

## Resum

En els últims anys, l'augment del comerç mundial de plantes i el moviment humà ha promogut el risc d'introducció de plantes invasores i patògens exòtics. Les invasions biològiques operen a nivell mundial i es consideren de com la segona causa de pèrdua de biodiversitat després de l'alteració i destrucció directa de l'hàbitat. En aquest context, *Phytophthora* és un dels mes importants patògens vegetals i agressius en l'agricultura i la silvicultura. La detecció primerenca i la identificació de les seves vies resulten de gran importància per a minimitzar l'amenaça que representen per als ecosistemes naturals. S'han desenvolupat i aplicat diferents mètodes moleculars per a la detecció de patògens de plantes en mostres ambientals. Aquests mètodes permeten una detecció i identificació de patògens ràpida i precisa fins i tot quan la quantitat d'indòcul és baixa. Per tant, es proposa un nou mètode millorat per a la seva detecció en mostres ambientals a partir de l'extracció d'ADN ambiental (eDNA) de diferents fonts (sòl, arrels i aigua) i diferents ecosistemes.

L'objectiu del primer capítol va ser aplicar HTS (*High Throughput Sequencing*) per investigar la presència de *Phytophthora* en diferents comunitats de plantes en boscos naturals, plantacions i ambients aquàtics al nord d'Espanya. L'eDNA es va extraure del sòl i de l'aigua dels rius i rierols dels boscos de *Fagus sylvatica* i *Abies alba* i de plantacions de *Chamaecyparis lawsoniana* i *Pseudotsuga menziesii* al nord d'Espanya (bosc d'Irati i Villanúa). Es va dissenyar i va aplicar un assaig específic per a la detecció de *Phytophthora* mitjançant la seqüenciació massiva de amplicons basat en la regió ITS1. Diferents valors de *threshold* es van analitzar per a la separació òptima d'espècies de *Phytophthora* en les anàlisis bioinformàtics. L'agrupament al 99% va ser el millor criteri per separar la major part de les espècies de *Phytophthora*. Múltiples Unitats Operacionals Taxonòmiques Moleculares (MOTU) corresponents a 36 espècies

diferents de *Phytophthora* es van amplificar en les mostres ambientals. La piroseqüenciació d'amplicons de mostres de sòl va revelar una diversitat baixa de *Phytophthora* (13 espècies) en comparació amb les 35 espècies detectades en mostres d'aigua. Tretze dels MOTU detectats en els rius i rierols no van mostrar homologia amb seqüències dipositades en les bases de dades, el que revela que la piroseqüenciació de l'ADN ambiental és una estratègia útil per avaluar la diversitat d'espècies de *Phytophthora* en els ecosistemes naturals.

Una vegada que la tècnica va ser desenvolupada i validada, es va proposar un altre objectiu enfocat en el decaïment de la carrasca. La carrasca (*Quercus ilex*) és l'espècie arbòria més representativa de la Península Ibèrica i l'arbre principal de les deveses. El decaïment de la carrasca en sòls no calcaris al sud-oest d'Espanya s'ha associat amb *Phytophthora cinnamomi* durant dècades. No obstant això, altres espècies de *Phytophthora* com *P. quercina* i *P. psychrophila* s'han associat amb el declivi de *Quercus* a la part oriental d'Espanya on predominen els sòls calcaris. Amb l'objectiu d'investigar la implicació de *Phytophthora* spp. en el declivi de la carrasca a l'est d'Espanya, es van seleccionar dos boscos en diferents zones geogràfiques (Alcoi i Vallivana) com a llocs de mostreig. Les mostres de sòl i arrel es van analitzar per piroseqüenciació d'amplicons. Els resultats de la seqüenciació massiva van mostrar la diversitat d'espècies de *Phytophthora*, i va revelar que un taxó mai aïllat de *Phytophthora*, anomenat de forma provisional *Phytophthora* taxon ballota, va ser l'espècie predominant en les dues àrees. A més, es va desenvolupar un assaig de PCR a temps real, basat en els resultats de la piroseqüenciació, per a la detecció d'aquest taxó de *Phytophthora* mai aïllat, i també per a la detecció de *P. quercina*. Els assajos de qPCR es van aplicar en mostres de sòl i arrel, i en cultius purs de *Phytophthora*. Els

nous assaigs van mostrar alta especificitat i van ser consistents amb els resultats de seqüenciació massiva.

Finalment, els esforços es van centrar en l'estratègia de mostreig en mostres d'aigua, ja que com s'ha vist anteriorment, els rius i rierols representaven un *hotspot* per a la detecció de *Phytophthora*. L'aïllament d'espècies de *Phytophthora* en mostres d'aigua és comuna i mundialment conegut. En general, els mètodes més comuns utilitzats són el trampeig i el filtrat d'aigua. Tots dos mètodes són exitosos per a l'aïllament d'espècies aquàtiques incloses en el clade 6. No obstant això, només unes poques espècies d'altres clades són aïllades usant aquests mètodes a causa del índex relativament baix disponible. En aquest estudi, a l'octubre de 2013 es van mostrejear un total de 15 rius i rierols, que comprenien àrees forestals a la muntanya i àrees agrícoles a la vall. A cada riu i rierol es van utilitzar dos mètodes de mostreig diferents: el filtrat, i el trampeig amb fulles de *Rhododendron* i amb pètals de clavell. Els filtres i trampes vegetals es van sotmetre a aïllament en medis selectius. Es va extreure ADN de les mostres, es van generar biblioteques d'amplicons mitjançant encebadors específics de *Phytophthora*, i es piroseqüenciaren usant l'instrument GS Junior. Es van identificar sis espècies de *Phytophthora* utilitzant tècniques d'aïllament en contrast amb els 25 fitotips de *Phytophthora* identificats mitjançant el mètode de seqüenciació massiva. Un total de 8 nous fitotips de *Phytophthora*, no representats en bases de dades públiques, es van detectar a les 15 vies d'aigua mostrejades. Els mètodes de seqüenciació massiva d'amplicons que utilitzen la combinació de trampes vegetals i filtres d'aigua representen un mètode útil per a descriure les comunitats i com una eina de monitorització d'espècies patògenes de *Phytophthora* en ecosistemes aquàtics.