**Resumen**

En los últimos años, el aumento del comercio mundial de plantas y el movimiento humano ha promovido el riesgo de introducción de plantas invasoras y patógenos exóticos. Las invasiones biológicas operan a nivel mundial y se consideran como la segunda causa de pérdida de biodiversidad después de la alteración y destrucción directas del hábitat. En este contexto, *Phytophthora* es uno de los patógenos vegetales más importantes y agresivos en la agricultura y la silvicultura. La detección temprana y la identificación de sus vías son de gran importancia para minimizar la amenaza que representan para los ecosistemas naturales. Se han desarrollado y aplicado diferentes métodos moleculares para la detección de patógenos de plantas en muestras ambientales. Estos métodos permiten una detección e identificación de patógenos rápida y precisa incluso cuando la cantidad de inóculo es baja. Por lo tanto, se propone un nuevo método mejorado para su detección en muestras ambientales a partir de la extracción de ADN ambiental (eDNA) de diferentes fuentes (suelo, raíces y agua) y diferentes ecosistemas.

El objetivo del primer capítulo fue aplicar HTS (*High Throughput Sequencing*) para investigar la presencia de *Phytophthora* en diferentes comunidades de plantas en bosques naturales, plantaciones y ambientes acuáticos en el norte de España. El eDNA se extrajo del suelo y del agua de los ríos y arroyos de los bosques de *Fagus sylvatica* y *Abies alba* y de plantaciones de *Chamaecyparis lawsoniana* y *Pseudotsuga menziesii* en el norte de España (bosque de Irati y Villanúa). Se diseñó y aplicó un ensayo específico para la detección de *Phytophthora* mediante la secuenciación masiva de amplicones basado en la región ITS1. Diferentes valores de *threshold* se analizaron para la separación óptima de especies de *Phytophthora* en los análisis bioinformáticos. El agrupamiento al 99% fue el mejor criterio para separar la mayor parte de las especies de *Phytophthora*. Múltiples Unidades Operacionales Taxonómicas Moleculares (MOTU) correspondientes a 36 especies distintas de *Phytophthora* se amplificaron en las muestras ambientales. La pirosequenciación de amplicones de muestras de suelo reveló una diversidad baja de *Phytophthora* (13 especies) en comparación con las 35 especies detectadas en muestras de agua. Trece de los MOTU detectados en los ríos y arroyos no mostraron homología con secuencias depositadas en las bases de datos, lo que revela que la pirosequenciación del ADN ambiental es una estrategia útil para evaluar la diversidad de especies *Phytophthora* en los ecosistemas naturales.

Una vez que la técnica fue desarrollada y validada, se propuso otro objetivo enfocado en el decaimiento de la carrasca. La carrasca (*Quercus ilex*) es la especie arbórea más representativa de la Península Ibérica y el árbol principal de las dehesas. El decaimiento de la carrasca en suelos no calcáreos en el suroeste de España se ha asociado con *Phytophthora cinnamomi* durante décadas. Sin embargo, otras especies de *Phytophthora* como *P. quercina* y *P. psychrophila* se han asociado con el declive de *Quercus* en la parte oriental de España donde predominan los suelos calcáreos. Con el objetivo de investigar la implicación de *Phytophthora* spp. en el declive de la carrasca en el este de España, se seleccionaron dos bosques en diferentes zonas geográficas (Alcoi y Vallivana) como lugares de muestreo. Las muestras de suelo y raíz se analizaron por pirosequenciación de amplicones. Los resultados de la secuenciación masiva mostraron la diversidad de especies de *Phytophthora*, y reveló que un taxón nunca aislado de *Phytophthora*, llamado provisional *Phytophthora* taxon ballota, fue la especie predominante en ambas áreas. Además, se desarrolló un ensayo de PCR a tiempo real, basado en los resultados de la pirosequenciación, para la detección de este taxón de *Phytophthora* nunca aislado, y también para la detección de *P. quercina*. Los ensayos de qPCR se aplicaron en muestras de suelo y raíz, y en cultivos puros de *Phytophthora*. Los nuevos ensayos mostraron alta especificidad y fueron consistentes con los resultados de secuenciación masiva.

Por último, los esfuerzos se centraron en la estrategia de muestreo en muestras de agua, ya que como se ha visto anteriormente, los ríos y arroyos representaban un *hotspot* para la detección de *Phytophthora*. El aislamiento de especies de *Phytophthora* en muestras de agua es común y mundialmente conocido. Por lo general, los métodos más comunes utilizados son el trampeo y el filtrado de agua. Ambos métodos son exitosos para el aislamiento de especies acuáticas incluidas en el clado 6. Sin embargo, sólo unas pocas especies de otros clados son aisladas usando estos métodos debido al inóculo relativamente bajo disponible. En este estudio, en octubre de 2013 se muestrearon un total de 15 ríos y arroyos, que comprendían áreas forestales en la montaña y áreas agrícolas en el valle. En cada río y arroyo se utilizaron dos métodos de muestreo diferentes: el filtrado, y el trampeo con hojas de *Rhododendron* y con pétalos de clavel. Los filtros y trampas vegetales se sometieron a aislamiento en medios selectivos. Se extrajo ADN de las muestras, se generaron bibliotecas de amplicones usando cebadores específicos de *Phytophthora*, y se piroseccuenciaron usando el instrumento GS Junior. Se identificaron seis especies de *Phytophthora* utilizando técnicas de aislamiento en contraste con los 25 fitotipos de *Phytophthora* identificados mediante el método de secuenciación masiva. Un total de 8 nuevos filotipos de *Phytophthora*, no representados en bases de datos públicas, se detectaron en las 15 vías de agua muestreadas. Los métodos de secuenciación masiva de amplicones que utilizan la combinación de trampas vegetales y filtros del agua representan un método útil para describir las comunidades y como una herramienta de monitoreo de especies patógenas de *Phytophthora* en ecosistemas acuáticos.