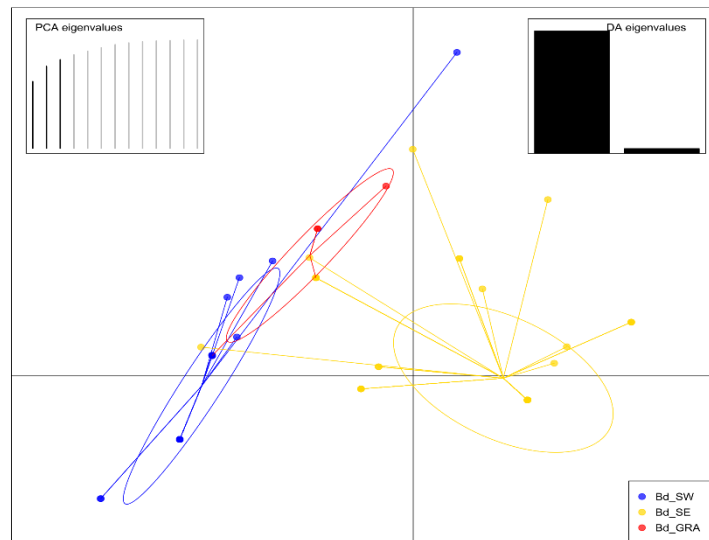


**Figure 3.** Minimum-spanning networks based on Bruvo's distance of MLGs of *B. dothidea* (Bd) and *N. parvum* (Np) populations. The networks were generated for the southwestern (SW) and southeastern (SE) production areas, as well as for walnut husks (H) and twigs (T). A: Bd populations in the South-West; B: Bd populations in the South-East; C: Np populations in the South-West; D: Np populations in the South-East. MLGs are represented by nodes (circle) and edges (lines) representing genetic distance between individuals. The size of the nodes corresponds to the number of individuals sharing the same MLG.

### **Comparison of *B. dothidea* and *N. parvum* populations from French walnut orchards with populations from other countries and/or crops**

Populations of *B. dothidea* and *N. parvum* from French walnut orchards were compared with other populations from different geographical and host origin: *B. dothidea* and *N. parvum* populations isolated from grapevines in France (Bd\_GRA, N = 5 individuals; and Np\_GRA, N = 43 individuals, respectively), and *N. parvum* populations isolated from walnut trees in California (Np\_CAL\_W, N = 5 individuals) and in Spain (Np\_SPAN, N = 5 individuals), and from almond trees in California (Np\_CAL\_A, N = 14 individuals). Geographical and plant origin of these populations is listed in **Table S4** and **Table S5**.

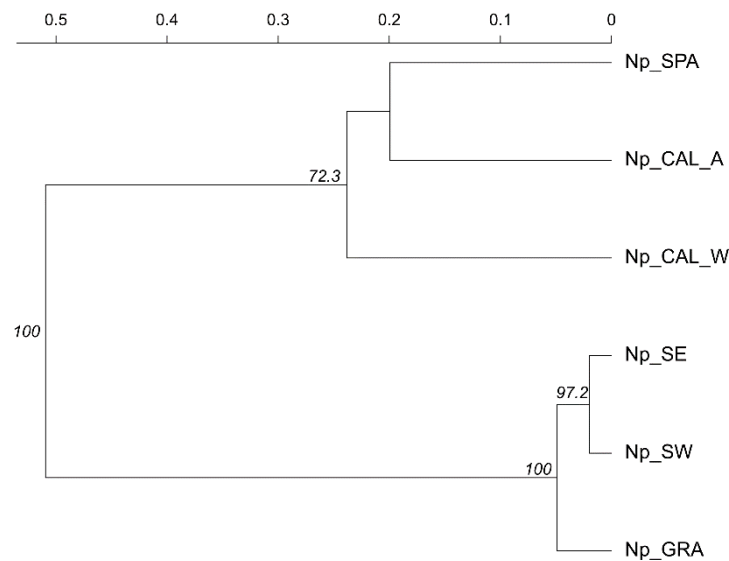
Surprisingly, a certain level of genetic proximity was found between Bd\_SW and Bd\_GRA populations, as illustrated in the DAPC where the SW and GRA populations were clustered together at the opposite side of the SE one (**Figure 4**). Despite this higher genetic similarity between Bd\_SW and Bd\_GRA, only one MLG was shared between these two populations while one MLG was also shared between Bd\_SE and Bd\_GRA (**Figure S12A**).



**Figure 4.** Discriminant Analysis of Principal Components for *B. dothidea* populations from French walnut-producing regions (South-West -SW and South-East -SE) and French vineyards (GRA).

The UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance highlighted an even stronger genetic proximity between Np\_SW, Np\_SE and Np\_GRA populations than that reported above with *B. dothidea* (**Figure 5**). Indeed, the Np\_SE and Np\_SW populations, respectively, shared 3 and 5 MLGs with the Np\_GRA population (**Figure S2B**). Altogether, these observations further supported the lack of differentiation according to geographical origin of *N. parvum* populations. Interestingly, among the individuals collected from grapevines in France (see **Table S4** for geographical origin), those that corresponded to the shared MLGs between Np\_SW/Np\_SE and Np\_GRA populations were all collected in the South-West (Nouvelle-Aquitaine and Occitanie regions) while grapevine isolates from the North-East (Grand Est region) did not share any MLGs with the French walnut populations. On the other hand, the population collected from walnut trees in Spain displayed a low genetic proximity with the Np\_SW, Np\_SE and Np\_GRA populations on the UPGMA dendrogram, and no MLGs among the 5 from this Spanish population were common with the previous ones (**Figures 5 and S2B**). The same was true for the populations collected from walnut (CAL\_W) and almond (CAL\_A)

trees in California. This was confirmed by the UPGMA which highlighted a higher proximity between the Californian and Spanish populations than between the other three (**Figure 5**).



**Figure 5.** UPGMA dendrogram based on Nei's distance between four *N. parvum* populations from southwestern and southeastern French regions (SW and SE respectively), grapevines in France (GRA) and walnut (CAL\_W) and almond (CAL\_A) trees in California and walnut trees in Spain (SPA). Bootstrap values above 50 are displayed at nodes.

## Discussion

In the current study, we documented the genetic diversity and distribution of *B. dothidea* and *N. parvum* populations associated with walnut dieback in the two main French walnut production areas. Interestingly, walnut dieback symptoms have been associated with the presence of ten Botryosphaeriaceae species in addition to two species of *Diaporthe* in California at the beginning of the 2010s (Chen *et al.* 2014), while six different species have been associated with dieback symptoms in France (Belair *et al.* 2023; Laloum *et al.* 2022), among which *B. dothidea* and *N. parvum* were the only representatives of the Botryosphaeriaceae family. The emergence of this disease in France led us to investigate the genetic and genotypic diversity and population structure of *B. dothidea* and *N. parvum* from organs showing walnut dieback symptoms as well as asymptomatic ones.

Analysis of both *B. dothidea* and *N. parvum* populations from South-West and South-East of France showed relatively low genetic diversity, which is consistent with the emerging nature of the disease in France. The same conclusions were also obtained from previous studies using different methods such as RAPD to study *B. dothidea* populations from blackberry,

eucalyptus, pecan, pistachio, walnut and willow in California (Ma *et al.* 2001) or UP-PCR to study *N. parvum* populations from vineyards in New-Zealand (Baskarathevan *et al.*, 2012), although these markers are much less resolute than SSR (Sunnucks 2000). Interestingly, the genetic diversity of both species isolated from different hosts and countries was also reported from moderate (Mehl *et al.* 2017; Zlatković *et al.* 2019) to relatively high (Manawasinghe *et al.* 2018; Pavlic-Zupanc *et al.* 2015; Sakalidis *et al.* 2013) based on microsatellite markers genotyping. Reproduction mode is known to contribute to the level of genetic diversity, with populations undergoing sexual reproduction more likely to exhibit higher genetic diversity (McDonald & Linde 2002). In this study, *B. dothidea* and *N. parvum* populations were associated with a dominant clonal reproduction pattern. Indeed, it is known that Botryosphaeriaceae species tend to display relatively low levels of sexual reproduction and primarily rely on asexual reproduction in field conditions (Slippers & Wingfield 2007). Likewise, both *B. dothidea* and *N. parvum* were reported to be represented by a high number of individuals sharing the same MLG and to have a low genetic diversity (Ma *et al.* 2001; Mehl *et al.* 2017; Pavlic-Zupanc *et al.* 2015; Zlatković *et al.* 2019), suggesting an important role of clonal reproduction (McDonald & Linde 2002). Both sexual and asexual reproduction modes, associated with high and low genetic diversity, respectively, were detected based on linkage disequilibrium by Sakalidis *et al.* (2013) who studied the diversity of *N. parvum* populations collected in different countries, highlighting the species' ability to reproduce in both ways. However, in our *B. dothidea* clone-corrected dataset, significant linkage equilibrium was observed, suggesting the presence of recombinations or sexual reproduction such as homothallic mating type (Xu 2006). This is consistent with previous observations of *B. dothidea* populations from grapevines in China (Manawasinghe *et al.* 2018) as well as the presence of homothallic mating types in these two species, as revealed by their genome analysis (Lopes *et al.* 2017; Marsberg *et al.* 2017; Nagel *et al.* 2018). The predominance of clonal strains is also characteristic of the emergence of a disease, as shown by Ma *et al.* 2001 on individuals associated with recent panicle and shoot blight disease in pistachio in California. Moreover, Botryosphaeriaceae species appear to exhibit higher genetic diversity in native hosts and environments, such as *N. parvum* isolated from *Syzygium cordatum* in South-Africa (Pavlic-Zupanc *et al.* 2015). Further investigations on the presence of reproduction structures on the surface of walnut branches could give more information about the reproduction mode of these species in walnut orchards in France, but taken together our observations are consistent with the recent emergence of the disease in France (Laloum *et al.* 2022).

Comparisons between strains associated with walnut husks and twigs revealed a high percentage of identity between MLGs of the two types of organs and a relatively low genetic distance. These connections between walnut husks and twigs support the hypothesis raised by (Michailides *et al.* 2013) that the walnut dieback disease often originates in fruits, with pathogen agents transferring from fruits to twigs through the peduncle. A second hypothesis would be that infection can also initiate directly in twigs through wounds and scars caused by the fall of fruits and leaves from walnut trees or even pruning wound, although practices requires less pruning on walnut trees than on grapevines (Michailides *et al.* 2013; Moral *et al.* 2019a). Actually, pruning wounds are identified as the primary entry point for infection of twigs and branches by Botryosphaeriaceae species in other hosts like vines (Rosace *et al.* 2023), and in walnut trees, wounds were shown to remain susceptible to Botryosphaeriaceae infection for at least 4 months (Michailides *et al.* 2016). These different wounds could either constitute a breach for exogenous infections of Botryosphaeriaceae or generate abiotic and biotic stresses that could lead to the behavioral shift of Botryosphaeriaceae species from endophytes (that is, present in the plant before wounds occurred) to pathogens. In order to consider this endophytic lifestyle, we additionally collected isolates from asymptomatic organs. Results evidenced that, for both species, populations isolated from symptomatic and asymptomatic husks and twigs were genetically similar, indicating that strains exhibiting endophytic lifestyle in asymptomatic organs were the same that had a pathogenic lifestyle in symptomatic ones. It was evidenced that Botryosphaeriaceae species are capable of causing latent infections on young walnut trees in nurseries (Moral *et al.* 2019b), further supporting the hypothesis that these species can remain latent for extended periods and switch to a pathogenic lifestyle under specific conditions, when resources become limited, and defense responses become weaker in a stressed plant (Manawasinghe *et al.* 2016; Rai & Agarkar 2016; Slippers & Wingfield 2007). The first observation of dieback symptoms occurred in August 2003 in France concurrently with the occurrence of a severe heatwave before dieback symptoms were reported again from 2015 onwards, corresponding to an unusual succession of hot summers (Bressolier 2021; European Environment Agency 2023; Laloum *et al.* 2022; World Meteorological Organization 2022). This temporal link between occurrence of dieback symptoms and summer heatwaves could be explained by the following two hypotheses: (i) environmental stresses have an impact on the activation of latent infections by Botryosphaeriaceae species, and (ii) higher temperatures increase the sporulation and growth of Botryosphaeriaceae that have a high optimal growth temperature (Moral *et al.* 2019b). In addition, we found that the majority of strains isolated from symptomatic walnut husks sampled in 2020 were also detected in 2021, for both species,

suggesting a certain stability, at least over a year of experiment. Further investigations on individuals collected during multiple years could give additional information about the spatiotemporal structure of the populations of the two species. It could also provide more information on the stability of populations over time and potential changes in these populations, as shown in *B. dothidea* populations from pistachio in California (Ma *et al.* 2003).

We also found that the structure of *N. parvum* populations did not depend on geographical origin, nor on organ type or presence of symptoms, indicating a lack of genetic differentiation based on these factors. This observation would imply a possible dispersion of individuals between the two regions through wind or insects (Moral *et al.* 2019b) which allowed for longer distance dispersal than spore dispersal by rain-splash. In addition, our results clearly showed a significantly higher level of *N. parvum* genotypic diversity in the South-West. This fact, together with a significantly higher prevalence of the species in the South-West, also suggest that origin of contamination may be older and/or environmental conditions as well as agronomic practices may favor the implanting of *N. parvum* compared to the South-East. Past observations in France may support the hypothesis that walnut trees in the South-West are more subject to abiotic stress and thus more prone to fungal diseases. In fact, the first observations of fungal walnut dieback caused by *Phytophthora* species were reported during the 1990s only in the South-West production region (Herman *et al.* 1995), despite the fact that the “intensive” cultivation of walnut trees has been going on for longer in the South-East (i.e. at the beginning of the 1900s; Letonnelier 1930) than in the South-West (around the 1950s; Laugénie 1965). Moreover, a reduction of production due to unhealthy, unproductive and/or lacking vigor trees was reported in the South-West in the early 1980s, while at the same time the South-East was seen as the best area to grow walnut trees (Ramos & Doyle 1984). Conversely, *B. dothidea* populations based on geographical origin were genetically significantly different when analyzing the uncorrected dataset, and no MLG was shared between the two populations. Therefore, the emergence of *B. dothidea* on walnut trees may result from separate inoculum sources between the South-West and the South-East of France.

Interestingly, *B. dothidea* and *N. parvum* populations collected from French walnut trees showed differences in behavior and structure that could be the result of several parameters such as host specificity, the mechanisms of spore dispersal, the age of introduction or pathogenicity criteria such as aggressiveness. In their study, Marsberg *et al.* (2017) highlighted that on the one hand, the low host specificity, displayed by Botryosphaeriaceae, would contribute to a lack of spatial differentiation as observed for *N. parvum* populations in France while on the other hand, the dispersal of Botryosphaeriaceae spores by rain and water on relatively short distances



may lead to geographic-based genetic structure, like the one observed for *B. dothidea* populations. Additionally, considering that reproduction mode plays an important role in population structure (Pavlic-Zupanc *et al.* 2015), the highlighted traces of sexual reproduction displayed by *B. dothidea* populations could also explain their specific structure. Furthermore, a recently-introduced population is more likely to have no particular structure (Zlatković *et al.* 2019), and some studies hypothesized that introduction of *B. dothidea* may be older originating from Europe (Marsberg *et al.* 2017), which could be a second partial explanation. The difference in aggressiveness between the two species is also likely to explain the differences observed. Indeed, it has been shown that *N. parvum* is more aggressive than *B. dothidea* (Chen *et al.* 2014; Gusella *et al.* 2021; López-Moral *et al.* 2022; Sohrabi *et al.* 2020), and a higher aggressiveness involved longer and more numerous lesions as well as a higher level of reproduction (Dyakov 2007). A higher aggressiveness may also reflect a greater ability to colonize the host. Altogether, this could also partially explain the higher number of collected *N. parvum* individuals compared to *B. dothidea*. This higher occurrence of *N. parvum* in walnut orchards displaying dieback symptoms has also been demonstrated in surveys carried out in California (Chen *et al.* 2014), Croatia (Novak *et al.* 2018) and Turkey (Yildiz *et al.* 2022). It has been shown that some cryptic species, such as *N. parvum* and *N. ribis*, are better invaders due to their better adaptation to colonize non-native and human-disturbed environments (Pavlic-Zupanc *et al.* 2015).

Furthermore, the analyses revealed that *N. parvum* populations not only exhibited genetic similarity between the two walnut production regions, but also showed proximity to strains collected from French vineyards in the southwestern regions. In contrast, *N. parvum* populations were clearly different from Californian and Spanish ones. Interestingly, some individuals from French walnut trees and vineyards even shared identical MLGs. Shared MLGs were also evidenced between the *B. dothidea* population from the South-West (Bd\_SW) and French southwestern vineyards. Thus, *B. dothidea* and *N. parvum* populations infecting walnut trees could share common origin with the population collected from vineyards or originate from them, the two species are indeed commonly associated with grapevine trunk diseases in France (Batista *et al.* 2022). This hypothesis is also supported by the fact that viticulture is historically older than walnut orchards cultivation in the French regions studied (Laugénie 1965; Letonnelier 1930) As described previously, climate change could play a significant role in causing abiotic stresses on plants, leading to disease onset as well as facilitating the geographical and host expansion of pathogenic agents, as predicted by Batista *et al.* (2023). A second possible transmission pathway is the human-mediated transmission specifically through

introduction of infected material. In the history of walnut cultivation, English walnut (*Juglans regia* L.), which found its origins in Central Asia, was exported to North-America primarily as rootstock to enhance the characteristics and cultivation of walnut and to improve species crossbreeding (Preece & McGranahan 2015). Initially, the major part of Californian walnut trees was grafted on *Juglans nigra* rootstocks, an endemic species (McGranahan & Leslie 1991). Currently, scions grafted on *Juglans nigra* rootstock are still produced in Californian nurseries and exported to different regions including France (Delbos *et al.* 1983). Thus, some French walnut producers are cultivating *J. regia* × *J. nigra* hybrids. However, the lack of genetic proximity between strains of French and Californian walnut trees does not confirm this origin of infection and indicates that may have had separate origins or, alternatively, have undergone distinct evolution processes, although additional samplings would be needed in walnut-producing countries to confirm or not this result. *N. parvum* strains from Spain were also genetically distant from French ones. Nevertheless, implantation and evolutionary pressure of these populations are likely to be quite similar between those two regions, considering that walnut dieback was, like in France, more recently observed in Spain than it was in California (López-Moral *et al.* 2020). Further isolations and investigations of *B. dothidea* and *N. parvum* populations from other hosts and countries should help to shed light into the emergence of walnut dieback in France.

## Conclusion

Overall, the present study aimed at exploring the genetic diversity and population structure of *B. dothidea* and *N. parvum* isolates collected from walnut trees using SSR-sequencing. The results showed relatively low genetic diversity and a main clonal reproduction pattern, although *B. dothidea* French populations displayed traces of sexual reproduction. Unlike *N. parvum*, *B. dothidea* populations from the two production areas did not share any MLG and showed a geographic-based genetic structure. Some strains collected from symptomatic organs could also be isolated from asymptomatic ones, further confirming the ability of both species to switch from endophytic to pathogenic lifestyles. Genetic similarity of *N. parvum* and *B. dothidea* walnut populations from the South-West of France with French grapevines populations indicates a possible host jump from grapevine to walnut. In addition, the observed genetic distance between French and Spanish *N. parvum* populations as well as with Californian ones rather suggested that introduced contaminated materials are less likely to be an important source of inoculum here. This study provides important insight into the epidemiology of two important

pathogens involved in an emergent dieback disease in French walnut orchards, including their distribution, potential to mate, putative origin and disease pathways.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Funding**

This work, which was conducted in the framework of the CARIBOU project, was funded by the French ministry of Agriculture and Food under CASDAR funds (AAP RT 2020 CARIBOU project coordinated by the CTIFL). This project was also funded by the French Brittany region (ARED Grant #1797 SHERWOOD project) and the French ministry of Higher Education, Research and Innovation (2020 CDE EGAAL).

### **Acknowledgments**

We would like to thank the growers who have agreed to include their orchards in this project. We are also grateful to the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (doi:10.15454/1.5572396583599417E12) for performing sequence-based microsatellite genotyping, with the help of Emilie Chancerel, Zoé Delaporte and Erwan Guichoux.

### **References**

- Adamack, A.T. & Gruber, B. (2014) PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
- Agapow, P.-M. & Burt, A. (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium: TECHNICAL NOTE. *Molecular Ecology Notes* 1: 101–102. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Aiello, D., Guarnaccia, V., Costanzo, M.B., Leonardi, G.R., Epifani, F., Perrone, G. & Polizzi, G. (2022) Woody Canker and Shoot Blight Caused by Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae on Mango and Litchi in Italy. *Horticulturae* 8: 330. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040330>
- Bache, S. & Wickman, H. (2022) magrittr: A Forward-Pipe Operator for R.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M.V., Jones, E.E., Cruickshank, R.H. & Ridgway, H.J. (2012) Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards. *Fungal Biology* 116: 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.010>
- Batista, E., Lopes, A. & Alves, A. (2021) What Do We Know about Botryosphaeriaceae? An Overview of a Worldwide Cured Dataset. *Forests* 12: 313. <https://doi.org/10.3390/f12030313>
- Batista, E., Lopes, A. & Alves, A. (2022) MDRBOT. Available from: [https://mdr-bot-cesam-ua.shinyapps.io/bot\\_database/](https://mdr-bot-cesam-ua.shinyapps.io/bot_database/) (March 29, 2023)

- Batista, E., Lopes, A., Miranda, P. & Alves, A. (2023) Can species distribution models be used for risk assessment analyses of fungal plant pathogens? A case study with three Botryosphaeriaceae species. *European Journal of Plant Pathology* 165: 41–56. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02587-7>
- Belair, M., Grau, A.L., Chong, J., Tian, X., Luo, J., Guan, X. & Pensec, F. (2022) Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses. *Pathogens* 11: 951. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080951>
- Belair, M., Pensec, F., Jany, J.-L., Floch, G.L. & Picot, A. (2023) Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding. *Plants* 12: 2383. <https://doi.org/10.3390/plants12122383>
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V. & Valier, A. (2002) Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. *Plant Disease* 86: 599–602. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.599>
- Bezerra, J.D.P., Crous, P.W., Aiello, D., Gullino, M.L., Polizzi, G. & Guarnaccia, V. (2021) Genetic Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Associated with Symptomatic Citrus Plants in Europe. *Plants* 10: 492. <https://doi.org/10.3390/plants10030492>
- Billones-Baaijens, R., Jaspers, M., Allard, A., Hong, Y., Ridgway, H. & Jones, E. (2015) Management of Botryosphaeriaceae species infection in grapevine propagation materials. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 355–367.
- Bressolier, A. (2021) Participez à l'enquête sur le dépérissement du noyer. *Médiafel par l'arboriculture fruitière et culture légumière*. Available from: <https://www.arboriculture-fruitiere.com/articles/technique-fruit/participez-lenquete-sur-le-deperissement-du-noyer> (August 1, 2023)
- Brown, A.H.D., Feldman, M.W. & Nevo, E. (1980) Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96: 523–536. <https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.523>
- Bruvo, R., Michiels, N.K., D'souza, T.G. & Schulenburg, H. (2004) A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* 13: 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>
- Chen, S.F., Morgan, D.P., Hasey, J.K., Anderson, K. & Michailides, T.J. (2014) Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant Disease* 98: 636–652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>
- Delbos, R., Kerlan, C., Dunez, J., Lansac, M., Dosba, F. & Germain, E. (1983) Virus infection of walnuts in France. *Acta Horticulturae* 130: 123–132. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1983.130.21>
- Díaz, G.A., Valdez, A., Halleen, F., Ferrada, E., Lolas, M. & Latorre, B.A. (2022) Characterization and Pathogenicity of *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, and *Neofusicoccum* Species Causing Botryosphaeria Canker and Dieback of Apple Trees in Central Chile. *Plant Disease* 106: 925–937. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1291-RE>
- Dissanayake, A. (2016) Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. *Mycosphere* 7: 1001–1073. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/13>
- Dray, S. & Dufour, A.-B. (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Dunn, A.M. & Hatcher, M.J. (2015) Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. *Trends in Parasitology* 31: 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.003>

- Dyakov, Yu.T. (2007) Chapter 0 - Overview on parasitism. In: Yu. T. Dyakov, V. G. Dzhavakhiya, & T. Korpela (eds.) *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Studies in Plant Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 3–17.
- European Environment Agency (2023) Global and European temperatures. Available from: <https://www.eea.europa.eu/ims/global-and-european-temperatures> (August 2, 2023)
- FAOSTAT (2021) Statistical database - World and France total production. Walnut with shell. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (February 1, 2023)
- Frankel, S.J., Conforti, C., Hillman, J., Ingolia, M., Shor, A., Benner, D., Alexander, J.M., Bernhardt, E. & Swiecki, T.J. (2020) *Phytophthora* Introductions in Restoration Areas: Responding to Protect California Native Flora from Human-Assisted Pathogen Spread. *Forests* 11: 1291. <https://doi.org/10.3390/f11121291>
- Giraud, M., Prunet, J.-P., Chevalier, A. & Ramain, S. (2007) La Bactériose du Noyer: Évolution des populations de *Xanthomonas* en verger. 38–42.
- Giraud, M. & Verhaeghe, A. (2015) *Fiche bio-agresseur: Anthracnose à Colletotrichum sp. en verger de noyers*. 2pp.
- Grünwald, N.J., Goodwin, S.B., Milgroom, M.G. & Fry, W.E. (2003) Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology* 93: 738–746. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.6.738>
- Gusella, G., Giambra, S., Conigliaro, G., Burrano, S. & Polizzi, G. (2021) Botryosphaeriaceae species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy. *Forest Pathology* 51. <https://doi.org/10.1111/efp.12661>
- Gusella, G., Lawrence, D.P., Aiello, D., Luo, Y., Polizzi, G. & Michailides, T.J. (2022) Etiology of Botryosphaeria Panicle and Shoot Blight of Pistachio (*Pistacia vera*) Caused by Botryosphaeriaceae in Italy. *Plant Disease* 106: 1192–1202. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1672-RE>
- Herman, I., Prunet, J.-P., Bergougnoux, Y., Jourdain, J.-M., Giraud, M., Baffet, M., Baudry, A., Courteix, M., Ginibre, T., Bourrières, D., Couzon, J.-P., Laval, J.-M., Joffre, M.-A. & Montamat-Dols, L. (1995) *Etude sur les dépérissements et la mortalité des noyers - Région Sud-Ouest*. Station expérimentale de Creysse, 1–80pp.
- Hernández-Rodríguez, L., Mondino-Hintz, P. & Alaniz-Ferro, S. (2022) Diversity of Botryosphaeriaceae species causing stem canker and fruit rot in olive trees in Uruguay. *Journal of Phytopathology* 170: 264–277. <https://doi.org/10.1111/jph.13078>
- Hoogenboom, J., van der Gaag, K.J., de Leeuw, R.H., Sijen, T., de Knijff, P. & Laros, J.F.J. (2017) FDSTools: A software package for analysis of massively parallel sequencing data with the ability to recognise and correct STR stutter and other PCR or sequencing noise. *Forensic Science International: Genetics* 27: 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.007>
- Huda-Shakirah, A.R., Mohamed Nor, N.M.I., Zakaria, L., Leong, Y.-H. & Mohd, M.H. (2022) *Lasioidiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports* 12: 8966. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Trouillas, F.P. & Michailides, T.J. (2010) A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia* 102: 1350–1368. <https://doi.org/10.3852/10-006>
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)

- Jombart, T. & Ahmed, I. (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27: 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Kamvar, Z.N., Brooks, J.C. & Grünwald, N.J. (2015) Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics* 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208>
- Laloum, Y., Verhaeghe, A., Moronvalle, A., Masson, C., Hebrard, M.-N., Picot, A., Pensec, F. & Belair, M. (2022) Projet CARIBOU : Élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer. *INFOS CTIFL* 386: 48–58.
- Laugénie, C. (1965) La culture du noyer en Périgord. *Revue géographique des Pyrénées et du Sud-Ouest. Sud-Ouest Européen* 36: 135–158. <https://doi.org/10.3406/rgpso.1965.4803>
- Lepais, O., Chancerel, E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., Dutech, C., Aissi, A., Bacles, C.F.E., Daverat, F., Launey, S. & Guichoux, E. (2020) Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8: e9085. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>
- Letonnellier, G. (1930) Les origines de la culture intensive du noyer dans le Bas-Grésivaudan. *Revue de Géographie Alpine* 18: 303–325. <https://doi.org/10.3406/rga.1930.4531>
- Lopes, A., Phillips, A.J.L. & Alves, A. (2017) Mating type genes in the genus *Neofusicoccum*: Mating strategies and usefulness in species delimitation. *Fungal Biology* 121: 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.011>
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B.I., Gámiz, A.M., Michailides, T.J., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2022) Effects of Cultivar Susceptibility, Branch Age, and Temperature on Infection by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Fungi on English Walnut (*Juglans regia*). *Plant Disease* 106: 2920–2926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2042-RE>
- López-Moral, A., Lovera, M., del Carmen Raya, M. del C., Cortés-Cosano, N., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2020) Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Species in Southern Spain. *Plant Disease* 104: 533–550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0545-RE>
- Ma, Z., Boehm, E.W.A., Luo, Y. & Michailides, T.J. (2001) Population Structure of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and Other Hosts in California. *Phytopathology* 91: 665–672. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.665>
- Ma, Z., Luo, Y. & Michailides, T.J. (2003) Spatiotemporal Changes in the Population Structure of *Botryosphaeria dothidea* from California Pistachio Orchards. *Phytopathology* 94: 326–332. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.4.326>
- Manawasinghe, I.S., Phillips, A.J.L., Hyde, K.D., Chethana, K.W.T., Zhang, W., Zhao, W.S., Yan, J.Y. & Li, X.H. (2016) Mycosphere Essays 14: Assessing the aggressiveness of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. *Mycosphere* 7: 883–892. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/7>
- Manawasinghe, I.S., Zhang, W., Li, X., Zhao, W., Chethana, K.W.T., Xu, J., Chen, Z., Dissanayaka, A.J., Mugnai, L., Úrbez-Torres, J.R., Savocchia, S., Hyde, K.D. & Yan, J. (2018) Novel microsatellite markers reveal multiple origins of *Botryosphaeria dothidea* causing the Chinese grapevine trunk disease. *Fungal Ecology* 33: 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.02.004>
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer*

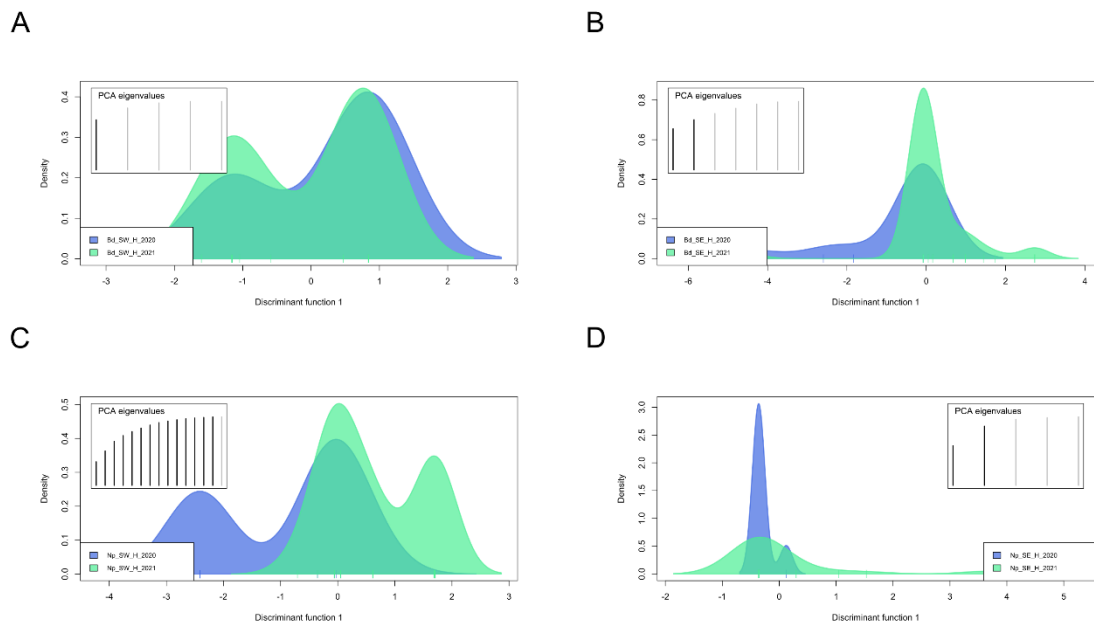
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J.H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Spatafora, J.W., Hesse, C.N., Robbertse, B. & Slippers, B. (2017) *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18: 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
- Martínez-García, P.J., Crepeau, M.W., Puiu, D., Gonzalez-Ibeas, D., Whalen, J., Stevens, K.A., Paul, R., Butterfield, T.S., Britton, M.T., Reagan, R.L., Chakraborty, S., Walawage, S.L., Vasquez-Gross, H.A., Cardeno, C., Famula, R.A., Pratt, K., Kuruganti, S., Aradhya, M.K., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., Salzberg, S.L., Wegrzyn, J.L., Langley, C.H. & Neale, D.B. (2016) The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. *The Plant Journal* 87: 507–532. <https://doi.org/10.1111/tpj.13207>
- McDonald, B.A. & Linde, C. (2002) Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McGranahan, G. & Leslie, C. (1991) Walnuts (*Juglans*). *Acta Horticulturae* 290: 907–974. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.20>
- McGranahan, G. & Leslie, C. (2012) Walnut. *Fruit Breeding*. Handbook of Plant Breeding. Springer, Boston, MA, pp. 827–846.
- Megléc, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R. & Martin, J.-F. (2014) QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular Ecology Resources* 14: 1302–1313. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12271>
- Mehl, J.W.M., Slippers, B., Roux, J. & Wingfield, M.J. (2017) Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host. *Fungal Biology* 121: 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.015>
- Michailides, T.J., Chen, S., Morgan, D., Felts, D., Nouri, M.T., Puckett, R., Luna, M., Hasey, J., Anderson, K., Coates, W., Fichtner, E., Buchner, R. & Bentley, W. (2013) *Managing Botryosphaeria/Phomopsis cankers and anthracnose blight of walnut in California*. California Walnut Board, Folsom, CA., 325–346pp.
- Michailides, T.J., Morgan, D.P., Felts, D.G., Luo, Y., Puckett, R., Hasey, J., Lampinen, B., Symmes, E., Coates, W., Buchner, R., Lightle, D., Fichtner, E., Rodriguez, D. & Cunningham, C. (2016) *Epidemiology and management of Botryosphaeria/Phomopsis canker and blight and anthracnose blight of walnut in California*. California Walnut Board, Folsom, CA., 349–376pp.
- Moral, J., Morgan, D. & Michailides, T.J. (2019a) Management of Botryosphaeria canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection* 126: 104927. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104927>
- Moral, J., Morgan, D., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2019b) Ecology and Epidemiology of Diseases of Nut Crops and Olives Caused by Botryosphaeriaceae Fungi in California and Spain. *Plant Disease* 103: 1809–1827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>
- Na, D.-H., Lee, J.S., Shin, H.-D., Ono, Y. & Choi, Y.-J. (2022) Emergence of a New Rust Disease of Virginia Creeper (*Parthenocissus quinquefolia*) through a Host Range Expansion of *Neophysopella vitis*. *Mycobiology* 50: 166–171. <https://doi.org/10.1080/12298093.2022.2076366>
- Nagel, J.H., Cruywagen, E.M., Machua, J., Wingfield, M.J. & Slippers, B. (2020) Highly transferable microsatellite markers for the genera *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum*. *Fungal Ecology* 44:

100903. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100903>
- Nagel, J.H., Wingfield, M.J. & Slippers, B. (2018) Evolution of the mating types and mating strategies in prominent genera in the Botryosphaeriaceae. *Fungal Genetics and Biology* 114: 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.003>
- Nei, M. (1972) Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* 106: 283–292. <https://doi.org/10.1086/282771>
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Novak, A., Ivić, D., Sever, Z., Fazinić, T. & Šimunac, K. (2018) Botryosphaeria canker of walnut in Croatia. *Glasiło biljne zaštite* 18: 316–321. <https://hrcak.srce.hr/236900>
- Pavlic-Zupanc, D., Wingfield, M.J., Boissin, E. & Slippers, B. (2015) The distribution of genetic diversity in the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex suggests structure correlated with level of disturbance. *Fungal Ecology* 13: 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.002>
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pielou, E.C. (1975) *Ecological Diversity*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. 165 pp.
- Preece, J.E. & McGranahan, G. (2015) Luther Burbank’s Contributions to Walnuts. *HortScience* 50: 201–204. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.2.201>
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing.
- Rai, M. & Agarkar, G. (2016) Plant-fungal interactions: What triggers the fungi to switch among lifestyles? *Critical Reviews in Microbiology* 42: 428–438. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958052>
- Ramos, D. & Doyle, J. (1984) *Walnut research and industry survey - France, 1984*. Walnut Research Reports, University of California, Davis, 49–55pp.
- Robert, S., Ravigne, V., Zapater, M.-F., Abadie, C. & Carlier, J. (2012) Contrasting introduction scenarios among continents in the worldwide invasion of the banana fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 21: 1098–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05432.x>
- Rosace, M.C., Legler, S.E., Salotti, I. & Rossi, V. (2023) Susceptibility of pruning wounds to grapevine trunk diseases: A quantitative analysis of literature data. *Frontiers in Plant Science* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1063932>
- Sakalidis, M.L., Slippers, B., Wingfield, B.D., Hardy, G.E.St.J. & Burgess, T.I. (2013) The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*–*N. ribis* species complex. *Diversity and Distributions* 19: 873–883. <https://doi.org/10.1111/ddi.12030>
- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, B.K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J.E., Liu, H. & Trivedi, P. (2023) Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*: 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>

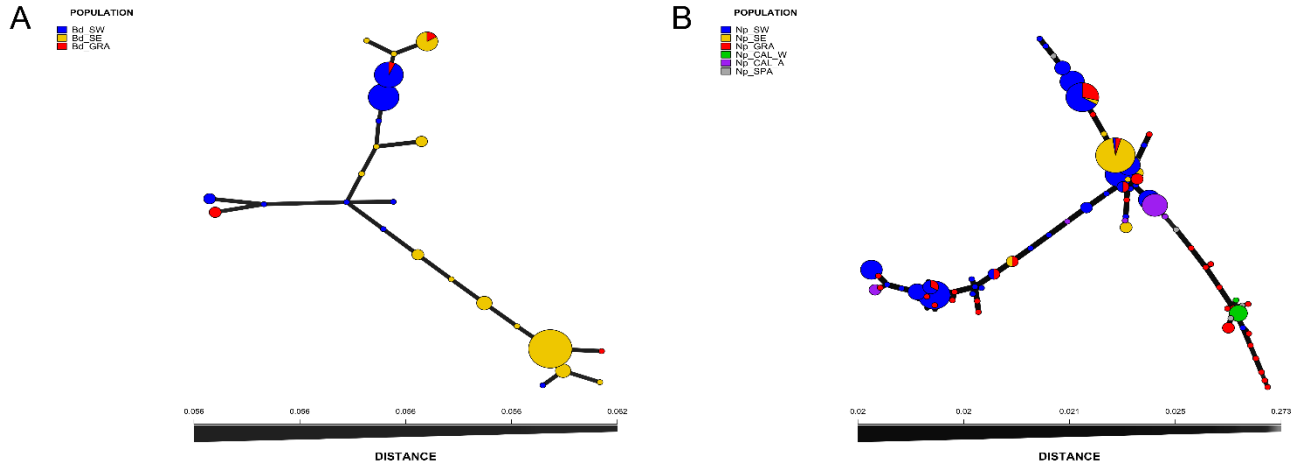


- Slippers, B., Burgess, T., Wingfield, B.D., Crous, P.W., Coutinho, T.A. & Wingfield, M.J. (2004) Development of simple sequence repeat markers for *Botryosphaeria* spp. with *Fusicoccum* anamorphs. *Molecular Ecology Notes* 4: 675–677. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00780.x>
- Slippers, B., Crous, P.W., Jami, F., Groenewald, J.Z. & Wingfield, M.J. (2017) Diversity in the Botryosphaerales: Looking back, looking forward. *Fungal Biology* 121: 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>
- Slippers, B. & Wingfield, M.J. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Sohrabi, M., Mohammadi, H., León, M., Armengol, J. & Banihashemi, Z. (2020) Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 157: 327–351. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01996-w>
- Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01825-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01825-5)
- Tautz, D. & Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127–4138. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>
- Thines, M. (2019) An evolutionary framework for host shifts – jumping ships for survival. *New Phytologist* 224: 605–617. <https://doi.org/10.1111/nph.16092>
- Úrbez-Torres, J.R. (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S5–S45. <https://doi.org/jstor.org/stable/26458709>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and amplifications*. Academic Press, Cambridge, MA, USA, pp. 315–322.
- World Meteorological Organization (2022) Temperatures in Europe increase more than twice global average. Available from: <https://public.wmo.int/en/media/press-release/temperatures-europe-increase-more-twice-global-average> (August 2, 2023)
- Xu, J. (2006) Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analyses. *Current Issues in Molecular Biology* 8: 75–90. <https://doi.org/10.21775/cimb.008.075>
- Yildiz, A., Benlioglu, S., Benlioglu, K. & Korkom, Y. (2022) Occurrence of twig blight and branch dieback of walnut caused by Botryosphaeriaceae species in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129: 687–693. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00591-x>
- Zhou, S., Smith, D.R. & Stanosz, G.R. (2001) Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. 105: 919–926. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61947-4)
- Zlatković, M., Wingfield, M.J., Jami, F. & Slippers, B. (2018) Host specificity of co-infecting Botryosphaeriaceae on ornamental and forest trees in the Western Balkans. *Forest Pathology* 48: e12410. <https://doi.org/10.1111/efp.12410>
- Zlatković, M., Wingfield, M.J., Jami, F. & Slippers, B. (2019) Genetic uniformity characterizes the invasive spread of *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia sapinea* in the Western Balkans. *Forest Pathology* 49: e12491. <https://doi.org/10.1111/efp.12491>

## Figures supplémentaires



**Figure S1.** Discriminant Analysis of Principal Components of *B. dothidea* (A and B) and *N. parvum* (C and D) populations based on geographical origin (South-West -SW and South-East -SE) and the year of sampling (2020 and 2021) of walnut husks (H).



**Figure S2.** Minimum spanning networks based on Bruvo's distance of MLGs of *B. dothidea* (Bd) and *N. parvum* (Np) individuals based on the southwestern (SW) and southeastern (SE) French walnut-producing areas, the French vineyard population (GRA), the Californian walnut (CAL\_W) and almond (CAL\_A) trees and the Spanish walnut trees (SPA) populations.

**Table S1.** Analysis of molecular variance (AMOVA) for *B. dothidea* and *N. parvum* isolates among and within regions.

Species	Source of variation	Uncorrected dataset				Clone-corrected dataset			
		Df	Sum of squares	Variance components	% of variation	Df	Sum of squares	Variance components	% of variation
<i>B. dothidea</i>	Between regions	1	107.81	1.93	64.66	1	8.58	0.58	20.74
	Between individuals within orchards	131	138.63	1.06	35.34	20	44.51	2.23	79.26
	Total	132	246.44	2.99	100	21	53.09	2.81	100
<i>N. parvum</i>	Between regions	1	62.82	0.89	22.31	1	7.94	0.31	6.61
	Between individuals within orchards	154	476.42	3.09	77.69	38	165.97	4.37	93.39
	Total	155	539.24	3.98	100	39	173.91	4.68	100

**Table S2.** Descriptive statistics and indices of genetic diversity of *B. dothidea* and *N. parvum* populations based on organ type (Husk -H and twig -T) in the two French production areas.

Species	Population	Nb of individuals	AR	uh (s.d.)	%P	MLG	eMLG
<i>B. dothidea</i>	Bd_SW_H	22	2.1	0.102 (0.043)	54.55	7	6.05
	Bd_SW_T	17	2.0	0.083 (0.031)	45.45	5	5
	Bd_SE_H	76	1.7	0.087 (0.032)	72.73	12	4.55
	Bd_SE_T	18	1.5	0.030 (0.016)	27.27	4	3.83
<i>N. parvum</i>	Np_SW_H	46	2.3	0.179 (0.037)	85.19	17	7.44
	Np_SW_T	61	3.2	0.124 (0.033)	51.85	24	9.15
	Np_SE_H	37	1.6	0.041 (0.014)	37.04	7	3.17
	Np_SE_T	12	1.4	0.037 (0.014)	22.22	2	2.00

s.d.: standard deviation; AR: allelic richness; uh: unbiased haploid genetic diversity; %P: % of polymorphic loci; MLG: number of observed multilocus genotypes; eMLG: number of multilocus genotypes expected at the smallest sample size.

**Table S3.** Analysis of molecular variance (AMOVA) for *B. dothidea* and *N. parvum* isolates among and within organs.

Species	Source of variation	Uncorrected dataset				Clone-corrected dataset			
		Df	Sum of squares	Variance components	% of variation	Df	Sum of squares	Variance components	% of variation
<i>B. dothidea</i>	Between organs	1	4.55	0.05	2.76	1	1.03	-0.11	-4.81
	Between individuals within organs	131	241.89	1.85	97.24	26	61.00	2.35	104.81
	Total	132	246.44	1.90	100	27	62.03	2.24	100

**Table S3.** Continued.

Species	Source of variation	Uncorrected dataset				Clone-corrected dataset			
		Df	Sum of squares	Variance components	% of variation	Df	Sum of squares	Variance components	% of variation
<i>N. parvum</i>	Between organs	1	8.30	0.06	1.78	1	2.27	-0.10	-2.21
	Between individuals within organs	154	530.95	3.45	98.22	46	215.96	4.70	102.21
	Total	155	539.25	3.51	100	47	218.23	4.60	100

**Table S4.** Geographical origin of isolates collected from French vineyards according to region.

French region	Nb of isolates	
	<i>B. dothidea</i>	<i>N. parvum</i>
Grand Est	1	10
Nouvelle-Aquitaine	3	26
Occitanie	1	7
Total	5	43

**Table S5.** Geographical and plant origin of isolates of *N. parvum* collected from Californian almond and walnut trees and Spanish walnut trees.

Country	Nb of <i>N. parvum</i> isolates	
	Walnut trees	Almond trees
USA (California)	5	14
Spain	5	-
Total	10	14



## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES





Les symptômes de dépérissement du noyer, caractérisés principalement par des nécroses et chancre au niveau des branches, des décolorations internes du bois, une défoliation et la mort des bourgeons sur les jeunes pousses, ainsi que des nécroses et brûlures au niveau des fruits n'ont été que récemment observés et étudiés en Europe. L'Espagne a ainsi été le premier pays européen faisant l'objet d'une étude après l'observation de ces symptômes de dépérissement en 2017 au sein de ses noyeraies (López-Moral *et al.* 2020b). Par la suite, de nombreuses études de ces symptômes dans d'autres pays européens ont vu le jour, toutes faisant état d'une maladie émergente liée à des symptômes nouvellement décrits. Les dommages importants provoqués par ces symptômes et les fortes pertes qui peuvent en découler, comme en témoignent des études menées en Californie où ces symptômes sont largement répandus depuis le début des années 2000 (Michailides *et al.* 2012; Michailides & Hasey 2010), illustrent la menace qui pèse sur les noyeraies. L'observation de ces symptômes en France dès 2015, et l'augmentation de leur occurrence constatée en 2018 ont conduit à la réalisation de ce travail.

Dans ce contexte, cette thèse a porté sur l'étude étiologique et épidémiologique du dépérissement du noyer dans les principales zones de production de noix françaises. La stratégie de recherche a consisté à étudier la diversité fongique associée aux organes (noix et rameaux) présentant des symptômes de dépérissement, et à étudier les facteurs, en lien avec les pratiques culturales et les conditions météorologiques, pouvant impacter cette diversité. Dans un second temps, ce travail s'est aussi intéressé à la diversité génétique des espèces de Botryosphaeriaceae majoritaires associées à ces symptômes afin d'évaluer leur distribution sur le territoire français et les facteurs pouvant être associés à leur introduction et dissémination au sein des noyeraies françaises.

L'ensemble des analyses réalisées durant la thèse a permis de dégager 6 résultats-clés discutés ci-après :

- **Séquençage métabarcoding : l'utilisation d'échantillons contrôles s'avère indispensable**

Le séquençage métabarcoding est une technique de séquençage massif à grande échelle appartenant aux techniques dites de nouvelle génération (NGS, Next-Generation Sequencing). Elle est actuellement fréquemment utilisée pour l'analyse d'échantillons de types environnementaux et pour étudier les communautés microbiennes associées, aussi bien bactériennes et virales que fongiques (Ruppert *et al.* 2019). Les nombreux biais pouvant survenir durant la réalisation de cette approche impliquent une méthodologie précise et la

nécessité de contrôles afin d'évaluer le plus précisément possible les erreurs et biais introduits durant l'amplification de l'ADN, le séquençage des amplicons, mais aussi durant l'analyse bioinformatique des séquences. L'analyse d'échantillons contrôles fait partie des contrôles préconisés. Ces contrôles peuvent être aussi bien externes qu'internes, et avoir un caractère positif, négatif, voire même étranger (contrôles "alien").

L'utilisation de communautés synthétiques de composition et de concentration connues, autrement appelées mock, a permis durant ces travaux d'évaluer l'efficacité (la spécificité et la sensibilité) de différentes paires d'amorces et de plusieurs paramètres d'outils bioinformatiques dans l'analyse des séquences et l'identification des principales espèces ciblées. Ce contrôle positif, bien que de plus en plus recommandé (Lebas & Massart 2020; Tedersoo *et al.* 2022), n'est encore actuellement que peu utilisé. Le recours aux mocks a permis de comparer différentes paires d'amorces, et outils bioinformatiques afin de choisir par la suite les amorces et le pipeline à appliquer pour le séquençage métabarcoding des échantillons environnementaux et l'analyse des communautés fongiques associées. Un second objectif était d'évaluer la résolution taxonomique des amorces afin d'éviter une surinterprétation des résultats. En effet, comme pour l'analyse d'échantillons d'ADN purs, l'amplification et le séquençage d'un seul barcode s'avère souvent insuffisant pour identifier précisément l'isolat à l'échelle de l'espèce, voire parfois du genre.

Cinq paires d'amorces ciblant les régions ITS (amorces ITS), ITS1 (amorces ITS1) et ITS2 (amorces GTAA, GTAAM et KYO) ont été comparées vis-à-vis de leur capacité à amplifier les espèces introduites dans les mocks, l'abondance relative obtenue par rapport à celle attendue, et leur résolution taxonomique. Les régions ITS et ITS1 se sont avérées être les moins adéquates quant à l'amplification des espèces d'intérêt introduites dans les mocks, les abondances relatives obtenues n'étant pas significativement corrélées à celles attendues. Précisément, les genres *Fusarium*, *Epicoccum* et *Gibellulopsis* étaient fortement sur-estimés, tandis que les espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* étaient fortement sous-estimées. De plus, l'amplification par les amorces ITS1 était fortement hétérogène entre les réplicats des mocks contenant le plus d'espèces, certains genres (*Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, et *Diaporthe*) n'étant pas toujours détectés par les amorces au sein des trois réplicats. Nous avons ensuite déterminé que les amorces KYO et GTAAM ciblant la région ITS2 étaient les deux paires les plus performantes, les amorces GTAA ne permettant pas l'amplification des séquences de *C. godetiae*.

Concernant le pipeline d'analyse, l'intérêt d'une étape d'extraction de séquence via l'outil ITSx a été évalué sur les jeux de données amplifiés à l'aide des amorces GTAAM et KYO. Enfin, en testant des combinaisons d'amorces/pipeline d'analyse, nous avons mis en évidence que pour notre pathosystème, l'utilisation de la paire d'amorces KYO sans l'application de l'outil ITSx a permis d'obtenir une meilleure résolution taxonomique des espèces d'intérêt.

Ainsi, les résultats obtenus durant ces travaux ont mis en avant l'importance de l'analyse de communautés synthétiques afin de s'assurer de la bonne amplification des espèces d'intérêt par les amorces envisagées, ainsi que pour évaluer les potentielles sur-estimations (notamment des espèces du genre *Fusarium*) ou sous-estimations (notamment des espèces de *Botryosphaeria*, *Diaporthe* et *Lasiodiplodia*) des abondances relatives. De plus, l'évaluation de la résolution taxonomique s'est avérée indispensable, permettant ainsi de s'assurer du niveau d'identification possible par les amorces, et ainsi de ne pas se fier exclusivement aux identifications obtenues lors de l'étape d'assignation taxonomique. Durant ces travaux, de nombreuses espèces introduites dans les communautés synthétiques ne pouvaient ainsi pas être identifiées à l'échelle de l'espèce par les amorces KYO sélectionnées mais essentiellement à l'échelle du genre. C'est le cas pour *D. eres* et *F. juglandicola*, identifiées à l'échelle du genre, ainsi que pour *B. dothidea*, identifiée à l'échelle du genre et non différenciable de *Neoscytalidium* (*Botryosphaeria/Neoscytalidium*). *Colletotrichum godetiae*, *C. fioriniae* et *N. parvum* étaient quant à elles identifiées à l'échelle de l'espèce.

- **Le dépérissement à Botryosphaeriaceae et *Diaporthe* du noyer est une maladie complexe et fréquemment retrouvée en co-occurrence avec d'autres maladies dont les symptômes sont similaires**

L'étude des communauté fongiques associées aux symptômes de dépérissement à Botryosphaeriaceae et *Diaporthe* du noyer à l'aide des approches culture-dépendante et culture-indépendante a mis en avant la présence d'un complexe d'espèces phytopathogènes, dont certaines responsables d'autres maladies. Les principaux acteurs du dépérissement du noyer ont été identifiés à l'aide des deux approches à la fois dans les brous et dans les rameaux. Ainsi, *B. dothidea*, *N. parvum*, appartenant toutes deux à la famille des Botryosphaeriaceae, et *D. eres* sont les trois espèces majoritaires associées à ces symptômes en France. D'autres espèces phytopathogènes, telles que *C. fioriniae* et *C. godetiae*, espèces responsables de l'antracnose sur fruits du noyer, et *F. juglandicola* ont elles aussi été fréquemment isolées. L'identification

commune des principaux genres pathogènes du noyer par les deux types d'approches, ainsi que la mise en évidence de la présence d'autres genres du pathobiome peu voire pas isolés lors de l'analyse culturale, tels que *Cladosporium*, *Juglanconis*, *Ophiognomonina* et *Plectosphaerella*, met bien ici en avant la complémentarité de ces deux méthodes et l'apport de l'une par rapport à l'autre dans l'analyse globale des communautés fongiques.

Peu d'études font état de l'identification conjointe d'espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* avec d'autres espèces phytopathogènes à partir d'organes présentant des symptômes de dépérissement. Ainsi, les études menées en Australie, Californie, Chine, Hongrie, Italie et au Chili ne rapportent que la présence de ces deux groupes fongiques (essentiellement des genres *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* et *Neoscytalidium* parmi la famille des Botryosphaeriaceae et des espèces *D. amygdali*, *D. australafricana*, *D. cynaroidis*, *D. eres*, *D. foeniculina*, *D. juglandina* et *D. cynaroidis* appartenant au genre *Diaporthe* ; Antony *et al.* 2023; Chen *et al.* 2014a; Gusella *et al.* 2021; Jiménez Luna *et al.* 2022a; Li *et al.* 2016; Zabiák *et al.* 2023), tandis que l'étude menée en Espagne rapporte aussi la présence d'espèces du genre phytopathogène *Cytospora* (López-Moral *et al.* 2020b), et une étude préliminaire menée en Californie rapporte l'identification d'espèces des genres *Alternaria*, *Colletotrichum* et *Fusarium* (Michailides *et al.* 2013). Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, les symptômes sur fruits de l'antracnose provoquée par *Colletotrichum* présentent des similarités avec les nécroses et brûlures associées au dépérissement du noyer. Ces espèces additionnelles, pourtant peu agressives sur rameaux, pourraient donc aussi être des actrices de l'état de dépérissement des noyers en créant des voies d'entrée pour d'autres agents pathogènes ou en affaiblissant l'arbre.

Les espèces *B. dothidea* et *N. parvum* ont été les seules deux espèces de la famille des Botryosphaeriaceae collectées et identifiées aussi bien à l'aide de l'approche culturale que du séquençage métabarcoding. Du fait de la diversité des espèces de Botryosphaeriaceae mise en avant dans d'autres études menées sur le noyer (10 espèces en Californie; Chen *et al.* 2014a) et 6 espèces en Espagne; López-Moral *et al.* 2020b), mais aussi sur d'autres hôtes tels que la vigne (plus de 25 espèces; Larignon 2016), ces résultats sont apparus comme étonnants. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la diversité des espèces de Botryosphaeriaceae associées au noyer en France pourrait augmenter au fur et à mesure du développement et de l'installation de la maladie dans les vergers. De même, l'espèce de *Diaporthe* majoritairement collectées au cours de ces travaux s'avère être *D. eres*, suivie par *D. foeniculina* mais collectée dans une bien moindre mesure (61 % et 22 % des isolats appartenant au genre *Diaporthe*, respectivement).

Ces deux espèces semblent, en fonction du pays, et donc potentiellement aussi en fonction des variétés majoritairement cultivées dans un pays donné, se partager la place d'espèce majoritaire sur noyers présentant des symptômes de dépérissement. Alors que *D. eres* est l'espèce de *Diaporthe* majoritairement collectée lors d'études menées en Hongrie (Zabiák *et al.* 2023) et en République Tchèque (Eichmeier *et al.* 2020), à partir de cultivar/variété non renseignés, *D. foeniculina* est l'espèce majoritairement collectée en Espagne à partir des cultivars Chandler, Hartley, Serr, Tulare et Vina (López-Moral *et al.* 2020b), et en Californie à partir de cultivars non renseignés (Chen *et al.* 2014a).

La présence de chacune de ces espèces dans des échantillons asymptomatiques a aussi été mise en avant par le biais de l'analyse culture-dépendante, suggérant de potentielles infections latentes. L'analyse des échantillons asymptomatiques grâce au séquençage métabarcoding n'a pas été concluante, du fait d'une profondeur de séquençage trop faible, entraînant principalement l'amplification de l'ADN de la plante plutôt que de l'ADN fongique. Ceci indique principalement une très faible abondance d'ADN fongique dans ces échantillons par rapport aux échantillons symptomatiques. L'objectif de cette analyse était d'apporter des informations supplémentaires concernant la composition du phytomicrobiome d'échantillons d'apparence saine. La quantification relative des principales espèces du pathobiome aurait permis d'apprécier leur dominance dans ces échantillons. Aussi, cela aurait pu permettre d'évaluer la diversité des espèces fongiques autres que celles correspondant aux agents pathogènes d'intérêt et les différences de composition des communautés fongiques entre des échantillons asymptomatiques et symptomatiques, comme cela a été réalisé dans l'étude de Wang *et al.* (2022). L'analyse comparative d'échantillons de feuilles de noyers asymptomatiques et de feuilles présentant des symptômes d'anthracnose a permis de mettre en avant la présence des genres pathogènes *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe* et *Fusarium* dans les deux types d'échantillons. De plus, les espèces du genre *Vishniacozyma* étaient plus abondamment présentes dans les échantillons asymptomatiques que symptomatiques. Cette étude a aussi permis de mettre en avant une plus grande richesse et diversité dans les échantillons symptomatiques que dans les échantillons asymptomatiques, et ce quelles que soient les dates de prélèvement. Les échantillons associés à la richesse et la diversité les plus élevées étaient les échantillons symptomatiques prélevés le plus tardivement, présentant donc un stade d'avancement de la maladie plus important. Ce phénomène déjà démontré auparavant est une caractéristique du pathobiome d'échantillons présentant un stade avancé de maladie.

- **Des espèces fongiques majoritaires à pathogénicité variable**

Les analyses menées au cours de ces travaux ont permis de mettre en avant des degrés d'agressivité différents, aussi bien inter- qu'intra-spécifiques. Premièrement, les espèces *B. dothidea* et *N. parvum* de la famille des Botryosphaeriaceae ont été identifiées comme les espèces les plus agressives sur rameaux détachés en conditions contrôlées. Les espèces *C. fioriniae* et *F. juglandicola* ne se sont révélées pathogènes que pour un nombre réduit d'isolats, caractérisés comme très faiblement agressifs, tandis que *C. godetiae* n'apparaissait pas comme un agent pathogène dans les rameaux, les nécroses provoquées n'étant pas significativement différentes de celles mesurées sur les témoins. Enfin, *D. eres* présentait une agressivité inférieure à celle des espèces de Botryosphaeriaceae, mais supérieure à celles des 3 espèces les moins agressives. La diversité de l'agressivité a aussi été constatée à l'échelle intraspécifique, associée parfois à d'importants écarts. C'était notamment le cas pour *F. juglandicola*, dont le taux moyen d'évolution de la nécrose variait entre 0,2 mm et 1,3 mm par jour en fonction des isolats. *Diaporthe eres*, *N. parvum* et *B. dothidea* présentaient des différences entre isolats entre 1,5 et plus de 2 fois supérieures, tandis que les espèces de *Colletotrichum* étaient les plus homogènes. Ces différenciations de la pathogénicité des isolats se sont aussi reflétées par le biais des taux de réisolement des espèces inoculées à partir des nécroses provoquées. Les espèces les plus pathogènes étaient associées à un taux de réisolement de 100 % pour chacun des isolats testés (soit *B. dothidea* et *N. parvum*), tandis que les taux diminuaient globalement à mesure que l'espèce était moins pathogène, mettant en doute le caractère réellement pathogène de ces espèces sur ce modèle. Sur cette base, un isolat de *F. juglandicola* et deux de *C. godetiae*, réisolés à partir de seulement 10% des rameaux inoculés, n'ont donc pas été inclus dans l'analyse finale.

De nombreuses études visent à caractériser la pathogénicité des espèces de Botryosphaeriaceae (notamment des genres *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* et *Neoscytalidium*) et de *Diaporthe*, et font l'état d'une agressivité plus marquée de la part de ces premières sur noyers, notamment de *Lasiodiplodia citricola*, *Neofusicoccum parvum*, *N. mediterraneum* et *Neoscytalidium dimidiatum* (Eichmeier *et al.* 2020; Jiménez Luna *et al.* 2022a; López-Moral *et al.* 2020b). Le pouvoir pathogène plus important de la famille des Botryosphaeriaceae a aussi été démontré à partir de l'analyse d'isolats provenant d'autres hôtes, tels que le pistachier (López-Moral *et al.* 2020a; Nouri *et al.* 2019), l'amandier (Holland *et al.* 2021b), le pommier (Martino *et al.* 2023) ou encore la myrtille (Guarnaccia *et al.* 2020). Les espèces de *Colletotrichum* étant les principaux agents pathogènes responsables de l'antracnose

du noyer sur fruits et sur feuilles, leur pathogénicité a principalement été évaluée sur ces modèles (Da Lio *et al.* 2018; Varjas *et al.* 2019; Yang *et al.* 2021; Zhu *et al.* 2015), et très peu d'études ont permis de caractériser leur pathogénicité sur rameaux. Sur fruits et sur feuilles, les espèces *C. fioriniae* et *C. godetiae* se sont révélées être pathogènes, provoquant des nécroses jusqu'à plus de 3 cm de diamètre sur fruits en conditions contrôlées après 19 jours d'expérimentation (Da Lio *et al.* 2018), et recréant sur feuilles détachées en conditions contrôlées les symptômes observés en vergers (Yang *et al.* 2021; Zhu *et al.* 2015). Sur rameaux, seuls Varjas *et al.* (2020) ont évalué la pathogénicité de *C. godetiae*. Après 14 jours d'expérimentation sur rameaux âgés de deux ans en vergers, des nécroses entre 12 et 17 mm de longueur ont été relevées (taux moyen de développement de nécrose d'environ 1 mm par jour), soit des résultats globalement similaires à ceux obtenus durant ces travaux. Comme expliqué dans la partie suivante, la variété Franquette semble peu sensible aux infections provoquées par les espèces de *Colletotrichum* et de *F. juglandicola* sur rameaux. Bien qu'aucune information ne soit à ce jour disponible concernant le cultivar Milotai 10 utilisé dans l'étude de Varjas *et al.* (2020), celui-ci semble présenter une sensibilité similaire à celle de la variété Franquette à l'infection de *C. godetiae*. Enfin, aucune étude n'a à ce jour permis d'évaluer la pathogénicité de *C. fioriniae* et *F. juglandicola* sur rameaux de noyers, cette dernière étant une espèce nouvellement décrite en 2021 (Crous *et al.* 2021).

- **La sensibilité variétale, les pratiques culturales et les conditions météorologiques contribuent à façonner le phytomicrobiome et le pathobiome**

L'analyse de l'impact de ces différents facteurs sur la composition du phytomicrobiome et du pathobiome a reposé sur les résultats obtenus par les deux approches culturale et culture-indépendante.

La variété Franquette et le cultivar Serr sont les deux types de noyers à avoir été échantillonnés durant ces travaux. De plus, une partie des parcelles était irriguées, certaines étaient traitées chimiquement tandis que d'autres étaient traitées à l'aide de produits utilisables en agriculture biologique. Nous avons démontré que ces trois facteurs ont une contribution à hauteur de moins de 15 % sur la composition et l'abondance des différentes espèces composant les communautés fongiques associées aux organes symptomatiques. L'étude menée par López-Moral *et al.* (2022) a démontré que le cultivar Serr était particulièrement sensible aux symptômes provoqués par certaines espèces de Botryosphaeriaceae (*B. dothidea*, *N. mediterraneum* et *N. parvum*) lors d'inoculations artificielles à partir de plug mycéliens sur

branches détachées en conditions contrôlées ainsi qu'en vergers. Cette sensibilité importante du cultivar peut donc partiellement expliquer la prévalence importante de *N. parvum* (62.8% des échantillons de cultivar Serr) sur les parcelles concernées par rapport aux parcelles cultivées avec la variété Franquette (23.4% des échantillons de variétés Franquette), bien qu'aucune donnée ne soit actuellement disponible concernant la sensibilité de cette variété. De plus, les genres *Botryosphaeria* et *Colletotrichum* étaient associés à une prévalence significativement supérieure dans les échantillons de variété Franquette (33,0% versus 5,7%, et 45,2% versus 21,4%, respectivement). Toutefois, le plan d'échantillonnage basé sur 10 parcelles cultivées en Franquette contre 2 en Serr ne permet pas de tirer des conclusions solides sur la plus grande sensibilité de Serr.

La contribution de l'irrigation sur la structure des communautés fongiques à hauteur de maximum 10 % peut s'expliquer par le fait que l'eau, sous forme de gouttes provenant de la pluie ou de l'irrigation par aspersion, est une voie importante de transmission des spores des espèces de Botryosphaeriaceae, *Diaporthe*, *Colletotrichum* et *Fusarium* à travers la canopée (Moral *et al.* 2019b; Palmero *et al.* 2011; Penet *et al.* 2014). Par exemple, pour contrôler cette dispersion, la réduction de l'angle d'aspersion des asperseurs dans les vergers de pistachiers a permis de réduire de plus de 70 % les clusters infectieux en Californie (Michailides *et al.* 2017). Dans notre étude, de façon surprenante, seule la prévalence du genre *Diaporthe* était significativement supérieure dans les parcelles irriguées.

Le système de culture des parcelles étudiées (de type conventionnel ou biologique) semble impacter à hauteur de maximum 6,5 % la structuration des communautés fongiques dans les brous et rameaux des parcelles concernées. La principale différence de traitement entre ces parcelles était l'application de fongicides synthétiques lors d'une conduite conventionnelle, tandis que des traitements au cuivre sont appliqués quel que soit le type de conduite. Les parcelles traitées uniquement à l'aide de produits utilisables en agriculture biologique, soit principalement à l'aide de produits à base de cuivre, étaient donc moins traitées que les parcelles en conduite conventionnelle. Ces différentes conduites peuvent expliquer une différence dans la composition du phytomicrobiome et du pathobiome de par la régularité et l'efficacité des traitements bien que l'effet reste mineur. Il a en effet été démontré que l'application de produits à base de cuivre, notamment l'oxychlorure de cuivre, permettait de ralentir l'apparition et le développement des symptômes d'antracnose causés par *C. godetiae* sur oliviers de 3 ans en serre, de 14 jours pour les fruits et de 3 semaines pour le dépérissement des branches, avec un indice de sévérité de la maladie sur plants traités à l'oxychlorure de cuivre significativement



inférieurs à celui des plants non traités (63,2 % et 93,6 % respectivement) (Moral *et al.* 2018). De plus, les différents produits à base de cuivre testés présentaient une efficacité mitigée dans l'inhibition de la croissance de cette même espèce *in vitro*. Ces traitements entraînaient en général une moindre inhibition de la germination des spores en comparaison avec les références chimiques, et l'effet était dépendant des isolats testés, indiquant de plus une résistance au traitement isolat-dépendante (Moral *et al.* 2018). En outre, il a été démontré par séquençage métabarcoding que l'application de produits fongicides dits de synthèse ou de produits utilisables en agriculture biologique avaient un effet significativement différent sur la richesse et la diversité des communautés fongiques associées aux pommes (Abdelfattah *et al.* 2016). Dans cette étude, plusieurs taxons fongiques de faible abondance relative (entre 1 % et 6,3 %) ont été exclusivement identifiés dans les échantillons de fruits traités à l'aide de produits organiques. Les taxons les plus abondants ne présentaient quant à eux pas de différence significative en termes d'abondance relative. Les traitements fongicides de synthèse semblent ainsi avoir un impact modéré sur la composition du phytomicrobiome (Abdelfattah *et al.* 2016). Parmi les espèces pathogènes d'intérêt, seules celles du genre *Colletotrichum* ont été détectées comme significativement plus abondantes dans les parcelles associées à un traitement conventionnel que dans celles traitées essentiellement au cuivre. Cependant, l'expérimentation n'étant initialement pas conçue dans l'objectif de comparer ces effets, il s'avère que la quasi-totalité des parcelles de variétés Franquette sont traitées en suivant l'itinéraire technique conventionnel, pouvant ainsi biaiser les résultats.

Les conditions météorologiques, telles que la température et les précipitations, sont aussi des facteurs influençant la composition du phytomicrobiome. Ces travaux ont particulièrement mis en évidence une différence significative dans la composition du pathobiome en fonction des températures et des précipitations moyennes. Globalement, il est ressorti de cette étude que les genres *Botryosphaeria* et *Diaporthe* étaient significativement plus abondants dans les échantillons associés à des températures plus élevées et des précipitations plus faibles, contrairement à *Colletotrichum*. Les infections provoquées par les espèces de Botryosphaeriaceae, *Colletotrichum* et *Diaporthe* ont souvent lieu lors de périodes pluvieuses, humides et chaudes (Moral *et al.* 2019b; Salotti *et al.* 2023), cependant, les températures optimales de croissance de ces différents taxons diffèrent. La température optimale de croissance de *B. dothidea* et *N. parvum* (entre 25°C et 30°C; Chen *et al.* 2014a; López-Moral *et al.* 2020b) est en effet plus élevée que celle de *D. eres* et *C. godetiae* (entre 20°C et 25°C; Arciuolo *et al.* 2021; Salotti *et al.* 2022; Thomidis & Michailides 2009). Ces différences

peuvent ainsi partiellement expliquer une différence d'abondance relative de ces espèces en fonction des températures en vergers. De plus, les conditions météorologiques peuvent affecter négativement l'état de santé de l'hôte, notamment lors de périodes de sécheresse. Ces stress abiotiques font partie des facteurs suspectés d'être déclencheur du comportement pathogène des Botryosphaeriaceae et des *Diaporthe* lorsque ceux-ci se développent de manière endophyte dans l'hôte (Hilário & Gonçalves 2023; Slippers & Wingfield 2007).

- **Le développement du pathobiome est aussi façonné par des interactions entre ses membres ainsi qu'avec les autres espèces composant le phytomicrobiome**

L'analyse des interactions entre genres ou espèces, issue des données culturales et non culturales, a permis de mettre en évidence des corrélations positives et négatives entre les différents membres du pathobiome. Les résultats interprétés à l'aide de corrélogrammes et de réseaux de SparCC ont permis l'identification de corrélations positives et négatives différentes, mais aussi communes, mettant une nouvelle fois en avant l'apport complémentaire de ces deux méthodes dans l'analyse du pathobiome.

Les principales corrélations négatives mises en avant entre certaines des principales espèces d'intérêt souligne la complexité des relations entre ces espèces associées au dépérissement du noyer. Ainsi, bien que les espèces *N. parvum*, *B. dothidea* et *D. eres* aient été démontrées comme pathogènes du noyer sur rameaux détachés, elles semblent avoir un rôle différent dans le développement des symptômes. Par exemple, les corrélations négatives entre *N. parvum* et *D. eres*, et *N. parvum* et *C. godetiae*, identifiées via les corrélogrammes basés sur les données de prévalence des espèces, illustrent de potentielles interactions compétitives ou antagonistes entre ces espèces. Ces interactions ont été confirmées à l'échelle de l'organe, *N. parvum* et *D. eres* étant significativement plus retrouvées seules qu'en association l'une avec l'autre, de même que *C. godetiae* par rapport à *N. parvum*. Les interactions entre *N. parvum* et *D. eres* ont aussi été évaluées à l'aide d'inoculations de ces espèces (seules, conjointes et séquentielles) sur rameaux détachés en conditions contrôlées. Ces expérimentations ont permis de garder plausible l'hypothèse d'interactions antagonistes entre ces espèces, les résultats obtenus étant identiques à ceux de Agustí-Brisach *et al.* (2019) qui ont mis en avant des interactions antagonistes entre *N. mediterraneum* et *D. rhusicola*.

Bien qu'aucune interaction n'ait été mise en avant entre *D. eres* et *F. juglandicola* par les analyses *in silico*, le fait que les deux espèces soient significativement plus fréquemment retrouvées en association dans les rameaux que seules nous a poussés à réaliser des co-

inoculations conjointes et séquentielles de ces espèces sur rameaux détachés. Ceci a permis de mettre en avant de potentielles interactions facilitatrices entre ces deux espèces, en particulier le comportement opportuniste et saprophyte du genre *Fusarium* pouvant profiter des lésions causées par *D. eres* pour se développer dans le rameau. La biomasse fongique de *D. eres* et *F. juglandicola* va être estimée à l'aide d'une approche qPCR afin de vérifier les postulats de Koch, mais aussi d'étudier si les co-inoculations des deux espèces sont associées à une meilleure colonisation de l'une voire des deux espèces par rapport aux inoculations seules. Ce comportement des espèces du genre *Fusarium* pourrait ainsi aussi expliquer la corrélation positive entre *F. juglandicola* et *C. godetiae*, cette dernière pouvant faciliter le développement de la première.

D'autres corrélations mises en avant entre les principales espèces d'intérêt et d'autres espèces du phytomicrobiome illustrent aussi les interactions entre ces différentes espèces et leur rôle potentiel dans le développement des symptômes. Par exemple, l'abondance du genre *Vishniacozyma*, correspondant à une levure endophyte, est négativement corrélée avec l'abondance de *Neofusicoccum*. Ceci pourrait laisser penser que ces espèces endophytes pourraient jouer un rôle dans le ralentissement du développement des symptômes, et pourraient ainsi être de potentiels agents de lutte biologique contre cette maladie.

L'identification de corrélations entre espèces doit être réalisée avec précaution, car les résultats obtenus via les données des approches culturales et non culturales peuvent être interprétés différemment. Enfin, l'identification de ces corrélations apporte des informations supplémentaires dans la compréhension du développement des symptômes du dépérissement du noyer, montrant que leur apparition met en jeu les relations des principales espèces pathogènes entre elles, mais aussi avec autres espèces du phytomicrobiome, principalement les espèces endophytes du noyer, illustrant ainsi la définition du pathobiome (Bass *et al.* 2019) et l'évolution récente du postulat de Koch dans sa version écologique : un microbiote dysfonctionnel, une maladie (Vonaesch *et al.* 2018).

- **Une différenciation génétique des populations de *B. dothidea* et *N. parvum* particulière à chaque espèce et des hypothèses sur les sources d'introduction et de dissémination**

L'étude de la génétique des populations de *B. dothidea* et *N. parvum* par la méthode des microsatellites a permis d'approfondir les connaissances concernant la répartition et la diversité génétique de ces espèces émergentes sur le noyer en France.

Les populations de *B. dothidea* se sont révélées partiellement façonnées par l'origine géographique des prélèvements, à l'inverse des populations de *N. parvum* qui ne présentent aucune différenciation génétique en fonction des deux bassins de production. De plus, des traces de reproduction sexuée ont été mises en avant dans les populations de *B. dothidea*, alors que seul le mode de reproduction clonal a été identifié dans les populations de *N. parvum*. Les différences génétiques entre les deux populations de *B. dothidea* selon le bassin de prélèvement pourraient ainsi s'expliquer par les différences que présentent ces deux bassins, en termes de conditions météorologiques, mais aussi de variétés/cultivars de noyers cultivés, ainsi que les autres principales cultures entourant les noyeraies et pouvant jouer le rôle de réservoir d'individus, entre autres. Ces différences pourraient aussi être la résultante de multiples introductions d'individus de *B. dothidea* en France, introductions mettant en jeu des individus génétiquement différents. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle les individus du bassin du Sud-Ouest pourraient provenir d'introductions depuis l'Espagne, tandis que les individus du bassin du Sud-Est pourraient provenir d'introductions depuis l'Italie, par exemple. De plus, ces différences pourraient aussi partiellement s'expliquer de par la reproduction sexuée identifiée chez ces populations. L'étude menée pendant ma thèse n'ayant pas permis d'approfondir cet aspect, ces hypothèses restent à creuser et à démontrer. A l'inverse, l'homogénéité des populations de *N. parvum* sur les deux bassins de production suggère la présence d'une large population non influencée par des facteurs géographiques. Ceci pourrait potentiellement s'expliquer par le mode de reproduction exclusivement clonal de ces individus ou encore une dissémination facilitée entre les deux bassins par les insectes et/ou le vent. Bien que nos tests de pathogénicité sur rameaux détachés aient montré un niveau d'agressivité similaire entre ces 2 espèces avec les isolats testés et dans nos conditions expérimentales, les études tirées de la bibliographie concordent toutes vers un pouvoir pathogène de *N. parvum* supérieur à celui de *B. dothidea in planta* (cf **Tableau 4** de la partie introductive du manuscrit). Par ailleurs, dans le **chapitre II**, nous avons montré une prévalence de *N. parvum* significativement plus forte dans les échantillons symptomatiques par rapport aux asymptomatiques, contrairement à *B. dothidea*, tandis que *N. parvum* était significativement plus fréquemment retrouvé seul par rapport à *B. dothidea*, ce qui va dans le sens d'un meilleur pouvoir pathogène et compétitif de *N. parvum* sur *B. dothidea*. De même que précédemment, ces hypothèses restent à approfondir pour améliorer la compréhension de la répartition de ces populations au sein des noyeraies françaises.

Des différences entre ces populations ont donc été mises en avant à l'échelle de la France, mais aussi des points communs. Les populations des deux espèces ne sont pas apparues comme génétiquement influencées par l'organe d'origine (rameau brou) ni par l'état symptomatologique de celui-ci (asymptomatique ou symptomatique). Ces derniers résultats viennent faire écho aux potentielles infections latentes de ces espèces, ainsi qu'à leur changement de comportement, d'un mode de vie endophyte vers un mode de vie pathogène/ou de pathogène latent à actif. Ainsi, l'absence de différenciation génétique dans ce contexte laisse penser que ce sont bien les mêmes individus qui évoluent d'un comportement à un autre en réponse à des stress externes ou internes. De plus, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'infection par les espèces de Botryosphaeriaceae débiterait par le fruit et se propagerait au rameaux à travers le pédoncule (Moral *et al.* 2019b). Cependant, ces résultats ne permettent pas non plus d'écarter l'hypothèse selon laquelle l'infection pourrait aussi se propager des rameaux vers les fruits.

La comparaison des individus collectés de noyers en France avec d'autres individus collectés de vignes en France a mis en avant une forte proximité génétique entre ces populations. Les populations de noyer de *N. parvum* des deux bassins de production étaient génétiquement proches de celle de vignes, tandis que la population de *B. dothidea* du Sud-Ouest était la plus proche de celle de vignes. Ces points communs permettent d'émettre deux hypothèses principales. Premièrement, les individus des deux cultures partageraient une origine commune, c'est-à-dire proviendraient d'un hôte commun ayant permis la transmission vers ces deux cultures. Deuxièmement, les vignobles pourraient être un réservoir d'individus qui présentent la capacité d'être transmis vers les noyers. Ces deux hypothèses restent donc actuellement à être vérifiées. Les populations de *N. parvum* ont aussi été comparées avec des individus collectés à partir de noyers en Californie et en Espagne, ainsi qu'à partir d'amandiers en Californie. Les populations espagnoles et californiennes se sont avérées génétiquement plus proches les unes des autres que des populations françaises de noyers. Une des hypothèses émanant de ces résultats est qu'une transmission des espèces entre les vignobles et les noyeraies françaises semble plus probable qu'une introduction par le biais de matériel infectés provenant de ces pays. Cet aspect reste aussi à approfondir.

## ▪ Perspectives

Les résultats obtenus durant ma thèse ouvrent la voie à plusieurs axes de recherche afin d'approfondir la compréhension du pathobiome associé au dépérissement du noyer et des populations associées.

### 1. Approfondir le cycle d'infection des principaux membres du pathobiome

Puisque les résultats obtenus durant la thèse mettent en évidence l'impact de la météorologie sur la composition des communautés microbiennes des brous et noix, la réalisation de nouvelles campagnes de prélèvement similaires serait intéressante pour confirmer les effets observés. Cela permettrait également de poursuivre l'identification des espèces composant le pathobiome et le phytomicrobiome, de manière plus large, à l'aide des deux approches culture-dépendante et -indépendante. De plus, il serait intéressant de comparer la composition, la diversité et la richesse des communautés fongiques dans des prélèvements de fruits et de rameaux réalisés aux mêmes périodes. Cela permettrait d'évaluer la charge en agents pathogènes dans les rameaux à l'époque où les noix présentent des symptômes (vers la fin de l'été), mais aussi dans les fruits à l'époque où les rameaux présentent des symptômes (vers la fin du printemps). De plus, une étude de l'évolution de la composition du pathobiome pourrait être conduite à l'aide de la réalisation de prélèvements réguliers tout au long de la période de croissance et de maturation des fruits. Le prélèvement de bourgeons, asymptomatiques et symptomatiques, apporterait aussi des informations supplémentaires à ces analyses, les bourgeons pouvant aussi présenter des nécroses, comme cela a été réalisé par Da Lio *et al.* (2018) concernant l'antracnose à *Colletotrichum*. De plus, l'analyse des échantillons pourrait apporter des informations quant au cycle d'infection des principales espèces pathogènes, les fleurs pouvant être une porte d'entrée pour les spores, au même titre que les plaies de taille et les blessures sur fruits. Enfin, la réalisation de prélèvements sur des parcelles supplémentaires, associées à d'autres variétés/cultivars et types de conduite permettrait d'approfondir les potentielles différences dans la composition du phytomicrobiome en fonction de ces différents facteurs.

Il serait aussi intéressant d'approfondir l'étude de la transmission des agents pathogènes, du fruit vers le rameau, ou du rameau vers le fruit. Pour ce faire, il pourrait être envisagé de réaliser des inoculations sur fruits, et de mettre en culture par la suite des échantillons de brou, de pédoncules et des rameaux auxquels sont attachés les fruits, idéalement en vergers, afin de vérifier l'hypothèse d'une transmission du fruit vers le rameau, mise de

nouveau en avant par les travaux de López-Moral *et al.* (2023). Enfin, les mêmes expérimentations peuvent être mises en place, en inoculant cette fois-ci les rameaux, pour évaluer une potentielle transmission des rameaux vers les fruits.

La capacité d'infection des différentes espèces est aussi étroitement liée à l'état de maturité des fruits (López-Moral *et al.* 2023; Moral *et al.* 2019b). La sensibilité des fruits aux infections des espèces de Botryosphaeriaceae augmente à mesure que le fruit approche de la maturité, tandis qu'il a été démontré que l'agressivité de *D. foeniculina* était constante quel que soit le stade de développement des fruits (López-Moral *et al.* 2023). La réalisation de tests d'infection sur des fruits en vergers à différents stades de développement apporterait ainsi des informations cruciales concernant le cycle de vie des principales espèces pathogènes en France, notamment de *D. eres*, à propos de laquelle peu d'informations sont disponibles.

La compréhension du cycle d'infection des noyers par les principales espèces pathogènes pourrait aussi être approfondie par la mise en place de spore-trapping au sein des vergers. Cette technique permet de capturer les spores transitant dans les vergers par le vent et la pluie, et d'évaluer quelle est la charge en agents pathogènes, et quelles sont les espèces qui semblent le plus présentes/le plus facilement transmises par la voie aérienne. Cette technique est donc complémentaire à la mise en culture d'échantillons symptomatiques pour élucider le cycle d'infection, et peut constituer un outil de prédiction des potentielles infections. L'étude menée par Jiménez-Luna *et al.* (2022b) a permis de mettre en avant des différences dans la composition du pathobiome d'amandiers et de noyers en fonction des conditions météorologiques, de l'âge des vergers et du type de verger (amandiers et noyers) par association d'une approche de spore-trapping et de mise en culture d'échantillons symptomatiques. Par exemple, Urbez-Torres *et al.* (2010) ont mis en évidence que la dispersion des spores de Botryosphaeriaceae était positivement corrélée avec les événements pluvieux et l'irrigation, et que la charge en spores était ainsi plus importante après le passage de précipitations dans les vignobles de Californie, ce qui a également été démontré dans des vergers d'amandiers et de noyers concernant les Botryosphaeriaceae et les Diaporthaceae (Jiménez Luna *et al.* 2022b). L'analyse de la concentration sporale toute les 3 à 4 semaines dans une noyeraie en Californie entre les mois d'avril et septembre a révélé une plus forte présence d'espèces de *Phomopsis* (anamorphe de *Diaporthe*) au début de la saison (avril), et une absence presque totale dans les mois suivants. A l'inverse, les spores des principaux genres pathogènes associés au dépérissement en Californie (soit *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* et *Neofusicoccum*) étaient globalement présentes de manière équivalente durant chaque mois (Michailides *et al.* 2016). Cette concentration moins importante de spores de *Diaporthe* en été pourrait être en lien avec

une plus faible prévalence de ce genre dans les brous que dans les rameaux symptomatiques, résultats obtenus lors de ces travaux concernant l'espèce *D. eres*.

L'évaluation de l'effet des conditions météorologiques sur le développement et la sévérité d'une maladie est complexe et implique de multiples facteurs pouvant présenter des effets synergiques mais aussi antagonistes. Durant ces travaux, l'analyse des conditions météorologiques a été réalisée sur la période d'avril à septembre, mois durant lesquels se développent les fruits et les symptômes sur ces derniers. Il serait intéressant d'effectuer ces analyses aussi sur la période de propagation des spores au sein des vergers, soit durant les périodes humides et pluvieuses de septembre à avril. Des analyses en conditions contrôlées pourraient aussi apporter des éléments supplémentaires quant aux facteurs impactant le plus le développement des symptômes, tels que la réalisation d'inoculations/de co-inoculations sur plants en pot et l'évaluation du développement des lésions nécrotiques à différentes températures et humidité relatives. Cela pourrait ainsi permettre de générer des modèles de prévision du risque en fonction des conditions climatiques.

De plus, la compréhension du cycle d'infection passe aussi par l'évaluation des différentes structures reproductrices présentes dans les vergers. En Californie, des structures de type pycnide ont été observées dans les noyeraies californiennes pour la majorité des espèces de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe*, conduisant à la formation de spores asexuées (conidies), ainsi que des structures de reproduction sexuée (périthèces) de *B. dothidea* et de *D. foeniculina* (Michailides *et al.* 2013). Actuellement, la recherche de ces structures dans les noyeraies françaises n'a pas été effectuée, mais il semble indispensable de réaliser ces recherches par la suite afin d'approfondir la compréhension du cycle d'infection des principales espèces pathogènes dans le sud de la France.

Enfin, il serait intéressant de poursuivre l'étude des populations de *B. dothidea* et *N. parvum* via l'isolement d'individus de ces deux espèces à partir d'autres vergers et cultures étant des hôtes de ces espèces, ainsi qu'à partir de plantes non cultivées présentes autour des noyeraies. Celles-ci peuvent en effet constituer un réservoir d'individus de ces espèces de par leur diversité microbienne souvent supérieure à celle des espèces cultivées (Campisano *et al.* 2015; Pérez-Jaramillo *et al.* 2018; Putra *et al.* 2015). En outre, la comparaison des individus collectés de noyers en France avec des individus collectés du même hôte en Espagne et en Italie pourrait aussi apporter des informations concernant l'introduction de ces espèces, en particulier concernant *B. dothidea*.



## 2. Approfondir la contribution des membres du pathobiome dans le développement de la maladie

Les tests de pathogénicité ayant été uniquement réalisés sur rameaux détachés en conditions contrôlées, une meilleure évaluation de la pathogénicité pourrait être réalisée par la mise en place de ces tests en vergers, aussi bien sur fruits que sur rameaux, dans les conditions environnementales dans lesquelles se développent naturellement les symptômes. De plus, la réalisation de tests de pathogénicité à l'aide d'une seule espèce ne rend pas compte de la complexité de la maladie et de la diversité des espèces pathogènes impliquées, comme expliqué dans la partie introductive de ce manuscrit. Ainsi, la réalisation de tests de pathogénicité à l'aide d'inoculations conjointes de différentes combinaisons d'espèces pourrait apporter des informations primordiales concernant la sévérité des symptômes provoqués par différents consortiums d'espèces, mais aussi les interactions entre ces différentes espèces, tel que réalisé pour *D. eres*, *N. parvum* et *F. juglandicola* durant ces travaux. La réalisation de ces tests à l'aide de solution de spores, idéalement de faible concentration, permettrait aussi de se rapprocher des conditions naturelles d'infection, contrairement aux inoculations réalisées à l'aide de plugs mycéliens.

L'espèce *F. juglandicola* étant une espèce nouvellement décrite récemment, les seules informations concernant sa potentielle pathogénicité sont les résultats obtenus durant ces travaux concernant les rameaux de noyer. La pathogénicité pouvant aussi être partiellement appréhendée à l'échelle moléculaire par l'étude des facteurs de pathogénicité, l'analyse de génomes étant une étape supplémentaire et complémentaire aux précédentes. Cette expérimentation est un projet que je souhaite mener prochainement au sein du LUBEM grâce au séquençage du génome d'une souche *F. juglandicola*, préalablement caractérisée et maintenue dans la collection UBOCC (Culture Collection de l'Université de Bretagne Occidentale).

D'autres méthodes d'analyse pourraient être appliquées sur les échantillons, afin d'obtenir une identification plus approfondie des espèces fongiques, telle que des analyses de type métagénomique, ou encore obtenir des informations plus fonctionnelles concernant la participation des différents agents dans le développement des symptômes, telles que des analyses de type métatranscriptomique. Le couplage d'une analyse culture-dépendante, métagénomique et métatranscriptomique concernant les communautés fongiques associées à des échantillons symptomatiques de vigne a mis en avant une complémentarité entre ces trois

approches, bien que les deux dernières suggèrent une complexité d'espèces fongiques supérieures à l'analyse culture-dépendante (Morales-Cruz *et al.* 2018). L'analyse du transcriptome a révélé que les CAZymes (Carbohydrate-Active Enzymes) et les transporteurs étaient globalement les fonctions associées à la pathogénicité les plus exprimées par tous les agents pathogènes étudiés, résultats aussi obtenus par Nerva *et al.* (2022), mais avec des profils d'expression variant en fonction des types de symptômes (Esca, Eutypiose et symptômes de chancres sans symptômes foliaires). Ainsi, Morales-Cruz *et al.* (2018) sont parvenus à mettre en avant que les différentes espèces associées à la même maladie semblaient exprimer des fonctions de virulence similaires et à des niveaux d'expression comparables. L'étude menée par Nerva *et al.* (2022) s'est intéressée à la comparaison d'échantillons de vigne présentant des symptômes d'Esca et des échantillons d'apparence saine par une analyse de métatranscriptomique. Ils n'ont pas seulement cherché à identifier et évaluer les profils d'expression des espèces fongiques, mais se sont aussi intéressés à une fraction plus large du phytomicrobiome par l'étude des bactéries et virus, et leurs profils d'expression dans le cas d'échantillons symptomatiques. Les principales espèces pathogènes présentaient globalement des profils d'expression similaires, soit une expression plus importante des gènes associés aux transporteurs dans les échantillons symptomatiques, et des gènes associés aux CAZymes et au métabolisme secondaire dans les échantillons asymptomatiques. L'espèce *Aureobasidium pullulans*, espèce endophyte connue de la vigne, a présenté un profil d'expression de CAZymes et de transporteurs particulièrement élevé dans les échantillons symptomatiques, tandis que le niveau d'expression dans les échantillons asymptomatiques était particulièrement faible. Ces résultats suggèrent une potentielle action d'*A. pullulans*, soit dans le développement des symptômes, soit dans la lutte contre les agents pathogènes. Certaines bactéries de la classe des Actinomycetes se sont avérées être plus présentes dans les échantillons d'apparence saine que symptomatiques, suggérant la possibilité d'une action de lutte par ces bactéries contre les agents pathogènes ou simplement, leur capacité à proliférer en l'absence des pathogènes. Enfin, l'analyse du virome a révélé une richesse et une diversité de virus significativement plus importante dans les échantillons symptomatiques, et notamment les virus *Botryosphaeria dothidea fusavirus 1* et *Grapevine associated mitovirus 1*, suggérant un impact de l'état physiologique des plantes sur la composition du virome (Nerva *et al.* 2022). La réalisation de telles analyses permettrait d'évaluer de manière plus approfondie le rôle des différentes espèces pathogènes et des autres espèces du phytomicrobiome dans le développement des symptômes de dépérissement. Ces résultats encouragent aussi fortement à ne pas limiter l'analyse du pathobiome et du phytomicrobiome aux communautés fongiques,

mais aussi aux autres communautés microbiennes pouvant impacter le développement des symptômes.

### 3. Explorer les interactions et le potentiel d'agents de biocontrôle

Ce projet de thèse a permis de mettre en évidence des corrélations positives ou négatives entre différentes espèces du pathobiome, il serait intéressant de comprendre les mécanismes impliqués dans ces interactions à l'aide d'expérimentations *in vitro*, telles que l'évaluation de la compétition pour l'espace et les nutriments ainsi que de l'effet sur la germination des spores ou encore l'étude des métabolites produits. Par la confrontation de suspensions de spores, Agustí-Brisach *et al.* (2019) ont mis en avant une inhibition de la germination des spores de *D. rhusicola* par la présence de spores de *N. mediterraneum*, pouvant partiellement expliquer le développement de lésions nécrotiques moins importantes lors de co-inoculations simultanées des deux espèces sur rameaux détachés.

Il semble important, au vu des dégâts causés par cette maladie, de trouver des solutions pour limiter son développement et sa sévérité. La recherche de méthodes de lutte fait partie des solutions envisagées, en particulier via la recherche d'agents de biocontrôle. Il peut être intéressant dans un premier temps de pratiquer les essais à l'aide de certaines espèces déjà identifiées comme potentiels agents de lutte de type biocontrôle, telles que *Trichoderma* spp. et *A. pullulans*. Ensuite, l'analyse des communautés fongiques ayant mis en évidence de potentiels taxons répresseurs, il serait important de tenter de les isoler, puis de tester leur capacité à limiter le développement des agents pathogènes *in vitro* puis *in planta*. Par ailleurs, l'analyse des communautés fongiques dans les échantillons asymptomatiques fait partie des étapes permettant de renforcer l'identification de potentiels taxons répresseurs, du fait que leur présence n'a pas permis le développement d'agents pathogènes par exemple. Dans le cadre de ma thèse, l'analyse des données de séquençage métabarcoding n'a pas été possible dans ce type d'échantillons. La réalisation de nouvelles campagnes de prélèvements permettrait d'obtenir ces informations et de s'intéresser de manière plus approfondie aux différences dans la composition du phytomicrobiome et du pathobiome entre des échantillons asymptomatiques et symptomatiques.

Le projet MAGIC, présenté dans la partie introductive de ce manuscrit, a pour objectif de poursuivre l'étude des communautés fongiques associées au dépérissement du noyer, et

permettra de réaliser une partie des expérimentations présentées dans ces perspectives. De nouvelles campagnes de prélèvements sont programmées sur un plus grand nombre de parcelles, dont celles échantillonnées pour la réalisation de ces travaux. L'évaluation de la pathogénicité des principales espèces d'intérêt sera aussi réalisée sur fruits détachés et en vergers. L'analyse de la charge en agents pathogènes par la mise en place de spore-trapping est aussi un des objectifs de ce projet, de même que l'évaluation de la sensibilité des fruits aux infections de Botryosphaeriaceae et de *Diaporthe* à différents stades phénologiques du fruit. Enfin, l'évaluation de méthodes de lutte est aussi un axe de ce projet, par l'évaluation *in vitro* et en vergers de l'efficacité de produits utilisables en agriculture biologique et de produits de biocontrôle déjà homologués, ainsi que par la recherche de nouveaux candidats et leur potentielle application en vergers. Certains isolats collectés durant ce projet de thèse pourront faire l'objet de tests dans le cadre de cet axe de recherche, tels que *A. pullulans*, *Epicoccum nigrum*, *Trichoderma* spp. et *Trichothecium roseum*.

#### ▪ Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont permis d'identifier les principales espèces pathogènes associées à l'émergence du dépérissement du noyer en France ainsi que les principaux genres composant le phytomicrobiome de rameaux et de fruits symptomatiques jusqu'alors peu étudiés.

A travers cette étude, les résultats obtenus ont confirmé l'intérêt de recourir aux deux approches culture-dépendante et -indépendante afin de décrire le plus précisément possible les communautés fongiques associés au dépérissement du noyer. Par ailleurs, ces deux méthodes se sont avérées efficaces pour mener une large étude des principales espèces pathogènes mais aussi des autres espèces du phytomicrobiome, des interactions entre ces différentes espèces et des facteurs pouvant influencer leur répartition.

Enfin, la collection d'isolats des espèces de *B. dothidea* et *N. parvum* a permis le génotypage d'un large nombre d'individus pour mener à bien l'analyse de ces deux populations dans les bassins de production nucicoles français et entamer le processus de compréhension de leur émergence dans les noyeraies.

## ANNEXES

## I. Annexe 1 - Revue publiée dans Pathogens

**Belair, M.**, Grau, A. L., Chong, J., Tian, X., Luo, J., Guan, X., Pensec, F. Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses. *Pathogens* **2022**, *11*, 951. doi: 10.3390/pathogens11080951.

Review

# Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses

Marie Belair <sup>1,†</sup>, Alexia Laura Grau <sup>2,†</sup>, Julie Chong <sup>2</sup>, Xubin Tian <sup>3,4</sup>, Jiaxin Luo <sup>3,4</sup>, Xin Guan <sup>3,4,\*</sup>  
and Flora Pensec <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, University Brest, INRAE,

F-29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> Unité de Recherche Vigne et Oenologie Colmar-Reims, UR3991, Université de Haute Alsace, 33 Rue de Herrlisheim, F-68000 Colmar, France

<sup>3</sup> College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

<sup>4</sup> Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

\* Correspondence: xin.guan@swu.edu.cn (X.G.); flora.pensec@univ-brest.fr (F.P.)

† These authors contributed equally to this work.



check for updates

**Citation:** Belair, M.; Grau, A.L.; Chong, J.; Tian, X.; Luo, J.; Guan, X.; Pensec, F. Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses.

*Pathogens* **2022**, *11*, 951. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080951>

Academic Editor: Katrina Ramonell

Received: 20 July 2022

Accepted: 10 August 2022

Published: 22 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Botryosphaeriaceae are a family of fungi associated with the decay of a large number of woody plants with economic importance and causing particularly great losses in viticulture due to grapevine trunk diseases. In recent years, major advances in the knowledge of the pathogenicity factors of these pathogens have been made possible by the development of next-generation sequencing. This review highlights the knowledge gained on genes encoding small secreted proteins such as effectors, carbohydrate-associated enzymes, transporters and genes associated with secondary metabolism, their representativeness within the Botryosphaeriaceae family and their expression during grapevine infection. These pathogenicity factors are particularly expressed during host-pathogen interactions, facilitating fungal development and nutrition, wood colonization, as well as manipulating defense pathways and inducing impacts at the cellular level and phytotoxicity. This work highlights the need for further research to continue the effort to elucidate the pathogenicity mechanisms of this family of fungi infecting grapevine in order to improve the development of control methods and varietal resistance and to reduce the development and the effects of the disease on grapevine harvest quality and yield.

**Keywords:** Botryosphaeriaceae; dieback; grapevine; trunk diseases; pathogenicity factors; plant defense response

## 1. Introduction

The Botryosphaeriaceae family (Botryosphaeriales, Ascomycetes) includes species with a worldwide distribution and a wide host range [1–4]. To date, around 22 genera and 300 species have been identified in this family [5,6], characterized as saprotrophic, endophytic or pathogenic and sometimes these trophic regimes are characteristic of the same species [7–9]. Pathogenic species can enter the host plant through wounds or natural openings [10], they settle latently in the host tissues and become pathogenic when the plant is stressed [9,11,12].

The symptoms are often described on perennial plants such as apples, blueberries, citrus, grapes, conifers or eucalyptuses; and range from dieback, to cankers, fruit rots and leaf discolorations [13–16]. Among the affected plants, Botryosphaeriaceae are well known as involved in the grapevine trunk diseases (GTD). Grapevine, whose physiology and composition of the berries is the subject of various studies [17–19], has been the most



economically impacted plant of agronomic interest in recent decades [20,21] due to yield reductions, increased production costs and shorter vineyard life span [22,23].

In recent years, the development of next-generation sequencing techniques has led to major advances in the understanding of the virulence mechanisms of these pathogens [5,24–28]. Thus, different classes of genes involved in fungal pathogenesis have been identified as belonging to the arsenal of Botryosphaeriaceae, such as those encoding effectors and other small proteins, enzymes associated with wood degradation, peptidases, transporters and those associated with secondary metabolism [5,10,26,27]. Botryosphaeriaceae toxins, secondary metabolites and wood degradation enzymes are known to primarily exert a destructive effect on grapevine cells and are hypothesized to be the cause of the observed symptoms (wood and bud necrosis, foliar discolorations) [29]. However, recent work also suggests that Botryosphaeriaceae effectors could have a more subtle role than cell and tissue damaging, by allowing fungi to escape from grapevine immunity [30].

The objective of this review is to highlight the latest knowledge established in the literature on the pathogenicity factors of the main agents associated with Botryosphaeria dieback in grapevines such as *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum mediterraneum* or *Dothiorella viticola*. The main classes of factors will be deciphered and their dispersion as well as their specificities within the main species will be highlighted. From the view of gene regulation and morphology modification, the effects of these pathogenicity factors on defense reactions and metabolism of grapevine will then be discussed and will allow to better understand the interaction between grapevine and Botryosphaeriaceae with regard to the research advances of these last years.

## 2. Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Species Associated with Grapevine Trunk Diseases

### 2.1. Small Secreted Proteins as an Important Element of Plant–Fungi Interaction

Botryosphaeriaceae species are known to cause foliar symptoms but, to date, they have never been isolated from leaves or fruits. Thus, it has been postulated that these symptoms are due to phytotoxins and secreted proteins (SP) produced by the fungi in the perennial part of the plant and then translocated to the leaves through the transpiration stream [31,32]. Moreover, for many pathogens, particularly in fungi and oomycetes, the excretion of proteins is essential for pathogenicity [33].

One category of SP seems of particular interest: the small secreted proteins (SSP). Often defined as proteins of less than 300 amino acids, they contain a signal peptide that permits secretion. These SSPs play an important role in the plant–fungal interaction and in pathogen virulence mechanisms [34]. Few studies have been conducted on these effectors in the Botryosphaeriaceae family, but Yu et al. (2022) reported that the number of SP widely varies between genera of Botryosphaeriaceae [33]. Species belonging to the *Macrophomina*, *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* genera are described as containing between 922 and 1118 SPs compared to only 671 to 866 SP in the genera *Diplodia*. In the same study, the authors indicate that two Botryosphaeriaceae genera (*Macrophomina* and *Botryosphaeria*) may be able to release over 250 SSPs while all *Diplodia* species considered produce less than 200 SSPs [33]. The most studied small effectors are probably the small cysteine-rich secreted proteins (SCSP). Several of these SCSPs have been identified as virulence factors in fungi and oomycetes. SCSPs can inhibit extracellular plant proteases, protect the hyphae against chitin-triggered defenses or play a role in programmed cell death (PCD) mechanisms [34,35]. These functions have never been highlighted in Botryosphaeriaceae species, nevertheless, Vázquez-Avendaño and colleagues (2021) have identified five new cysteine-rich proteins in *N. parvum* [35]. These proteins can build disulfide bonds and present a signal peptide. None of these five proteins have an identified function but, interestingly, two of them contain a CFEM domain [35]. This pattern unique to fungi and characterized with the presence of eight cysteines is predicted to be more abundant in pathogenic fungi, and has thus been identified as a putative virulence factor [36].



The LysM domain is another pattern largely described to be present in SSPs involved in pathogenic interactions between plants and fungi by protecting the hyphae from host defenses and preventing the recognition of the pathogen by the plant [37–39]. Although these mechanisms have been largely described in many plant–fungi interactions, less is known about their role in Botryosphaeriaceae pathogenicity. Harishchandra and colleagues, 2020, have identified three putative LysM-containing SSPs. Suppression by RNAi of one of them, LtLysM, resulted in fewer lesions on a susceptible grapevine cultivar, demonstrating the involvement of LtLysM1 in *L. theobromae* pathogenicity [37]. Other SSPs are suspected to contribute to the virulence of Botryosphaeriaceae species by suppressing plant immune defenses. In particular, Zhang et al. (2021) highlighted candidate effectors with a signal peptide capable of totally suppressing the BAX (Bcl-2-associated X) mediated PCD [30].

Among SSPs, the Nep1-like protein (NLP) family is widely conserved in pathogenic microorganisms. NLPs have two conserved domains in their amino acid sequence: two cysteines connected with a disulfide bond and a hepta-peptide (GHRHDWE), forming a negatively-charged cavity. These two elements are particularly essential for plant cell membrane damaging [32,40–42]. It has been further demonstrated that these NLPs can cause cell death and ethylene production during the interaction between dicotyledonous and fungi [40–42]. Nazar Pour et al. (2020) identified six homologs to NLP proteins in *N. parvum* that induced necrosis in tomato (*Solanum lycopersicum*), and the synthesis of these NLPs seemed to result from plant recognition by fungi, however, the mechanisms inducing necrosis remain to be elucidated [40]. Cobos and colleagues (2019) identified four NLP-like proteins in *D. seriata*. They demonstrated that these NLPs could play a role in the pathogenicity of *D. seriata*, inducing necrosis on the leaf margin that progressed through the center of the leaves of infected grapevine [32]. Interestingly, in the same study, the authors were able to note an improvement in the conductance of leaves where NLPs had been infiltrated. This phenomenon could be directly related to the loss in cell membrane integrity caused by NLPs [32]. Other authors had already raised the hypothesis that the location of NLPs near cell and nuclear membranes could induce a loss in membrane integrity [42]. Localization of NLPs into the cytoplasm and even into the nucleoplasm could be an explanation for the particularly toxic effect of these proteins. They could then interfere with genic transcription, induce cell death or interact with chloroplasts [32]. Indeed, Nazar Pour and colleagues (2020) had also noticed that NLPs from *N. parvum* harmed the photosynthesis of tomato leaves infiltrated with this kind of effector [40].

## 2.2. Carbohydrate-Active Enzymes Are Key Actors of Grapevine Colonization by Botryosphaeriaceae

Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) are responsible for the biosynthesis, modification or breakdown of complex carbohydrates and glycoconjugates. They play an important role in fungal pathogen–host interactions, particularly plant cell wall-degrading enzymes (PCWDE), involved in the pathogenicity of fungi by degrading plant cell-wall polymers and allowing the release of sugars as carbon source. These enzymes can be intra- or extracellular, the latter being the most involved in the degradation of primary and secondary plant cell walls [27,43–48]. Compared to other Dothideomycetes, Botryosphaeriaceae genomes are richer in CAZymes-related genes [46,49,50], such as *Colletotrichum* and *Fusarium* species which share the same lifestyle plasticity and broad host range [10,25,33]. This high content of CAZymes in Botryosphaeriaceae genomes is closely similar to that of opportunistic fungi, more than pathogenic fungi [10]. According to the literature, the number of predicted CAZyme encoding genes is comprised between 504 and 753 in *N. parvum* [25,27,33,46,50,51], 504 in *N. mediterraneum* [27], between 485 and 825 in *B. dothidea* [27,33,50,51], between 465 and 789 in *L. theobromae* [10,27,33,50,52,53], between 433 and 577 in *D. mutila* [27,33], between 432 and 662 in *D. seriata* [27,33,46,50] and 395 in *D. viticola* [27]. Interestingly, 294 genes encoding CAZymes carrying a signal peptide were identified in *N. parvum*, indicating a potential role in extracellular activities [51]. Researchers showed that the lifestyle and host diversity of fungi are associated with the

CAZyme content of genomes, and that their aggressiveness is a result of a part of the latter, combined with other pathogenicity factors [25,27,33,48,54–56]. For example, it has been shown that *N. parvum* is one of the most aggressive Botryosphaeriaceae species on grapevines [27,57,58], in accordance with its high CAZyme content [27,33,50]. In contrast, *B. dothidea* is the second species containing the highest number of these genes, but shows a low aggressiveness on grapevines [27,57,58].

CAZyme classification is composed of five enzyme classes (glycoside hydrolases, GHs; glycosyltransferases, GTs; polysaccharides lyases, PLs; carbohydrates esterases, CEs; auxiliary activities, AA) and an associated module (carbohydrate-binding modules, CBMs) [43,59,60]. Among grapevine-pathogenic Botryosphaeriaceae, CAZymes comprise at least 54 GH families, 4 PL families, 9 CE and 9 AA families, 18 CBM families and 27 GT families, including, respectively, at least 20, 4, 5, 9 and 3 families belonging to the PCWDE (0 for the GT families) [3,25,27,33,46,50,51]. It has been reported that more than 34% of the putative secreted proteins of *N. parvum* and *D. seriata* genomes are enzymes involved in cell wall degradation, and the same is true for other grapevine trunk pathogens. Thus, the rich and diverse repertoire of CAZymes in Botryosphaeriaceae appears to be associated with their ability to colonize woody plants. Although CAZyme repertoire is shared by several pathogens associated with GTDs, a specific expression pattern of these enzymes was evidenced after infection with fungi responsible for Esca (*Fomitiporia mediterranea*, *Stereum hirsutum*, *Phaeoacremonium chlamydospora* and *P. minimum*), Eutypa dieback (*Eutypa lata*) and Botryosphaeria dieback (*B. dothidea*, *D. seriata* and *N. parvum*). Therefore, it seems that CAZyme expression signature is characteristic of each pathosystem causing distinct symptoms [46,61]. The five classes (GHs, PLs, CEs, AAs and CBMs) targeting mainly celluloses, hemicelluloses, lignin and pectin are the most expanded in Botryosphaeriaceae genomes. These superfamilies are more enriched in *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species than in other Botryosphaeriaceae such as *Diplodia*, *Dothiorella* and *Lasiodiplodia* [25,27,33,50]. Interestingly, depending on the *Botryosphaeria* strain, the most expanded CAZyme families target mainly hemicelluloses and lignin according to Wang et al. (PG45 and CBS 115476 *B. dothidea* strains) [25], while those described by Yu et al. [33] mainly degrade cellulose and pectin, showing the variability that can exist in this species.

Literature reports a variable number of PCWDE-coding genes within a genus. This can be explained by (i) the inter- and intraspecific diversity, and (ii) the classification width of CAZymes in PCWDE which can vary from 46 [33] to 52 [51] members. Considering the smallest classification of PCWDE-coding genes (i.e., 46 families), the genera *Neofusicoccum* and *Botryosphaeria* include the highest number of enzymes of interest, between 230 and 457, and between 235 and 356, respectively, followed by *Lasiodiplodia* (222–319), *Diplodia* (190–259) and *Dothiorella* (169–274). Among this classification, 9 families are the most expanded in these genera: AA9, GH31 and GH43, targeting cellulose and hemicelluloses, AA1, AA3 and AA7, targeting lignin, GH28, PL1 and PL3, targeting pectin, and CE5, targeting cutin [10,25,27,33,46,50,51]. Compared with other species within their genera, *D. seriata*, *L. theobromae* and *N. parvum* appeared as the species with the most PCWDE (with 243, 273 and 352 genes on average, respectively). On the other hand, *B. dothidea* (296), *D. mutila* (222), *D. viticola* (169) and *N. mediterraneum* (239) species are part of those with the less, representing for all these species between 42% and 56% of their CAZymes-coding genes [10,25,27,33,46,51].

Transcriptomic analysis of *L. theobromae* revealed that a lot of genes related to plant cell wall degradation are preferentially expressed in planta, especially in grapevine [10,62,63] and in cacao leaves [52], showing their role in fungi pathogenicity and plant colonization. To deepen the knowledge on *L. theobromae* virulence, Chethana et al. (2016) characterized the GH28 family by overexpression and silencing methods, and concluded that it induced an increase or a decrease of lesion lengths, respectively, after *L. theobromae* inoculation on grapevine shoots [64]. In the same way, a cutinase from *Botryosphaeria dothidea* (Bdo\_10846) was shown to be involved in the fungus aggressiveness and in the development of wart symptoms on apple trees [65]. Finally, a study of *N. parvum* pathogenicity factors led



to the identification of co-expressed gene clusters during grapevine infection that were enriched in both genes encoding PCWDEs and genes associated with secondary metabolism, suggesting a co-regulation that supports its aggressiveness. In addition, pairwise statistical testing of differential expression, followed by co-expression network analysis, revealed that physically clustered genes coding for putative virulence functions were induced depending on the substrate or stage of plant infection. Co-expressed gene clusters were significantly enriched not only in genes associated with secondary metabolism, but also in those associated with cell wall degradation, suggesting that dynamic co-regulation of transcriptional networks contributes to multiple aspects of *N. parvum* virulence. In total, 89 genes belonging to BCGs, as well as seven P450- and 20 PCWDE-encoding genes, were found to be expressed exclusively in planta [51].

### 2.3. Transporters Are Virulence Factors Enabling Fungal Nutrition and Resistance

Like many plant pathogenic fungi, Botryosphaeriaceae rely on transmembrane transporters to (i) assimilate sugars from plant wall degradation by CAZymes, as well as other nutrients such as amino acids or lipids, (ii) secrete secondary metabolites or compounds involved in pathogenicity or (iii) avoid accumulation of toxic compounds from the plant or anti-fungal treatments [66–68]. Most genomes in the Botryosphaeriaceae family are rich in genes belonging to the transporter family, a number of which are shared with species characterized as opportunistic [10]. In general, the number of cellular transporters varies from one species to another, according to the studies, from 2419 to 2490 in *L. theobromae* [10,27], from 1526 to 2588 in *N. parvum* [27,46,51], 2549 in *N. mediterraneum*, 2505 in *B. dothidea* and from 1345 to 2238 in *D. seriata* [27,46]. Similarly to *Colletotrichum* or *Fusarium* species, membrane transporters in the Botryosphaeriaceae family are found to be more abundant (over 917 in *L. theobromae*, being the richest in such transporters among Botryosphaeriaceae) than in other pathogenic fungi such as *M. oryzae*, *B. graminis* or *A. brassicicola* [10,52]. Furthermore, the transporter family is under positive or negative selection pressure regarding the species. The constant need to adapt to a changing environment is notably allowed by the evolution of transporter families. Thus, the gene families encoding transporters in species such as *L. theobromae* and *B. dothidea* show significant expansions, while *D. seriata* and *N. parvum* are contracting these families [27]. Interestingly, the low host specificity and broad geographical distribution of fungi from the Botryosphaeriaceae family such as *L. theobromae*, able to colonize various phylum such as Pinophyta, Magnoliids, Monocots and Dicots, indicate their ability to use different forms of nutrients [3,27,69,70].

Transporters can be categorized in nine classes including channels or pores that facilitate passive transport, primary active transporters ATP-driven and secondary active or electrochemical potential-driven transporters [67,71–74]. The latter category shows the highest number of genes across Botryosphaeriaceae species, representing up to 31 to 42% annotated transporters depending on the studies [27,46]. Among these, the major facilitator superfamily (MFS; transporter classification database (TCDB), 2.A.1) transport simple sugars, oligosaccharides, inositols, drugs, amino acids, nucleosides, organophosphate esters, Krebs cycle metabolites and a large variety of organic and inorganic anions and cations in solution in response to chemiosmotic ion gradients or proton motive force [75]. This family is found to be particularly enriched in the Botryosphaeriaceae family compared to other transporter families, as described for Ascomycetes in general [27,67], and represents between 455 and 514 predicted genes in the genera *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* and *Botryosphaeria* where they are found to be more numerous than in other species from the Botryosphaeriaceae family [27,33,51,52]. In planta, studies evidenced up-regulation of *L. theobromae* and *N. parvum* genes from the MFS family in particular those transporting sugars during infection of grapevine, and sometimes as soon as 24 h post inoculation [51,62,63], as observed in other genera such as *Colletotrichum* [24,76,77]. Primary active transporters represent the second most abundant transporter category with up to 27% annotated transporters. Among these, the ATP-binding cassette (ABC) superfamily (TCDB, 3.A.1) gathers multicomponent transporters containing highly conserved amino

acid motifs, capable of transporting across membranes, in response to ATP hydrolysis, both small molecules and macromolecules including toxins, metal ions, fatty acids and secondary metabolites [67,78,79]. The Botryosphaeriaceae genome known to have the highest number of genes encoding ABC-transporters is *Dothiorella sarmentorum* (134 genes compared to around 60 for other Botryosphaeriaceae species, similarly to *Colletotrichum* and *Fusarium*) [27,51,80]. During the infection of grapevine, four ABC transporters were up-regulated in *L. theobromae*, suggesting their role in fungal pathogenesis [62]. Within this class of transporters, the pleiotropic drug resistance (PDR) subfamily, that is described as providing a way to expel the drugs and associated with azole resistance, was up-regulated by *L. theobromae* during grapevine infection [10]. In addition to drug, toxin or phytotoxin resistance characteristics conferred by both MFS and ABC transporters to fungi, descriptions of their involvement in secondary metabolism are also provided in literature. These families are notably identified in several secondary metabolism gene clusters of *B. dothidea* and might be involved in the exportation of secondary metabolites [25].

#### 2.4. Expansion of Genes Associated with Secondary Metabolism and Production of Highly Diversified Phytotoxic Metabolites

##### 2.4.1. Genomic and Transcriptomic Studies of Secondary Metabolic Pathways

Overall, analysis of all available Botryosphaeriaceae genomes show richness in secondary metabolite biosynthetic gene clusters compared to other Dothideomycete genomes [10,81]. Morales Cruz et al. (2018) identified 252 gene clusters involved in the synthesis and secretion of secondary metabolites in grapevine trunk pathogens, including Botryosphaeriaceae. The total number of genes related to secondary metabolism ranged from 142 in *D. seriata* to 353 in *N. parvum* [61]. Secondary metabolite synthesis probably represents an important virulence factor during wood colonization, since gene families specifically expanded in Ascomycete trunk pathogens were significantly enriched in genes associated with secondary metabolism [46]. The most abundant gene cluster in Botryosphaeriaceae was represented by polyketide synthases (PKS), followed by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), terpene synthases (TS) and PKS-NRPS hybrid clusters [51,81]. Polyketide synthases constitute an enzyme family responsible for the synthesis of polyketides from acyl CoA. Polyketides are a major class of naturally occurring secondary metabolites with diverse chemical structures and broad-spectrum functions. Non-ribosomal peptide synthetases generate non-ribosomal peptides from amino acids and are involved in the biosynthesis of peptide secondary metabolites. Finally, terpene synthases synthesize terpenes from activated isoprene units [82,83]. Recently, the number of PKS genes was evaluated in several Botryosphaeriaceae genera and revealed that the largest number (from 23 to 31) was reached in *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* and *Macrophomina* while *Diplodia* and *Dothiorella* contained the least numbers (11 and 8, respectively) [33].

Among gene families associated with secondary metabolism, [46] also found different classes of cytochrome P450 genes abundant in Ascomycete trunk pathogens such as *N. parvum* and *D. seriata*. They reported 212 and 122 genes encoding P450 in the genomes of *N. parvum* and *D. seriata*, respectively. Similarly, Yu et al. (2022) reported that Botryosphaeriaceae contained the largest number of genes encoding cytochrome P450, especially *N. parvum* with 267 genes [33]. In fungi, P450s are involved in housekeeping functions such as synthesis of essential membrane lipids and are also key players in the synthesis of secondary metabolites and detoxification of xenobiotic compounds [84]. In addition, expansion of P450 gene family could explain the wide host range of Botryosphaeriaceae fungi [33].

A recent transcriptome profiling of *N. parvum* virulence factor repertoire in the presence of grapevine wood showed that co-expressed gene clusters were enriched in genes associated with secondary metabolism [51]. Transcriptional dynamics during woody stem colonization further revealed that the activation of secondary metabolism takes place during later stages of infection since expression of genes associated with this pathway peaked



only two weeks after inoculation. Co-expressed gene clusters belonged to the mevalonate pathway involved in the biosynthesis of sterols and terpenoids. They also comprised epoxide hydrolases involved in detoxication of plant aromatic compounds and in the synthesis of toxins [51].

#### 2.4.2. Diversity of Secondary Metabolite Synthesis

In accordance with the expansion of genes involved in secondary metabolite synthesis, Botryosphaeriaceae produce a high diversity of secondary metabolites considered as toxins. These toxins are thought to play an essential role in the fungi pathogenicity and virulence. Metabolites produced by *Neofusicoccum* species belong to different classes of natural products: 5,6-dihydro-2-pyrones, cyclohexenones, fatty acids, melleins, myrtucommulones, naphthalenones, naphthoquinones, phenols and alcohols and sesquiterpenes [85]. One could hypothesize that specific secondary metabolite profile could reflect different aggressiveness of various Botryosphaeriaceae strains. However, characterization of secreted secondary metabolites reported that different isolates of *N. parvum* have a similar profile. Structure elucidation showed that metabolites belonged to four different chemical families: dihydrotoluquinones (terremutin and derivatives), epoxy lactones (asperlin and dia-asperlin) dihydroisocoumarins (mellein and hydroxymelleins) and hydroxybenzoic acids (methylsalicylic acid hydroxypropyl salicylic acid) [29]. Mellein and hydroxymelleins were also isolated from culture filtrate from *D. seriata* and mellein was further detected in grapevine wood infected by *D. seriata* [86]. A number of secondary metabolites with high structure diversity are also produced by *L. theobromae*, belonging to diketopiperazines, jasmonates, lactones and mellein. In detail, *L. theobromae* synthesizes compounds belonging to cyclohexenes and cyclohexenones, depsidones, diketopiperazines, indoles, jasmonates, lactones, melleins, phenyl and phenol derivatives, 2-(2-Phenylethyl)chromones, phytohormones and preussomerins [69].

Among the different classes of metabolites, diverse free fatty acids and their esters were identified in cultures of Botryosphaeriaceae, including *L. theobromae*, *N. parvum* and *N. vitifusiforme* [87,88]. Fatty acids are precursors for many secondary metabolites involved in fungal virulence, such as jasmonates, and they also constitute a source of acetyl CoA for polyketide-type metabolites [69,87,89].

### 3. Various Effects of Botryosphaeriaceae Pathogenicity Factors on Grapevine Metabolism and Defenses

A number of studies have reported the induction of defense responses in different grapevine tissues (especially leaves and wood) after natural or artificial inoculation with Botryosphaeriaceae pathogens [47]. However, despite the activation of plant defense mechanisms, it seems that GTD associated fungi overcome these responses and efficiently colonize the wood. The subsequent paragraphs discuss about the action of Botryosphaeriaceae pathogenicity factors on grapevine, which could explain how the fungi finally prevail on persistent plant immunity, at the level of gene regulation, metabolite production, cell functions and symptom development.

#### 3.1. Phytotoxic Effect of Secondary Metabolites and Small Proteins

In grapevine, Botryosphaeria dieback is associated with several symptoms such as wood vascular discoloration, vascular cankers, leaf chlorosis and bud necrosis. Since most of secondary metabolites produced by Botryosphaeriaceae exert a phytotoxic activity, these symptoms are likely the result of fungal toxin production. Indeed, since GTD fungi are never detected in leaves of diseased grapevines, it has been hypothesized that toxin production in wood and migration to leaves could be involved in the appearance of GTD leaf symptoms. In addition, different Botryosphaeriaceae species produce similar metabolite arsenal which might explain the symptom similarity induced by these fungi.

Mellein and its derivatives have been detected in most strains isolated from grapevines affected by trunk diseases. Phytotoxic activity of several toxins has been tested via necrosis

induction on grapevine leaves or leaf discs. Mellein and its derivatives induce necrosis on grapevine leaf discs, with (R)-(-)-3-hydroxmellein being the most toxic compound [29]. Among cyclohexenones, the most active metabolites are cyclobotryoxide, terremitin and epi-sphaeropsidone, while among naphthalenones, botryosphaerone represents the principal phytotoxic compound [85,90].

Phytotoxic effect of toxins has been mainly studied in vitro and fungal toxins have been rarely identified in infected grapevines. However, terremitin and mellein were detected in the wood of grapevines with *Botryosphaeria dieback* symptoms, and therefore, these compounds are likely involved in wood discoloration and necrosis symptoms [29]. In addition, in a study investigating life traits of different *Botryosphaeriaceae*, [91] showed that *N. parvum* isolate PER20 virulence could be related to a specific metabolite profile, including terremitin and salicylic acid derivatives.

On the other hand, involvement of fungal toxins in GTD symptom expression was recently questioned. Reveglia et al. (2021) showed that mellein is detected in wood artificially or naturally inoculated with *D. seriata*, and that the toxin amount is correlated to the amount of pathogen quantified by qPCR. However, no translocation of mellein to grapevine tissues free of pathogen (leaves) was evidenced, showing that this metabolite may not be responsible for foliar symptom expression [92]. In another recent study, Trotel Aziz et al. (2022) characterized several *N. parvum* mutant strains, impaired in the production of mellein or terremitin. These mutants remained pathogenic on grapevine, showing that these two metabolites alone are not essential for fungal virulence. However, they could play a quantitative role in the infection process [93]. Apart from secondary metabolites, SSPs may also be involved in the induction of wood necrosis and foliar symptoms of GTD, as discussed in the above paragraph.

Overall, it is likely that the virulence of fungi associated to GTD results from a synergistic effect of all pathogenicity factors.

### 3.2. Manipulation of Plant Defense Pathways by Pathogenicity Factors

#### 3.2.1. Inhibition of Programmed Cell Death

In a recent study, Zhang et al. [30] identified 119 candidate effectors from *Botryosphaeria dothidea*. The effect of these effectors on plant cell death was investigated after transient expression with *A. tumefaciens* in the *N. benthamiana* non-host system. Most of the effectors (116) inhibited the programmed cell death induced by BAX1. Seven effectors were further studied and found to completely inhibit PCD triggered by the INF1, MKK1 and NPK1 elicitors. These results suggest that effectors from *B. dothidea* could suppress PAMP triggered immunity in order to escape from plant defense and efficiently colonize the host [30]. A disturbance on cytoskeleton early-stage re-arrangement and later strong induction on oxidation reduction process have been reported on *D. seriata* and *N. parvum* infected grapevine suspension cells [94]. Which were then confirmed by direct evidence on PCD marker genes in grapevine on tissue based single cell sequencing (Guan et al., manuscript preparing).

#### 3.2.2. Interaction with Plant Hormonal Pathways

Transcriptome analysis of *L. theobromae* in the presence of grapevine wood revealed an upregulation of genes involved in salicylic acid and phenylpropanoid degradation (encoding salicylate hydroxylase, intradiol ring cleavage dioxygenase and fumarylacetoacetase). This upregulation was enhanced by high temperature. Activation of L tyrosine catabolism pathway could lead to inhibition of SA pathway, favoring fungal development especially during heat stress [63].

Other than the inhibition of plant defensive pathways, *Botryosphaeriaceae* are known to produce fatty acids and jasmonates. Free fatty acids and jasmonates were identified in the culture filtrate from *L. theobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *N. vitifusiforme* [69,87]. Linoleic acid and jasmonates could take part in signaling pathway during grapevine colonization by *Botryosphaeriaceae*. Indeed, a growth regulator activity on tobacco seedlings



has been shown for fatty acid esters from *L. theobromae* [88]. On another hand, high jasmonate concentration is known to have an antagonistic effect on the SA pathway [95]. Hence it could be hypothesized that in addition to a toxic effect, jasmonates inhibit the SA pathway involved in stimulation of plant defenses. Downregulation of VvWRKY70, a putative central component of the SA pathway after treatment of *V. rupestris* cells with *D. seriata* secreted compounds [94] may be in accordance with this hypothesis. However, the respective contributions of SA and JA pathways in grapevine resistance/sensitivity to Botryosphaeriaceae are not fully elucidated since no plant mutant impaired in one or the other pathway is known. Nonetheless, resistance of apple to *B. dothidea*, the causing agent of apple ring rot would involve the SA pathway [96].

### 3.2.3. Phytoalexin Degradation

Botryosphaeriaceae fungi involved in GTD are known to secrete enzymes involved in wood decay that could also participate in phytoalexin degradation. Indeed it has been reported that *N. parvum* and *D. seriata* are able to quickly metabolize resveratrol and  $\delta$ -viniferin, two major stilbene phytoalexins of grapevine [31,97]. Interestingly, the highest metabolizing activity was measured for *D. seriata* in accordance with a high laccase activity measured in extracellular protein extracts in the presence of grapevine wood. These results suggest that phenolic compound decay activity could help GTD fungi to bypass defense responses of the host [97]. Other studies are in accordance with this hypothesis. Transcriptome analysis of *L. theobromae* during grapevine infection showed an upregulation of genes involved in plant phenylpropanoid precursor degradation encoding salicylate hydroxylase, tyrosinase, (homo)gentisate dioxygenase and fumarylacetoacetate hydrolases [62,63]. Massonnet et al. (2016) also reported an early upregulation of salicylate hydroxylase expression during woody stem colonization by *N. parvum*, suggesting that this fungus is able to overcome host immunity via SA and phenolic metabolization [51].

### 3.3. Reactions to Pathogenicity Factors at Cellular Level

The above discussed pathogenicity factors are aimed at the plant xylem, where formed by the dead cells such as vessels belonging to vascular tissue or living cells such as paratracheal parenchyma, fibers and rays (For review of the classic CODIT in grapevine, compartmentalization of decay in trees, see [98]). Therefore, the resource allocation could be subjected to a trade-off between vessel occlusion and defense reaction in conjunctive living tissues in grapevine stem. As well as the signaling transduction cascade within single cells and amongst the symplasts through plasmodesmata. Grapevine secondary cell walls can be degraded/impeded by substantial amounts of enzymes produced by GTD associated Botryosphaeriaceae. Pectin rich pit membranes connecting xylem vessels, as well as gels secreted in vessels can be degraded by compounds with pectinolytic activity, benefiting from already existing openings in cell walls. Pathogens can also spread out from a parenchyma cell [99]. PCWDEs can act both intra- or extracellularly, the latter being the most involved in the degradation of primary and secondary plant cell walls [27,43–48]. In contrast, grapevine cell wall thickening in paratracheal parenchyma impede lateral hyphae penetration in xylem parenchyma cells, and cell wall modifications in living fibers and ray parenchyma is associated with suberin rather than lignin deposits. Suberized layers in ray parenchyma could efficiently restrict the fungus spread from one fascicular portion to another [100]. Cells infected by *L. theobromae* are described with reduced hardness, less materials for cell wall establishment, covalent/ion soluble pectin, fibers, but with higher value of water soluble pectin and cell wall polysaccharide-disassembling enzymes [101]. Other pathogenicity factors such as cutinases were also described as involved in virulence of *B. dothidea*, the plant infected by this pathogen showed a prompt increase of phellem layer where the infecting hyphae sieged, together with a newly formed secondary cork layer and callose formation [65].

Recently, based on the classic zigzag model, studies using suspension cell lines and callus cells to consider the cells in a naïve system can simplify the model focusing on the

host responses from detection of transcription and metabolites. After the outermost defense barrier was broken through by the pathogens, it is the plasma membrane that act as the primary site in the symplast, where pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are perceived.  $Ca^{2+}$  signals are diverse, depending on plant species and process specificity in PTI and ETI. A transient (within minutes)  $Ca^{2+}$  elevation has been reported on grapevine and other species ([102]; Guan et al., manuscript preparing). Subsequently, microtubule rearrangement, calcium signal amplification, phospholipid signaling and ethylene signaling have been reported to be triggered by Botryosphaeriaceae pathogen [94,103,104]. During wounding, some hormone signals, e.g., ethylene, have been showed to regulate occlusion of vessels via tylose development, constituting a barrier for fungal spread in the plant [105]. The interdisciplinary research utilizing the biotechnology such as single-cell sequencing and technics from material science such as quasi-in situ characterization can meet the above goal to develop new insights in certain tissues in stems affected by casual agents of GTD.

#### 4. Conclusions

This review evidenced the recent advances in the deciphering of pathogenicity factors of Botryosphaeriaceae associated with GTD. The highlighted researches indicate that the classes of genes encoding small secreted proteins, enzymes associated with carbohydrate degradation, genes associated with secondary metabolism and transporters (closely related to the two last classes) are involved in the pathogenicity of Botryosphaeriaceae. Furthermore, the differential combination of these different factors contributes to explain the differential aggressiveness of species within this family affecting grapevines. Next generation sequencing provided tremendous amounts of data that help to better understand the pathosystem at a big scale, but further functional analyses will enable to better understand the specific role of candidate pathogenicity factors.

**Funding:** M.B. PhD fellowship is financed by the French Brittany region and the French ministry of research. A.G. PhD fellowship is financed by the French ministry of research. X.G., J.L. and X.T. research is supported by projects of the National Natural Science Foundation of China 31901990, and the Natural Science Foundation of Chongqing cstc2021jcyj-msxmX0994.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Batista, E.; Lopes, A.; Alves, A. Botryosphaeriaceae Species on Forest Trees in Portugal: Diversity, Distribution and Pathogenicity. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *158*, 693–720. [\[CrossRef\]](#)
- Mehl, J.W.M.; Slippers, B.; Roux, J.; Wingfield, M.J. Overlap of Latent Pathogens in the Botryosphaeriaceae on a Native and Agricultural Host. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, 405–419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marsberg, A.; Kemler, M.; Jami, F.; Nagel, J.H.; Postma-Smidt, A.; Naidoo, S.; Wingfield, M.J.; Crous, P.W.; Spatafora, J.W.; Hesse, C.N.; et al. *Botryosphaeria dothidea*: A Latent Pathogen of Global Importance to Woody Plant Health. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18*, 477–488. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Linaldeddu, B.T.; Deidda, A.; Scanu, B.; Franceschini, A.; Serra, S.; Berraf-Tebbal, A.; Zouaoui Boutiti, M.; Ben Jamâa, M.L.; Phillips, A.J.L. Diversity of Botryosphaeriaceae Species Associated with Grapevine and Other Woody Hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with Descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* Sp. Nov. *Fungal Divers.* **2015**, *71*, 201–214. [\[CrossRef\]](#)
- Nagel, J.H.; Wingfield, M.J.; Slippers, B. Next-Generation Sequencing Provides Important Insights into the Biology and Evolution of the Botryosphaeriaceae. *Fungal Biol. Rev.* **2021**, *38*, 25–43. [\[CrossRef\]](#)
- Burgess, T.I.; Tan, Y.P.; Gamas, J.; Edwards, J.; Scarlett, K.A.; Shuttleworth, L.A.; Daniel, R.; Dann, E.K.; Parkinson, L.E.; Dinh, Q.; et al. Current Status of the Botryosphaeriaceae in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **2019**, *48*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
- Phillips, A.J.L.; Alves, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Groenewald, J.Z. Crous The Botryosphaeriaceae: Genera and Species Known from Culture. *Stud. Mycol.* **2013**, *76*, 51–167. [\[CrossRef\]](#)
- Urbez-Torres, J.R. The Status of Botryosphaeriaceae Species Infecting Grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* **2011**, *50*, 5–45.
- Slippers, B.; Wingfield, M.J. Botryosphaeriaceae as Endophytes and Latent Pathogens of Woody Plants: Diversity, Ecology and Impact. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, *21*, 90–106. [\[CrossRef\]](#)



10. Yan, J.Y.; Zhao, W.S.; Chen, Z.; Xing, Q.K.; Zhang, W.; Chethana, K.W.T.; Xue, M.F.; Xu, J.P.; Phillips, A.J.L.; Wang, Y.; et al. Comparative Genome and Transcriptome Analyses Reveal Adaptations to Opportunistic Infections in Woody Plant Degrading Pathogens of Botryosphaeriaceae. *DNA Res.* **2018**, *25*, 87–102. [[CrossRef](#)]
11. Songy, A.; Fernandez, O.; Clément, C.; Larignon, P.; Fontaine, F. Grapevine Trunk Diseases under Thermal and Water Stresses. *Planta* **2019**, *249*, 1655–1679. [[CrossRef](#)]
12. Hrycan, J.; Hart, M.; Bowen, P.; Forge, T.; Úrbez-Torres, J.R. Grapevine Trunk Disease Fungi: Their Roles as Latent Pathogens and Stress Factors That Favour Disease Development and Symptom Expression. *Phytopathol. Mediterr.* **2020**, *59*, 395–424.
13. Hilário, S.; Lopes, A.; Santos, L.; Alves, A. Botryosphaeriaceae Species Associated with Blueberry Stem Blight and Dieback in the Centre Region of Portugal. *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *156*, 31–44. [[CrossRef](#)]
14. Alves, A.; Phillips, A.J.L.; Henriques, I.; Correia, A. Rapid Differentiation of Species of Botryosphaeriaceae by PCR Fingerprinting. *Res. Microbiol.* **2007**, *158*, 112–121. [[CrossRef](#)]
15. Yan, J.-Y.; Xie, Y.; Zhang, W.; Wang, Y.; Liu, J.-K.; Hyde, K.D.; Seem, R.C.; Zhang, G.-Z.; Wang, Z.-Y.; Yao, S.-W.; et al. Species of Botryosphaeriaceae Involved in Grapevine Dieback in China. *Fungal Divers.* **2013**, *61*, 221–236. [[CrossRef](#)]
16. Berraf-Tebbal, A.; Mahamedi, A.E.; Aigoun-Mouhous, W.; Špetik, M.; Čechová, J.; Pokluda, R.; Baránek, M.; Eichmeier, A.; Alves, A. *Lasiodiplodia mitidjana* Sp. Nov. and Other Botryosphaeriaceae Species Causing Branch Canker and Dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232448. [[CrossRef](#)]
17. Cataldo, E.C.; Salvi, L.S.; Paoli, F.P.; Fucile, M.F.; Masciandaro, G.M.; Manzi, D.M.; Masini, C.M.M.; Mattii, G.B.M. Effects of Natural Clinoptilolite on Physiology, Water Stress, Sugar, and Anthocyanin Content in Sanforte (*Vitis vinifera* L.) Young Vineyard. *J. Agric. Sci.* **2021**, *159*, 488–499. [[CrossRef](#)]
18. Cataldo, E.; Salvi, L.; Paoli, F.; Fucile, M.; Mattii, G.B. Effects of Defoliation at Fruit Set on Vine Physiology and Berry Composition in Cabernet Sauvignon Grapevines. *Plants* **2021**, *10*, 1183. [[CrossRef](#)]
19. Tyagi, K.; Maoz, I.; Lapidot, O.; Kochanek, B.; Butnaro, Y.; Shlissel, M.; Lerno, L.; Ebeler, S.E.; Lichter, A. Effects of Gibberellin and Cytokinin on Phenolic and Volatile Composition of Sangiovese Grapes. *Sci. Hort.* **2022**, *295*, 110860. [[CrossRef](#)]
20. Bertsch, C.; Larignon, P.; Farine, S.; Clément, C.; Fontaine, F. The Spread of Grapevine Trunk Disease. *Science* **2009**, *324*, 721. [[CrossRef](#)]
21. Gramaje, D.; Baumgartner, K.; Halleen, F.; Mostert, L.; Sosnowski, M.R.; Úrbez-Torres, J.R.; Armengol, J. Fungal Trunk Diseases: A Problem beyond Grapevines? *Plant Pathol.* **2016**, *65*, 355–356. [[CrossRef](#)]
22. Gramaje, D.; Úrbez-Torres, J.R.; Sosnowski, M.R. Managing Grapevine Trunk Diseases with Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 12–39. [[CrossRef](#)]
23. Kaplan, J.; Travadon, R.; Cooper, M.; Hillis, V.; Lubell, M.; Baumgartner, K. Identifying Economic Hurdles to Early Adoption of Preventative Practices: The Case of Trunk Diseases in California Winegrape Vineyards. *Wine Econ. Policy* **2016**, *5*, 127–141. [[CrossRef](#)]
24. O’Connell, R.J.; Thon, M.R.; Hacquard, S.; Amyotte, S.G.; Kleemann, J.; Torres, M.F.; Damm, U.; Buiate, E.A.; Epstein, L.; Alkan, N.; et al. Lifestyle Transitions in Plant Pathogenic *Colletotrichum* Fungi Deciphered by Genome and Transcriptome Analyses. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1060–1065. [[CrossRef](#)]
25. Wang, B.; Liang, X.; Gleason, M.L.; Zhang, R.; Sun, G. Comparative Genomics of *Botryosphaeria dothidea* and *B. kuwatsukai*, Causal Agents of Apple Ring Rot, Reveals Both Species Expansion of Pathogenicity-Related Genes and Variations in Virulence Gene Content during Speciation. *IMA Fungus* **2018**, *9*, 243–257. [[CrossRef](#)]
26. Batista, E.; Lopes, A.; Alves, A. What Do We Know about Botryosphaeriaceae? An Overview of a Worldwide Cured Dataset. *Forests* **2021**, *12*, 313. [[CrossRef](#)]
27. Garcia, J.F.; Lawrence, D.P.; Morales-Cruz, A.; Travadon, R.; Minio, A.; Hernandez-Martinez, R.; Rolshausen, P.E.; Baumgartner, K.; Cantu, D. Phylogenomics of Plant-Associated Botryosphaeriaceae Species. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 652802. [[CrossRef](#)]
28. Chethana, K.W.T.; Li, X.; Zhang, W.; Hyde, K.; Yan, J. Trail of Decryption of Molecular Research on Botryosphaeriaceae in Woody Plants. *Phytopathol. Mediterr.* **2016**, *55*, 147–171. [[CrossRef](#)]
29. Abou-Mansour, E.; Débieux, J.-L.; Ramírez-Suero, M.; Bénard-Gellon, M.; Magnin-Robert, M.; Spagnolo, A.; Chong, J.; Farine, S.; Bertsch, C.; L’Haridon, F.; et al. Phytotoxic Metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a Pathogen of *Botryosphaeria* Dieback of Grapevine. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 207–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zhang, C.-J.; Wang, S.-X.; Liang, Y.-N.; Wen, S.-H.; Dong, B.-Z.; Ding, Z.; Guo, L.-Y.; Zhu, X.-Q. Candidate Effectors from *Botryosphaeria dothidea* Suppress Plant Immunity and Contribute to Virulence. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Labois, C.; Stempien, E.; Schneider, J.; Schaeffer-Reiss, C.; Bertsch, C.; Goddard, M.-L.; Chong, J. Comparative Study of Secreted Proteins, Enzymatic Activities of Wood Degradation and Stilbene Metabolization in Grapevine *Botryosphaeria* Dieback Fungi. *J. Fungi* **2021**, *7*, 568. [[CrossRef](#)]
32. Cobos, R.; Calvo-Peña, C.; Álvarez-Pérez, J.M.; Ibáñez, A.; Diez-Galán, A.; González-García, S.; García-Angulo, P.; Acebes, J.L.; Coque, J.J.R. Necrotic and Cytolytic Activity on Grapevine Leaves Produced by Nep1-Like Proteins of *Diplodia seriata*. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1282. [[CrossRef](#)]
33. Yu, C.; Diao, Y.; Lu, Q.; Zhao, J.; Cui, S.; Xiong, X.; Lu, A.; Zhang, X.; Liu, H. Comparative Genomics Reveals Evolutionary Traits, Mating Strategies, and Pathogenicity-Related Genes Variation of Botryosphaeriaceae. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 800981. [[CrossRef](#)]



34. de Jonge, R.; Bolton, M.D.; Thomma, B.P. How Filamentous Pathogens Co-Opt Plants: The Ins and Outs of Fungal Effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2011**, *14*, 400–406. [[CrossRef](#)]
35. Vázquez-Avendaño, R.; Rodríguez-Haas, J.B.; Velázquez-Delgado, H.; Rosas-Saito, G.H.; Hernández-Domínguez, E.E.; Sánchez-Rangel, D. Insights of the *Neofusicoccum Parvum*–*Liquidambar Styraciflua* Interaction and Identification of New Cysteine-Rich Proteins in Both Species. *J. Fungi* **2021**, *7*, 1027. [[CrossRef](#)]
36. Zhang, Z.-N.; Wu, Q.-Y.; Zhang, G.-Z.; Zhu, Y.-Y.; Murphy, R.W.; Liu, Z.; Zou, C.-G. Systematic Analyses Reveal Uniqueness and Origin of the CFEM Domain in Fungi. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13032. [[CrossRef](#)]
37. Harishchandra, D.L.; Zhang, W.; Li, X.; Chethana, K.W.T.; Hyde, K.D.; Brooks, S.; Yan, J.; Peng, J. A LysM Domain-Containing Protein LtLysM1 Is Important for Vegetative Growth and Pathogenesis in Woody Plant Pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Pathol. J.* **2020**, *36*, 323–334. [[CrossRef](#)]
38. Kombrink, A.; Thomma, B.P.H.J. LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLOS Pathog.* **2013**, *9*, e1003769. [[CrossRef](#)]
39. Rovenich, H.; Zuccaro, A.; Thomma, B.P.H.J. Convergent Evolution of Filamentous Microbes towards Evasion of Glycan-Triggered Immunity. *New Phytol.* **2016**, *212*, 896–901. [[CrossRef](#)]
40. Nazar Pour, F.; Cobos, R.; Rubio Coque, J.J.; Serôdio, J.; Alves, A.; Félix, C.; Ferreira, V.; Esteves, A.C.; Duarte, A.S. Toxicity of Recombinant Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins (NLPs) from *Neofusicoccum parvum*. *Toxins* **2020**, *12*, 235. [[CrossRef](#)]
41. Qutob, D.; Kemmerling, B.; Brunner, F.; Küfner, I.; Engelhardt, S.; Gust, A.A.; Luberacki, B.; Seitz, H.U.; Stahl, D.; Rauhut, T.; et al. Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Plant Cell* **2006**, *18*, 3721–3744. [[CrossRef](#)]
42. Schouten, A.; Van Baarlen, P.; Van Kan, J.A.L. Phytotoxic Nep1-like Proteins from the Necrotrophic Fungus *Botrytis Cinerea* Associate with Membranes and the Nucleus of Plant Cells. *New Phytol.* **2008**, *177*, 493–505. [[CrossRef](#)]
43. van den Brink, J.; de Vries, R.P. Fungal Enzyme Sets for Plant Polysaccharide Degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1477–1492. [[CrossRef](#)]
44. Kubicek, C.P.; Starr, T.L.; Glass, N.L. Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 427–451. [[CrossRef](#)]
45. Gibson, D.M.; King, B.C.; Hayes, M.L.; Bergstrom, G.C. Plant Pathogens as a Source of Diverse Enzymes for Lignocellulose Digestion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 264–270. [[CrossRef](#)]
46. Morales-Cruz, A.; Amrine, K.C.H.; Blanco-Ulate, B.; Lawrence, D.P.; Travadon, R.; Rolshausen, P.E.; Baumgartner, K.; Cantu, D. Distinctive Expansion of Gene Families Associated with Plant Cell Wall Degradation, Secondary Metabolism, and Nutrient Uptake in the Genomes of Grapevine Trunk Pathogens. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 469. [[CrossRef](#)]
47. Bertsch, C.; Ramírez-Suero, M.; Magnin-Robert, M.; Larignon, P.; Chong, J.; Abou-Mansour, E.; Spagnolo, A.; Clément, C.; Fontaine, F. Grapevine Trunk Diseases: Complex and Still Poorly Understood. *Plant Pathol.* **2013**, *62*, 243–265. [[CrossRef](#)]
48. Lyu, X.; Shen, C.; Fu, Y.; Xie, J.; Jiang, D.; Li, G.; Cheng, J. Comparative Genomic and Transcriptional Analyses of the Carbohydrate-Active Enzymes and Secretomes of Phytopathogenic Fungi Reveal Their Significant Roles during Infection and Development. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15565. [[CrossRef](#)]
49. Islam, M.S.; Haque, M.S.; Islam, M.M.; Emdad, E.M.; Halim, A.; Hossen, Q.M.M.; Hossain, M.Z.; Ahmed, B.; Rahman, M.S.; et al. Tools to Kill: Genome of One of the Most Destructive Plant Pathogenic Fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 493. [[CrossRef](#)]
50. Nagel, J.H.; Wingfield, M.J.; Slippers, B. Increased Abundance of Secreted Hydrolytic Enzymes and Secondary Metabolite Gene Clusters Define the Genomes of Latent Plant Pathogens in the Botryosphaeriaceae. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 589. [[CrossRef](#)]
51. Massonnet, M.; Morales-Cruz, A.; Figueroa-Balderas, R.; Lawrence, D.P.; Baumgartner, K.; Cantu, D. Condition-dependent Co-regulation of Genomic Clusters of Virulence Factors in the Grapevine Trunk Pathogen *Neofusicoccum parvum*. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *19*, 21–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ali, S.S.; Asman, A.; Shao, J.; Balidion, J.F.; Strem, M.D.; Puig, A.S.; Meinhardt, L.W.; Bailey, B.A. Genome and Transcriptome Analysis of the Latent Pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, an Emerging Threat to the Cacao Industry. *Genome* **2020**, *63*, 37–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Félix, C.; Meneses, R.; Gonçalves, M.F.M.; Tilleman, L.; Duarte, A.S.; Jorrín-Novo, J.V.; Van de Peer, Y.; Deforce, D.; Van Nieuwerburgh, F.; Esteves, A.C.; et al. A Multi-Omics Analysis of the Grapevine Pathogen *Lasiodiplodia theobromae* Reveals That Temperature Affects the Expression of Virulence- and Pathogenicity-Related Genes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhao, Z.; Liu, H.; Wang, C.; Xu, J.-R. Correction: Comparative Analysis of Fungal Genomes Reveals Different Plant Cell Wall Degrading Capacity in Fungi. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 6. [[CrossRef](#)]
55. Haridas, S.; Albert, R.; Binder, M.; Bloem, J.; LaButti, K.; Salamov, A.; Andreopoulos, B.; Baker, S.E.; Barry, K.; Bills, G.; et al. 101 Dothideomycetes Genomes: A Test Case for Predicting Lifestyles and Emergence of Pathogens. *Stud. Mycol.* **2020**, *96*, 141–153. [[CrossRef](#)]
56. Ehsan, T.; Reza, R.N.; Das, A.; Ahmed, O.; Baten, A.K.M.A.; Ferdous, A.S.; Islam, M.R.; Khan, H. Genome and Secretome Analysis of Jute Endophyte *Grammothele lineata* Strain SDL-CO-2015-1: Insights into Its Lignocellulolytic Structure and Secondary Metabolite Profile. *Genomics* **2020**, *112*, 2794–2803. [[CrossRef](#)]
57. Urbez-Torres, J.R.; Gubler, W.D. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevine Cankers in California. *Plant Dis.* **2009**, *93*, 584–592. [[CrossRef](#)]



58. Pitt, W.M.; Huang, R.; Steel, C.C.; Savocchia, S. Pathogenicity and Epidemiology of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevines in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **2013**, *42*, 573–582. [[CrossRef](#)]
59. Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): An Expert Resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D233–D238. [[CrossRef](#)]
60. Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D490–D495. [[CrossRef](#)]
61. Morales-Cruz, A.; Allenbeck, G.; Figueroa-Balderas, R.; Ashworth, V.E.; Lawrence, D.P.; Travadon, R.; Smith, R.J.; Baumgartner, K.; Rolshausen, P.E.; Cantu, D. Closed-reference Metatranscriptomics Enables in Planta Profiling of Putative Virulence Activities in the Grapevine Trunk Disease Complex. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19*, 490–503. [[CrossRef](#)]
62. Gonçalves, M.; Nunes, R.; Tilleman, L.; Van de Peer, Y.; Deforce, D.; Van Nieuwerburgh, F.; Esteves, A.; Alves, A. Dual RNA Sequencing of *Vitis Vinifera* during *Lasiodiplodia Theobromae* Infection Unveils Host–Pathogen Interactions. *IJMS* **2019**, *20*, 6083. [[CrossRef](#)]
63. Paolinelli-Alfonso, M.; Villalobos-Escobedo, J.M.; Rolshausen, P.; Herrera-Estrella, A.; Galindo-Sánchez, C.; López-Hernández, J.F.; Hernandez-Martinez, R. Global Transcriptional Analysis Suggests *Lasiodiplodia Theobromae* Pathogenicity Factors Involved in Modulation of Grapevine Defensive Response. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 615. [[CrossRef](#)]
64. Thilini Chethana, K.W.; Peng, J.; Li, X.; Xing, Q.; Liu, M.; Zhang, W.; Hyde, K.D.; Zhao, W.; Yan, J. LtEPG1, a Secretory Endopolygalacturonase Protein, Regulates the Virulence of *Lasiodiplodia theobromae* in *Vitis vinifera* and Is Recognized as a Microbe-Associated Molecular Patterns. *Phytopathology* **2020**, *110*, 1727–1736. [[CrossRef](#)]
65. Dong, B.-Z.; Zhu, X.-Q.; Fan, J.; Guo, L.-Y. The Cutinase Bdo\_10846 Play an Important Role in the Virulence of *Botryosphaeria Dothidea* and in Inducing the Wart Symptom on Apple Plant. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1910. [[CrossRef](#)]
66. Coleman, J.J.; Mylonakis, E. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLOS Pathog.* **2009**, *5*, e1000486. [[CrossRef](#)]
67. Perlin, M.H.; Andrews, J.; San Toh, S. Chapter Four-Essential Letters in the Fungal Alphabet: ABC and MFS Transporters and Their Roles in Survival and Pathogenicity. In *Advances in Genetics*; Friedmann, T., Dunlap, J.C., Goodwin, S.F., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; Volume 85, pp. 201–253.
68. Víglaš, J.; Olejníková, P. An Update on ABC Transporters of Filamentous Fungi—from Physiological Substrates to Xenobiotics. *Microbiol. Res.* **2021**, *246*, 126684. [[CrossRef](#)]
69. Salvatore, M.M.; Alves, A.; Andolfi, A. Secondary Metabolites of *Lasiodiplodia Theobromae*: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Toxins* **2020**, *12*, 457. [[CrossRef](#)]
70. Sakalidis, M.L.; Slippers, B.; Wingfield, B.D.; Hardy, G.E.S.J.; Burgess, T.I. The Challenge of Understanding the Origin, Pathways and Extent of Fungal Invasions: Global Populations of the *Neofusicoccum Parvum*–*N. Ribis* Species Complex. *Divers. Distrib.* **2013**, *19*, 873–883. [[CrossRef](#)]
71. Saier, M.H.; Reddy, V.S.; Moreno-Hagelsieb, G.; Hendargo, K.J.; Zhang, Y.; Iddamsetty, V.; Lam, K.J.K.; Tian, N.; Russum, S.; Wang, J.; et al. The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 Update. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D461–D467. [[CrossRef](#)]
72. Saier, M.H., Jr.; Yen, M.R.; Noto, K.; Tamang, D.G.; Elkan, C. The Transporter Classification Database: Recent Advances. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D274–D278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Lemieux, M.J. A Perspective on the Structural Studies of Inner Membrane Electrochemical Potential-Driven Transporters. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr.* **2008**, *1778*, 1805–1813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Del Sorbo, G.; Schoonbeek, H.; De Waard, M.A. Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. *Fungal Genet. Biol.* **2000**, *30*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1–34. [[CrossRef](#)]
76. Gan, P.; Ikeda, K.; Irieda, H.; Narusaka, M.; O’Connell, R.J.; Narusaka, Y.; Takano, Y.; Kubo, Y.; Shirasu, K. Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses Reveal the Hemibiotrophic Stage Shift of *Colletotrichum Fungi*. *New Phytol.* **2013**, *197*, 1236–1249. [[CrossRef](#)]
77. Dubrulle, G.; Picot, A.; Madec, S.; Corre, E.; Pawtowski, A.; Baroncelli, R.; Zivy, M.; Balliau, T.; Le Floch, G.; Pensec, F. Deciphering the Infectious Process of *Colletotrichum lupini* in Lupin through Transcriptomic and Proteomic Analysis. *Microorganisms* **2020**, *8*, E1621. [[CrossRef](#)]
78. Locher, K.P. Structure and Mechanism of ATP-Binding Cassette Transporters. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 239–245. [[CrossRef](#)]
79. Morita, M.; Imanaka, T. Peroxisomal ABC Transporters: Structure, Function and Role in Disease. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1387–1396. [[CrossRef](#)]
80. Dube, G.; Kadoo, N.; Prashant, R. Exploring the Biological Roles of Dothideomycetes ABC Proteins: Leads from Their Phylogenetic Relationships with Functionally-Characterized Ascomycetes Homologs. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197447. [[CrossRef](#)]
81. Nagel, J.H.; Wingfield, M.J.; Slippers, B. Abundant Secreted Hydrolytic Enzymes and Secondary Metabolite Gene Clusters in Genomes of the Botryosphaeriaceae Reflect Their Role as Important Plant Pathogens. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
82. Keller, N.P. Fungal Secondary Metabolism: Regulation, Function and Drug Discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 167–180. [[CrossRef](#)]
83. Harwani, D.; Barupal, S.; Begani, J.; Lakhani, J. Genetic Diversity of Polyketide Synthases and Nonribosomal Peptide Synthetases in Fungi. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 11–21. ISBN 978-0-12-821008-6.



84. Chen, W.; Lee, M.-K.; Jefcoate, C.; Kim, S.-C.; Chen, F.; Yu, J.-H. Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. *Genome Biol. Evol.* **2014**, *6*, 1620–1634. [[CrossRef](#)]
85. Salvatore, M.M.; Alves, A.; Andolfi, A. Secondary Metabolites Produced by *Neofusicoccum* Species Associated with Plants: A Review. *Agriculture* **2021**, *11*, 149. [[CrossRef](#)]
86. Djoukeng, J.D.; Polli, S.; Larignon, P.; Abou-Mansour, E. Identification of Phytotoxins from *Botryosphaeria Obtusa*, a Pathogen of Black Dead Arm Disease of Grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* **2009**, *124*, 303–308. [[CrossRef](#)]
87. Salvatore, M.; Giambra, S.; Naviglio, D.; DellaGreca, M.; Salvatore, F.; Burruano, S.; Andolfi, A. Fatty Acids Produced by *Neofusicoccum vitifusiforme* and *N. parvum*, Fungi Associated with Grapevine *Botryosphaeria* Dieback. *Agriculture* **2018**, *8*, 189. [[CrossRef](#)]
88. Uranga, C.C.; Beld, J.; Mrse, A.; Córdova-Guerrero, I.; Burkart, M.D.; Hernández-Martínez, R. Fatty Acid Esters Produced by *Lasioidiplodia theobromae* Function as Growth Regulators in Tobacco Seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *472*, 339–345. [[CrossRef](#)]
89. Heitz, T.; Smirnova, E.; Widemann, E.; Aubert, Y.; Pinot, F.; Ménard, R. The Rise and Fall of Jasmonate Biological Activities. In *Lipids in Plant and Algae Development*; Nakamura, Y., Li-Beisson, Y., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 86, pp. 405–426. ISBN 978-3-319-25977-2.
90. Burruano, S.; Giambra, S.; Mondello, V.; Dellagrecia, M.; Basso, S.; Tuzi, A.; Andolfi, A. Naphthalenone Polyketides Produced by *Neofusicoccum parvum*, a Fungus Associated with Grapevine *Botryosphaeria* Dieback. *Phytopathol. Mediterr.* **2016**, *55*, 197–206. [[CrossRef](#)]
91. Bellée, A.; Comont, G.; Nivault, A.; Abou-Mansour, E.; Coppin, C.; Dufour, M.C.; Corio-Costet, M.F. Life Traits of Four *Botryosphaeriaceae* Species and Molecular Responses of Different Grapevine Cultivars or Hybrids. *Plant Pathol.* **2017**, *66*, 763–776. [[CrossRef](#)]
92. Reveglia, P.; Billones-Baaijens, R.; Millera Niem, J.; Masi, M.; Cimmino, A.; Evidente, A.; Savocchia, S. Production of Phytotoxic Metabolites by *Botryosphaeriaceae* in Naturally Infected and Artificially Inoculated Grapevines. *Plants* **2021**, *10*, 802. [[CrossRef](#)]
93. Trotel-Aziz, P.; Robert-Siegwald, G.; Fernandez, O.; Leal, C.; Villaume, S.; Guise, J.-F.; Abou-Mansour, E.; Lebrun, M.-H.; Fontaine, F. Diversity of *Neofusicoccum parvum* for the Production of the Phytotoxic Metabolites (-)-Terremutin and (R)-Mellein. *J. Fungi* **2022**, *8*, 319. [[CrossRef](#)]
94. Zhao, L.; You, S.; Zou, H.; Guan, X. Transcriptome Analysis and Cell Morphology of *Vitis Rupestris* Cells to *Botryosphaeria* Dieback Pathogen *Diplodia seriata*. *Genes* **2021**, *12*, 179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Li, N.; Han, X.; Feng, D.; Yuan, D.; Huang, L.-J. Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering? *IJMS* **2019**, *20*, 671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Han, P.-L.; Wang, C.-K.; Liu, X.-J.; Dong, Y.-H.; Jiang, H.; Hu, D.-G.; Hao, Y.-J. BTB-BACK Domain E3 Ligase MdPOB1 Suppresses Plant Pathogen Defense against *Botryosphaeria dothidea* by Ubiquitinating and Degrading MdPUB29 Protein in Apple. *Plant Cell Physiol.* **2019**, *60*, 2129–2140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Stempien, E.; Goddard, M.-L.; Wilhelm, K.; Tarnus, C.; Bertsch, C.; Chong, J. Grapevine *Botryosphaeria* Dieback Fungi Have Specific Aggressiveness Factor Repertory Involved in Wood Decay and Stilbene Metabolization. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188766. [[CrossRef](#)]
98. Morris, H.; Hietala, A.M.; Jansen, S.; Ribera, J.; Rosner, S.; Salmeia, K.A.; Schwarze, F.W.M.R. Using the CODIT Model to Explain Secondary Metabolites of Xylem in Defence Systems of Temperate Trees against Decay Fungi. *Ann. Bot.* **2020**, *125*, 701–720. [[CrossRef](#)]
99. Valtaud, C.; Foyer, C.H.; Fleurat-Lessard, P.; Bourbonloux, A. Systemic Effects on Leaf Glutathione Metabolism and Defence Protein Expression Caused by Esca Infection in Grapevines. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 260–279. [[CrossRef](#)]
100. Pouzoulet, J.; Pivovarov, A.L.; Santiago, L.S.; Rolshausen, P.E. Can Vessel Dimension Explain Tolerance toward Fungal Vascular Wilt Diseases in Woody Plants? Lessons from Dutch Elm Disease and Esca Disease in Grapevine. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 253. [[CrossRef](#)]
101. Chen, Y.; Zhang, S.; Lin, H.; Lu, W.; Wang, H.; Chen, Y.; Lin, Y.; Fan, Z. The Role of Cell Wall Polysaccharides Disassembly in *Lasioidiplodia theobromae*-Induced Disease Occurrence and Softening of Fresh Longan Fruit. *Food Chem.* **2021**, *351*, 129294. [[CrossRef](#)]
102. Sun, J.; Lin, H.; Zhang, S.; Lin, Y.; Wang, H.; Lin, M.; Hung, Y.-C.; Chen, Y. The Roles of ROS Production-Scavenging System in *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.-Induced Pericarp Browning and Disease Development of Harvested Longan Fruit. *Food Chem.* **2018**, *247*, 16–22. [[CrossRef](#)]
103. Guan, P.; Schmidt, F.; Riemann, M.; Fischer, J.; Thines, E.; Nick, P. Hunting Modulators of Plant Defence: The Grapevine Trunk Disease Fungus *Eutypa lata* Secretes an Amplifier for Plant Basal Immunity. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 3710–3724. [[CrossRef](#)]
104. Guan, X.; Buchholz, G.; Nick, P. The Cytoskeleton Is Disrupted by the Bacterial Effector HrpZ, but Not by the Bacterial PAMP Flg22, in Tobacco BY-2 Cells. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 1805–1816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Sun, Q.; Rost, T.L.; Reid, M.S.; Matthews, M.A. Ethylene and Not Embolism Is Required for Wound-Induced Tylose Development in Stems of Grapevines. *Plant Physiol.* **2007**, *145*, 1629–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## VALORISATIONS SCIENTIFIQUES



## Publications

**Belair, M.**, Grau, A. L., Chong, J., Tian, X., Luo, J., Guan, X., Pensec, F. Pathogenicity Factors of Botryosphaeriaceae Associated with Grapevine Trunk Diseases: New Developments on Their Action on Grapevine Defense Responses. *Pathogens* **2022**, *11*, 951. doi: 10.3390/pathogens11080951.

**Belair, M.**, Pensec, F., Jany, J.-L., Le Floch, G., Picot, A. Profiling Walnut Fungal Pathobiome Associated with Walnut Dieback Using Community-Targeted DNA Metabarcoding. *Plants* **2023**, *12*, 2383. doi: 10.3390/plants12122383.

## Publications en préparation

**Belair, M.**, Picot, A., Masson, C., Hébrard, M.-N., Debled, M., Morvant, L., Henri-Sanvoisin, A., Tréguer, S., Verhaeghe, A., Laloum, Y., Le Floch, G., Pensec, F. Etiology and epidemiology of branch dieback and fruit blight and necrosis of English walnut associated with Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Glomerellaceae and Nectriaceae species in southern France. **Manuscript in preparation**

**Belair, M.**, Picot, A., Lepais, O., Masson, C., Hébrard, M.-N., Moronvalle, A., Comont, G., Gabri Martin, V. M., Tréguer, S. Laloum, Y., Corio-Costet, M.-F., Michailides, T. J., Le Floch, G., Pensec, F. Genetic diversity and population structure of *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* on English walnut (*Juglans regia* L.) in France. **Manuscript in preparation**

## Publication technique

Laloum, Y., Verhaeghe, A., Moronvalle, A., Masson, C., Hébrard, M.-N., Picot, A., Pensec, F., **Belair, M.** Projet CARIBOU : Élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer. *Infos CTIFL*. **2022**, *386*, 48-58.

## Communications orales

**Belair M.**, Picot A., Masson C., Hébrard M.-N., Laloum Y., Verhaeghe A., Le Floch G., Pensec F. Qui sont les responsables du dépérissement du noyer en France ? Webinaire de l'Institut Brestois Santé-Agro-Matière, Plouzané, France, 5 octobre 2021.

**Belair M.**, Picot A., Masson C., Hébrard M.-N., Laloum Y., Verhaeghe A., Le Floch G., Pensec F. Qui sont les responsables du dépérissement du noyer en France ? Journées nationales des maladies du bois de la vigne, Bezannes, France, 17 & 18 novembre 2021.

**Belair M.**, Picot A., Masson C., Hébrard M.-N., Laloum Y., Verhaeghe A., Le Floch G., Pensec F. Qui sont les responsables du dépérissement du noyer en France ? Journées Jean Chevaugéon, 13<sup>e</sup> Rencontres de Phytopathologie - Mycologie, Aussois, France, 12 - 16 septembre 2022.

## Communications affichées

**Belair M.**, Picot A., Masson C., Hébrard M.-N., Laloum Y., Verhaeghe A., Le Floch G., Pensec F. Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species are the main species associated with walnut dieback in France. Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale EGAAL, Rennes, France, 30 juin & 1er juillet 2022. (poster)

Pensec F, **Belair M.**, Masson C., Labour A., Lindé C., Le Floch G., Picot A. Occurrence of *Colletotrichum* species, causal agents of anthracnose on walnuts, in France by cultural and metabarcoding approaches during ripening. 16<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria, 5-8 March 2023. (poster).

**Belair M.**, Pensec F., Masson C., Hébrard M.-N., Morvant L., Tréguer S., Laloum Y., Verhaeghe A., Le Floch G., Picot A. Insights into the fungal pathobiome associated with walnut dieback in France. 10<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists - FEMS, Hamburg, Germany, 9 - 13 July 2023. (poster)



**Belair M.**, Picot A., Lepais O., Masson C., Hébrard M.-N., Moronvalle A., Comont G., Gabri Martin V. M., Tréguer S., Laloum Y., Corio-Costet M.-F., Michailides T. J., Le Floch G., Pensec F. Genetic structure and population diversity of Botryosphaeriaceae associated with recent walnut dieback in France. 12<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Lyon, France, 20-25 August 2023. (poster)

# Walnut dieback in France is associated with seven major fungal species



Marie Belair<sup>a</sup>, Adeline Picot<sup>a</sup>, Cyrielle Masson<sup>b</sup>, Marie-Neige Hébrard<sup>c</sup>, Yohana Laloum<sup>d</sup>, Agnès Verhaeghe<sup>b, d</sup>, Gaëtan Le Floch<sup>a</sup>, Flora Pensec<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Station d'Expérimentation Nuicole Rhône Alpes, 38160 Chatte, France

<sup>c</sup> Station expérimentale de Creysse, Perrical 40600 Creysse, France

<sup>d</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prignonieux, France

E-mail: marie.belair@univ-brest.fr



## Background

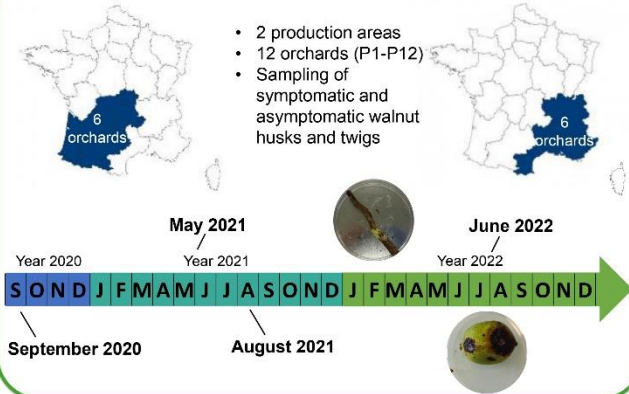


- French walnut orchards are targeted by numerous fungi causing diseases on fruits. Among them, important dieback symptoms characterized with fruit necroses, and twig cankers and necroses were detected in France from 2015 onwards, leading to important yield losses.
- In the United States and Mediterranean countries, similar symptoms are regularly encountered and described in literature as caused by species belonging to the *Botryosphaeriaceae* family and the *Diaporthe* genus.

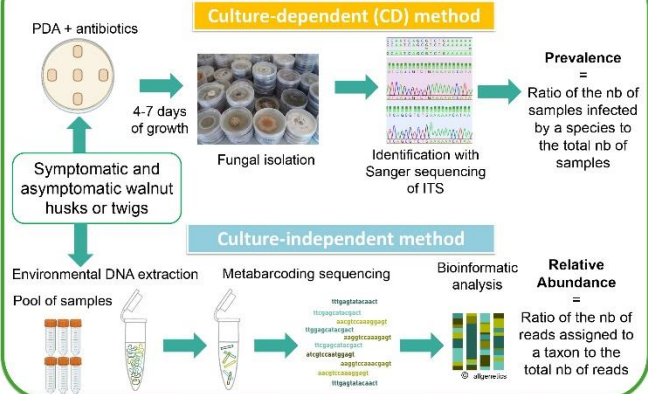


Which species are responsible for walnut dieback in France?

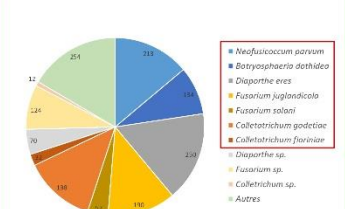
## Sampling plan



## Two complementary methods



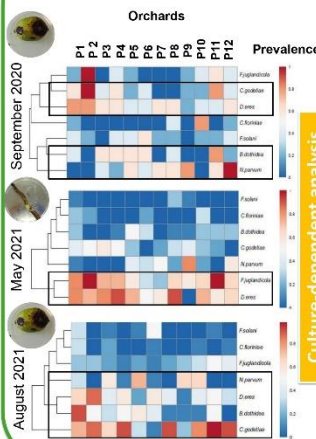
## Seven main pathogenic species



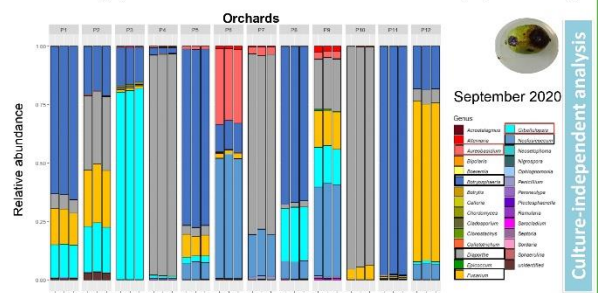
Total = 1534 isolates (3 campaigns)

- 70 % of isolates represented by seven known pathogenic species
- Botryosphaeriaceae*, only represented by the two species *N. parvum* and *B. dothidea*, and *Diaporthe eres* were the most frequently isolated species

## Varying profiles according to prevalence and abundance in symptomatic organs



- B. dothidea*, *C. godetiae*, *D. eres* and *N. parvum* were isolated in 30 to 68 % of symptomatic husks
- D. eres* and *F. juglandicola* were isolated in more than 65 % of symptomatic twigs



- In agreement with the CD analysis, abundance of *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Fusarium* and *Neofusicoccum* varied greatly according to orchards.
- In spite of their absence of detection in the CD analysis, the *Aureobasidium* and *Gibellulopsis* genera were abundant in symptomatic walnuts of a few orchards

## Conclusions

- 7 dominant pathogenic species associated with walnut dieback symptoms on walnuts and twigs were identified whatever the methods used
- Contrary to the literature, not only *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species were isolated but also *F. juglandicola* (mainly on twigs) and *Colletotrichum* spp. (mainly on husks)
- All species, except *F. solani*, were found in both symptomatic and asymptomatic organs, confirming their latent pathogen lifestyle
- There was no direct link between prevalence and abundance
- Additional information provided by metabarcoding: 2 genera identified that were not isolated by CD method

## Perspectives

- Optimization of metabarcoding sequencing analysis method to improve *Colletotrichum* spp. detection
- Laboratory pathogenicity tests on twigs: are these species responsible for walnut dieback and capable of causing necroses ?

## Funding

This project was supported by the Brittany region and MESRI (PhD scholarship) as well as CASDAR (Caribou project coordinated by Ctilf)



Journées Scientifiques de l'ED EGAAL – 30 juin/1er juillet 2022 - Rennes





# Occurrence of *Colletotrichum* species, causal agents of anthracnose on walnuts, in France by cultural and metabarcoding approaches during ripening

Flora Pensec<sup>a</sup>, Marie Belair<sup>a</sup>, Cyrielle Masson<sup>b</sup>, Axel Labour<sup>a</sup>, Charline Lindé<sup>a</sup>, Gaëtan Le Floch<sup>a</sup>, Adeline Picot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Station d'Expérimentation Nucicole Rhône-Alpes, 38160 Chatte, France

E-mail: flora.pensec@univ-brest.fr



## Background

For several years, production losses due to several species of *Colletotrichum* have been observed in walnut orchards in France (emergence in 2011). This emerging pathogen has become responsible for a major disease in walnut orchards, especially in the Southeast production area of France, causing yield losses up to 70%. This disease is difficult to manage in the field because of the lack of knowledge of the species involved and their expression and infection conditions.

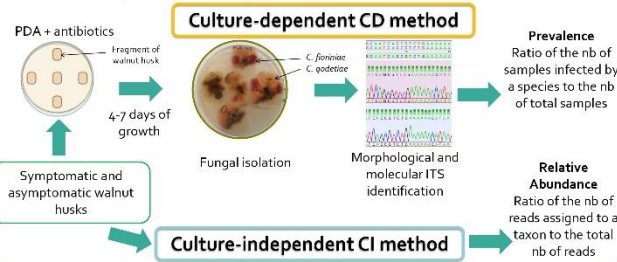
**Objectives: detecting and evaluating the presence of causal agents of anthracnose on walnuts**



## Sampling plan

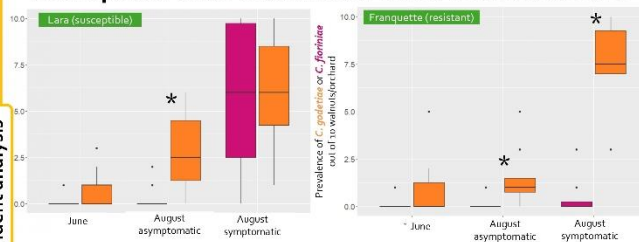


## Two complementary methods



## High prevalence of *Colletotrichum godetiae* in susceptible and resistant varieties to anthracnose

Culture-dependent analysis

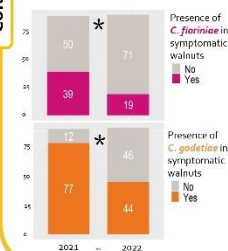


In 2021 and 2022, *C. godetiae* was significantly more isolated in symptomatic and asymptomatic Franquette mature walnuts compared to *C. fioriniae*, for which prevalence was significantly higher in symptomatic walnuts of the susceptible variety Lara. *C. godetiae* was present in asymptomatic walnuts, whatever the stage, evidencing a latent characteristic.

## Impact of climate conditions

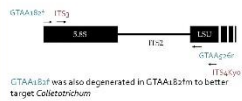
Contamination of walnuts with *C. fioriniae* and *C. godetiae* was influenced by climate conditions, both species being more isolated (p-value < 0,05) in 2021 compared to 2022. Summer 2022 (T<sub>max</sub> mean = 31,6°C, Rain<sub>cum</sub> = 178 mm) was hotter (p-value = 1,718E-14) and drier than summer 2021 (T<sub>max</sub> mean = 26,7°C, Rain<sub>cum</sub> = 286 mm) in the Southeast of France. In the project, the optimal temperature (combined with humectation) for spore germination was between 25 and 27°C for both species, which could explain the higher level of contaminations in 2021.

Statistically significant different results (p-value < 0,05) are indicated by \*



## Development of a metabarcoding pipeline

### Primer selection



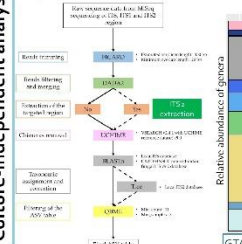
### Mock composition

The pipeline was first tested and developed on mock communities: DNA solutions in equal concentrations from pure cultures of 17 fungal species commonly isolated from walnuts

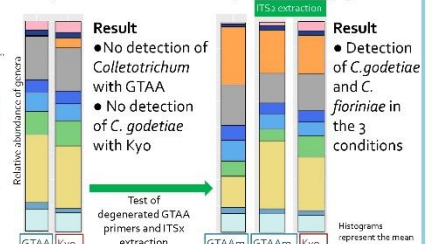
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Diplodia</i>	<i>Dothiorella</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Neofusicoccum</i>
2 species	1 species	1 species	1 species	2 species
<i>Diaporthe</i>	<i>Epicoecium</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>
2 species	1 species	2 species	2 species	1 species

Culture-independent analysis

### Pipeline



### Comparative evaluation of primers and pipelines



**Sensitivity:** ability of a primer pair to well assign an ASV at genus level  
**Precision:** quality of detection of fungal species  
**Compositional similarity:** comparison between the recovered community and the expected community  
**Richness:** mean average number of ASVs obtained

Primers	ITSx step	Sensitivity	Precision	Similarity of composition	Richness
GTAA	No	0.882	0.454	0.710 ± 0.003	34
Kyo	No	0.882	0.127	0.734 ± 0.003	119
	Yes	0.941	0.121	0.745 ± 0.001	133
GTAAm	No	1	0.315 ± 0.003	0.752 ± 0.009	52.3 ± 0.6
	Yes	0.941	0.257 ± 0.002	0.704 ± 0.010	63.3 ± 0.6

The highest performance was obtained with GTAAm without ITSx extraction, but adding an ITS2 extraction step with GTAAm and Kyo allowed the detection and accurate quantification of *Colletotrichum* up to species level

## Conclusion

- C. godetiae* and *C. fioriniae* were the two main *Colletotrichum* species associated with walnut anthracnose, *C. nymphaeae* and *C. kahawae* were anecdotally isolated
- C. godetiae* was more frequently isolated than *C. fioriniae* and was able to infect a resistant variety. It was also detected in asymptomatic walnut husks, evidencing its ability to infect the plant at early stage without causing symptoms
- Climate conditions in 2021 were conducive to walnut infection by both species, T<sub>opt</sub> being lower than ≥8°C for most *Colletotrichum* species.
- A metabarcoding pipeline was developed and enabled to target walnut pathogens and particularly *Colletotrichum* at species level

## Perspectives

- In order to compare results obtained with the CD method, a CI analysis will be performed with the chosen metabarcoding pipeline on the same samples
- In addition, CI analysis will enable to better understand interactions between species in symptomatic and asymptomatic walnuts, and correlation networks will be established to identify taxons positively or negatively correlated with the presence of *C. fioriniae* and *C. godetiae* in walnuts

## Fundings

This project was supported by the PEPIT project MAC (Auvergne-Rhône-Alpes region) coordinated by SENURA. Marie Belair PhD fellowship is financed by the French Brittany region (ARED Grant #1797) and MESRI PhD scholarship



16<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics ECFG, Innsbruck





# Insights into the fungal pathobiome associated with walnut dieback in France



Marie Belair<sup>a</sup>, Flora Pensec, Cyrielle Masson<sup>b</sup>, Marie-Neige Hébrard<sup>c</sup>, Léa Morvant<sup>a</sup>, Sylvie Tréguer<sup>a</sup>, Yohana Laloum<sup>d</sup>, Agnès Verhaeghe<sup>b, d</sup>, Gaétan Le Floch<sup>a</sup>, Adeline Picot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

<sup>b</sup> Station d'Expérimentation Nucléaire Rhône Alpes, 38160 Chatte, France

<sup>c</sup> Station expérimentale de Creysse, Perrical 46600 Creysse, France

<sup>d</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prignonieux, France

E-mail: marie.belair@univ-brest.fr

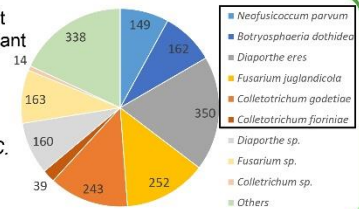


## Background

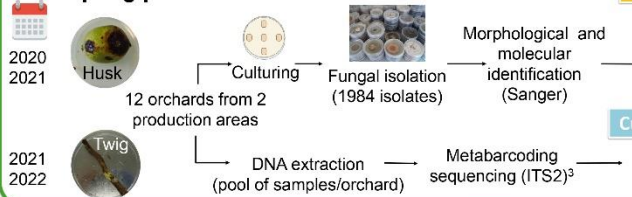


- French walnut orchards are targeted by important dieback symptoms characterized with fruit necrosis, and twig cankers and necrosis, reported from 2013 onwards and leading to important yield losses. In other walnut-growing countries, walnut dieback was mainly associated with *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species<sup>1,2</sup>.
- We identified six main fungal pathogenic species, representing up to 60% total isolates, associated with symptoms based on a cultural approach: *N. parvum*, *B. dothidea*, *D. eres*, *C. godetiae*, *C. fioriniae* and *F. juglandicola*.

What are the structure and the interactions within this pathobiome ?



## Sampling plan and method



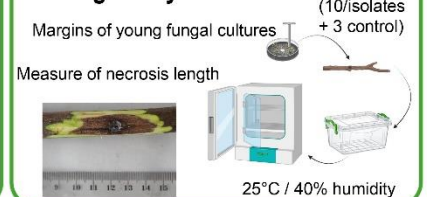
## Culture-dependent method

**Prevalence**  
Ratio of the nb of samples infected by a species to the total nb of samples

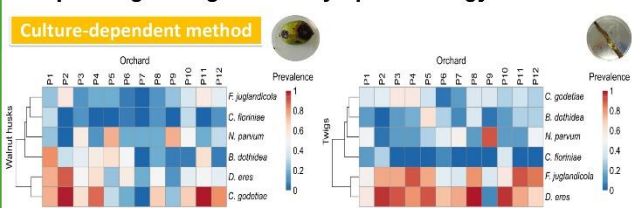
## Culture-independent method

**Relative abundance & Interactions**

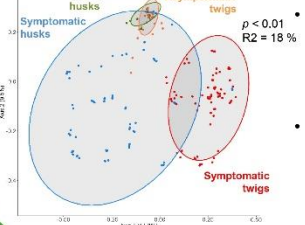
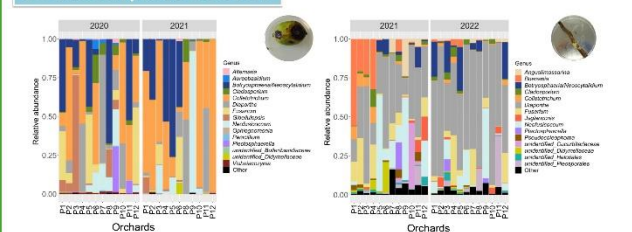
## Pathogenicity tests



## Six main pathogens with a composition profile depending on organs and symptomatology

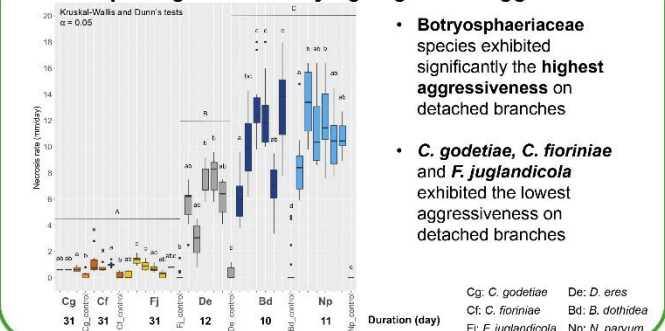


## Culture-independent method



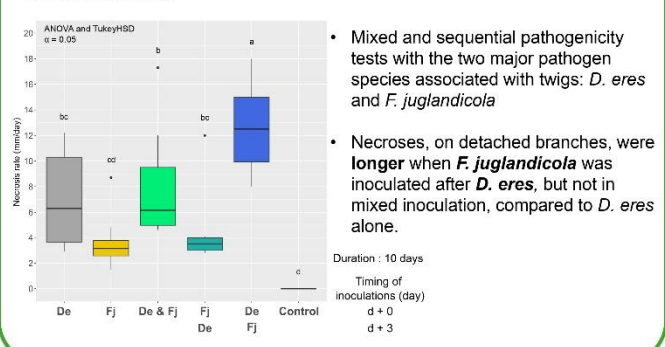
- In symptomatic samples, microbiota composition differed between organs, notably with *Colletotrichum* mostly associated with husks and *Diaporthe* and *Fusarium* with twigs
- The microbiota composition differed between asymptomatic and symptomatic samples (with a much lower fungal load in asymptomatic samples)

## Six main pathogens with varying degrees of aggressiveness



- Botryosphaeriaceae* species exhibited significantly the highest aggressiveness on detached branches
- C. godetiae*, *C. fioriniae* and *F. juglandicola* exhibited the lowest aggressiveness on detached branches

## Evidence for facilitative interactions between *Diaporthe* and *Fusarium*



- Mixed and sequential pathogenicity tests with the two major pathogen species associated with twigs: *D. eres* and *F. juglandicola*
- Necroses, on detached branches, were longer when *F. juglandicola* was inoculated after *D. eres*, but not in mixed inoculation, compared to *D. eres* alone.

## Conclusions

- Identification of 6 dominant fungal pathogenic species in walnut husks and twigs with variable aggressiveness
- The fungal pathobiome composition depends on organ type and symptomatology
- Not only *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* species were isolated but also *F. juglandicola* (mainly on twigs) and *Colletotrichum* spp. (mainly on husks), although not very aggressive
- Fusarium* did not induce severe necrosis in twigs but could participate to (and/or benefit from) the development of other pathogenic species, particularly the genus *Diaporthe*
- Other parameters could influence the composition of the pathosystem and its ability to generate symptoms, such as cultural practices or climate conditions

## Funding

This project was supported by the Brittany region (2020 ARED Grant #1797) and MESRI (2020 CDE EGGAL) as well as CASDAR (AAP RT 2020 CARIBOU project coordinated by CTIFL)



References <sup>1</sup> Morat, J., Morgan, D., Trapero, A., Michalides, T.J., 2019. 10.1094/PDIS-03-19-0622-FE.  
<sup>2</sup> López-Moral, A., del Carmen Raya, M., Cortés-Cosano, N., Arquero, O., Trapero, A., Agustí-Brisach, C., 2020. 10.1094/PDIS-03-19-0545-RE.  
<sup>3</sup> Belair, M., Pensec, F., Jarry, J.-L., Le Floch, G., Picot, A., 2023. 10.3390/plants12122363.





# Genetic structure and population diversity of Botryosphaeriaceae associated with recent walnut dieback in France

Marie Belair<sup>a</sup>, Adeline Picot<sup>a</sup>, Olivier Lepais<sup>b</sup>, Cyrielle Masson<sup>c</sup>, Marie-Neige Hébrard<sup>d</sup>, Aude Moronvalle<sup>e</sup>, Gwénaëlle Comont<sup>f</sup>, Victor M. Gabri Martin<sup>g</sup>, Sylvie Tréguer<sup>h</sup>, Yohana Laloum<sup>i</sup>, Marie-France Corio-Costet<sup>j</sup>, Themis J. Michailides<sup>k</sup>, Gaëtan Le Floch<sup>a</sup>, Flora Pensec<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France  
<sup>b</sup> Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610 Cestas, France  
<sup>c</sup> Station d'Expérimentation Nuicôle Rhône Alpes, 38180 Châtel, France  
<sup>d</sup> Station expérimentale de Creysse, Peralat 46600 Creysse, France  
<sup>e</sup> Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prignorioux, France  
<sup>f</sup> INRAE, UMR Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, Labex Cote, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France  
<sup>g</sup> University of California Davis, Department of Plant Pathology, Kearney Agricultural Research and Extension Center, Parlier, CA, 93648, USA  
<sup>h</sup> e-mail: marie.belair@univ-brest.fr



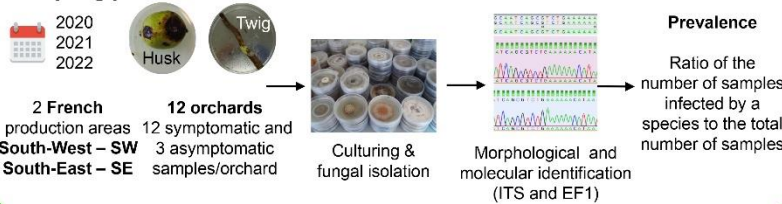
## Context

- French walnut orchards are affected by important and emergent dieback symptoms characterized with fruit necrosis, and twig cankers and necrosis, reported from 2013 onwards and leading to important yield losses. In other walnut-growing countries, walnut dieback was mainly associated with Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species<sup>1,2</sup>
- In France, *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum* were the only two species from the Botryosphaeriaceae family isolated from symptomatic husks and twigs, along with other pathogenic species
- Microsatellite markers (SSR markers) are a useful tool to assess the genetic diversity of fungal pathogen populations and to study transmission pathway and/or inoculum sources responsible for the new development of these species in French walnut orchards



What is the genetic structure of Botryosphaeriaceae populations in French walnut orchards and which factors contribute to shape populations ?

## Sampling plan and method

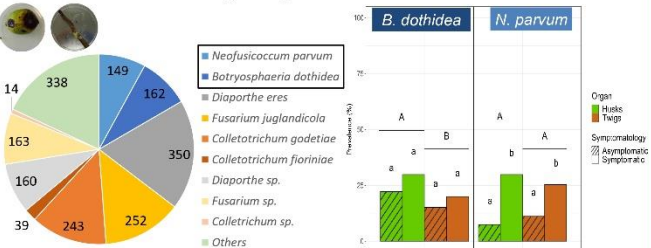


## SSR-sequencing

Design of 60 SSR markers based on available genomes PGTB

Species	Collection origin	Purified	Genotyped	Used in the analysis
<i>B. dothidea</i>	French walnuts	182	181	133
	French grapevines	7	5	5
<i>N. parvum</i>	French walnuts	323	200	156
	French grapevines	58	57	43
	Californian walnuts	5	5	5
	Californian almonds	19	18	14
	Spanish walnuts	6	5	5

## Two Botryosphaeriaceae species frequently collected from walnut husk and twig samples in France...



- Only two Botryosphaeriaceae species isolated from husks and twigs: *B. dothidea* and *N. parvum* (representing 17 % isolates in total and up to 30% prevalence)
- B. dothidea*: more prevalent in husks than in twigs, regardless of symptomatology
- N. parvum*: more prevalent in symptomatic than in asymptomatic organs

## ... with a low genetic diversity associated with a main clonal reproduction mode

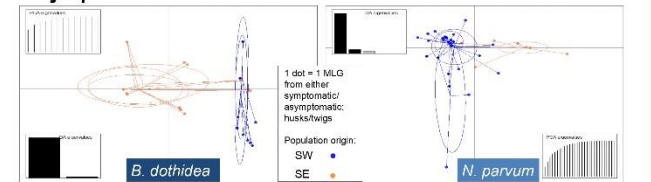
A: p-value < 0.05; B: p-value > 0.05

French walnut populations	Nb of individuals	Nb of loci	eMLG	Evenness	Uncorrected dataset rbarD	Clone-corrected dataset rbarD
<i>B. dothidea_SW</i>	35	11	10	0.61	0.20 A	0.07 B
<i>B. dothidea_SE</i>	94		7.35	0.42	0.26 A	-0.03 B
<i>N. parvum_SW</i>	107	27	20.58	0.73	0.09 A	0.10 A
<i>N. parvum_SE</i>	49		7	0.39	0.35 A	0.15 A

eMLG: MultiLocus Genotypes at the smallest sample size; rbarD: standardized index of association

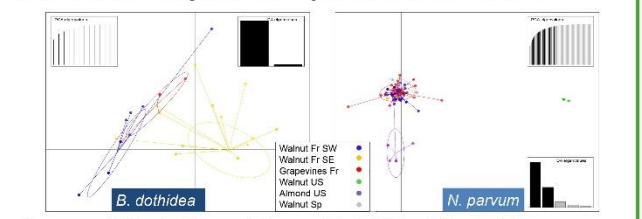
- Globally low genetic diversity among the two *a priori* *B. dothidea* and *N. parvum* French walnut populations based on geographical origin
- SW populations exhibited higher genetic diversity (eMLG) and a more even distribution, especially for *N. parvum*, suggesting a different dissemination and/or evolution pattern
- A main clonal mode of reproduction for both species although traces of sexual reproduction were evidenced for *B. dothidea* populations (rbarD)

## Geographical distances contribute to genetic differentiation for *B. dothidea* French walnut populations only, but not organs or symptoms



- Significant correlation between geographic and genetic distances for *B. dothidea* populations (Mantel test,  $R^2 = 0.42$  and  $p = 0.01$ )
- High genetic proximity of isolates from both organs, either symptomatic or asymptomatic, highlighting the ubiquitous and latent lifestyle of both species

## French walnut populations genetically close to populations from French vineyards and Spanish walnut orchards



- N. parvum\_SW* and *\_SE* populations and *B. dothidea\_SW* populations were genetically close to French vineyards populations and shared MLGs
- N. parvum* isolates from Spanish walnut orchards were genetically close from French isolates but shared no MLGs, strains from Californian walnut and almond orchards were genetically more distant

## Conclusions

- Botryosphaeriaceae are important members of the pathobiome associated with walnut dieback in France
- A clonal reproduction mode was predominantly observed in both species, consistent with the low genetic diversity<sup>3,4</sup>
- B. dothidea* populations were differentiated based on geographical origins, indicating region-specific inoculum sources and/or lower level of dissemination between both production areas compared to *N. parvum*, known to be more aggressive than *B. dothidea* (in line with the higher *N. parvum* predominance in symptomatic samples, unlike *B. dothidea*)
- Genetic similarity of populations from symptomatic or asymptomatic husks and twigs, consistent with the hypothesis of a transmission of pathogens from fruits to twigs and the endophytic lifestyle often displayed by these species<sup>4,5</sup>
- Possible common origin between *N. parvum* and *B. dothidea* populations from walnut orchards in the southwestern region of France and populations from French grapevines and to a lesser extent with Spanish walnut orchards

## Funding

This project was supported by the Brittany region (2020 ARED Grant #1797) and MESRI (2020 CDE EGAAL) as well as CASDAR (AAP RT 2020 CARIBOU project coordinated by CTIFL)



Collaboration: PGTB SEQUENÇAGE GÉNOTYPAGE

References <sup>1</sup> Moral, J., Morgan, D., Trapero, A., Michailides, T.J., 2019. 10.1094/PDIS-03-19-0622-FE. <sup>2</sup> Lopez-Moral, A., del Carmen Raya, M., Cortés-Cosano, N., Argüero, O., Trapero, A., Agustí-Brisach, C., 2020. 10.1094/PDIS-03-19-0545-RE. <sup>3</sup> McDonal, B.A., Linde, C., 2002. 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443. <sup>4</sup> Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. 10.1016/j.fbr.2007.06.002. <sup>5</sup> Michailides, T.J., Chen, S., Morgan, D., Fells, D.G., Nour, M.T., Puckett, R., Luna, M., Hasey, J., Anderson, K., Coates, W., Fichtner, E., Buchner, R., Bentley, W., 2013. California Walnut Board, Folsom, CA.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S. & Schena, L. (2016) Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research* 3: 16047. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.47>
- Adaskaveg, J.E., Buchner, R.P., Browne, G.T., Gubler, W.D., Michailides, T.J., Hasey, J.K., Fichtner, E.J., Seybold, S.J., Bostock, R.M. & Teviotdale, B.L. (2017) *Botryosphaeria* and *Phomopsis* Cankers / Walnut / Agriculture: Pest Management Guidelines / UC Statewide IPM Program (UC IPM). Available from: <https://ipm.ucanr.edu/agriculture/walnut/botryosphaeria-dieback/> (August 15, 2023)
- Adaskaveg, J.E., Michailides, T.J. & Eskalen, A. (2022) Fungicides, bactericides, biocontrols, and natural products for deciduous tree fruit and nut, citrus, strawberry, and vine crops in California. *California Fruit and Nut Fungicides*. Available from: [https://ipm.ucanr.edu/legacy\\_assets/pdf/pmg/fungicideefficacytiming.pdf](https://ipm.ucanr.edu/legacy_assets/pdf/pmg/fungicideefficacytiming.pdf) (August 15, 2023)
- Agreste (2022a) *GRAPH'AGRI 2022 - L'agriculture, la forêt, la pêche et les industries agroalimentaires*. Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. Paris. 219 pp.
- Agreste (2022b) *Statistique agricole annuelle 2021. Chiffres définitifs*. Paris
- Agustí-Brisach, C., Moral, J., Felts, D., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2019) Interaction Between *Diaporthe rhusicola* and *Neofusicoccum mediterraneum* Causing Branch Dieback and Fruit Blight of English Walnut in California, and the Effect of Pruning Wounds on the Infection. *Plant Disease* 103: 1196–1205. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1118-RE>
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J.L., Alba, P. & García, M.E. (2011) Fungal growth in culture media simulating an extreme environment. *Revista Iberoamericana de Micología* 28: 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.03.005>
- ANSES (2014) *Analyse de risque phytosanitaire portant sur Rhagoletis completa - Avis de l'Anses - Rapport d'expertise collective*. ANSES, Maisons-Alfort, 80pp.
- Antony, S., Billones-Baaijens, R., Stodart, B.J., Steel, C.C., Lang, M.D. & Savocchia, S. (2023) Incidence and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with dieback in walnut orchards in Australia. *Plant Pathology* 72: 610–622. <https://doi.org/10.1111/ppa.13685>
- Aradhya, M., Velasco, D., Ibrahimov, Z., Toktoraliev, B., Maghradze, D., Musayev, M., Bobokashvili, Z. & Preece, J.E. (2017) Genetic and ecological insights into glacial refugia of walnut (*Juglans regia* L.). *PLOS ONE* 12: e0185974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185974>
- Arciuolo, R., Camardo Leggieri, M., Chiusa, G., Castello, G., Genova, G., Spigolon, N. & Battilani, P. (2021) Ecology of *Diaporthe eres*, the causal agent of hazelnut defects. *PLoS ONE* 16: e0247563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247563>
- Bardakci, F. (2001) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* 25: 185–196. <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol25/iss2/10>
- Bass, D., Stentiford, G.D., Wang, H.-C., Koskella, B. & Tyler, C.R. (2019) The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends in Ecology & Evolution* 34: 996–1008. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Batista, E., Lopes, A. & Alves, A. (2020) Botryosphaeriaceae species on forest trees in Portugal: diversity, distribution and pathogenicity. *European Journal of Plant Pathology* 158: 693–720. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02112-8>
- Beiki, T., Najafpour, G.D. & Hosseini, M. (2018) Evaluation of antimicrobial and dyeing properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract for cosmetics. *Coloration Technology* 134: 71–81. <https://doi.org/10.1111/cote.12322>
- Bekris, F., Vasileiadis, S., Papadopoulou, E., Samaras, A., Testempasis, S., Gkizi, D., Tavlaki, G., Tzima, A., Paplomatas, E., Markakis, E., Karaoglanidis, G., Papadopoulou, K.K. & Karpouzas, D.G. (2021) Grapevine wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens

- and potential interactions with the bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance. *Environmental Microbiome* 16: 23. <https://doi.org/10.1186/s40793-021-00390-1>
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V. & Valier, A. (2002) Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. *Plant Disease* 86: 599–602. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.599>
- Belisario, A., Maccaroni, M., Vettrano, A.M., Vannini, A. & Valier, A. (2005) *Phytophthora* species associated with decline and death of English walnut in Italy and France. *Acta Horticulturae* 705: 401–407. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.705.57>
- Belisario, A., Santori, A., Potente, G., Fiorin, A., Saphy, B., Reigne, J.L., Pezzini, C., Bortolin, E. & Valier, A. (2010) Brown apical necrosis (BAN): A fungal disease causing fruit drop of English walnut. *Acta Horticulturae* 861: 449–452. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.861.63>
- Belisario, A., Scotton, M., Santori, A. & Onofri, S. (2008) Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. *Forest Pathology* 38: 129–145. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00540.x>
- Bernard, A., Lheureux, F. & Dirlwanger, E. (2018) Walnut: past and future of genetic improvement. *Tree Genetics & Genomes* 14: 1. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1214-0>
- Billones-Baaijens, R. & Savocchia, S. (2019) A review of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine trunk diseases in Australia and New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 48: 3–18. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0585-5>
- Borah, N., Albarouki, E. & Schirawski, J. (2018) Comparative Methods for Molecular Determination of Host-Specificity Factors in Plant-Pathogenic Fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 863. <https://doi.org/10.3390/ijms19030863>
- Brazauskienė, I. & Petraitiene, E. (2006) The occurrence of *Alternaria* blight (*Alternaria* spp.) and phoma stem canker (*Phoma lingam*) on oilseed rape in central Lithuania and pathogenic fungi on harvested seed. *Journal of Plant Protection Research* 46: 295–311.
- Byrd, A.L. & Segre, J.A. (2016) Adapting Koch’s postulates. *Science* 351: 224–226. <https://doi.org/10.1126/science.aad6753>
- Campanile, G., Ruscelli, A. & Luisi, N. (2007) Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. *European Journal of Plant Pathology* 117: 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9089-1>
- Campisano, A., Pancher, M., Puopolo, G., Puddu, A., Lòpez-Fernàndez, S., Biagini, B., Yousaf, S. & Pertot, I. (2015) Diversity in Endophyte Populations Reveals Functional and Taxonomic Diversity between Wild and Domesticated Grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* 66: 12–21. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14046>
- Chen, S., Fichtner, E., Morgan, D.P. & Michailides, T.J. (2013) First Report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Death of Graft Union of English Walnut in California. *Plant Disease* 97: 993. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-1000-PDN>
- Chen, S., Li, G., Liu, F. & Michailides, T.J. (2015) Novel species of Botryosphaeriaceae associated with shoot blight of pistachio. *Mycologia* 107: 780–792. <https://doi.org/10.3852/14-242>
- Chen, S., Morgan, D.P., Hasey, J.K., Anderson, K. & Michailides, T.J. (2014a) Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant Disease* 98: 636–652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>
- Chen, S., Morgan, D.P. & Michailides, T.J. (2014b) Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae associated with panicle and shoot blight of pistachio in California, USA. *Fungal Diversity* 67: 157–179. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0285-6>

- Chen, W.-Q., Morgan, D.P., Felts, D. & Michailides, T.J. (2003) Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and Biological Control of Panicle and Shoot Blight of Pistachio. *Plant Disease* 87: 359–365. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.359>
- Cheon, W., Kim, Y.S., Lee, S.G., Jeon, Y.H. & Chun, I.-J. (2013) First Report of Branch Dieback of Walnut Caused by *Neofusicoccum parvum* in Korea. *Plant Disease* 97: 1114. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1137-PDN>
- Chowdappa, S., Jagannath, S., Konappa, N., Udayashankar, A.C. & Jogaiyah, S. (2020) Detection and Characterization of Antibacterial Siderophores Secreted by Endophytic Fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules* 10: 1412. <https://doi.org/10.3390/biom10101412>
- Cobos, R., Ibañez, A., Diez-Galán, A., Calvo-Peña, C., Ghorehshizadeh, S. & Coque, J.J.R. (2022) The Grapevine Microbiome to the Rescue: Implications for the Biocontrol of Trunk Diseases. *Plants* 11: 840. <https://doi.org/10.3390/plants11070840>
- Comité Interprofessionnel de la Noix de Grenoble La Noix de Grenoble. *La noix de Grenoble*. Available from: <https://www.aoc-noixdegrenoble.com/> (March 23, 2023)
- Crous, P.W., Cowan, D.A., Maggs-Kölling, G., Yilmaz, N., Thangavel, R., Wingfield, M.J., Noordeloos, M.E., Dima, B., Brandrud, T.E., Jansen, G.M., Morozova, O.V., Vila, J., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Bishop-Hurley, S., Lacey, E., Marney, T.S., Larsson, E., Le Floch, G., Lombard, L., Nodet, P., Hubka, V., Alvarado, P., Berraf-Tebbal, A., Reyes, J.D., Delgado, G., Eichmeier, A., Jordal, J.B., Kachalkin, A.V., Kubátová, A., Maciá-Vicente, J.G., Malysheva, E.F., Papp, V., Rajeshkumar, K.C., Sharma, A., Spetik, M., Szabóová, D., Tomashevskaya, M.A., Abad, J.A., Abad, Z.G., Alexandrova, A.V., Anand, G., Arenas, F., Ashtekar, N., Balashov, S., Bañares, Á., Baroncelli, R., Bera, I., Biketova, A.Yu., Blomquist, C.L., Boekhout, T., Boertmann, D., Bulyonkova, T.M., Burgess, T.I., Carnegie, A.J., Cobo-Díaz, J.F., Corriol, G., Cunningham, J.H., da Cruz, M.O., Damm, U., Davoodian, N., de A. Santiago, A.L.C.M., Dearnaley, J., de Freitas, L.W.S., Dhileepan, K., Dimitrov, R., Di Piazza, S., Fatima, S., Fuljer, F., Galera, H., Ghosh, A., Giraldo, A., Glushakova, A.M., Gorczak, M., Gouliamova, D.E., Gramaje, D., Groenewald, M., Gunsch, C.K., Gutiérrez, A., Holdom, D., Houbaken, J., Ismailov, A.B., Istel, Ł., Iturriaga, T., Jeppson, M., Jurjević, Ž., Kalinina, L.B., Kapitonov, V.I., Kautmanova, I., Khalid, A.N., Kiran, M., Kiss, L., Kovács, Á., Kurose, D., Kusan, I., Lad, S., Læssøe, T., Lee, H.B., Luangsa-ard, J.J., Lynch, M., Mahamedi, A.E., Malysheva, V.F., Mateos, A., Matočec, N., Mešić, A., Miller, A.N., Mongkolsamrit, S., Moreno, G., Morte, A., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Naseer, A., Navarro-Ródenas, A., Nguyen, T.T.T., Noisripoom, W., Ntandu, J.E., Nuytinck, J., Ostrý, V., Pankratov, T.A., Pawłowska, J., Pecenka, J., Pham, T.H.G., Polhorský, A., Posta, A., Raudabaugh, D.B., Reschke, K., Rodríguez, A., Romero, M., Rooney-Latham, S., Roux, J., Sandoval-Denis, M., Smith, M.Th., Steinrucken, T.V., Svetasheva, T.Y., Tkalčec, Z., van der Linde, E.J., v.d. Vegte, M., Vauras, J., Verbeken, A., Visagie, C.M., Vitelli, J.S., Volobuev, S.V., Weill, A., Wrzosek, M., Zmitrovich, I.V., Zvyagina, E.A. & Groenewald, J.Z. (2021) Fungal Planet description sheets: 1182–1283. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 46: 313–528. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.11>
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J.Z. (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235–253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>
- Da Lio, D., Cobo-Díaz, J.F., Masson, C., Chalopin, M., Kebe, D., Giraud, M., Verhaeghe, A., Nodet, P., Sarrocco, S., Le Floch, G. & Baroncelli, R. (2018) Combined Metabarcoding and Multi-locus approach for Genetic characterization of *Colletotrichum* species associated with common walnut (*Juglans regia*) anthracnose in France. *Scientific Reports* 8: 10765. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29027-z>

- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C. & Crous, P.W. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P. & Alaniz-Ferro, S. (2016) Botryosphaeriaceae species associated with stem canker, dieback and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146: 637–655. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0949-z>
- Derviş, S., Türkölmez, Ş., Çiftçi, O., Ulubaş Serçe, Ç. & Dikilitas, M. (2019) First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Black Canker and Root Rot of Walnut in Turkey. *Plant Disease* 103: 2129–2129. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0306-PDN>
- DGDDI (2022) Le chiffre du commerce extérieur. *Un site de la direction générale des douanes et droits indirects*. Available from: <https://lekiosque.finances.gouv.fr/Default.asp> (March 22, 2023)
- Díaz, G.A., Latorre, B.A., Ferrada, E., Gutiérrez, M., Bravo, F. & Lolas, M. (2018) First Report of *Diplodia mutila* Causing Branch Dieback of English Walnut cv. Chandler in the Maule Region, Chile. *Plant Disease* 102: 1451. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1860-PDN>
- Díaz, G.A., Valdez, A., Halleen, F., Ferrada, E., Lolas, M. & Latorre, B.A. (2022) Characterization and Pathogenicity of *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, and *Neofusicoccum* Species Causing Botryosphaeria Canker and Dieback of Apple Trees in Central Chile. *Plant Disease* 106: 925–937. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1291-RE>
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W. & Sharon, A. (2017) Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016>
- van Dyk, M., Spies, C.F.J., Mostert, L., van der Rijst, M., du Plessis, I.L., Moyo, P., van Jaarsveld, W.J. & Halleen, F. (2021) Pathogenicity Testing of Fungal Isolates Associated with Olive Trunk Diseases in South Africa. *Plant Disease* 105: 4060–4073. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1837-RE>
- Eichmeier, A., Pecenka, J., Spetik, M., Necas, T., Ondrasek, I., Armengol, J., León, M., Berlanas, C. & Gramaje, D. (2020) Fungal Trunk Pathogens Associated With *Juglans regia* in the Czech Republic. *Plant Disease* 104: 761–771. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1308-RE>
- E-Phy & ANSES (2020a) E-Phy. TEBUWG. Available from: <https://ephy.anses.fr/ppp/tebuwg> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2020b) E-Phyt. AGRITEBU. Available from: <https://ephy.anses.fr/ppp/agritebu> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2021) E-Phy. HORIZON ARBO. Available from: <https://ephy.anses.fr/ppp/horizon-arbo> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2022) E-Phy. Thiophanate-methyl. Available from: <https://ephy.anses.fr/substance/thiophanate-methyl> (August 15, 2023)
- E-Phy & ANSES (2023a) E-Phy. Fluxapyroxade. Available from: <https://ephy.anses.fr/substance/fluxapyroxad> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2023b) E-Phy. Pyraclostrobine. Available from: <https://ephy.anses.fr/substance/pyraclostrobin> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2023c) E-Phy. SIGNUM. Available from: <https://ephy.anses.fr/ppp/signum> (August 16, 2023)
- E-Phy & ANSES (2023d) E-phy. Usages. Culture : Noyer. Ravageur/Maladie : Dépérissement cryptogamique ou Chancre à champignons. Available from: [https://ephy.anses.fr/resultats\\_recherche/usages?culture1=Noyer&culture2=&nuisible1=D%C3%A9p%C3%A9rissement%20cryptogamique&nuisible2=Chancre%20%C3%A0%20champignons&mode=&f%5B0%5D=list\\_type\\_usage%3A2010040100000000000001](https://ephy.anses.fr/resultats_recherche/usages?culture1=Noyer&culture2=&nuisible1=D%C3%A9p%C3%A9rissement%20cryptogamique&nuisible2=Chancre%20%C3%A0%20champignons&mode=&f%5B0%5D=list_type_usage%3A2010040100000000000001) (August 15, 2023)

- E-Phy & ANSES (2023e) E-Phy. VINTEC. Available from: <https://ephy.anses.fr/ppp/vintec> (August 16, 2023)
- Ermel, M., Jumel, S. & Bousset, L. (2020) Influence of the culture media on the aspect and growth of oilseed rape fungal pathogens.
- Fan, X., Yang, Q., Bezerra, J.D.P., Alvarez, L.V. & Tian, C. (2018) *Diaporthe* from walnut tree (*Juglans regia*) in China, with insight of the *Diaporthe eres* complex. *Mycological Progress* 17: 841–853. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1395-4>
- FAOSTAT (2021) Statistical database - World and France total production. Walnut with shell. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (February 1, 2023)
- Fawcett, H.S. (1915) *Melaxuma of the walnut, "Juglans regia": a preliminary report*. Berkeley, Cal. : Agricultural Experiment Station, Berkeley, California
- Florilège Florilège. Collection de noyers. Available from: <http://florilege.arcad-project.org/fr/collections/97433> (August 17, 2023)
- FranceAgriMer (2022) *Les chiffres-clés de la filière Fruits & Légumes frais et transformés en 2020*. Montreuil
- Frisullo, S., Lops, F., Sisto, D. & Trombetta, N.M. (1994) Pathogenic fungi in southern Italy. *Botryosphaeria ribis* Grossenb. et Duggar. on walnut. *Informatore Fitopatologico* 44: 61–64.
- Gao, H., Pan, M., Tian, C. & Fan, X. (2021) *Cytospora* and *Diaporthe* Species Associated With Hazelnut Canker and Dieback in Beijing, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 664366. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.664366>
- Garcin, A., Germain, E. & Prunet, J.-P. (1999) *Le Noyer - monographie*. CTIFL. Paris. 279 pp.
- GEVES (2023) Le Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France - GEVES. *Juglans regia*. <https://www.geves.fr/>. Available from: <https://www.geves.fr/catalogue/> (August 17, 2023)
- Giraud, M., Prunet, J.-P. & Verhaeghe, A. (2011) Le Point sur les maladies et ravageurs : Connaissance et maîtrise de la bactériose du noyer. *CTIFL*: 8.
- Giraud, M. & Verhaeghe, A. (2015) *Fiche bio-agresseur: Anthracnose à Colletotrichum sp. en verger de noyers*. 2pp.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R. & Sosnowski, M.R. (2018) Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease* 102: 12–39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>
- Griffith, G.W., Easton, G.L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H.J., Nicholson, J. & Perkins, W.T. (2007) Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters* 276: 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x>
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Woodhall, J., Armengol, J., Cinelli, T., Eichmeier, A., Ezra, D., Fontaine, F., Gramaje, D., Gutierrez-Aguirregabiria, A., Kaliterna, J., Kiss, L., Larignon, P., Luque, J., Mugnai, L., Naor, V., Raposo, R., Sándor, E., Váczy, K.Z. & Crous, P.W. (2018) *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 40: 135–153. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.06>
- Guarnaccia, V., Martino, I., Tabone, G., Brondino, L. & Gullino, M.L. (2020) Fungal pathogens associated with stem blight and dieback of blueberry in northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 59: 229–245. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11278>
- Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F. & Mugnai, L. (2019) Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural

- factors. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 49–71.  
[https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-25153](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-25153)
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit, R.J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Gusella, G., Giambra, S., Conigliaro, G., Burruano, S. & Polizzi, G. (2021) Botryosphaeriaceae species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy. *Forest Pathology* 51: e12661. <https://doi.org/10.1111/efp.12661>
- Gusella, G., Lawrence, D.P., Aiello, D., Luo, Y., Polizzi, G. & Michailides, T.J. (2022) Etiology of Botryosphaeria Panicle and Shoot Blight of Pistachio (*Pistacia vera*) Caused by Botryosphaeriaceae in Italy. *Plant Disease* 106: 1192–1202. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1672-RE>
- Gutleben, J., Chaib De Mares, M., van Elsas, J.D., Smidt, H., Overmann, J. & Sipkema, D. (2018) The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Critical Reviews in Microbiology* 44: 212–229. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332003>
- Haggag, W.M., Abou Rayya, M.S.M. & Kasim, N.E. (2007) First Report of a Canker Disease of Walnut Caused by *Botryodiplodia theobromae* in Egypt. *Plant Disease* 91: 226–226. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0226B>
- Havenga, M., Gatsi, G.M., Halleen, F., Spies, C.F.J., van der Merwe, R. & Mostert, L. (2019) Canker and Wood Rot Pathogens Present in Young Apple Trees and Propagation Material in the Western Cape of South Africa. *Plant Disease* 103: 3129–3141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0867-RE>
- Hilário, S. & Gonçalves, M.F.M. (2023) Mechanisms Underlying the Pathogenic and Endophytic Lifestyles in *Diaporthe*: An Omics-Based Approach. *Horticulturae* 9: 423. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040423>
- Holland, L.A., Travadon, R., Lawrence, D.P., Nouri, M.T. & Trouillas, F. (2021a) Evaluation of Pruning Wound Protection Products for the Management of Almond Canker Diseases in California. *Plant Disease* 105: 3368–3375. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2371-RE>
- Holland, L.A., Trouillas, F.P., Nouri, M.T., Lawrence, D.P., Crespo, M., Doll, D.A., Duncan, R.A., Holtz, B.A., Culumber, C.M., Yaghmour, M.A., Niederholzer, F.J.A., Lightle, D.M., Jarvis-Shean, K.S., Gordon, P.E. & Fichtner, E.J. (2021b) Fungal Pathogens Associated With Canker Diseases of Almond in California. *Plant Disease* 105: 346–360. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2128-RE>
- Hrycan, J., Hart, M., Bowen, P., Forge, T. & Úrbez-Torres, J.R. (2020) Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. *Phytopathologia Mediterranea* 59: 395–424. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11275>
- Ibragimov, G.R. (1960) The basis of measures for the control of bacteriosis of Persian Walnut. *Trudy Azerb. Stn. vses. Inst. Zashch. Rast.* 1: 123–134.
- Iqbal, S., Hernández, Y., Lolas, M., Elfar, K., Eskalen, A., Latorre, B.A. & Díaz, G.A. (2023) *Dothiorella sarmentorum* Causing Canker and Branch Dieback of English Walnut in Maule Region, Chile. *Plant Disease* 107: 1219. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-22-0636-PDN>
- Jahanban-Esfahlan, Ostadrahimi, Tabibiazar, & Amarowicz (2019) A Comprehensive Review on the Chemical Constituents and Functional Uses of Walnut (*Juglans* spp.) Husk. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 3920. <https://doi.org/10.3390/ijms20163920>
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)

- Jiménez Luna, I., Besoain, X., Saa, S., Peach-Fine, E., Cadiz Morales, F., Riquelme, N., Larach, A., Morales, J., Ezcurra, E., Ashworth, V.E.T.M. & Rolshausen, P.E. (2022a) Identity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from *Juglans regia* in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 79–94. <https://doi.org/10.36253/phyto-12832>
- Jiménez Luna, I., Cadiz, F., Aravena, R., Larach, A., Besoain, X., Ezcurra, E. & Rolshausen, P.E. (2020) First Report of *Diaporthe cynaroidis* and *D. australafricana* Associated with Walnut Branch Canker in Chile. *Plant Disease* 104: 2732. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0205-PDN>
- Jiménez Luna, I., Doll, D., Ashworth, V.E.T.M., Trouillas, F.P. & Rolshausen, P.E. (2022b) Comparative Profiling of Wood Canker Pathogens from Spore Traps and Symptomatic Plant Samples Within California Almond and Walnut Orchards. *Plant Disease* 106: 2182–2190. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1057-RE>
- Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J. & Olmedilla-Alonso, B. (2010) Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry* 123: 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.104>
- Juhásová, G., Ivanová, H. & Spišák, J. (2005) Occurrence and spread of the parasitic microscopic fungi on walnut (*Juglans regia*) on various localities of Slovakia. *Trakya University Journal of Natural Sciences* 6: 19–27.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., Belabess, Z. & Barka, E.A. (2022) Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms* 10: 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Laloum, Y., Verhaeghe, A., Moronvalle, A., Masson, C., Hebrard, M.-N., Picot, A., Pensec, F. & Belair, M. (2022) Projet CARIBOU : Élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer. *INFOS CTIFL* 386: 48–58.
- Larach, A., Riquelme, N., Salinas, A., Rolshausen, P.E., Seeger, M. & Besoain, X. (2022) First Report of *Diaporthe ambigua* Associated with Dead Arm Disease on Grapevine in Chile. *Plant Disease* 106: 1988. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2116-PDN>
- Larignon, P. (2016) *Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes*. 2nd ed.
- Lawrence, D.P., Travadon, R. & Baumgartner, K. (2015) Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. *Mycologia* 107: 926–940. <https://doi.org/10.3852/14-353>
- Lebas, B. & Massart, S. (2020) “Best practice” guidelines for validation and routine use of non-targeted techniques in diagnostic setting which could serve as a basis for a new EPPO Standard. 1–89pp.
- Lepais, O., Chancerel, E., Boury, C., Salin, F., Manicki, A., Taillebois, L., Dutech, C., Aissi, A., Bacles, C.F.E., Daverat, F., Launey, S. & Guichoux, E. (2020) Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8: e9085. <https://doi.org/10.7717/peerj.9085>
- Lesuthu, P., Mostert, L., Spies, C.F.J., Moyo, P., Regnier, T. & Halleen, F. (2019) *Diaporthe nebulae* sp. nov. and First Report of *D. cynaroidis*, *D. novem*, and *D. serafiniae* on Grapevines in South Africa. *Plant Disease* 103: 808–817. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0433-RE>
- Li, G., Liu, F., Li, J., Liu, Q. & Chen, S. (2016) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China. *Journal of Phytopathology* 164: 348–353. <https://doi.org/10.1111/jph.12422>
- Li, Z., Hanafy, H., Zhang, L., Sellaoui, L., Schadeck Netto, M., Oliveira, M.L.S., Seliem, M.K., Luiz Dotto, G., Bonilla-Petriciolet, A. & Li, Q. (2020) Adsorption of congo red and methylene blue dyes on an ashitaba waste and a walnut shell-based activated carbon from aqueous solutions:



- Experiments, characterization and physical interpretations. *Chemical Engineering Journal* 388: 124263. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124263>
- Linaldeddu, B.T., Franceschini, A., Alves, A. & Phillips, A.J.L. (2013) *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia* 105: 1266–1274. <https://doi.org/10.3852/12-370>
- Linaldeddu, B.T., Rossetto, G., Maddau, L., Vatrano, T. & Bregant, C. (2023) Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae and *Phytophthora* Species Associated with Emerging Olive Diseases in Italy. *Agriculture* 13: 1575. <https://doi.org/10.3390/agriculture13081575>
- Liu, J., Sun, C., Xue, D.-S., Li, B., Lian, S. & Wang, C. (2020) Identification of the pathogen causing shoot dieback on walnut and study on its biological characteristics. *Acta Phytopathologica Sinica* 50: 774–778.
- López-Moral, A., del Carmen Raya, M., Ruiz-Blancas, C., Medialdea, I., Lovera, M., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2020a) Aetiology of branch dieback, panicle and shoot blight of pistachio associated with fungal trunk pathogens in southern Spain. *Plant Pathology* 69: 1237–1269. <https://doi.org/10.1111/ppa.13209>
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B.I., Gámiz, A.M., Michailides, T.J., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2022) Effects of Cultivar Susceptibility, Branch Age, and Temperature on Infection by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Fungi on English Walnut (*Juglans regia*). *Plant Disease* 106: 2920–2926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2042-RE>
- López-Moral, A., Lovera, M., del Carmen Raya, M. del C., Cortés-Cosano, N., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2020b) Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Species in Southern Spain. *Plant Disease* 104: 533–550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0545-RE>
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B.I., Michailides, T.J., Arquero, O., Trapero, A. & Agustí-Brisach, C. (2023) Effects of cultivar susceptibility, fruit maturity, and natural wounds on the infection of English walnut (*Juglans regia* L.) fruits by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* fungi. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01492-0>
- Luo, X., Zhou, H., Cao, D., Yan, F., Chen, P., Wang, J., Woeste, K., Chen, X., Fei, Z., An, H., Malvolti, M., Ma, K., Liu, C., Ebrahimi, A., Qiao, C., Ye, H., Li, M., Lu, Z., Xu, J., Cao, S. & Zhao, P. (2022) Domestication and selection footprints in Persian walnuts (*Juglans regia*). L.-J. Qu (ed.). *PLOS Genetics* 18: e1010513. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010513>
- Lynch, S.C., Eskalen, A., Zambino, P.J., Mayorquin, J.S. & Wang, D.H. (2013) Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with coast live oak (*Quercus agrifolia*) decline in southern California. *Mycologia* 105: 125–140. <https://doi.org/10.3852/12-047>
- Ma, Z., Boehm, E.W.A., Luo, Y. & Michailides, T.J. (2001) Population Structure of *Botryosphaeria dothidea* from Pistachio and Other Hosts in California. *Phytopathology* 91: 665–672. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.7.665>
- Ma, Z., Luo, Y. & Michailides, T.J. (2003) Spatiotemporal Changes in the Population Structure of *Botryosphaeria dothidea* from California Pistachio Orchards. *Phytopathology* 94: 326–332. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2004.94.4.326>
- Makris, G., Solonos, S., Christodoulou, M. & Kanetis, L.I. (2022) First Report of *Diaporthe foeniculina* Associated with Grapevine Trunk Diseases on *Vitis vinifera* in Cyprus. *Plant Disease* 106: 1294. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0503-PDN>
- Manawasinghe, I.S., Dissanayake, A.J., Li, X., Liu, M., Wanasinghe, D.N., Xu, J., Zhao, W., Zhang, W., Zhou, Y., Hyde, K.D., Brooks, S. & Yan, J. (2019) High Genetic Diversity and Species

- Complexity of *Diaporthe* Associated With Grapevine Dieback in China. *Frontiers in Microbiology* 10: 1936. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01936>
- Manawasinghe, I.S., Phillips, A.J.L., Hyde, K.D., Chethana, K.W.T., Zhang, W., Zhao, W.S., Yan, J.Y. & Li, X.H. (2016) Mycosphere Essays 14: Assessing the aggressiveness of plant pathogenic Botryosphaeriaceae. *Mycosphere* 7: 883–892. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/7>
- Manawasinghe, I.S., Zhang, W., Li, X., Zhao, W., Chethana, K.W.T., Xu, J., Chen, Z., Dissanayaka, A.J., Mugnai, L., Úrbez-Torres, J.R., Savocchia, S., Hyde, K.D. & Yan, J. (2018) Novel microsatellite markers reveal multiple origins of *Botryosphaeria dothidea* causing the Chinese grapevine trunk disease. *Fungal Ecology* 33: 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.02.004>
- Mang, S.M., Marccone, C., Maxim, A. & Camele, I. (2022) Investigations on Fungi Isolated from Apple Trees with Dieback Symptoms from Basilicata Region (Southern Italy). *Plants* 11: 1374. <https://doi.org/10.3390/plants11101374>
- Mannaa, M. & Seo, Y.-S. (2021) Plants under the Attack of Allies: Moving towards the Plant Pathobiome Paradigm. *Plants* 10: 125. <https://doi.org/10.3390/plants10010125>
- Marcelino, J., Giordano, R., Gouli, S., Gouli, V., Parker, B.L., Skinner, M., TeBeest, D. & Cesnik, R. (2008) *Colletotrichum acutatum* var. *fiorinae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fiorinae* var. nov.) infection of a scale insect. *Mycologia* 100: 353–374. <https://doi.org/10.3852/07-174r>
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J.H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Spatafora, J.W., Hesse, C.N., Robbertse, B. & Slippers, B. (2017) *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18: 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
- Martínez-García, P.J., Crepeau, M.W., Puiu, D., Gonzalez-Ibeas, D., Whalen, J., Stevens, K.A., Paul, R., Butterfield, T.S., Britton, M.T., Reagan, R.L., Chakraborty, S., Walawage, S.L., Vasquez-Gross, H.A., Cardeno, C., Famula, R.A., Pratt, K., Kuruganti, S., Aradhya, M.K., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., Salzberg, S.L., Wegrzyn, J.L., Langley, C.H. & Neale, D.B. (2016) The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. *The Plant Journal* 87: 507–532. <https://doi.org/10.1111/tpj.13207>
- Martino, I., Agustí-Brisach, C., Nari, L., Gullino, M.L. & Guarnaccia, V. (2023) Characterization and pathogenicity of fungal species associated with dieback of apple trees in Northern Italy. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0645-RE>
- Matuo, T. & Sakurai, Y. (1954) Notes on the three newly-found diseases of Walnut stems in Japan. *Research Report. Fac. Text. Seric.* 4: 9–12.
- McGranahan, G. & Leslie, C. (1991) Walnuts (*Juglans*). *Acta Horticulturae* 290: 907–974. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.20>
- McGranahan, G. & Leslie, C. (2012) Walnut. *Fruit Breeding*. Handbook of Plant Breeding. Springer, Boston, MA, pp. 827–846.
- Mehl, J.W.M., Slippers, B., Roux, J. & Wingfield, M.J. (2017) Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host. *Fungal Biology* 121: 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.015>
- Meng, L., Yu, C., Wang, C. & Li, G. (2018) First Report of *Diaporthe amygdali* Causing Walnut Twig Canker in Shandong Province of China. *Plant Disease* 102: 1859–1859. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0192-PDN>
- Michailides, T., Morgan, D.P., Felts, D.G., Luo, Y., Puckett, R., Hasey, J., Lampinen, B., Symmes, E., Coates, W., Buchner, R., Lightle, D., Rodriguez, D. & Cunningham, C. (2016) *Epidemiology*

- and management of *Botryosphaeria/Phomopsis* canker and blight and anthracnose blight of walnut in California. California Walnut Board, Folsom, CA., 1–34pp.
- Michailides, T.J., Chen, S., Coates, B., Morgan, D., Puckett, R., Anderson, K., Buchner, R., DeBuse, C. & Fichtner, E. (2012) *Managing anthracnose blight and Botryosphaeriaceae and Phomopsis cankers of walnut*. Walnut research Reports. California Walnut Board, Folsom, CA., 367–388pp.
- Michailides, T.J., Chen, S., Morgan, D., Felts, D., Nouri, M.T., Puckett, R., Luna, M., Hasey, J., Anderson, K., Coates, W., Fichtner, E., Buchner, R. & Bentley, W. (2013) *Managing Botryosphaeria/Phomopsis cankers and anthracnose blight of walnut in California*. California Walnut Board, Folsom, CA., 325–346pp.
- Michailides, T.J. & Hasey, J. (2010) *Botryosphaeria and Phomopsis cankers of walnuts in California*. University of California, 5–7pp.
- Michailides, T.J., Luo, Y., Felts, D., Moral, J. & Puckett, R. (2017) *Botryosphaeria and Phomopsis Canker Management in California Walnut Orchards*.
- Mihaescu, C., Dunea, D., Băşa, A.G. & Frasin, L.N. (2021) Characteristics of *Phomopsis juglandina* (Sacc.) Hohn. Associated with Dieback of Walnut in the Climatic Conditions of Southern Romania. *Agronomy* 11: 46. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010046>
- Mircetich, S.M. & Matheron, M.E. (1983) *Phytophthora* root and crown rot of walnut trees. *Phytopathology* 73: 1481–1488.
- Moragrega, C., Matias, J., Aletà, N., Montesinos, E. & Rovira, M. (2011) Apical Necrosis and Premature Drop of Persian (English) Walnut Fruit Caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Plant Disease* 95: 1565–1570. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0259>
- Moragrega, C. & Özaktañ, H. (2010) Apical Necrosis of Persian (english) Walnut (*Juglans regia*): An Update. *Journal of Plant Pathology* 92: S67–S71. <https://www.jstor.org/stable/41998757>
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Pérez-Rodríguez, M., Xaviér, C., Raya, M.C., Rhouma, A. & Trapero, A. (2017) Identification of Fungal Species Associated with Branch Dieback of Olive and Resistance of Table Cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 101: 306–316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0806-RE>
- Moral, J., Morgan, D. & Michailides, T.J. (2019a) Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection* 126: 104927. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104927>
- Moral, J., Morgan, D., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2019b) Ecology and Epidemiology of Diseases of Nut Crops and Olives Caused by *Botryosphaeriaceae* Fungi in California and Spain. *Plant Disease* 103: 1809–1827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A. & Michailides, T.J. (2010) Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Collected from Olive and Other Hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100: 1340–1351. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-09-0343>
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., de Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L.F., Romero, J. & Trapero, A. (2018) Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection* 114: 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.033>
- Morales, A., Labidi, J. & Gullón, P. (2021) Hydrothermal treatments of walnut shells: A potential pretreatment for subsequent product obtaining. *The Science of the Total Environment* 764: 142800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142800>
- Morales, A., Labidi, J. & Gullón, P. (2022) Integral valorisation of walnut shells based on a three-step sequential delignification. *Journal of Environmental Management* 310: 114730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114730>

- Morales-Cruz, A., Allenbeck, G., Figueroa-Balderas, R., Ashworth, V.E., Lawrence, D.P., Travadon, R., Smith, R.J., Baumgartner, K., Rolshausen, P.E. & Cantu, D. (2018) Closed-reference metatranscriptomics enables *in planta* profiling of putative virulence activities in the grapevine trunk disease complex. *Molecular Plant Pathology* 19: 490–503. <https://doi.org/10.1111/mpp.12544>
- Morgan, D.P., Driever, G.F., Felts, D., Krueger, W.H. & Michailides, T.J. (2009) Evaluation of Two Disease Warning Systems for Botryosphaeria Panicle and Shoot Blight of California Pistachio and Efficient Control Based on Early-Season Sprays. *Plant Disease* 93: 1175–1181. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1175>
- Moricca, S., Innocenti, G. & Ragazzi, A. (2018) Epidemiological Investigations Shed Light on the Ecological Role of the Endophyte *Phomopsis quercina* in Mediterranean Oak Forests. In: A. M. Pirttilä & A. C. Frank (eds.) *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Forestry Sciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 207–227.
- Moya-Elizondo, E.A., Lagos, M.J., San Martin, J. & Ruiz, B. (2021) First Report of *Alternaria alternata* and *Fusarium* spp. Causing Brown Apical Necrosis in Walnut Fruit in Southern Chile. *Plant Health Progress* 22: 573–574. <https://doi.org/10.1094/PHP-05-21-0080-BR>
- Nagel, J.H., Wingfield, M.J. & Slippers, B. (2021) Next-generation sequencing provides important insights into the biology and evolution of the Botryosphaeriaceae. *Fungal Biology Reviews* 38: 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.09.002>
- Nerva, L., Garcia, J.F., Favaretto, F., Giudice, G., Moffa, L., Sandrini, M., Cantu, D., Zanzotto, A., Gardiman, M., Velasco, R., Gambino, G. & Chitarra, W. (2022) The hidden world within plants: metatranscriptomics unveils the complexity of wood microbiomes. *Journal of Experimental Botany* 73: 2682–2697. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac032>
- Ni, Z.-J., Zhang, Y.-G., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., Shang, Y.-F. & Wei, Z.-J. (2022) Exploration of walnut components and their association with health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62: 5113–5129. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881439>
- van Niekerk, J., Fourie, P., Halleen, F. & Crous, P. (2006) *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S43–S54. <https://www.jstor.org/stable/26463235>
- Nilsson, R.H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P. & Tedersoo, L. (2019) Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology* 17: 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nouri, M.T., Lawrence, D.P., Holland, L.A., Doll, D.A., Kallsen, C.E., Culumber, C.M. & Trouillas, F.P. (2019) Identification and Pathogenicity of Fungal Species Associated with Canker Diseases of Pistachio in California. *Plant Disease* 103: 2397–2411. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1717-RE>
- Novak, A., Ivić, D., Sever, Z., Fazinić, T. & Šimunac, K. (2018) Botryosphaeria canker of walnut in Croatia. *Glasiło biljne zaštite* 18: 316–321. <https://hrcak.srce.hr/236900>
- O'Donnell, K., Whitaker, B.K., Laraba, I., Proctor, R.H., Brown, D.W., Broders, K., Kim, H.-S., McCormick, S.P., Busman, M., Aoki, T., Torres-Cruz, T.J. & Geiser, D.M. (2022) DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. *Plant Disease* 106: 1597–1609. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2035-SR>
- Oliveira, M. & Azevedo, L. (2022) Molecular Markers: An Overview of Data Published for Fungi over the Last Ten Years. *Journal of Fungi* 8: 803. <https://doi.org/10.3390/jof8080803>
- Palmero, D., Rodríguez, J.M., de Cara, M., Camacho, F., Iglesias, C. & Tello, J.C. (2011) Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric

- dust and rainfall dust. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 13–20.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0831-5>
- Penet, L., Guyader, S., Pétro, D., Salles, M. & Bussière, F. (2014) Direct Splash Dispersal Prevails over Indirect and Subsequent Spread during Rains in *Colletotrichum gloeosporioides* Infecting Yams. *PLOS ONE* 9: e115757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115757>
- Peng, Y., Li, S.J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J.P., Gao, A.J., Yao, X., Ruan, J.J. & Xu, B.L. (2021) Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>
- Pérez-Jaramillo, J.E., Carrión, V.J., de Hollander, M. & Raaijmakers, J.M. (2018) The wild side of plant microbiomes. *Microbiome* 6: 143. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2013) The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A. & Crous, P.W. (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 21: 29–55. <https://doi.org/10.3767/003158508X340742>
- Prabhakaran, S., Afifah Zaynab, M., Chinnarasu, K. & Keerthana, J. (2021) Performance Evolution of Walnut Shell Particle Filled Glass Fiber Reinforced Composite. *Natural Volatiles & Essential Oils* 8: 3458–3467.
- Putra, I.P., Rahayu, G. & Hidayat, I. (2015) Impact of Domestication on the Endophytic Fungal Diversity Associated With Wild Zingiberaceae at Mount Halimun Salak National Park. *HAYATI Journal of Biosciences* 22: 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.005>
- Radix, P., Seigle-Murandi, F. & Charlot, G. (1994) Walnut blight: development of fruit infection in two orchards. *Crop Protection* 13: 629–631. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90010-8)
- Réseau des Nouvelles des Marchés (2022) *La noix en 2021-2022*. 1–4pp.
- Rumbos, I.C. (1987) Twig and branch dieback of walnut trees induced by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Pathology* 36: 602–605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1987.tb02281.x>
- Ruppert, K.M., Kline, R.J. & Rahman, M.S. (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Sakalidis, M.L., Hardy, G.E.St.J. & Burgess, T.I. (2011) Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*–*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.026>
- Salotti, I., Ji, T. & Rossi, V. (2022) Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953760>
- Salotti, I., Liang, Y.-J., Ji, T. & Rossi, V. (2023) Development of a model for *Colletotrichum* diseases with calibration for phylogenetic clades on different host plants. *Frontiers in Plant Science* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1069092>
- Sandven, P. & Lassen, J. (1999) Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3731–3732. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3731-3732.1999>
- Santé publique France (2019) *Recommandations sur l'alimentation, l'activité physique & la sédentarité pour les adultes*. Santé publique France, 20pp.
- Santos, L., Alves, A. & Alves, R. (2017) Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. *PeerJ* 5: e3120. <https://doi.org/10.7717/peerj.3120>

- Savary, O., Coton, M., Jany, J.-L., Coroller, L. & Coton, E. (2022) Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated Nectriaceae species. *International Journal of Food Microbiology* 364: 109509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Diéguez-Uribeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliiegerova, K., Furtado, M., García, M.A., Ge, Z.-W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.-D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.-M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.-B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Kõljalg, U., Kovács, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Liggenstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.-M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramírez, J.M., Schmitt, I., Schüßler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.-O., Sung, G.-H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.-M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiß, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.-C., Zhang, N., Zhuang, W.-Y. & Schindel, D. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Scholz, M.B., Lo, C.-C. & Chain, P.S.G. (2012) Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.013>
- SENuRA (2019) *Reconnaissance maladies et ravageurs en verger de noyers*. Chatte, France
- SENuRA (2021) *Guide de taille du noyer - Projet dRaSTIC*. Chatte, France, 1–6pp.
- Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L. & Lupo, S. (2016) Botryosphaeriaceae species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146: 519–530. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0936-4>
- Shejkar, S.K., Agrawal, D.A. & Agrawal, D.B. (2020) Walnut Shell Particulates as Filler Material in Polymeric Matrix: A Review. *International Journal of Engineering Research in Current Trends*. Bhopal, India, pp. 41–43.
- Shurtleff, M.C. & Averre, C.W.I. (1997) *Glossary of plant-pathological terms*. American Phytopathological Society. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA. 361 pp.
- Silva-Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M. de los A., Lolas, M., Díaz, G.A., Cantu, D. & Castro, A. (2021) Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against

- Trunk Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 11: 614620.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614620>
- Sisto, D. & Luisi, N. (1983) A walnut dieback caused by *Phomopsis* in southern Italy. *L'Italia Forestale e Montana* 38: 214–223.
- Slippers, B. & Wingfield, M.J. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Sogonov, M.V., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Mejía, L.C. & White, J.F. (2008) Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Studies in Mycology* 62: 1–77.  
<https://doi.org/10.3114/sim.2008.62.01>
- Sohrabi, M., Mohammadi, H., León, M., Armengol, J. & Banihashemi, Z. (2020) Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 157: 327–351. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01996-w>
- Spies, C.F.J., Mostert, L., Carlucci, A., Moyo, P., van Jaarsveld, W.J., du Plessis, I.L., van Dyk, M. & Halleen, F. (2020) Dieback and decline pathogens of olive trees in South Africa. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 45: 196–220.  
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.08>
- Syndicat professionnel de la noix, du cerneau et de l'huile de Noix du Périgord Noix du Périgord I Site Officiel. Available from: <https://www.noixdupericord.com/fr/> (March 23, 2023)
- Tan, M., Ma, L., Rehman, M.S.U., Ahmed, M.A., Sajid, M., Xu, X., Sun, Y., Cui, P. & Xu, J. (2019) Screening of acidic and alkaline pretreatments for walnut shell and corn stover biorefining using two way heterogeneity evaluation. *Renewable Energy* 132: 950–958.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.131>
- Tautz, D. & Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127–4138. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R.H., Kennedy, P.G., Yang, T., Anslan, S. & Mikryukov, V. (2022) Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology* 31: 2769–2795. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>
- Thomidis, T. & Michailides, T.J. (2009) Studies on *Diaporthe eres* as a New Pathogen of Peach Trees in Greece. *Plant Disease* 93: 1293–1297. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1293>
- Travadon, R., Lawrence, D.P., Moyer, M.M., Fujiyoshi, P.T. & Baumgartner, K. (2022) Fungal species associated with grapevine trunk diseases in Washington wine grapes and California table grapes, with novelties in the genera *Cadophora*, *Cytospora*, and *Sporocadus*. *Frontiers in Fungal Biology* 3: 1018140. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1018140>
- Tsedaley, B. (2015) A Review on Disease Detection, Pathogen Identification and Population Genetics in Fungi. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5: 6.
- Udayanga, D., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. (2014a) Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity* 67: 203–229. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0297-2>
- Udayanga, D., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y. & Hyde, K.D. (2014b) Species limits in *Diaporthe* : molecular re-assessment of *D. citri* , *D. cytospora* , *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 32: 83–101.  
<https://doi.org/10.3767/003158514X679984>
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P.W., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. (2012) A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity* 56: 157–171. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0190-9>
- Úrbez-Torres, J.R. (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S5–S45. <https://www.jstor.org/stable/26458709>



- Úrbez-Torres, J.R. & Gubler, W.D. (2009) Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevine Cankers in California. *Plant Disease* 93: 584–592. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0584>
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Smith, R.J. & Gubler, W.D. (2013a) Phomopsis Dieback: A Grapevine Trunk Disease Caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease* 97: 1571–1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1072-RE>
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Vossen, P.M., Krueger, W.H. & Gubler, W.D. (2013b) Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. *Plant Disease* 97: 231–244. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0390-RE>
- Varjas, V., Kovács, Cs., Lakatos, T., Tóth, T. & Bujdosó, G. (2019) First Report of Walnut Anthracnose Caused by *Colletotrichum fioriniae* on English (Persian) Walnut Fruits in Hungary. *Plant Disease* 103: 2964–2964. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0286-PDN>
- Varjas, V., Lakatos, T., Tóth, T. & Kovács, C. (2020) First Report of *Colletotrichum godetiae* Causing Anthracnose and Twig Blight on Persian Walnut in Hungary. *Plant Disease* 105: 702–702. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0607-PDN>
- Vercesi, A. (1982) Dieback on walnut caused by *Phomopsis*. *Informatore Fitopatologico* 32: 52–54.
- Verhaeghe, A. (2014) *Anthracnose* - *Gnomonia leptostyla*. . Plaquette anthracnose
- Verhaeghe, A., Masson, C., Le Floch, G., Giraud, M. & Nodet, P. (2021) *Colletotrichum* : new pathogen in walnut orchards – characterization of the fungus and research on control methods. *Acta Horticulturae* 1318: 147–150. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1318.22>
- Verheggen, F., Verhaeghe, A., Giordanengo, P., Tassus, X. & Escobar-Gutiérrez, A. (2017) Walnut husk fly, *Rhagoletis completa* (Diptera: Tephritidae), invades Europe: invasion potential and control strategies. *Applied Entomology and Zoology* 52: 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13355-016-0459-7>
- Vettrano, A.M., Belisario, A., Maccaroni, M. & Vannini, A. (2003) Evaluation of root damage to English walnut caused by five *Phytophthora* species. *Plant Pathology* 52: 491–495. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00864.x>
- Vonaesch, P., Anderson, M. & Sansonetti, P.J. (2018) Pathogens, microbiome and the host: emergence of the ecological Koch's postulates. *FEMS Microbiology Reviews* 42: 273–292. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy003>
- Voronin, É.I., Kartausova, V.A. & Mishchenko, V.F. (1986) Field evaluation of resistance in nut crops to fungal diseases in the Crimea. *Sbornik Nauchnykh Trudov po Prikladnoĭ Botanike, Genetike i Seleksii* 104: 98–99.
- Voulgaridis, V. & Vassiliou, V.G. (2005) The walnut wood and its utilisation to high value products. *Acta Horticulturae* 705: 69–81. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.705.7>
- Wang, S., Tan, Y., Li, S. & Zhu, T. (2022) Structural and Dynamic Analysis of Leaf-Associated Fungal Community of Walnut Leaves Infected by Leaf Spot Disease Based Illumina High-Throughput Sequencing Technology. *Polish Journal of Microbiology* 71: 429–441. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-038>
- Wang, X., Li, K., Han, M., Zhang, W., Li, X., Ma, D., Wang, F., Pang, M. & Qi, J. (2020) Isolation and identification of endophytic fungi in walnut. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 508: 012138. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/508/1/012138>
- Weising, K., Atkinson, R.G. & Gardner, R.C. (1995) Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *Genome Research* 4: 249–255. <https://doi.org/10.1101/gr.4.5.249>
- Whitelaw-Weckert, M.A., Rahman, L., Appleby, L.M., Hall, A., Clark, A.C., Waite, H. & Hardie, W.J. (2013) Co-infection by Botryosphaeriaceae and *Ilyonectria* spp. fungi during propagation causes decline of young grafted grapevines. *Plant Pathology* 62: 1226–1237. <https://doi.org/10.1111/ppa.12059>

- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A.L. & Jankowska, A. (2016) Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. *Microbial Pathogenesis* 100: 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.009>
- Woeste, K.E. & Beineke, W.F. (2001) An efficient method for evaluating black walnut for resistance to walnut anthracnose in field plots and the identification of resistant genotypes. *Plant Breeding* 120: 454–456. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00632.x>
- van Wyk, M., Heath, R.N., Tarigan, M., Vermeulen, M. & Wingfield, M.J. (2010) Comparison of procedures to evaluate the pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata sensu lato* isolates from Eucalyptus in South Africa. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 72: 57–62. <https://doi.org/10.2989/20702620.2010.507011>
- Yabaneri, C. & Sevim, A. (2023) Endophytic fungi from the common walnut and their in vitro antagonistic activity against *Ophiognomonium leptostyla*. *Biologia* 78: 361–371. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01218-0>
- Yan, J.-Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu, J.-K., Hyde, K.D., Seem, R.C., Zhang, G.-Z., Wang, Z.-Y., Yao, S.-W., Bai, X.-J., Dissanayake, A.J., Peng, Y.-L. & Li, X.-H. (2013) Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity* 61: 221–236. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0251-8>
- Yang, Q., Fan, X.-L., Guarnaccia, V. & Tian, C.-M. (2018a) High diversity of *Diaporthe* species associated with dieback diseases in China, with twelve new species described. *MycKeys* 39: 97–149. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.26914>
- Yang, R.-H., Su, J.-H., Shang, J.-J., Wu, Y.-Y., Li, Y., Bao, D.-P. & Yao, Y.-J. (2018b) Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE* 13: e0206428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>
- Yang, T., Groenewald, J.Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L. & Crous, P.W. (2017) Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal Biology* 121: 322–346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>
- Yang, H., Cao, G., Jiang, S., Han, S., Yang, C., Wan, X., Zhang, F., Chen, L., Xiao, J., Zhu, P., Zhang, D., He, F. & Xing, W. (2021) Identification of the anthracnose fungus of walnut (*Juglans* spp.) and resistance evaluation through physiological responses of resistant vs. susceptible hosts. *Plant Pathology* 70: 1219–1229. <https://doi.org/10.1111/ppa.13354>
- Yildiz, A., Benlioglu, S., Benlioglu, K. & Korkom, Y. (2022) Occurrence of twig blight and branch dieback of walnut caused by Botryosphaeriaceae species in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 129: 687–693. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00591-x>
- Yu, Z., Tang, G., Peng, S., Chen, H. & Zhai, M. (2015) *Neofusicoccum parvum* causing canker of seedlings of *Juglans regia* in China. *Journal of Forestry Research* 26: 1019–1024. <https://doi.org/10.1007/s11676-015-0130-0>
- Zabiák, A., Kovács, C., Takács, F., Pál, K., Peles, F., Fekete, E., Karaffa, L., Mihály, K., Flippi, M. & Sándor, E. (2023) *Diaporthe* and *Diplodia* Species Associated with Walnut (*Juglans regia* L.) in Hungarian Orchards. *Horticulturae* 9: 205. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020205>
- Zhang, M., Zhang, Y.K., Geng, Y.H., Zang, R. & Wu, H.Y. (2017) First Report of *Diplodia seriata* Causing Twig Dieback of English Walnut in China. *Plant Disease* 101: 1036–1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0458-PDN>
- Zhu, Y.Z., Liao, W.J., Zou, D.X., Wu, Y.J. & Zhou, Y. (2015) First Report of Leaf Spot Disease on Walnut Caused by *Colletotrichum fioriniae* in China. *Plant Disease* 99: 289–289. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0938-PDN>



**Titre :** Les agents du dépérissement des noyers en France : écologie, diversité et cycle de vie

**Mots clés :** dépérissement du noyer, pathobiome fongique, génétique des populations

**Résumé :** Depuis 2015, les nuciculteurs français font face une forte occurrence de symptômes jusqu'alors peu constatés, tels que des brûlures, nécroses et/ou décoloration sur rameaux, jeunes pousses et/ou fruits. Décrits dans la littérature depuis le début des années 2000 en Californie, ces symptômes sont caractéristiques de la maladie du dépérissement du noyer et principalement associés à des espèces de Botryosphaeriaceae, retrouvées en co-occurrence avec des espèces de *Diaporthe*. Afin de mieux comprendre l'étiologie et l'épidémiologie de cette maladie, cette thèse visait à étudier le pathobiome fongique français, via une double approche culturale et par séquençage métabarcoding. Après avoir mis au point une méthode d'analyse des échantillons de noyers par séquençage métabarcoding, l'étude approfondie de brous et de rameaux de noyers a permis de mettre en évidence un cortège de six principales espèces pathogènes:

*B. dothidea*, *N. parvum*, *D. eres*, *F. juglandicola*, *C. godetiae* et *C. fioriniae*. Puis, les conditions météorologiques favorisant leur présence ainsi que les interactions entre ces espèces et avec d'autres espèces du phytomicrobiome ont été décrites, montrant à la fois des interactions compétitives, mettant en jeu *N. parvum*, et facilitatrices entre *F. juglandicola* et *D. eres*. Dans un second temps, l'étude de la diversité et de la structure des populations des deux espèces pathogènes de Botryosphaeriaceae à l'aide de marqueurs microsatellites a mis en évidence leur mode de reproduction majoritairement clonal et une différenciation géographique des populations de *B. dothidea*. L'exploration de l'origine de l'introduction de ces espèces sur noyers a révélé une forte proximité génétique avec des isolats provenant de vignes françaises, à la différence des populations californiennes ou espagnoles.

**Title :** Walnut dieback pathogens in France : ecology, diversity and life cycle

**Keywords :** walnut dieback, fungal pathobiome, population genetic

**Abstract :** New unseen symptoms have been frequently noticed in French walnut orchards since 2015, i.e. twig, shoot and/or fruit blight, necrosis and/or wood discoloration. These symptoms, which have been described in the literature since the early 2000s in California, are typical of walnut dieback disease and are mainly associated with Botryosphaeriaceae species, often co-occurring with *Diaporthe* species. To gain better insight into the etiology and epidemiology of this disease, the aim of this PhD thesis was to explore the French fungal pathobiome based on a dual approach of cultivation and metabarcoding sequencing. After the development of a metabarcoding approach applied to walnut samples, the in-depth study of walnut husks and twigs highlighted 6 main pathogenic species:

*B. dothidea*, *N. parvum*, *D. eres*, *F. juglandicola*, *C. godetiae* and *C. fioriniae*. The meteorological conditions favouring their presence and the interactions between these species and with other species of the phytomicrobiome were then described, showing both competitive interactions involving *N. parvum*, and facilitative interactions between *F. juglandicola* and *D. eres*. Secondly, a study of the diversity and population structure of the two pathogenic species of Botryosphaeriaceae using microsatellite markers highlighted a predominant clonal mode of reproduction and a geographical differentiation of *B. dothidea* populations. Exploring the origin of the introduction of these species on walnut trees revealed a strong genetic proximity with isolates from French vineyards, in contrast to Californian or Spanish populations.