



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.4.5.8: Αξιολόγηση και αξιοποίηση της ενδημικής λειτουργικής μικροβιακής ποικιλότητας για την αντιμετώπιση των ασθενειών του ξύλου της αμπέλου σε επιτραπέζιες ποικιλίες

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.5.8**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΑΠΘ /ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. ΕΛΜΕΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Μπεκρής Φώτιος, Φλούδας Άγγελος, Κρασαγάκης Νικόλαος, Τεστέμπασης Στέφανος Γαβριήλ, Μαρκάκης Εμμανουήλ, Καραογλανίδης Γεώργιος, Καρπούζας Δημήτριος]**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **[Έκθεση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15- 12- 2025]**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	4
2.1	<i>Υλικά και Μέθοδοι</i>	4
2.	Εκχύλιση DNA	5
3.	Μοριακές αναλύσεις	6
4.	Βιοπληροφορική ανάλυση	6
5.	Στατιστική ανάλυση	7
2.2	<i>Αποτελέσματα και Συζήτηση</i>	8
2.	Αναλύσεις μικροβιώματος μυκήτων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα	8
2.2.2	Αναλύσεις μικροβιώματος βακτηρίων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα	22
2.2.3	Αναλύσεις δικτύων συν-εμφάνισης μικροβιώματος μυκήτων & βακτηρίων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα	35
3.	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	38
4.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	41

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ4

Η Ενότητα Εργασίας 4 (ΕΕ4) επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη και αξιοποίηση καινοτόμων βιολογικών και οικολογικών προσεγγίσεων για τη βελτίωση της φυτοπροστασίας σε βασικές καλλιέργειες. Στόχος της υπήρξε η ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της βιολογικής καταπολέμησης, η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ καλλιεργειών και ωφέλιμων οργανισμών και η διερεύνηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας ως μέσο υποστήριξης βιώσιμων συστημάτων φυτοπροστασίας.

Στο πλαίσιο της ΕΕ4 υλοποιήθηκαν πολυεπίπεδες ερευνητικές δραστηριότητες που περιελάμβαναν τη μελέτη και βελτίωση αρπακτικών και παρασιτοειδών οργανισμών, την αξιολόγηση της ανθεκτικότητάς τους σε φυτοπροστατευτικές ουσίες, την ενίσχυση της δραστηκότητάς τους μέσω σημιοχημικών, καθώς και την κατανόηση του ρόλου της ενδημικής βιοποικιλότητας σε αγροοικοσυστήματα. Οι δράσεις της ενότητας καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών, μοριακών και οικολογικών προσεγγίσεων. Με αυτό τον τρόπο, η ΕΕ4 συνέβαλλε στη διαμόρφωση μιας ολοκληρωμένης στρατηγικής φυτοπροστασίας, η οποία βασίστηκε σε αρχές της αειφορίας, στη μείωση της εξάρτησης από χημικά μέσα και στην αξιοποίηση των φυσικών μηχανισμών ρύθμισης των πληθυσμών εχθρών και παθογόνων.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π.4.5.8

Το παρόν παραδοτέο αφορά τη μελέτη του μικροβιώματος ξύλου της ποικιλίας *Vitis vinifera* L. cv. "Sultantina" ή Thompson seedless, με στόχο την κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με πρέμνα που εμφανίζουν ή δεν εμφανίζουν συμπτώματα ασθενειών του ξύλου. Η συνολική ανάλυση του μικροβιώματος επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της σύνθεσης και διαφοροποίησης των μικροβιακών κοινοτήτων, συμβάλλοντας στη βαθύτερη κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας του ξυλώδους ιστού σε επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου.

Συνοπτικά, το παραδοτέο παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα των μικροβιακών κοινοτήτων που χαρακτηρίζουν τη Σουλτανίνα σε διαφορετικές περιοχές και διαφορετικές φυτοϋγειονομικές καταστάσεις, προσφέροντας πολύτιμη γνώση που μπορεί να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών παρακολούθησης της υγείας των πρέμνων και τη διερεύνηση μικροβιακών ενδείξεων σχετικών με ασθένειες του ξύλου.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

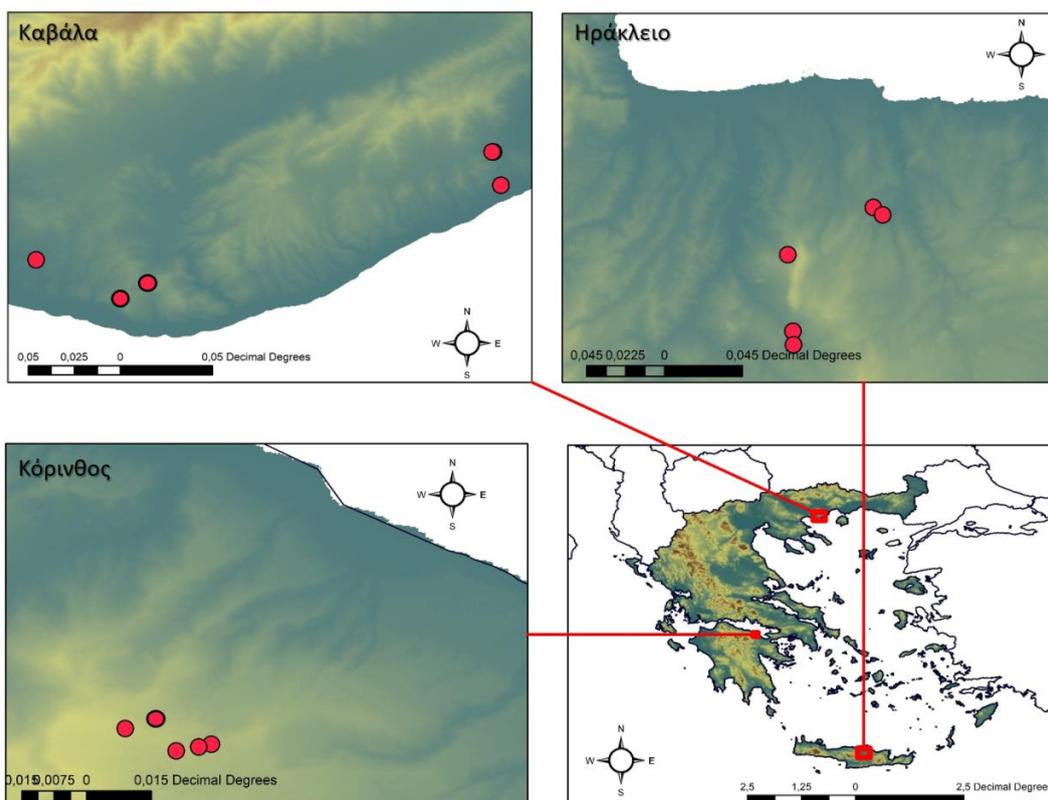
Οι ασθένειες του ξύλου της αμπέλου αποτελούν μία από τις σοβαρότερες αιτίες απώλειας παραγωγικότητας και πρόωρης θνησιμότητας των πρέμνων, καθώς προκαλούνται από σύμπλοκο παθογόνων που εγκαθίστανται και αναπτύσσονται στον ξυλώδη ιστό. Η απαγόρευση του αρσενικώδους νατρίου, το οποίο αποτελούσε για δεκαετίες τη μοναδική αποτελεσματική χημική λύση, δημιούργησε ένα σημαντικό κενό στη διαχείριση των ασθενειών, εντείνοντας την ανάγκη για νέες, ασφαλείς και βιώσιμες στρατηγικές αντιμετώπισης. Η ανάπτυξη γνώσης γύρω από τις ασθένειες του ξύλου και τις μικροβιακές διεργασίες που σχετίζονται με την υγεία των πρέμνων συνάδει με τις κατευθύνσεις αυτές, υποστηρίζοντας την εφαρμογή καινοτόμων και ασφαλών στρατηγικών για την αμπελουργία. Η κατανόηση επομένως, της μικροβιακής οικολογίας του ξύλου και των διαφοροποιήσεων μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών πρέμνων αποτελεί κρίσιμο βήμα για την ανίχνευση παραγόντων που σχετίζονται με την εκδήλωση ή την πρόληψη των ασθενειών. Η μελέτη αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία για επιτραπέζιες ποικιλίες υψηλής εμπορικής αξίας, όπως η Σουλτανίνα, όπου οι απώλειες φυτών έχουν άμεσο οικονομικό αντίκτυπο και περιορισμένες διαθέσιμες λύσεις διαχείρισης.

Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η παρουσίαση των εργασιών που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του παραδοτέου Π.4.5.8, καθώς και η συνοπτική και αναλυτική αποτύπωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη του μικροβιώματος ξύλου επιτραπέζιων αμπελιών. Το έγγραφο αποσκοπεί: στη συγκέντρωση και τεκμηριωμένη παρουσίαση των μικροβιακών κοινοτήτων, στον εντοπισμό των διαφοροποιήσεων ανάμεσα σε συμπτωματικά και ασυμπτωματικά πρέμνα και την αξιολόγηση λειτουργικής βιοποικιλότητας με απώτερο στόχο την ανάπτυξη στρατηγικών πρόγνωσης ή διαχείρισης ασθενειών του ξύλου της αμπέλου.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Σε πρώτη φάση έγινε συλλογή δειγμάτων ξύλου από πρέμνα (ποικιλίας Σουλτανίνα) κατά τη διάρκεια του Αυγούστου και Σεπτεμβρίου 2023, από αμπελώνες τριών σημαντικών και γεωγραφικά απομακρυσμένων αμπελουργικών περιοχών, στη Βόρεια (Καβάλα, Μακεδονία), Κεντρική (Κιάτο, Πελοπόννησος) και Νότια Ελλάδα (Ηράκλειο, Κρήτη) (Εικόνα 4.5.8-1). Σε κάθε μια από τις περιοχές αυτές, πέντε αμπελώνες, ηλικίας 11 έως 30 ετών, επιλέχθηκαν για δειγματοληψία. Σε κάθε αμπελώνα έξι πρέμνα χωρίς κανένα ορατό σύμπτωμα ασθένειας στα φύλλα τους και έξι πρέμνα που εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα GTDs στα φύλλα (αποχρωματισμό, λωρίδες τίγρης - 'tiger-stripe', χλώρωση, μαρασμό ή και ημιπληγία) και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν ως "ασυμπτωματικά" και "συμπτωματικά" πρέμνα αντίστοιχα. Τα πρέμνα αυτά επισημάνθηκαν με χρώμα ώστε με το στίγμα GPS του αμπελώνα να υπάρχει η δυνατότητα επιστροφής στους αμπελώνες και ιχνηλάτησης των συγκεκριμένων πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-1). Η διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν η ακόλουθη: δείγμα ξύλου από κάθε ένα από τα επιλεγθέντα πρέμνα συλλέχθηκε με μη καταστρεπτική μέθοδο και πιο συγκεκριμένα λήφθηκε δείγμα ξύλου από τους βραχίονες και τον κορμό χρησιμοποιώντας απολυμασμένο πυρηνολήπτη και στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την εκχύλιση του ολικού DNA τους.



Εικόνα 4.5.8-1. Χάρτης απεικόνισης αγροτεμαχίων δειγματοληψίας από τις περιοχές ενδιαφέροντος (Καβάλα, Ηράκλειο, Κόρινθος).

2. Εκύλιση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα ξύλου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Bekris et al. (2021), με μερικές τροποποιήσεις. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: το δείγμα που συλλέχθηκε ομογενοποιήθηκε και λειοτριβήθηκε με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Ποσότητα αυτού (250 mg) ζυγίστηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 1,2 ml 2X CTAB (100mM TrisHCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB, 0,5% v/v β-mecraproethanol) και ομογενοποιήθηκε. Τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο, στους 65°C και περιοδικά ανακινούνταν σε επιτραπέζιο κάθετο αναδευτήρα (vortex). Ύστερα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 10.000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια τύπου erpendorf (2 ml). Ακολούθως προστέθηκαν 600μl Chloroform: ισοαμλική αλκοόλη (24:1) και ανακινήθηκαν σε vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 13.000 rpm, και η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο (2 ml), όπου προστέθηκαν 5μl RNase και τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά στους 37°C. Ύστερα προστέθηκαν εκ νέου 600 μl διαλύματος chloroform:isoamyl alcohol (24:1) και ακολούθησε ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm - 10 λεπτά). Η υδατική φάση μεταφέρθηκε και πάλι σε νέο σωληνάριο (2 ml), όπου προστέθηκε ίσος όγκος προψυχθείσας ισοπροπανόλης, και μετά από μια ήπια ανάδευση, τα δείγματα επώαστηκαν στους -20°C για τουλάχιστον 1 ώρα. Η πελέτα του DNA κατακρημνίστηκε με φυγοκέντρηση (13.000 rpm - 20 λεπτά) και έγινε διπλός καθαρισμός με διάλυμα αιθανόλης (70%) και φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm - 3 λεπτά). Τέλος, η πελέτα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 50 μl νερού απαλλαγμένο από νουκλεάσες και η ακεραιότητα του DNA αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) και οι συγκεντρώσεις του DNA υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Quant-iT kit με μια συσκευή Qubit Fluorometric (Invitrogen, USA).

3. Μοριακές αναλύσεις

Το DNA που απομονώθηκε αραιώθηκε σε τελικές συγκεντρώσεις 1,0 ng/μl και 0,2 ng/μl προ της ενίσχυσης των υπο εξέταση φυλογενετικών δεικτών για μύκητες και βακτήρια αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση της V3-V4 περιοχής του 16S rRNA γονιδίου για τα βακτήρια και της ITS2 περιοχής για τους μύκητες. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν ήταν ο 515 Forward (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Walters et al., 2015) και 806 Reverse (5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT-3') (Walters et al., 2015) για τα βακτήρια ενώ για τους μύκητες οι εκκινητές ITS7 Forward (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') (Ihmark et al., 2012) και ITS4 Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Τα προγράμματα των PCR αντιδράσεων εκτελέστηκαν για 28 κύκλους στις παρακάτω συνθήκες: αρχική αποδιάταξη: 98 °C για 30", αποδιάταξη: 98 °C για 10", υβριδισμός: 50 °C για 30" για βακτήρια, υβριδισμός: 55 °C για 30" για μύκητες, επιμήκυνση: 72 °C για 30", τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10 μl τελικού όγκου και περιείχαν εκκινητές (forward, reverse) 0,5 μl (10 μM), BSA 0,2 μl (20 mg/ml), DNA 2 μl, Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) 5 μl (που περιέχει Q5 DNA polymerase 5 Unit/ μl, Buffer reaction με 2.0 mM Mg⁺⁺, νουκλεοτίδια dNTPs 200 μM από το κάθε ένα) (Katsoula et al., 2020). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Το επόμενο βήμα ήταν περαιτέρω ενίσχυση και σήμανση μέσω PCR με δειγματοειδικούς εκκινητές (indexed primers for multiplexing) έτσι ώστε να γίνει η ανάμειξη/κατασκευή της βιβλιοθήκης και η μαζική αλληλούχιση των ενισχυμάτων (NGS sequencing). Η σήμανση με τους δειγματοειδικούς εκκινητές πραγματοποιήθηκε μέσω PCR για 7 κύκλους στις παρακάτω συνθήκες: αρχική αποδιάταξη: 98 °C για 30", αποδιάταξη: 98 °C για 10", υβριδισμός: 50 °C για 30" για βακτήρια, υβριδισμός: 55 °C για 30" για μύκητες, επιμήκυνση: 72 °C για 30", τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 λεπτά. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 20 μl τελικού όγκου και περιείχαν εκκινητές 1 μl (10 μM) (forward, reverse) εκ των οποίων ο ένας ήταν σημασμένος (indexed for multiplexing), DNA 2 μl από το ήδη ενισχυμένο της προηγούμενης αντίδρασης, Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) 10 μl που περιέχει Q5 DNA polymerase 5 Unit/μl, Buffer reaction με 2.0 mM Mg⁺⁺, νουκλεοτίδια dNTPs 200 μM από το κάθε ένα. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης αναμειχθηκαν σε ίσες ποσότητες για την κατασκευή βιβλιοθηκών ενισχυμένων τμημάτων και έγινε καθαρισμός με την χρήση του εμπορικού σκευάσματος NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select Kit (Macherey- Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι βιβλιοθήκες ενισχυμένων τμημάτων αποστάλθηκαν για αλληλούχιση (NGS amplicon sequencing) σε πλατφόρμα illumina NextSeq 2x300bp στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών (Ι.Γ.Ε, Λευκωσία, Κύπρος). Στο προσεχές χρονικό διάστημα θα ολοκληρωθεί η ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν (raw sequences matrices), μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, καθώς και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

4. Βιοπληροφορική ανάλυση

Από την αλληλούχιση των δειγμάτων προέκυψαν μήτρες δεδομένων (raw data matrices) οι οποίες επεξεργάστηκαν βιοπληροφορικά για να προκύψουν τα αρχικά φυλογενετικά δεδομένα για το μυκητιακό και βακτηριακό μικροβίωμα από τα πρέμνα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα (Κεντρική, Βόρεια και Νότια Ελλάδα), το οποίο στη συνέχεια αναλύθηκε στατιστικά.

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε κυρίως με την χρήση του λογισμικού R v.4.0.2 (R Core Team, 2020). Ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκαν βιβλιοθήκες και πακέτα της R όπως τα ακόλουθα: "BioManager", "dada2", "DECIPHER",

"phangorn", "phyloseq", "ggplot2", "shiny", "miniUI", "caret", "pls", "e1071", "randomForest", "dplyr", "ggrepel", "nlme", "devtools", "reshape2", "PMA", "structSSI", "ade4", "ggnetwork", "intergraph", "scales", "jfukuyama/phyloseqGraphTest", "genefilter", "impute", "entropart", "agricolae", "microbiome", "pheatmap", "gtools", "vegan", "factoextra".

Αρχικά οι μήτρες δεδομένων διαχωρίστηκαν (demultiplexed) βάση των δειγματοειδικών εκκινήτων καθώς και των υπό εξέταση γονιδίων (16S rRNA γονιδίου για βακτήρια και ITS2 περιοχής για τους μύκητες) από τις βιβλιοθήκες που είχαν κατασκευαστεί. Με συναρμολόγηση των καλής ποιότητας αναγνωσμάτων του κάθε PCR προϊόντος, όπου αυτό ήταν δυνατό, προέκυψαν τα αρχικά αλληλόμορφα ενίσχυσης (amplicon sequence variants – ASVs) της ανάλυσης. Ακολουθήθηκε στοίχιση, διαλογή και έλεγχος των ASVs για χιμαιρικές ακολουθίες η οποίες και απομακρύνθηκαν από τα σετ των δεδομένων. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ταξινόμηση των ASVs βακτηρίων και μυκήτων σύμφωνα με εξιδεικευμένες βάσεις δεδομένων αναφοράς. Συγκεκριμένα για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε η ταξινομική βάση δεδομένων Silva v.138 (Yilmaz et al., 2014) της μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος ενώ για τους μύκητες η βάση δεδομένων Unite v.8.2. (Abarenkov et al., 2020) για την ITS περιοχή. Αλληλουχίες που δεν ταυτοποιήθηκαν στο ταξινομικό επίπεδο του Βασιλείου (Kingdom) και Συνομοταξίας (Phylum) σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών που εξετάστηκαν αφαιρέθηκαν επίσης από τα σετ δεδομένων το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις.

5. Στατιστική ανάλυση

Για την μελέτη του μικροβιώματος μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων της ποικιλίας Σουλτανίνα με σκοπό τη αξιοποίηση της ενδημικής λειτουργικής μικροβιακής ποικιλότητας για την αντιμετώπιση των ασθενειών του ξύλου της αμπέλου, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος αναλύσεων από αντίστοιχες μεθοδολογικά εργασίες που αναφέρονται σε μικροβιώματα πρέμνων (Bekris et al., 2021; Papadopoulou et al., 2022; Bekris et al., 2025). Σκοπός των αναλύσεων ήταν η πολυεπίπεδη εξέταση των μικροβιωμάτων των μυκήτων και βακτηρίων για την εξαγωγή συμπερασμάτων για την αντιμετώπιση των ασθενειών του ξύλου.

Συνοπτικά, έγινε εκτίμηση της β-ποικιλότητας των μικροοργανισμών, εντοπισμός των κυρίαρχων μικροοργανισμών, ανάλυση διαφορικής αφθονίας, εύρεση πυρηνικού μικροβιώματος, ανάλυση δικτύου μεταξύ μυκήτων και βακτηρίων και ανάλυση μέσω του αλγόριθμου Random Forest για την εύρεση μικροβιακών δεικτών για τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση ασθενειών ξύλου.

Η β-ποικιλότητα αναφέρεται στις διαφορές που παρατηρούνται στην ποικιλότητα μεταξύ κοινοτήτων, δηλαδή μεταξύ δειγμάτων και λαμβάνει υπόψιν την σχετική αφθονία σύμφωνα με δείκτες ομοιότητας/διαφοροποίησης. Για την εκτίμηση της β-ποικιλότητας πραγματοποιήθηκε μη παραμετρικός έλεγχος (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) έτσι ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή διαφοροποίηση-ομαδοποίηση των δειγμάτων ως προς την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας βάση της κατάστασης, ηλικίας και γεωγραφικής περιοχής των πρέμνων. Η NMDS πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις μήτρες δεδομένων των αποστάσεων των ASVs των δειγμάτων βάση του δείκτη διαφοροποίησης Bray-Curtis (dissimilarity). Στα διαγράμματα της NMDS που προέκυψαν για κάθε κατηγορία μικροοργανισμών που εξετάστηκε κρίθηκε σκόπιμο να αποτυπωθούν τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης με αντιμεταθέσεις (PERMANOVA, 999 permutations tests) για τους παράγοντες που εξετάστηκαν (γεωγραφική κατανομή, κατάσταση πρέμνων και ηλικιακή ομάδα). Επίσης στα γραφήματα παρέχεται και ο στατιστικός έλεγχος ανά ζεύγη μεταξύ των ομάδων του εκάστοτε υπό εξέταση παράγοντα pairwise PERMANOVA.

Στη συνέχεια εντοπίστηκαν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών φυτών ανά περιοχή μελέτης (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και παρουσιάστηκαν μέσω γραφημάτων ποσοστών σχετικής αφθονίας %. Ακολούθησαν οι θερμικοί χάρτες διαφορικής αφθονίας (Differential Abundance) με επιπλέον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis ακολουθούμενου από Wilcoxon test για το εντοπισμό ASVs με διαφορεική αφθονία μεταξύ των δειγμάτων έτσι ώστε να εντοπιστούν οι κοινοί μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν υψηλή αφθονία και είναι κυρίαρχοι μεταξύ των υγιών και ασθενών πρέμνων όπως αυτές προκύπτουν.

Περαιτέρω διερευνήθηκε το πυρηνικό μικροβίωμα (core microbiome) των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων ανά περιοχή με όρια ελέγχου Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100 για τους μύκητες ενώ για τα βακτήρια τα όρια ελέγχου ορίστηκαν σε Detection = 0.01/100, Prevalence = 85/100 και στη συνέχεια παρουσιάστηκαν σε πίνακες σχετικής αφθονίας %. Ολοκληρώνοντας με τις αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε ακόμα ανάλυση δικτύου (network analysis), κατά την οποία τα 20 πιο άφθονα στελέχη μυκήτων και βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν με στόχο τον εντοπισμό θετικών ή αρνητικών συσχετίσεων για τον εντοπισμό δικτύων αλληλεπιδράσεων. Οι δοκιμές συσχέτισης Spearman μεταξύ των μικροβιακών δικτύων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα γειννίασης για την ακόλουθη σταθμισμένη ανάλυση δικτύου που πραγματοποιήθηκε με το πακέτο igraph v1.2.6 (Csardi and Nepes, 2006) του λογισμικού R. Περαιτέρω, επιλέχθηκαν μυκητιακά ASV για να καθορίσουμε πιθανούς προγνωστικούς παράγοντες της κατάστασης των αμπέλων μέσω του αλγόριθμου Random Forest. Εν συντομία, τα taxa χαμηλού επιπολασμού φιλτραρίστηκαν για ένα εύρος ελάχιστων τιμών (από 5-65% σε προσαυξήσεις 5%) για κάθε δείγμα. Κάθε μοντέλο Random Forest εκτελέστηκε με 1000 δέντρα, χρησιμοποιώντας το 50% των δειγμάτων για την κατασκευή του μοντέλου και το 50% των δειγμάτων ως δείγματα για την αξιολόγηση σφαλμάτων μοντέλου.

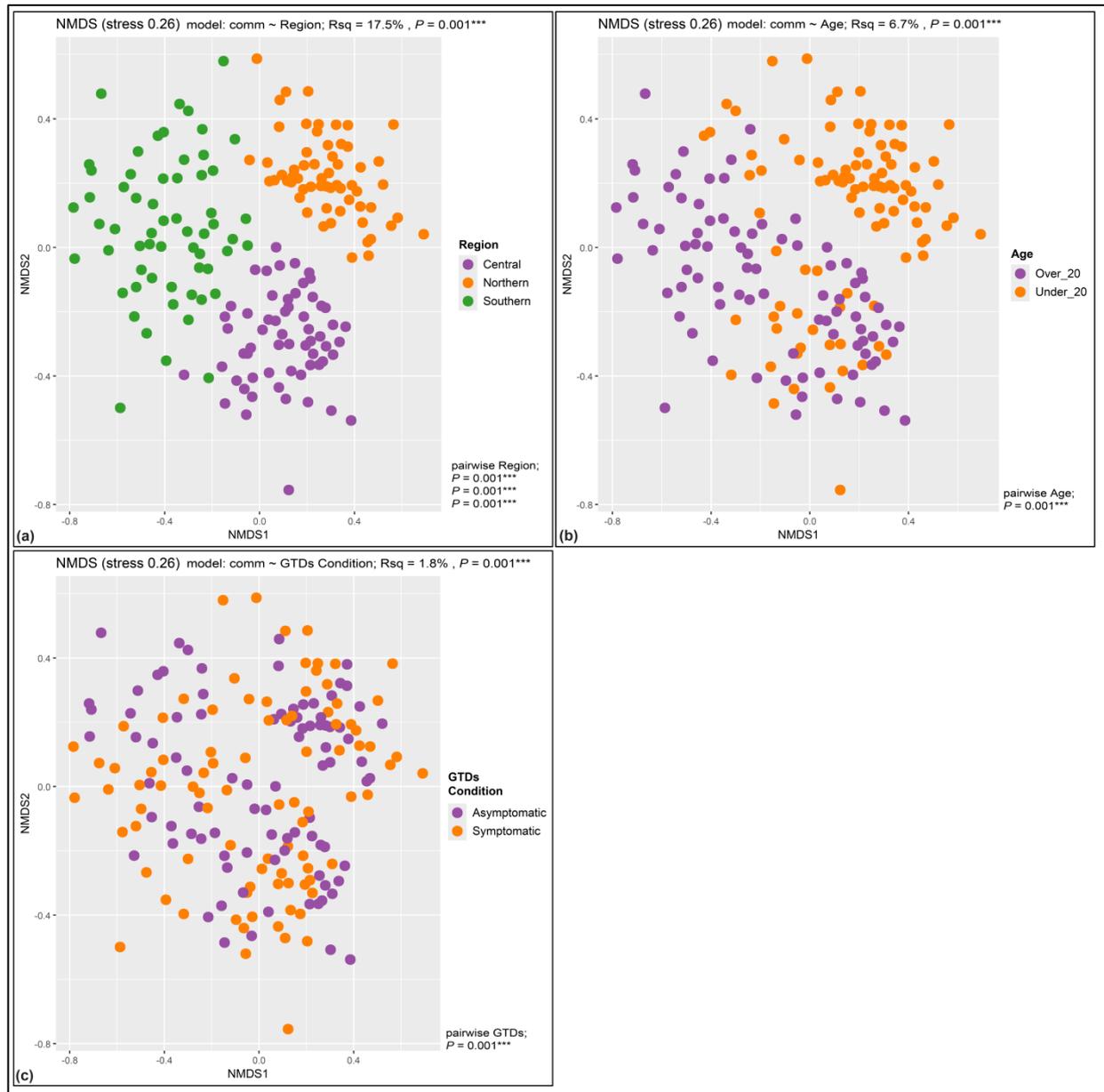
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

2. Αναλύσεις μικροβιώματος μυκήτων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα

Οι πρώτες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τη μελέτη της β-ποικιλότητας των μυκήτων μέσω NMDS διαγραμμάτων συνολικά για όλες τις περιοχές μελέτης (Εικόνα 4.5.8-2). Η ανάλυση έγινε με βάση τους παράγοντες: περιοχή δειγματοληψίας (Εικόνα 4.5.8-2a.), ηλικία πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-2b.), και κατάσταση των πρέμνων (εμφάνιση ή μη συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου) (Εικόνα 4.5.8-2c.). Ο παράγοντας ηλικία πρέμνων ορίστηκε στα 20 έτη για όλες τις αναλύσεις που ακολούθησαν. Στη συνέχεια έγινε η αντίστοιχη ανάλυση και για κάθε περιοχή ξεχωριστά, Κεντρική Ελλάδα (Central, Εικόνα 4.5.8-3), Βόρεια Ελλάδα (Northern, Εικόνα 4.5.8-4.), Νότια Ελλάδα (Southern, Εικόνα 4.5.8-5.) για τους παράγοντες: εμφάνιση συμπτωμάτων και ηλικία πρέμνων όπου αυτό ήταν εφικτό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συνολικά για όλες τις περιοχές παρατηρούμε ότι ο παράγοντας περιοχή δειγματοληψίας στο πρώτο διάγραμμα NMDS (Εικόνα 4.5.8-2a.), δείχνει ισχυρή διαφοροποίηση των μυκήτων ανάλογα με την περιοχή προέλευσης των πρέμνων. Το μοντέλο της PERMANOVA παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.001$) με $R^2 = 17.5\%$, γεγονός που υποδηλώνει ότι η γεωγραφική περιοχή εξηγεί το 17.5% της παραλλαγής στις κοινότητες των μυκήτων. Οι τρεις περιοχές σχηματίζουν ευδιάκριτες ομάδες, γεγονός που δείχνει ότι οι μύκητες ενδεχομένως επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς ή κλιματικούς παράγοντες. Η διάκριση μεταξύ των ομάδων είναι ξεκάθαρη, υποδηλώνοντας σημαντικές οικολογικές διαφορές στις κοινότητες των

μυκήτων ανά περιοχή. Το υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης των μυκήτων μπορεί να σχετίζεται επίσης με διαφορετικές γεωργικές πρακτικές στις τρεις περιοχές. Η υψηλή στατιστική σημαντικότητα ($P = 0.001$) της PERMANOVA για τον παράγοντα περιοχή αλλά και τα αποτελέσματα της pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$) ενισχύουν τον γεωγραφικό διαχωρισμό των μυκήτων βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων.



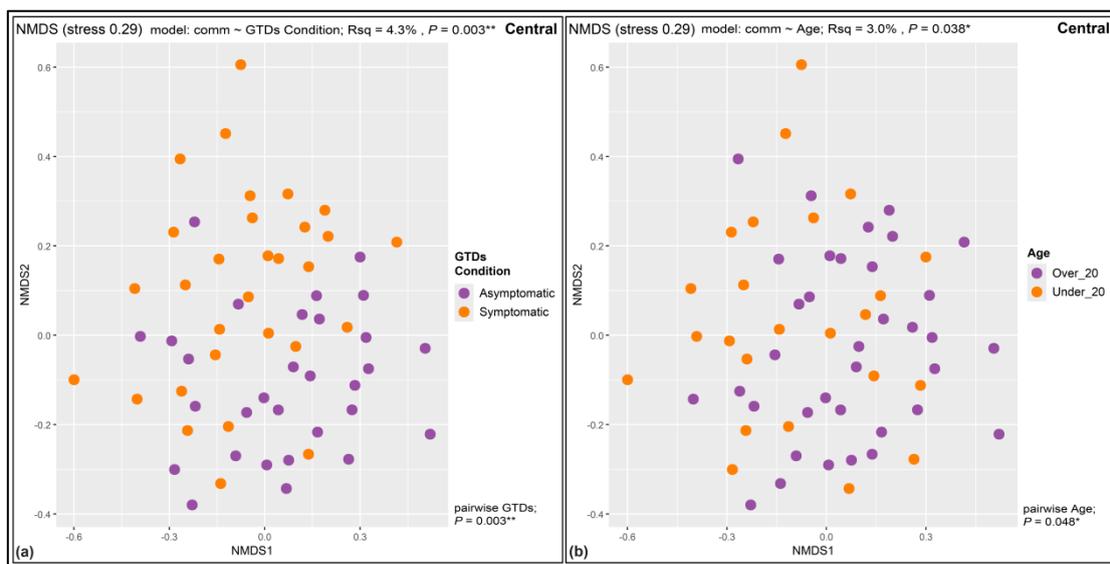
Εικόνα 4.5.8-2. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τους Μύκητες. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ταξιθέτηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: περιοχής δειγματοληψίας (a), ηλικίας (b), και εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου (c). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της ITS2 περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Για τον παράγοντα ηλικία των στο δεύτερο διάγραμμα της NMDS (Εικόνα 4.5.8-2b.), παρατηρείται επίσης διαφοροποίηση των μυκήτων. Το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί το 6.7% της παραλλαγής ($R^2 = 6.7\%$) και παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.001$). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων είναι λιγότερο έντονη σε σύγκριση με την περιοχή δειγματοληψίας, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι η

ηλικία έχει μικρότερο αλλά υπαρκτό αντίκτυπο στις κοινότητες των μυκήτων. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται σε μακροχρόνιες περιβαλλοντικές ή εδαφολογικές αλλαγές που επηρεάζουν τα παλαιότερα πρέμνα και κατά συνέπεια το μικροβίωμα του ξύλου. Πιθανά τα αποτελέσματα του διαχωρισμού να μπορούν να ερμηνευτούν και από την ύπαρξη καλά εγκαθιδρυμένων μυκήτων στα μεγαλύτερα σε έτη πρέμνα. Τα ευρήματα την ανάλυσης μπορεί να είναι σημαντικά για τη διαχείριση παλαιότερων και νεότερων καλλιεργητικών συστημάτων. Και σε αυτή την περίπτωση τα ευρήματα συνοδεύονται από υψηλή στατιστική σημαντικότητα βάση της pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$).

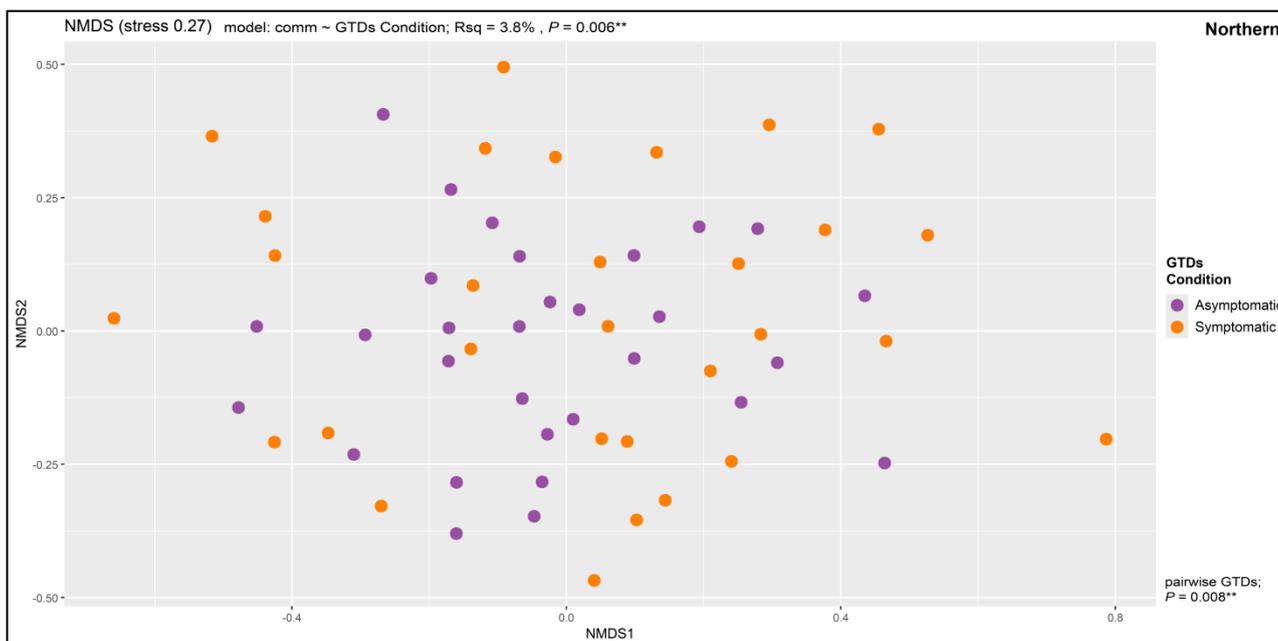
Το τρίτο διάγραμμα της NMDS ανάλυσης αφορούσε τον παράγοντα: κατάσταση των πρέμνων βάση της παρουσίας ή απουσίας συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου (Εικόνα 4.5.8-2c.). Παρατηρούμε ότι το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί μόλις το 1.8% της παραλλακτικότητας ($R^2 = 1.8\%$), αλλά η διαφορά παραμένει στατιστικά σημαντική ($P = 0.001$). Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι, αν και η παρουσία συμπτωμάτων μπορεί να επηρεάζει τη σύνθεση των μυκήτων, το επίπεδο του διαχωρισμού βάση της κατάστασης των φυτών είναι περιορισμένο σε σύγκριση με τους άλλους παράγοντες, τουλάχιστον όταν εξετάζουμε όλες τις περιοχές ταυτόχρονα. Η μικρή διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στην προσαρμοστικότητα των μυκήτων σε ποικίλες συνθήκες, στον απομακρυσμένο χαρακτήρα των γεωγραφικών περιοχών ανεξάρτητα από την παρουσία συμπτωμάτων, ή στην ύπαρξη κοινών ειδών σε συμπτωματικές και ασυμπτωματικές συνθήκες. Παρόλα αυτά ο διαχωρισμός των ομάδων δείχνει επίσης στατιστική σημαντικότητα με pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες NMDS για κάθε περιοχή ξεχωριστά. Για την Κεντρική Ελλάδα, το διάγραμμα της NMDS ανάλυσης (Εικόνα 2.) έδειξε μέτρια διαφοροποίηση των μυκήτων και για τους δύο παράγοντες: εμφάνιση συμπτωμάτων (Εικόνα 4.5.8-3a.), και ηλικία πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-3b.). Το μοντέλο της PERMANOVA παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για την ηλικία ($R^2 = 3.0\%$, $P = 0.038$) και την εμφάνιση συμπτωμάτων ($R^2 = 4.3\%$, $P = 0.003$). Η χαμηλή εξήγηση της παραλλακτικότητας υποδηλώνει ότι αυτοί οι παράγοντες έχουν μέτριο αντίκτυπο στη σύνθεση των μυκήτων. Συγκεκριμένα, η παρουσία συμπτωμάτων φαίνεται να συνδέεται με μια πιο διακριτή μετατόπιση των κοινοτήτων, καθώς η στατιστική σημαντικότητα ($P = 0.003$) υποδηλώνει έντονη συσχέτιση. Αντίθετα, η ηλικία φαίνεται να έχει μικρότερη αλλά σημαντική επίδραση ($P = 0.048$). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και οι δύο παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση των μυκήτων, αλλά σε περιορισμένο βαθμό. Πάντως και για τους δύο παράγοντες προκύπτει στατιστικά σημαντικός διαχωρισμός των ομάδων βάση της pairwise PERMANOVA.



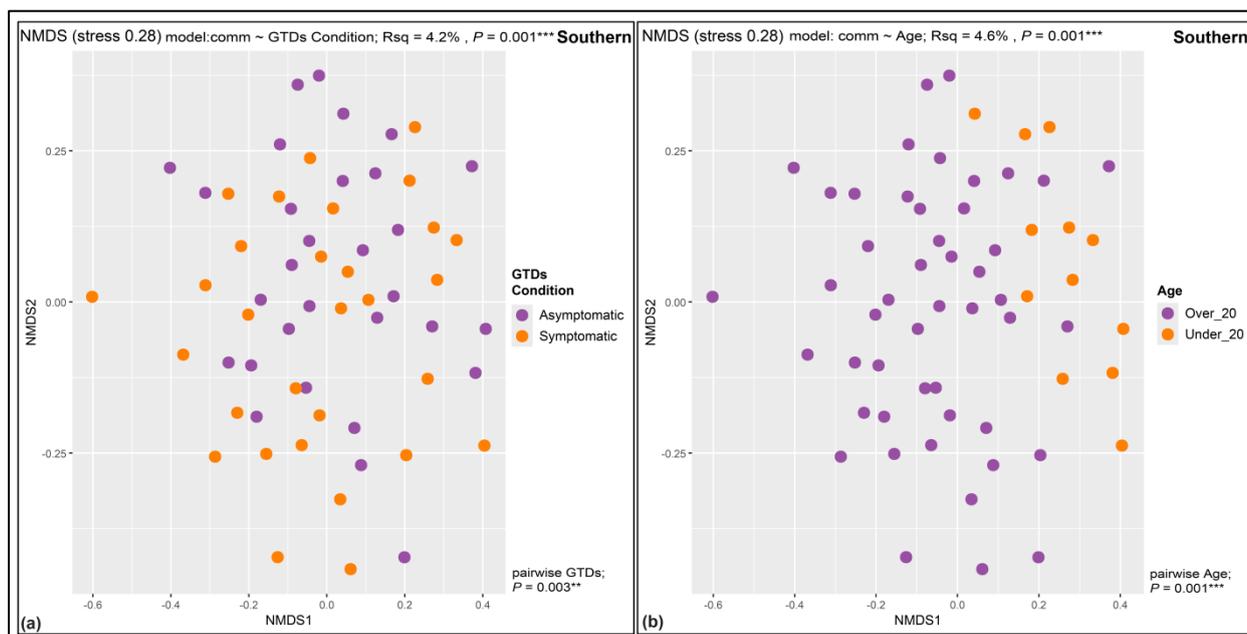
Εικόνα 4.5.8-3. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τους Μύκητες από την περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας (Central). Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ταξινόμηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου (a) και ηλικίας (b). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της ITS2 περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Το επόμενο διάγραμμα της ανάλυσης NMDS αφορούσε τα δείγματα πρέμνων από τη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-4.), σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ανάλυση δείχνει μέτρια διαφοροποίηση των μυκήτων βάση της κατάστασης των πρέμνων. Το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί το 3.8% της παραλλαγής ($R^2 = 3.8\%$) και παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ($P = 0.006$). Η παρουσία συμπτωμάτων φαίνεται να προκαλεί ελαφρές αλλαγές στη σύνθεση των κοινοτήτων των μυκήτων, αν και η επίδραση είναι περιορισμένη. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να υποδηλώνει ότι ορισμένοι μύκητες προσαρμόζονται ή ευνοούνται από τις συνθήκες που συνοδεύουν την εμφάνιση συμπτωμάτων. Η στατιστική σημαντικότητα ($P = 0.008$) ενισχύει την άποψη ότι η κατάσταση των φυτών παίζει κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση των μυκήτων. Για τα δείγματα από τη Βόρεια Ελλάδα δεν κατέστη δυνατός ο έλεγχος βάση της ηλικίας των φυτών καθώς όλα τα πρέμνα ήταν κάτω των 20 ετών που είχε οριστεί ως το όριο διαχωρισμού.



Εικόνα 4.5.8-4. Διάγραμμα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τους Μύκητες από την περιοχή της Βόρειας Ελλάδας (Northern). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ταξιθέτηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου. Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της ITS2 περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Ολοκληρώνοντας με την μελέτη της β-ποικιλότητας των μυκήτων μέσω NMDS διαγραμμάτων, ακολούθησε η ανάλυση που αφορούσε τα δείγματα από τη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-5.). Σύμφωνα με το διάγραμμα της NMDS (Εικόνα 4.5.8-5.) στα αποτελέσματα προκύπτει διαχωρισμός των δειγμάτων βάση και των δύο παραγόντων (κατάσταση πρέμνων, ηλικία). Το μοντέλο της PERMANOVA έδειξε ότι η μικροβιακή κοινότητα διαφοροποιείται σημαντικά με βάση την ηλικία των πρέμνων ($R^2 = 4.6\%$, $P = 0.001$) και την κατάσταση εμφάνισης συμπτωμάτων ($R^2 = 4.2\%$, $P = 0.003$). Τα δεδομένα δείχνουν σαφή διαχωρισμό μεταξύ των ηλικιών των πρέμνων που φαίνεται να επηρεάζουν τη δομή των μυκήτων του ξύλου. Τα συμπτωματικά δείγματα διαφέρουν σημαντικά από τα ασυμπτωματικά, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή συγκεκριμένων μυκήτων στις ασθένειες του ξύλου. Ο διαχωρισμός των ομάδων και για τους δύο παράγοντες συνοδεύεται από στατιστική σημαντικότητα με pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$, $P = 0.003$). Η ηλικία των πρέμνων και η παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων φαίνεται να είναι δύο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση των μυκήτων για την περιοχή της Νότιας Ελλάδας.

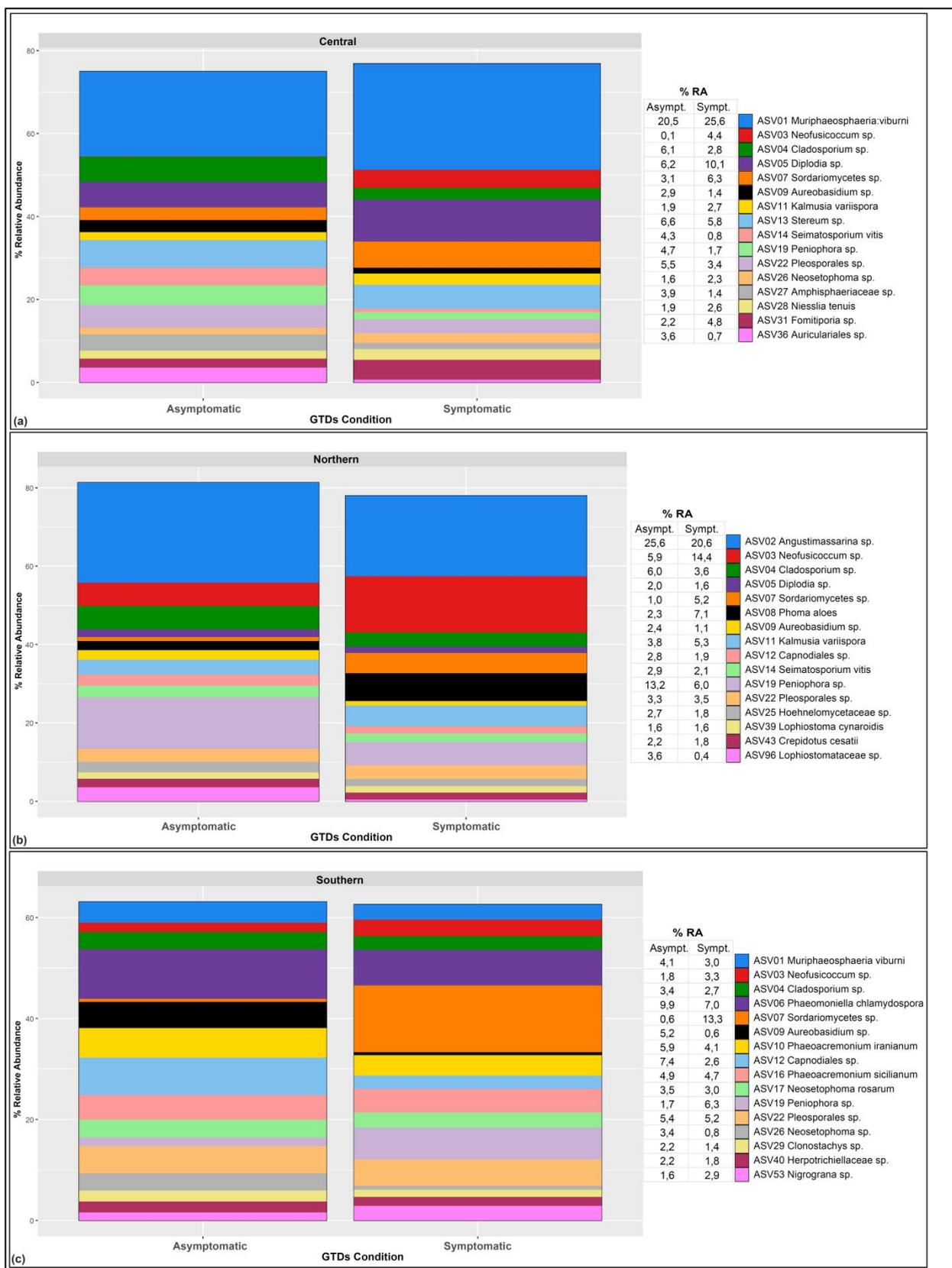


Εικόνα 4.5.8-5. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τους Μύκητες από την περιοχή της Νότιας Ελλάδας (Southern). Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ταξινόμηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου (a) και ηλικίας (b). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της ITS2 περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Το επόμενο επίπεδο αναλύσεων αφορούσε στον εντοπισμό των πιο άφθονων μυκήτων για κάθε περιοχή, βάση του ποσοστού σχετικής αφθονίας % μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-6.). Για τους σκοπούς της ανάλυσης επιλέχθηκαν να απεικονιστούν οι 16 πιο κυρίαρχοι μύκητες ανά γεωγραφική περιοχή. Στην Κεντρική Ελλάδα ((Εικόνα 4.5.8-6a.) παρατηρείται γενικά αυξημένη σχετική αφθονία συγκεκριμένων ειδών σε συμπτωματικές συνθήκες. Το ASV01 *Muriphaeosphaeria viburni* παραμένει κυρίαρχο τόσο σε ασυμπτωματικά (20.5%) όσο και σε συμπτωματικά δείγματα (25.6%). Παρόμοια τάση παρατηρείται και στο ASV05 *Diplodia* sp., το οποίο αυξάνεται από 6.2% σε ασυμπτωματικές συνθήκες σε 10.1% σε συμπτωματικές. Οι αυξήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ορισμένα είδη μυκήτων μπορεί να αναπτύσσονται πιο έντονα σε φυτά που εμφανίζουν συμπτώματα. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα ASVs παρουσιάζουν σημαντική μείωση στη σχετική αφθονία τους υπό συμπτωματικές συνθήκες. Για παράδειγμα, το ASV14 *Seimatosporium vitis* μειώνεται από 4.3% σε ασυμπτωματικά δείγματα σε μόλις 0.8% σε συμπτωματικά, ενώ το ASV36 *Auriculariales* sp. από 3.6% σε 0.7%. Η διαφοροποιημένη αυτή συμπεριφορά μπορεί να υποδεικνύει ότι αυτά τα είδη πιθανόν να είναι ευαίσθητα σε αλλαγές που συνοδεύουν την παρουσία συμπτωμάτων. Περαιτέρω παρατηρείται αύξηση της σχετικής αφθονίας πολλών παθογόνων μυκήτων στα συμπτωματικά πρέμνα από την Κεντρική Ελλάδα. Το ASV03 *Neofusicoccum* sp. αυξάνεται από 0.1% σε ασυμπτωματικές συνθήκες σε 4.4% σε συμπτωματικές, ενώ το ASV05 *Diplodia* sp. παρουσιάζει άνοδο από 6.2% σε 10.1%. Αντίστοιχα, το ASV31 *Fomitiporia* sp. διπλασιάζεται (2.2% σε 4.8%). Οι αυξήσεις αυτές υποδηλώνουν πιθανή σύνδεση αυτών των μυκήτων με την εκδήλωση συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρουσία του ASV07 *Sordariomycetes* sp., που αυξάνεται από 3.1% σε 6.3%, καθώς και του ASV11 *Kalmusia variispora* (1.9% σε 2.7%). Η αυξημένη σχετική αφθονία αυτών των ειδών πιθανώς να σχετίζεται με την επιδείνωση της υγείας των φυτών με έμμεσους ή άμεσους

τρόπους. Σε αντιπαράβολή, οι ωφέλιμοι μύκητες όπως το ASV09 *Aureobasidium* sp. (2.9% σε 1.4%) και το ASV04 *Cladosporium* sp. (6.1% σε 2.8%) μειώνονται στα συμπτωματικά δείγματα. Αυτό το εύρημα μπορεί να υποδηλώνει πιθανό ανταγωνισμό με τα παθογόνα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν ευνοούν την ανάπτυξή τους.

Στη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-6b.) παρατηρούνται έντονες διαφοροποιήσεις στη σχετική αφθονία των μυκήτων. Το ASV03 *Neofusicoccum* sp. αυξάνεται από 5.9% σε ασυμπτωματικές συνθήκες σε 14.4% σε συμπτωματικές, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς συνδέεται με την παρουσία ή την επιδείνωση των συμπτωμάτων. Παρόμοια αύξηση παρατηρείται και στο ASV07 *Sordariomycetes* sp., από 1.0% σε 5.2%. Οι αυξήσεις αυτές μπορεί να υποδηλώνουν ότι αυτά τα είδη προκαλούν παθογένεια στα πρέμνα ή ότι μπορούν να προσαρμόζονται ευκολότερα σε συνθήκες που συνοδεύουν συμπτωματολογία των φυτών. Σε αντίθεση, το ASV19 *Peniophora* sp. παρουσιάζει δραματική μείωση από 13.2% σε ασυμπτωματικά δείγματα σε μόλις 6.0% σε συμπτωματικά. Επίσης, το ASV96 *Lophiostomataceae* sp. σχεδόν εξαφανίζεται σε συμπτωματικά δείγματα (0.4% από 3.6%). Η μείωση αυτών των ειδών ενδέχεται να σχετίζεται με τη δυσκολία επιβίωσης ή τον ανταγωνισμό που υφίστανται σε περιβάλλοντα με έντονη συμπτωματολογία.



Εικόνα 4.5.8-6. Μπάρες ποσοτών σχετικής αφθονίας που δείχνουν τη σύνθεση των μυκήτων (σε ταξινομικό επίπεδο ASV) στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σύμφωνα με την περιοχή δειγματοληψίας και βάση των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων. Σε κάθε γράφημα απεικονίζονται οι 16 πιο κυρίαρχοι μύκητες με τα αντίστοιχα ποσοστά να αναγράφονται δίπλα από την ταξινόμηση των ASVs.

Στοχεύοντας στα πιο προφανή παθογόνα, στα πρέμνα από τη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-6b.) παρατηρούμε ότι το ASV03 *Neofusicoccum* sp. παρουσιάζει σημαντική αύξηση από 5.9% σε 14.4%, γεγονός που υποδεικνύει συσχέτιση με τα συμπτώματα. Παρόμοια τάση εμφανίζει το ASV07 *Sordariomycetes* sp., το οποίο αυξάνεται από 1.0% σε 5.2%. Η αυξημένη παρουσία αυτών των μυκήτων ενδέχεται να επηρεάζει άμεσα την υγεία των φυτών. Παράλληλα, το ASV11 *Kalmusia variispora* (3.8% σε 5.3%) παρουσιάζει επίσης άνοδο, ενισχύοντας την υπόθεση ότι παθογόνοι μύκητες σχετίζονται με τα συμπτώματα στην περιοχή. Αντίθετα, η σχετική αφθονία του ASV19 *Peniophora* sp. μειώνεται σημαντικά από 13.2% σε 6.0%. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μείωση στα συμπτωματικά δείγματα. Το ASV09 *Aureobasidium* sp. μειώνεται από 2.4% σε 1.1%, ενώ το ASV04 *Cladosporium* sp. από 6.0% σε 3.6%. Αυτές οι μειώσεις ενδέχεται να υποδηλώνουν ανταγωνισμό ή αδυναμία προσαρμογής στις συμπτωματικές συνθήκες.

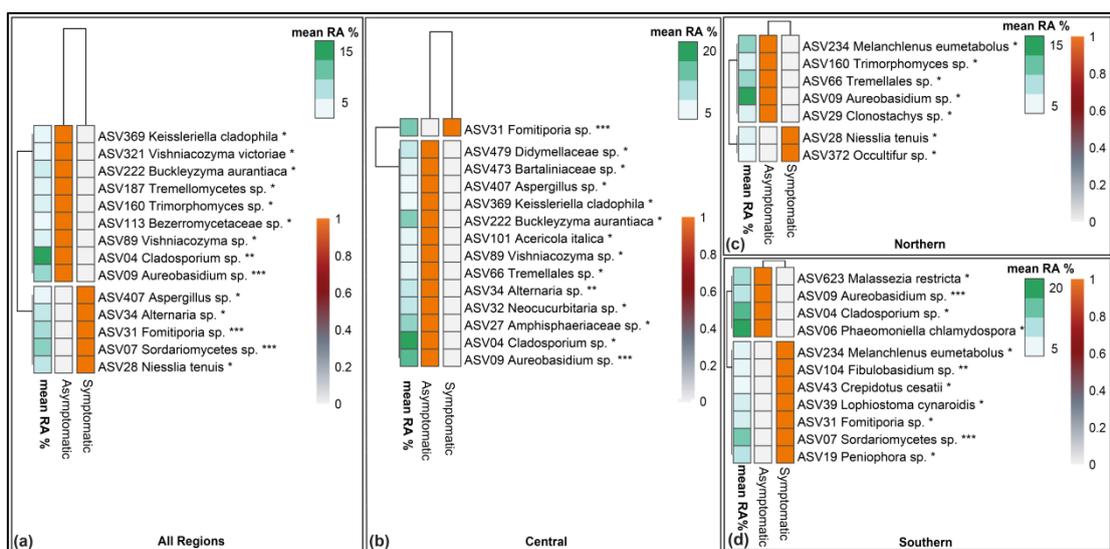
Ολοκληρώνοντας με τα πιο άφθονα στελέχη μυκήτων για τη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-6c.), οι αλλαγές στη σχετική αφθονία των μυκήτων είναι έντονες. Το ASV07 *Sordariomycetes* sp. εμφανίζει μια από τις μεγαλύτερες αυξήσεις, από 0.6% σε ασυμπτωματικά δείγματα σε 13.3% σε συμπτωματικά. Αυτή η απότομη αύξηση υποδηλώνει πιθανή ισχυρή σύνδεση με την ανάπτυξη ή τη διατήρηση των συμπτωμάτων. Παράλληλα, το ASV19 *Peniophora* sp. αυξάνεται από 1.7% σε 6.3%, φανερώνοντας πιθανή ενίσχυση της παρουσίας του υπό συμπτωματικές συνθήκες. Αντιθέτως, ορισμένα είδη φαίνεται να μειώνονται αισθητά. Το ASV09 *Aureobasidium* sp. μειώνεται από 5.2% σε μόλις 0.6%, ενώ το ASV26 *Neosetophoma* sp. από 3.4% σε 0.8%. Οι μειώσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ορισμένοι μύκητες μπορεί να μην ευνοούνται από τις συνθήκες που συνοδεύουν τη συμπτωματολογία ή να εκτοπίζονται από πιο ανταγωνιστικά είδη. Επίσης παρατηρούμε ένα παράδοξο: το ASV06 *Phaeomoniella chlamydospora* και το ASV10 *Phaeoacremonium iranianum*, που συνήθως συνδέονται με ασθένειες του ξύλου, παρουσιάζουν μείωση στα συμπτωματικά δείγματα (9.9% σε 7.0% και 5.9% σε 4.1% αντίστοιχα). Αυτή η μείωση είναι αντιφατική με την αναμενόμενη αύξηση των παθογόνων μυκήτων σε συμπτωματικές συνθήκες αλλά σε αρκετές περιπτώσεις η εκδήλωση των συμπτωμάτων αργεί να εμφανιστεί σε ασυμπτωματικά πρέμνα και τα παθογόνα ξύλου μπορούν να βρίσκονται σε λανθάνουσα μορφή για έτη. Αντιθέτως, το ASV07 *Sordariomycetes* sp. αυξάνεται ραγδαία από 0.6% σε 13.3%, γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει ότι αυτός ο μύκητας ευνοείται ή προκαλεί συνθήκες που συνοδεύουν τα συμπτώματα. Παρόμοια αύξηση παρατηρείται και στο ASV19 *Peniophora* sp. από 1.7% σε 6.3%. Οι ωφέλιμοι μύκητες παρουσιάζουν μειωμένη παρουσία στα συμπτωματικά δείγματα. Το ASV09 *Aureobasidium* sp. μειώνεται από 5.2% σε μόλις 0.6%, ενώ το ASV04 *Cladosporium* sp. από 3.4% σε 2.7%. Αυτές οι μειώσεις πιθανώς σχετίζονται με την ενίσχυση παθογόνων οργανισμών που ανταγωνίζονται τους ωφέλιμους ή καλά εγκαθιδρυμένους μικροοργανισμούς.

Το επόμενο επίπεδο αναλύσεων περιλάμβανε τους θερμικούς χάρτες διαφορικής αφθονίας με σκοπό τον εντοπισμό ASVs μυκήτων που διαφοροποιούνται μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων συνολικά για όλα τις περιοχές (Εικόνα 4.5.8-7a.), αλλά και ανά περιοχή χωριστά: Κεντρική (Εικόνα 4.5.8-7b.), Βόρεια (Εικόνα 4.5.8-7c.), και Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-7d.). Σύμφωνα με την εικόνα των αποτελεσμάτων για όλες τις περιοχές συγκεντρωτικά (Εικόνα 4.5.8-7a.) παρατηρούμε σαφείς διαφορές στην παρουσία και σχετική αφθονία μυκήτων όπως ο *Aspergillus* sp., *Fomitiporia* sp. και *Sordariomycetes* sp. που συνδέονται με παθογόνες καταστάσεις σε φυτά πρέμνων, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρόλο τους άμεσα ή έμμεσα στην εκδήλωση ασθενειών στους κορμούς του ξύλου. Επιπλέον, η διαφοροποίηση της αφθονίας τους μπορεί να σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες και γεωγραφικές συνθήκες, επηρεάζοντας περαιτέρω τη σύνθεση των κοινοτήτων των μυκήτων. Η

παρουσία συγκεκριμένων ASVs σε υψηλότερη αφθονία σε συμπτωματικά δείγματα υποδεικνύει πιθανή εμπλοκή τους σε ασθένειες του ξύλου. Κάτι που φαίνεται να επαληθεύεται και από τα προηγούμενα αποτελέσματα από τα ποσοστά αφθονίας παθογόνων μυκήτων.

Στα δείγματα από την Κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-7b.), παρατηρούμε αρκετούς μύκητες να σχετίζονται με την παρουσία και αφθονία τους κυρίως με τα ασυμπτωματικά πρέμνα όπως οι *Vishniacozyma* sp., *Cladosporium* sp., *Aureobasidium* sp., *Tremellales* sp., *Acericola italica* κ.α. Από την άλλη πλευρά στα συμπτωματικά πρέμνα εντοπίζεται η παρουσία του μύκητα *Fomitiporia* sp. ο οποίος εμπλέκεται στην εκδήλωση ασθενειών του ξύλου και βάση αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται να είναι ο κύριος εκφραστής τέτοιων φαινομένων στα πρέμνα της Κεντρικής Ελλάδος.

Στη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-7c.), οι μύκητες *Niesslia tenuis* και *Occultifur* sp. εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην αφθονία τους στα συμπτωματικά φυτά, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή τους σε σημάδια εμφανίσεις συμπτωμάτων και ασθενειών του ξύλου. Οι συνθήκες αυτές μπορούν να ευνοούν την ανάπτυξη τους. Ο μύκητας *Aureobasidium* sp. από την άλλη εμφανίζεται σε μη συμπτωματικά πρέμνα και είναι γνωστό ότι μπορεί να ωφελεί τα φυτά έναντι ασθενειών, κάτι που φαίνεται να επιβεβαιώνεται σύμφωνα με τα αποτελέσματα. Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι ορισμένοι μύκητες ενδέχεται να συνδέονται άμεσα με εκδηλώσεις ασθενειών.



Εικόνα 4.5.8-7. Θερμικοί χάρτες διαφορικής αφθονίας των Μυκήτων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για όλες της περιοχές δειγματοληψιών (a), για την Κεντρική (b.), Βόρεια (c.) και Νότια Ελλάδα (d.) Η μέση σχετική αφθονία για κάθε ASV υποδεικνύεται από τη λευκή-πράσινη στήλη στα αριστερά. Ο στατιστικός έλεγχος σημαντικότητας υποδεικνύεται δίπλα από κάθε γραμμή (p-value: *** 0 - 0.001, ** 0.001 - 0.01, * 0.01 - 0.05).

Στη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-7d.), η ανάλυση διαφορικής αφθονίας έδειξε ότι μύκητες όπως η *Phaeomoniella chlamydospora* φάνηκε να κυριαρχεί στα ασυμπτωματικά πρέμνα, γεγονός που μπορεί να συνδέεται με την υψηλή θερμοκρασία και τις ξηρές συνθήκες που χαρακτηρίζουν την περιοχή. Το συγκεκριμένο είδος είναι γνωστό για τη συμβολή του σε ασθένειες των αγγειακών ιστών των φυτών, υποδεικνύοντας πιθανές επιπτώσεις στην υγεία των αμπελώνων. Παρόλα αυτά η παρουσία και η αφθονία του στα ασυμπτωματικά φυτά συμπίπτει με την παρουσία ωφέλιμων μυκήτων για την υγεία των πρέμνων όπως οι μύκητες *Malassezia restricta* και *Aureobasidium* sp.. Οι ωφέλιμοι αυτοί μύκητες πιθανόν να καταστέλλουν την εκδήλωση παθογένειας από το μύκητα *Phaeomoniella chlamydospora* και να δρουν

ανταγωνιστικά. Γεγονός που μπορεί να αιτιολογήσει την έλλειψη συμπτωμάτων στα πρέμνα. Στα συμπτωματικά φυτά από την άλλη εντοπίζουμε μύκητες γνωστούς για την εκδήλωση ασθενειών του ξύλου όπως οι *Peniophora* sp., *Fomitiporia* sp. και *Sordariomycetes* sp. και ο οποίος φαίνεται να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη εμφάνιση συμπτωμάτων και ασθενειών του ξύλου στη Νότια Ελλάδα. Η γενική διαφοροποίηση της μυκήτων στη Νότια Ελλάδα συγκριτικά με άλλες περιοχές υποδηλώνει έντονες γεωγραφικές επιδράσεις στη μικροβιακή σύνθεση. Οι διαφορές αυτές είναι σημαντικές για την κατανόηση της δυναμικής των μυκήτων και τη διαμόρφωση στρατηγικών πρόληψης ασθενειών σε συγκεκριμένες ζώνες καλλιέργειας.

Περαιτέρω στις αναλύσεις ανιχνεύτηκε το πυρηνικό μικροβίωμα των μυκήτων (core microbiome) των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων της ποικιλίας Σουλτανίνα ανά περιοχή δειγματοληψίας με όρια ελέγχου Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100 για του μύκητες. Παρακάτω ακολουθεί η σύσταση του πυρηνικού μικροβιώματος και η διαφοροποίηση μεταξύ συμπτωματικών ασυμπτωματικών ανά περιοχή (Πίνακας 4.5.8-1., Πίνακας 4.5.8-2., Πίνακας 4.5.8-3.).

Για την Κεντρική Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-1.), στο πυρηνικό μικροβίωμα των μυκήτων των ασυμπτωματικών πρέμνων παρατηρείται υψηλή σχετική αφθονία του ASV01 *Muriphaeosphaeria viburni* (21.9%) και του ASV04 *Cladosporium* sp. (7.8%), που φαίνεται να είναι περισσότερο διαδεδομένα σε σχέση με τα συμπτωματικά πρέμνα. Άλλα είδη όπως το ASV05 *Diplodia* sp. και το ASV11 *Kalmusia variispora* παρουσιάζουν σημαντική παρουσία και στις δύο συνθήκες, αν και στα συμπτωματικά εμφανίζουν αύξηση (*Diplodia* sp. από 4.3% σε 8.4%). Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία του ASV08 *Phoma aloes* (2.5%) και του ASV34 *Alternaria* sp. (0.5%) αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά δείγματα, καθώς και του ASV194 *Basidiomycota* sp. και του ASV207 *Ascomycota* sp., τα οποία απουσιάζουν πλήρως από τα συμπτωματικά δείγματα. Στα συμπτωματικά πρέμνα, εντοπίζεται η παρουσία των ASV07 *Sordariomycetes* sp. (5.9%) και ASV31 *Fomitiporia* sp. (5.4%) που δεν εντοπίζονται καθόλου στα ασυμπτωματικά δείγματα. Η αύξηση αυτών των ειδών μπορεί να υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση με ασθένειες του ξύλου. Επίσης, τα είδη ASV27 *Amphisphaeriaceae* sp. και ASV28 *Niesslia tenuis* παρατηρούνται και στις δύο καταστάσεις των πρέμνων, αλλά με μικρότερη σχετική αφθονία στα συμπτωματικά δείγματα (*Amphisphaeriaceae* sp. από 5.3% σε 1.8%). Η παρουσία του ASV22/ASV35 *Pleosporales* sp. και στις δύο καταστάσεις των πρέμνων με παρόμοια ποσοστά (5.9% και 5.2%) υποδηλώνει πιθανή σταθερότητα της παρουσίας αυτού του στελέχους. Συνολικά για το πυρηνικό μικροβίωμα της Κεντρικής Ελλάδος εντοπίζονται αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα οι μύκητες ASV08 *Phoma aloes*, ASV34 *Alternaria* sp., ASV194 *Basidiomycota* sp., και ASV207 *Ascomycota* sp., ενώ αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα τα ASV07 *Sordariomycetes* sp., και ASV31 *Fomitiporia* sp..

Πίνακας 4.5.8-1. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (core microbiome) των Μυκήτων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από την Κεντρική Ελλάδα (Central).
(Detections limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100).

Phylogenetic Classification	% Relative abundance (+ standard error)	
	Asymptomatic Central	Symptomatic Central
	n=30	n=30
(ASV01) <i>Muriphaeosphaeria viburni</i>	21.9 (± 3.1)	28.0 (± 2.6)
(ASV02) <i>Angustimassarina</i> sp.	1.0 (± 0.4)	0.9 (± 0.4)
(ASV04) <i>Cladosporium</i> sp.	7.8 (± 1.4)	3.4 (± 0.6)
(ASV05) <i>Diplodia</i> sp.	4.3 (± 1.0)	8.4 (± 2.1)
(ASV07) <i>Sordariomycetes</i> sp.	-	5.9 (± 1.9)
(ASV08) <i>Phoma aloes</i>	2.5 (± 0.9)	-
(ASV09) <i>Aureobasidium</i> sp.	3.5 (± 0.6)	1.5 (± 0.3)
(ASV11) <i>Kalmusia variispora</i>	2.0 (± 0.9)	3.5 (± 1.3)
(ASV22, ASV35) Pleosporales sp.	5.9 (± 1.2)	5.2 (± 1.5)
(ASV25) <i>Hoehnelomycetaceae</i> sp.	1.8 (± 0.7)	1.1 (± 0.5)
(ASV26) <i>Neosetophoma</i> sp.	1.4 (± 0.3)	2.5 (± 0.9)
(ASV27) <i>Amphisphaeriaceae</i> sp.	5.3 (± 1.4)	1.8 (± 0.7)
(ASV28) <i>Niesslia tenuis</i>	1.6 (± 0.4)	2.4 (± 0.6)
(ASV31) <i>Fomitiporia</i> sp.	-	5.4 (± 1.3)
(ASV34) <i>Alternaria</i> sp.	0.5 (± 0.2)	-
(ASV194) <i>Basidiomycota</i> sp.	0.5 (± 0.2)	-
(ASV207) <i>Ascomycota</i> sp.	0.7 (± 0.2)	-

Για τη Βόρεια Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-2.), στο πυρηνικό μικροβίωμα των μυκήτων στα ασυμπτωματικά πρέμνα παρατηρείται υψηλή σχετική αφθονία του ASV02 *Angustimassarina* sp. (24.1%) και του ASV03 *Neofusicoccum* sp. (5.6%). Αντίθετα, στα συμπτωματικά δείγματα το *Angustimassarina* sp. παρουσιάζει μείωση στο 19.9%, ενώ το *Neofusicoccum* sp. υπερδιπλασιάζεται φτάνοντας το 12.7%, υποδεικνύοντας πιθανή σύνδεση με την εμφάνιση συμπτωμάτων. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί όπως το ASV04 *Cladosporium* sp. και το ASV09 *Aureobasidium* sp. μειώνονται αισθητά στα συμπτωματικά δείγματα (6.5% σε 4.8% και 2.8% σε 1.5% αντίστοιχα), γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ανταγωνισμό με παθογόνους οργανισμούς. Σταθερή παραμένει η παρουσία του ASV11 *Kalmusia variispora*, τόσο στα ασυμπτωματικά (4.6%) όσο και στα συμπτωματικά δείγματα (5.5%). Αξιοσημείωτη είναι η απουσία του ASV05 *Diplodia* sp. και του ASV12 *Carnodiales* sp. από τα συμπτωματικά δείγματα, παρά την παρουσία τους στα ασυμπτωματικά (3.0% για το κάθε ένα). Αντίθετα, το ASV34 *Alternaria* sp. και το ASV263/ASV116 *Ascomycota* sp. εμφανίζονται μόνο στα συμπτωματικά δείγματα (1.8% και 1.3% αντίστοιχα). Η παρουσία του ASV72/ASV94 *Pleosporales* sp. είναι σταθερή και στις δύο καταστάσεις με μικρή αύξηση στα συμπτωματικά (4.3% σε 5.7%). Το ASV08 *Phoma aloes* επίσης αυξάνεται από 2.1% σε 5.0% στα συμπτωματικά δείγματα, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση με την παρουσία συμπτωμάτων. Συνολικά για το πυρηνικό μικροβίωμα της Βόρειας Ελλάδος εντοπίζονται αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα οι μύκητες ASV05 *Diplodia* sp., ASV12 *Carnodiales* sp., ASV43 *Crepidotus cesatii*, ASV66 *Tremellales* sp. ενώ στα συμπτωματικά οι μύκητες ASV34 *Alternaria* sp., και ASV263/ASV116 *Ascomycota* sp.

Στη Νότια Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-3.), για το πυρηνικό μικροβίωμα των μυκήτων στα ασυμπτωματικά πρέμνα παρατηρείται υψηλή σχετική αφθονία του ASV06 *Phaeomoniella chlamydospora* (10.2%) και του ASV010 *Phaeoacremonium iranianum* (8.0%). Παράδοξο αποτελεί το γεγονός ότι αυτά τα είδη, που συνήθως συνδέονται με ασθένειες του ξύλου, παρουσιάζουν μείωση στα συμπτωματικά δείγματα, στο 6.4% και 6.0% αντίστοιχα. Αυτό ίσως υποδηλώνει ανταγωνισμό με ωφέλιμους ή άλλους παθογόνους μύκητες. Στα συμπτωματικά πρέμνα, εντοπίζεται η αύξηση του ASV07 *Sordariomycetes* sp. από πλήρη απουσία στα ασυμπτωματικά δείγματα σε 10.5%. Παρόμοια τάση εμφανίζει και το ASV21 *Peniophora* sp., το οποίο απουσιάζει πλήρως από τα ασυμπτωματικά δείγματα αλλά φτάνει στο 7.9% στα συμπτωματικά. Οι αυξήσεις αυτές πιθανώς να συνδέονται με ασθένειες του ξύλου. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί,

όπως το ASV09 *Aureobasidium* sp., απουσιάζουν εντελώς από τα συμπτωματικά δείγματα (3.9% στα ασυμπτωματικά), ενώ το ASV04 *Cladosporium* sp. μειώνεται από 3.5% σε 2.3%. Αυτές οι μεταβολές μπορεί να σχετίζονται με επίδραση των ωφέλιμων μυκήτων έναντι των παθογόνων στην εκδήλωση ασθενειών του ξύλου. Συνολικά για το πυρηνικό μικροβίωμα της Νότιας Ελλάδας εντοπίζονται αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα οι μύκητες ASV02 *Angustimassarina* sp., ASV09 *Aureobasidium* sp., ASV018 *Sordariomycetes* sp., ASV41 *Phialophora geniculata*, ASV45 *Acremonium citrinum* και ASV65 *Nigrograna* sp. ενώ στα συμπτωματικά αντίστοιχα εντοπίστηκαν αποκλειστικά οι μύκητες ASV07 *Sordariomycetes* sp. και ASV21 *Peniophora* sp..

Πίνακας 4.5.8-2. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (*core microbiome*) των Μυκήτων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από τη Βόρεια Ελλάδα (Northern). (Detections limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100).

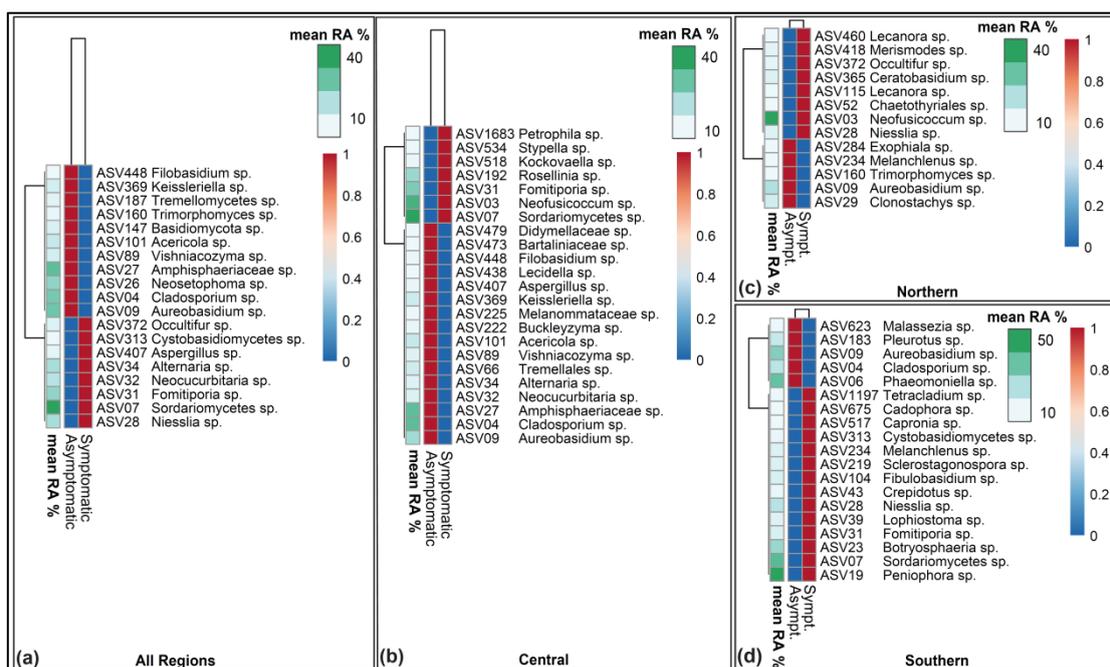
Phylogenetic Classification	% Relative abundance (\pm standard error)	
	Asymptomatic Northern n=30	Symptomatic Northern n=30
(ASV02) <i>Angustimassarina</i> sp.	24.1 (\pm 2.6)	19.9 (\pm 2.2)
(ASV03) <i>Neofusicoccum</i> sp.	5.6 (\pm 1.0)	12.7 (\pm 2.3)
(ASV04) <i>Cladosporium</i> sp.	6.5 (\pm 1.1)	4.8 (\pm 1.1)
(ASV05) <i>Diplodia</i> sp.	3.0 (\pm 1.2)	-
(ASV08) <i>Phoma aloes</i>	2.1 (\pm 0.7)	5.0 (\pm 1.6)
(ASV09) <i>Aureobasidium</i> sp.	2.8 (\pm 0.5)	1.5 (\pm 0.4)
(ASV11) <i>Kalmusia variispora</i>	4.6 (\pm 1.5)	5.5 (\pm 1.5)
(ASV12) <i>Capnodiales</i> sp.	3.0 (\pm 0.7)	-
(ASV25) <i>Hoehnelomycetaceae</i> sp.	2.4 (\pm 0.7)	1.6 (\pm 0.5)
(ASV34) <i>Alternaria</i> sp.	-	1.8 (\pm 0.7)
(ASV43) <i>Crepidotus cesatii</i>	2.3 (\pm 0.6)	-
(ASV66) <i>Tremellales</i> sp.	0.5 (\pm 0.1)	-
(ASV72, ASV94) <i>Pleosporales</i> sp.	4.3 (\pm 1.8)	5.7 (\pm 1.6)
(ASV263, ASV116) <i>Ascomycota</i> sp.	0.8 (\pm 0.2)	1.3 (\pm 0.4)

Πίνακας 4.5.8-3. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (*core microbiome*) των Μυκήτων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από τη Νότια Ελλάδα (Southern). (Detections limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100).

Phylogenetic Classification	% Relative abundance (\pm standard error)	
	Asymptomatic Southern n=30	Symptomatic Southern n=30
(ASV01) <i>Muriphaeosphaeria viburni</i>	5.1 (\pm 1.8)	3.3 (\pm 1.3)
(ASV02) <i>Angustimassarina</i> sp.	1.1 (\pm 0.7)	-
(ASV04) <i>Cladosporium</i> sp.	3.5 (\pm 0.6)	2.3 (\pm 0.5)
(ASV06) <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	10.2 (\pm 1.8)	6.4 (\pm 1.7)
(ASV07) <i>Sordariomycetes</i> sp.	-	10.5 (\pm 2.7)
(ASV09) <i>Aureobasidium</i> sp.	3.9 (\pm 1.2)	-
(ASV010) <i>Phaeoacremonium iranlanum</i>	8.0 (\pm 1.8)	6.0 (\pm 1.5)
(ASV12) <i>Capnodiales</i> sp.	4.9 (\pm 1.0)	2.6 (\pm 0.4)
(ASV14) <i>Seimatosporium vitis</i>	2.2 (\pm 0.8)	1.7 (\pm 0.6)
(ASV017) <i>Neosetophoma rosarum</i>	2.9 (\pm 0.8)	3.5 (\pm 1.0)
(ASV018) <i>Sordariomycetes</i> sp.	0.7 (\pm 0.3)	-
(ASV21) <i>Peniophora</i> sp.	-	7.9 (\pm 2.7)
(ASV22, ASV73) <i>Pleosporales</i> sp.	6.6 (\pm 1.8)	4.3 (\pm 0.9)
(ASV26) <i>Neosetophoma</i> sp.	2.9 (\pm 0.8)	1.1 (\pm 0.4)
(ASV29) <i>Clonostachys</i> sp.	2.2 (\pm 0.7)	1.6 (\pm 0.6)
(ASV34) <i>Alternaria</i> sp.	1.0 (\pm 0.4)	0.8 (\pm 0.4)
(ASV40) <i>Herpotrichiellaceae</i> sp.	1.8 (\pm 0.5)	1.1 (\pm 0.4)
(ASV41) <i>Phialophora geniculata</i>	1.7 (\pm 0.7)	-
(ASV45) <i>Acremonium citrinum</i>	1.2 (\pm 0.8)	-
(ASV65) <i>Nigrograna</i> sp.	1.8 (\pm 0.7)	-
(ASV148, ASV82) <i>Ascomycota</i> sp.	2.4 (\pm 1.2)	2.1 (\pm 0.6)

Ολοκληρώνοντας με τις αναλύσεις του μικροβιώματος των μυκήτων μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων της ποικιλίας Σουλτανίνα με σκοπό τη αξιοποίηση της ενδημικής λειτουργικής μικροβιακής ποικιλότητας για την αντιμετώπιση των ασθενειών του ξύλου της αμπέλου, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση Random Forest και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω θερμικών χαρτών (Εικόνα 4.5.8-8.). Η ανάλυση έγινε για όλες τις περιοχές δειγματοληψίας συγκεντρωτικά (Εικόνα 4.5.8-8a.) αλλά και για κάθε περιοχή αναλυτικά, Κεντρική (Εικόνα 4.5.8-8b.), Βόρεια (Εικόνα 4.5.8-8c.) και Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-8d.). Σκοπός την ανάλυσης Random Forest ήταν ο εντοπισμός μυκήτων που θα αποτελούσαν δείκτες για την εμφάνιση συμπτωμάτων από ασθένειες του ξύλου με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση και περαιτέρω αντιμετώπιση αντίστοιχων φαινομένων.

Βάση των αποτελεσμάτων για όλες τις περιοχές δειγματοληψίας (Εικόνα 4.5.8-8a.) και εστιάζοντας στα συμπτωματικά πρέμνα και στον εντοπισμό μυκήτων, μπορούμε να διακρίνουμε τα παθογόνα στελέχη μυκήτων *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fomitiporia*, *Sordariomycetes* και τα σαπροφυτικά *Neocucurbitaria* και *Niesslia*. Η παρουσία των σαπροφυτικών μυκήτων ενδεχομένως να ακολουθεί την εξέλιξη των συμπτωμάτων από τα παθογόνα. Για την Κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-8b.) βάση των θερμικών χαρτών της Random Forest εντοπίζονται οι παθογόνοι μύκητες *Rosellinia*, *Fomitiporia*, *Neofusicoccum* και *Sordariomycetes* ενώ από σαπροφυτικούς τον μύκητα *Stypella*. Στη συνέχεια και για την περίπτωση της Βόρειας Ελλάδας (Εικόνα 4.5.8-8c.) εντοπίζουμε τους παθογόνους μύκητες *Ceratobasidium* και *Neofusicoccum* καθώς και τους σαπροφυτικούς *Merismodes*, *Chaetothyriales* και *Niesslia*. Ολοκληρώνοντας με τα πρέμνα από την Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-8c.) τα οποία έδειξαν την μεγαλύτερη αφθονία σε παθογόνους και σαπροφυτικούς μύκητες συγκριτικά με τις υπόλοιπες περιοχές μελέτης. Στα πρέμνα από τη Νότια Ελλάδα εντοπίσαμε τους παθογόνους μύκητες *Peniophora*, *Sordariomycetes*, *Fomitiporia* καθώς και τους σαπροφυτικούς μύκητες *Tetracladium*, *Cadophora*, *Capronia*, *Lophiostoma*, *Niesslia*, *Crepidotus*. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης είναι η παρουσία μυκήτων σε όλα τα ασυμπτωματικά πρέμνα από όλες της περιοχές όπως ο *Aureobasidium* και ο *Cladosporium* και οι οποίοι συνδέονται με ωφέλιμη ή ανταγωνιστική παρουσία στα φυτά έναντι των παθογόνων, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την άποψη του κατευνασμού των παθογόνων από στελέχη του ενδημικού μικροβιώματος, καθώς και της πρόληψης συμπτωμάτων και ασθενειών.



Εικόνα 4.5.8-8. Random Forest θερμικοί χάρτες αφθονίας των Μυκήτων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για όλες της περιοχές δειγματοληψιών (a), για την Κεντρική (b.), Βόρεια (c.) και Νότια Ελλάδα (d.). Η ανάλυση παρουσιάζει τα ASVs τα οποία έδειξαν σημαντική θετική συσχέτιση από τα πρέμνα με (συμπτωματικά) και χωρίς (ασυμπτωματικά) συμπτώματα ασθενειών του ξύλου.

2.2.2 Αναλύσεις μικροβιώματος βακτηρίων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα

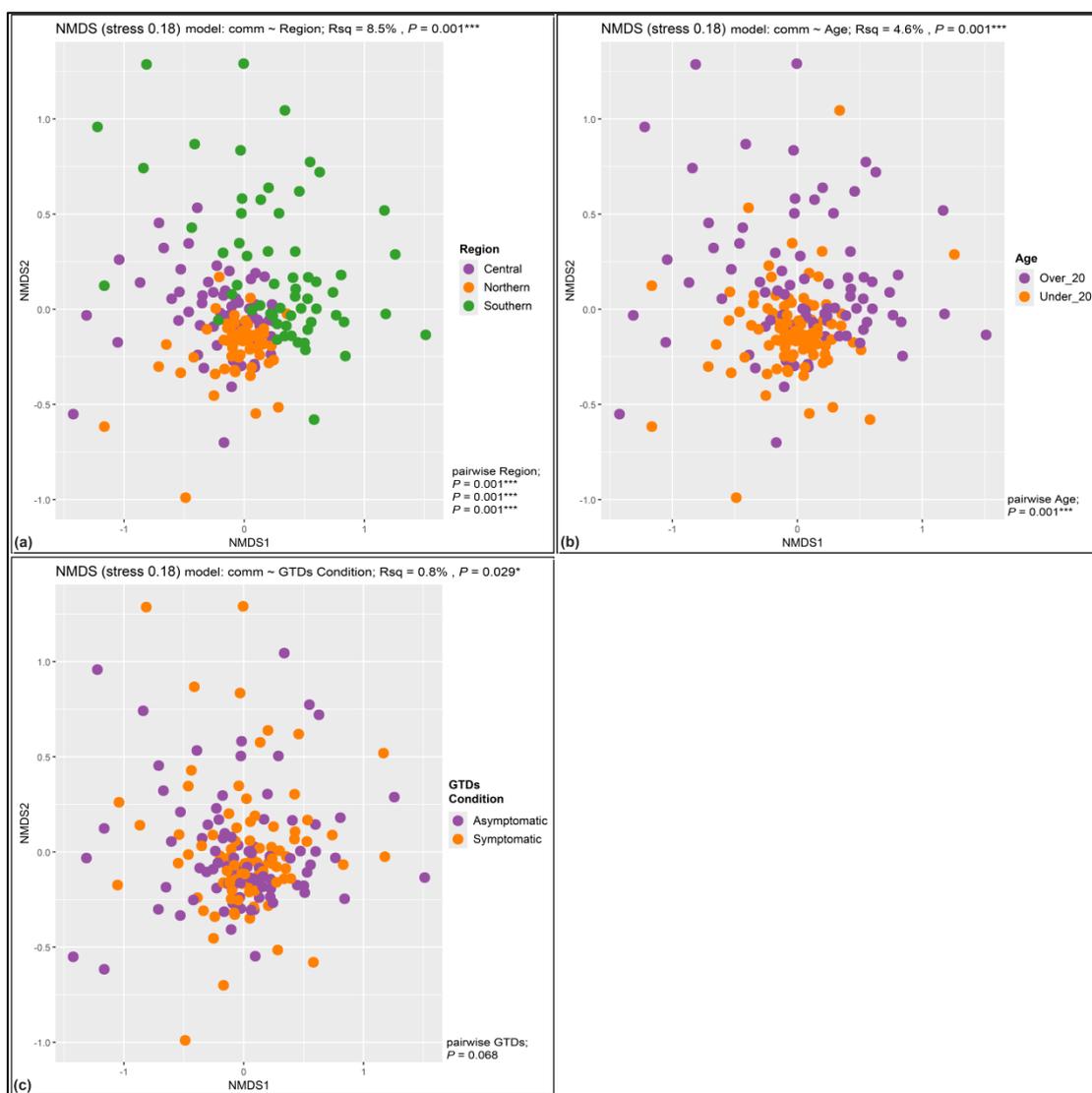
Οι αναλύσεις που αφορούσαν τη διερεύνηση του βακτηριακού μικροβιώματος σε δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων πραγματοποιήθηκαν με τρόπο αντίστοιχο των αναλύσεων για τους μύκητες. Συνοπτικά, εξετάστηκε η β-ποικιλότητα μέσω μη παραμετρικού ελέγχου NMDS για τους παράγοντες κατάσταση πρέμνων, ηλικία και γεωγραφική περιοχή, τόσο για το σύνολο των δειγμάτων όσο και ανά περιοχή. Η NMDS βασίστηκε σε μήτρες αποστάσεων ASVs χρησιμοποιώντας τον δείκτη διαφοροποίησης Bray-Curtis (dissimilarity). Στα διαγράμματα της NMDS ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης με αντιμεταθέσεις (PERMANOVA, 999 permutations tests) για κάθε παράγοντα, καθώς και οι στατιστικοί έλεγχοι ανά ζεύγη μέσω pairwise PERMANOVA. Ακολούθησε ο εντοπισμός των κυρίαρχων βακτηριακών γενών μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών φυτών σε κάθε περιοχή μελέτης (Βόρεια, Κεντρική και Νότια Ελλάδα), με παρουσίαση των αποτελεσμάτων σε γραφήματα σχετικής αφθονίας %. Επιπλέον εφαρμόστηκε ανάλυση διαφορικής αφθονίας (Differential Abundance) και οπτικοποίηση μέσω θερμικών χαρτών, συνοδευόμενη από μη παραμετρικούς ελέγχους Kruskal-Wallis και Wilcoxon για τον εντοπισμό ASVs με διαφοροποιημένη αφθονία μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων, τόσο συνολικά όσο και για κάθε περιοχή ξεχωριστά. Οι αναλύσεις ολοκληρώθηκαν με την εύρεση του πυρηνικού μικροβιώματος (core microbiome) ανά περιοχή μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων, με όρια Detection = 0.01/100 και Prevalence = 85/100, τα οποία παρουσιάστηκαν σε πίνακες σχετικής αφθονίας %. Το μεγαλύτερο μέρος της μεθοδολογίας βασίστηκε σε παρόμοιες έρευνες για μικροβιώματα πρέμνων (Bekris et al., 2021; Papadopoulou et al., 2022; Bekris et al., 2025). Η

ανάλυση πραγματοποιήθηκε κυρίως με το λογισμικό R v.4.0.2 (R Core Team, 2020). Το αρχικό σκέλος των αναλύσεων περιλάμβανε τη διερεύνηση της β-ποικιλότητας των βακτηρίων μέσω NMDS διαγραμμάτων για όλες τις περιοχές συνολικά (Εικόνα 4.5.8-9.) καθώς και για κάθε περιοχή ξεχωριστά: Κεντρική Ελλάδα (Central, Εικόνα 4.5.8-10.), Βόρεια Ελλάδα (Northern, Εικόνα 4.5.8-11.) και Νότια Ελλάδα (Southern, Εικόνα 4.5.8-12.).

Ξεκινώντας από τα NMDS διαγράμματα που αφορούν όλες τις περιοχές μελέτης, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τρεις παράγοντες: την περιοχή δειγματοληψίας (Εικόνα 4.5.8-9a.), την ηλικία των πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-9b.) και την παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου (Εικόνα 4.5.8-9c.). Όπως και στην περίπτωση των μυκήτων, ο παράγοντας της ηλικίας καθορίστηκε στα 20 έτη και διατηρήθηκε σταθερός σε όλες τις επόμενες αναλύσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για το σύνολο των δειγμάτων, το διάγραμμα NMDS που αφορά την περιοχή (Εικόνα 4.5.8-9a.) παρουσιάζει διακριτή, αν και όχι απόλυτη, διαφοροποίηση στις βακτηριακές κοινότητες μεταξύ των περιοχών. Το μοντέλο της PERMANOVA ήταν στατιστικά σημαντικό ($P = 0.001$), με $R^2 = 8.5\%$, υποδεικνύοντας ότι η γεωγραφική περιοχή εξηγεί ποσοστό 8.5% της παραλλακτικότητας στη σύνθεση των βακτηρίων. Η παρατηρούμενη ομαδοποίηση ενισχύει την υπόθεση ότι παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες, καθώς και οι καλλιεργητικές πρακτικές, διαφοροποιούν σε κάποιο βαθμό τις μικροβιακές κοινότητες. Παράλληλα, η μικρότερη ομαδοποίηση σε σχέση με τους μύκητες υποδηλώνει ευρύτερη γεωγραφική κατανομή των βακτηρίων. Η υψηλή στατιστική σημαντικότητα τόσο της PERMANOVA όσο και της pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$) αναδεικνύει τον γεωγραφικό διαχωρισμό ως σημαντικό παράγοντα διαφοροποίησης.

Στο NMDS διάγραμμα που αφορά την ηλικία των πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-9b.) παρατηρείται επίσης διαφοροποίηση στις βακτηριακές κοινότητες. Αν και η ομαδοποίηση είναι λιγότερο σαφής σε σχέση με τον παράγοντα περιοχή, η διαφορά παραμένει στατιστικά σημαντική ($P = 0.001$). Το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί το 4.6% της παραλλακτικότητας ($R^2 = 6.7\%$), υποδηλώνοντας ότι η ηλικία έχει μικρότερο αλλά υπαρκτό αντίκτυπο στη δομή των κοινοτήτων, εύρημα που επιβεβαιώνεται και στη μελέτη των μυκήτων. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν σχετίζεται με μακροχρόνιες μεταβολές στο περιβάλλον ή στο έδαφος, οι οποίες επηρεάζουν τα παλαιότερα πρέμνα. Η σημαντικότητα της pairwise PERMANOVA ($P = 0.001$) υποδηλώνει ότι η ηλικία παραμένει παράγοντας με ουσιαστικό ρόλο.

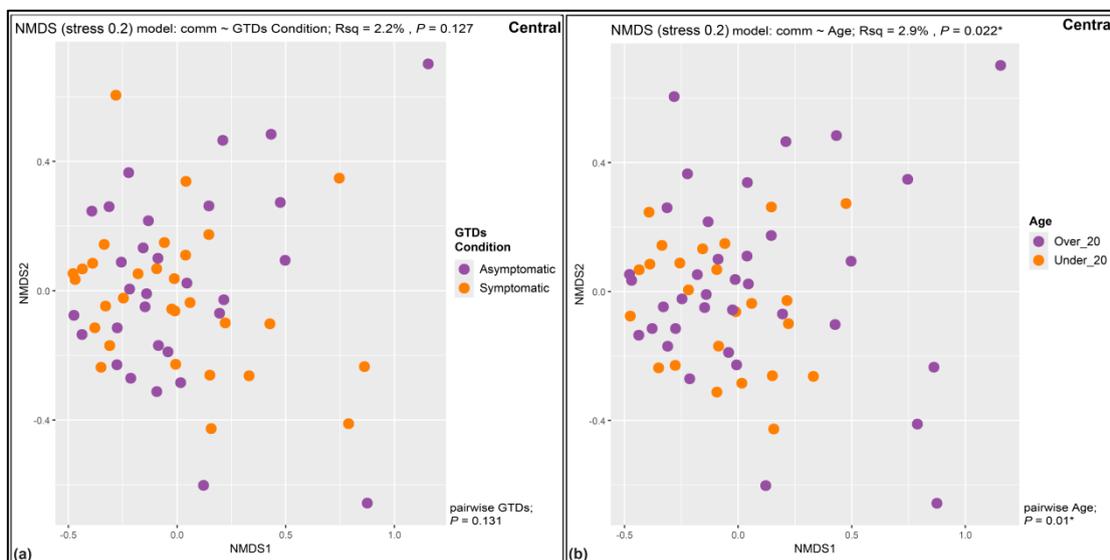
Το τρίτο NMDS διάγραμμα αφορά την κατάσταση των πρέμνων με βάση την παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου (Εικόνα 4.5.8-9c.). Στην περίπτωση αυτή, το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί μόλις το 0.8% της παραλλακτικότητας ($R^2 = 0.8\%$), ενώ η διαφορά είναι οριακά στατιστικά σημαντική ($P = 0.029$). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συμπτωματολογία έχει περιορισμένη επίδραση στη διαμόρφωση των βακτηριακών κοινοτήτων, τουλάχιστον όταν εξετάζονται όλες οι περιοχές συνολικά. Η μικρή διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στην υψηλή προσαρμοστικότητα των βακτηρίων και στην παρουσία κοινών taxa τόσο σε συμπτωματικές όσο και σε ασυμπτωματικές συνθήκες. Παρόμοιες τάσεις καταγράφηκαν και στους μύκητες, αν και με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα βάσει των pairwise PERMANOVA.



Εικόνα 4.5.8-9. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τα Βακτήρια. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ταξιθέτηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: περιοχής δειγματοληψίας (a), ηλικίας (b), και εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθενείς ξύλου (c). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της 16S rRNA περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

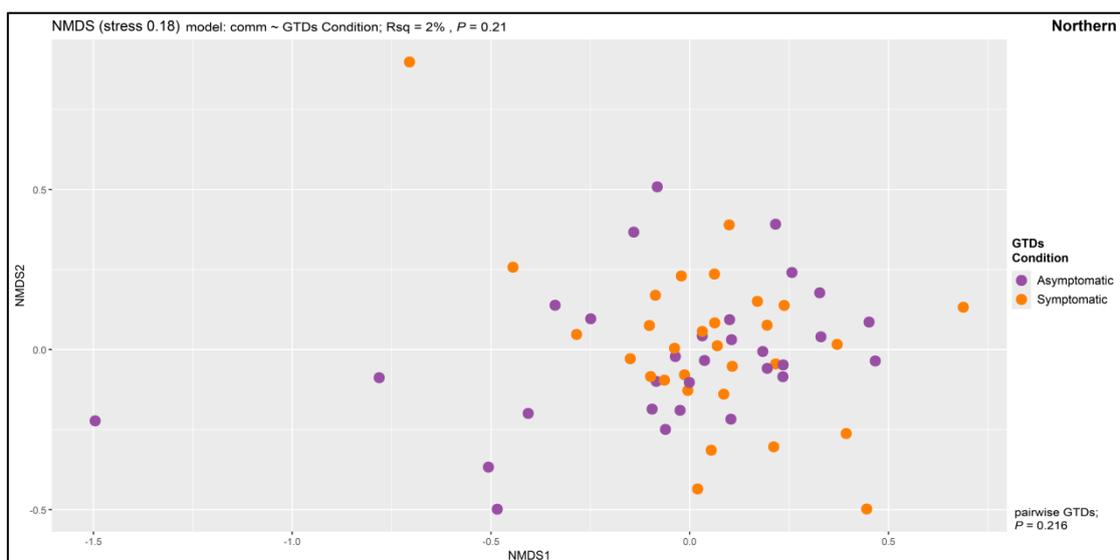
Στη συνέχεια, η ανάλυση της β-ποικιλότητας των βακτηρίων μέσω NMDS διαγραμμάτων εξετάστηκε ξεχωριστά για κάθε περιοχή μελέτης, λαμβάνοντας υπόψη τους παράγοντες της ηλικίας των πρέμνων και της παρουσίας ή απουσίας συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου. Για την Κεντρική Ελλάδα, το διάγραμμα NMDS (Εικόνα 4.5.8-10.) εμφάνισε μέτρια διαφοροποίηση στις βακτηριακές κοινότητες και για τους δύο παράγοντες: την εμφάνιση συμπτωμάτων (Εικόνα 4.5.8-10a.) και την ηλικία των πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-10b.). Το μοντέλο της PERMANOVA έδειξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για τον παράγοντα ηλικία ($R^2 = 2.9\%$, $P = 0.022$), ενώ για την εμφάνιση συμπτωμάτων η διαφοροποίηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($R^2 = 2.2\%$, $P = 0.127$). Το χαμηλό ποσοστό εξήγησης της παραλλακτικότητας υποδηλώνει ότι και οι δύο παράγοντες έχουν σχετικά περιορισμένη επίδραση στη διαμόρφωση των βακτηριακών κοινοτήτων. Ειδικότερα, η παρουσία συμπτωμάτων δεν φαίνεται να επηρεάζει ουσιαστικά τη δομή των βακτηριακών κοινοτήτων, ενώ αντίθετα η ηλικία των πρέμνων εμφανίζει ελαφρώς εντονότερη επίδραση ($P = 0.022$). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τον μικρό αλλά

διακριτό διαχωρισμό των ομάδων που προκύπτει από την pairwise PERMANOVA, καθώς και με τα αντίστοιχα ευρήματα της ανάλυσης των μυκήτων.



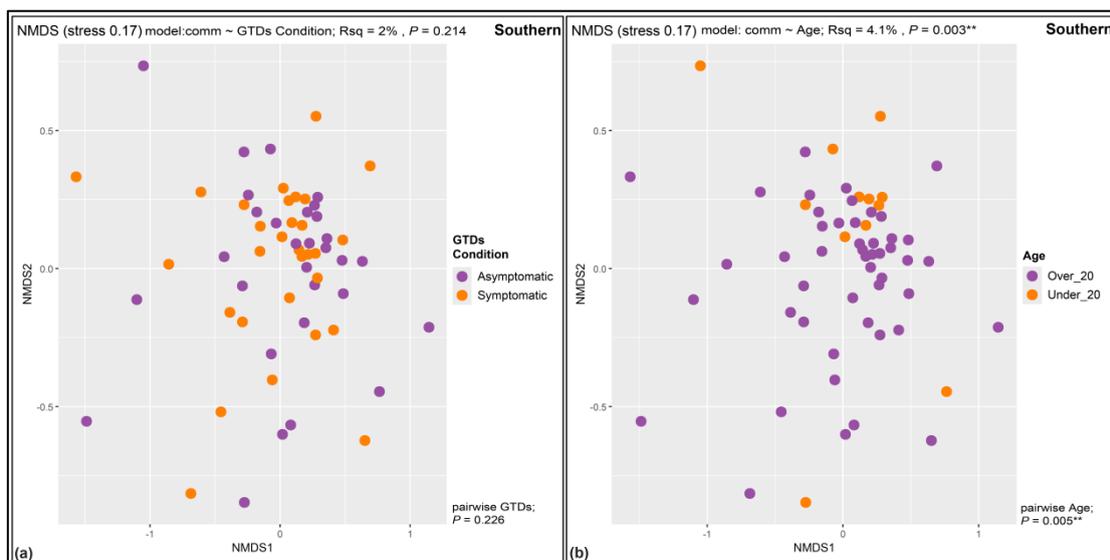
Εικόνα 4.5.8-10. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τα Βακτήρια από την περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας (Central). Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ταξινόμηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου (a) και ηλικίας (b). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της 16S rRNA περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Το επόμενο NMDS διάγραμμα αφορά τις βακτηριακές κοινότητες των πρέμνων από τη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-11.). Σε αυτή την περίπτωση εξετάστηκε αποκλειστικά ο παράγοντας της εμφάνισης συμπτωμάτων, καθώς όλα τα πρέμνα είχαν την ίδια ηλικία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο παράγοντας αυτός δεν δείχνει σαφή διαφοροποίηση στις βακτηριακές κοινότητες. Το μοντέλο της PERMANOVA εξηγεί το 2% της παραλλακτικότητας ($R^2 = 2\%$) και δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.21$). Η παρουσία συμπτωμάτων φαίνεται να προκαλεί περιορισμένες μεταβολές στη σύνθεση των κοινοτήτων, γεγονός που υποδηλώνει μικρό βαθμό επίδρασης. Η χαμηλή διαφοροποίηση πιθανόν αντανάκλα την προσαρμοστικότητα και σχετική σταθερότητα των βακτηρίων απέναντι στις συνθήκες που σχετίζονται με την εμφάνιση συμπτωμάτων. Επιπλέον, η pairwise PERMANOVA δεν ανέδειξε περαιτέρω διαχωρισμό των ομάδων, σε αντίθεση με την αντίστοιχη ανάλυση των μυκήτων, όπου παρά τον περιορισμένο αντίκτυπο του παράγοντα, παρατηρήθηκε σαφέστερη διαφοροποίηση των κοινοτήτων.



Εικόνα 4.5.8-11. Διάγραμμα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τα Βακτήρια από την περιοχή της Βόρειας Ελλάδας (Northern). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ταξιθέτηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου. Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της 16S rRNA περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της β-ποικιλότητας των βακτηρίων μέσω των διαγραμμάτων NMDS, εξετάστηκαν τα δείγματα που προέρχονταν από τη Νότια Ελλάδα. Σύμφωνα με την απεικόνιση της NMDS (Εικόνα 4.5.8-12.), παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση την ηλικία των πρέμνων, ενώ δεν καταγράφηκε αντίστοιχη διαφοροποίηση σε σχέση με την εμφάνιση συμπτωμάτων. Το μοντέλο της PERMANOVA έδειξε ότι η ηλικία επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή δομή των βακτηριακών κοινοτήτων ($R^2 = 4.1\%$, $P = 0.003$), σε αντίθεση με τον παράγοντα εμφάνιση συμπτωμάτων, ο οποίος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική επίδραση ($R^2 = 2\%$, $P = 0.214$). Ο σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων μεταξύ των ηλικιακών κατηγοριών υποδηλώνει ότι η ηλικία των πρέμνων αποτελεί σημαντικότερο οδηγό της διακύμανσης των βακτηριακών κοινοτήτων του ξύλου, εύρημα που συμφωνεί και με όσα παρατηρήθηκαν στις μυκητιακές κοινότητες. Η διαφοροποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της pairwise PERMANOVA ($P = 0.005$). Οι βακτηριακές κοινότητες των πρέμνων από τη Νότια Ελλάδα εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στον παράγοντα ηλικία, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με τις εντονότερες ξηροθερμικές κλιματικές συνθήκες της περιοχής, σε σύγκριση με την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα.



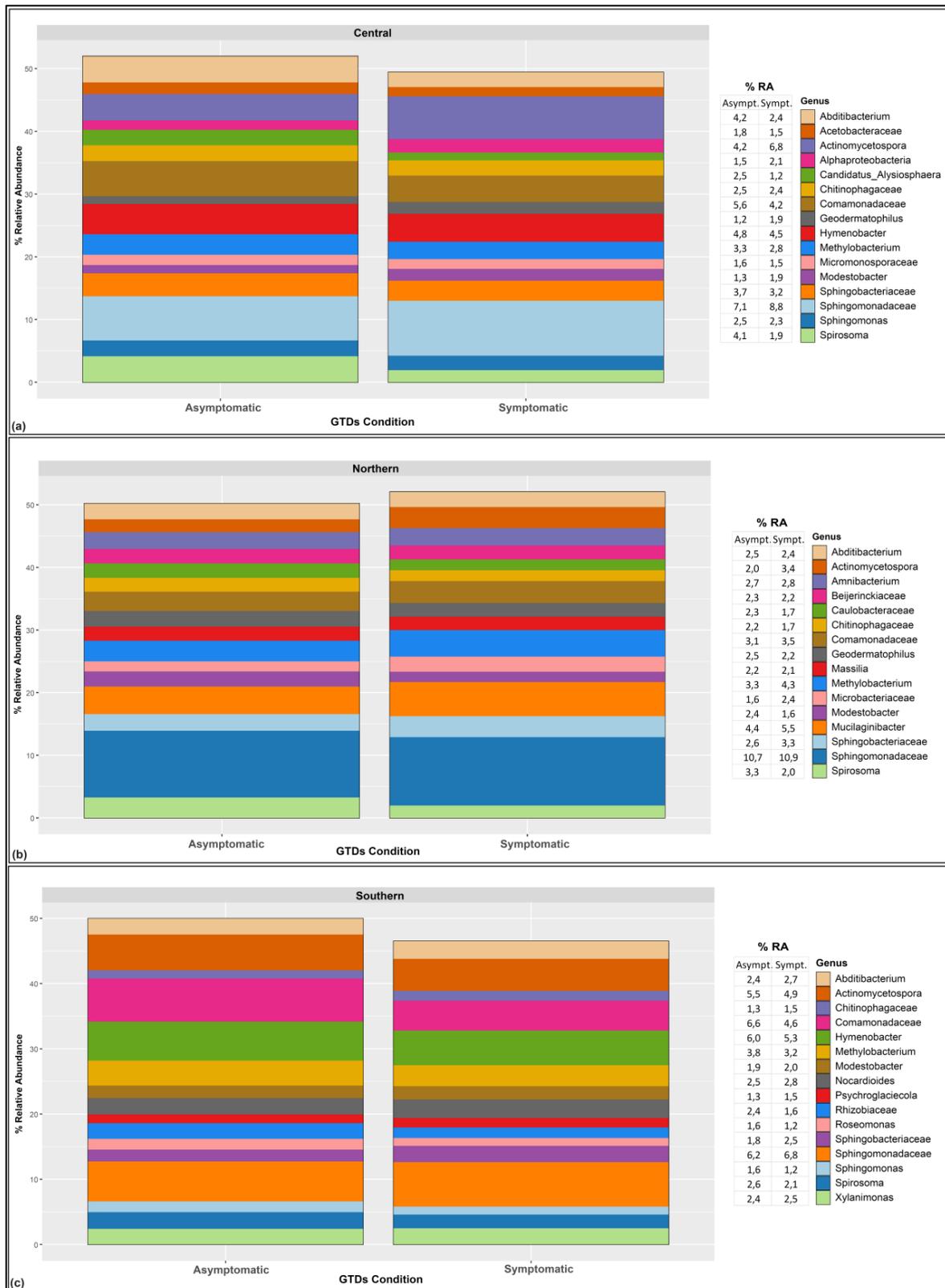
Εικόνα 4.5.8-12. Διαγράμματα NMDS ανάλυσης ανάμεσα στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για τα Βακτήρια από την περιοχή της Νότιας Ελλάδας (Southern). Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η ταξιθέτηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων βάση: εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων από ασθένειες ξύλου (a) και ηλικίας (b). Ο χαρακτηρισμός προέκυψε σύμφωνα με την ενίσχυση και αλληλούχιση της 16S rRNA περιοχής. Στα γραφήματα παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα του R^2 από την ανάλυση PERMANOVA καθώς τα επίπεδα σημαντικότητας από την PERMANOVA και την pairwise PERMANOVA.

Το επόμενο επίπεδο ανάλυσεων αφορούσε στον εντοπισμό των πιο άφθονων βακτηριακών γενών για κάθε περιοχή ξεχωριστά, με βάση το ποσοστό σχετικής αφθονίας (%) μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων, και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω γραφημάτων ποσοστών (Εικόνα 4.5.8-13.). Για την ανάλυση επιλέχθηκαν τα 16 κυρίαρχα γένη βακτηρίων ανά γεωγραφική περιοχή. Στην Κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-13a.), παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα σε βασικά γένη μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε αυξημένη σχετική αφθονία στα συμπτωματικά πρέμνα για τα γένη Actinomycetospora (6.8% από 4.2%), Alphaproteobacteria (2.1% από 1.5%), Geodermatophilus (1.9% από 1.2%), Modestobacter (1.9% από 1.3%) και Sphingomonadaceae (8.8% από 7.1%). Οι αυξήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να αναπτύσσονται περισσότερο σε φυτά με συμπτώματα ή να σχετίζονται άμεσα με την εκδήλωση της ασθένειας. Αντίθετα, ορισμένα γένη παρουσίασαν υψηλότερη αφθονία σε ασυμπτωματικά πρέμνα, όπως τα Abditibacterium (4.2% από 2.4%), Candidatus Alysiosphaera (2.5% από 1.2%), Comamonadaceae (5.6% από 4.2%), Methylobacterium (3.3% από 2.8%) και Spirosoma (4.1% από 1.9%). Συμπερασματικά, η αύξηση του Actinomycetospora στα συμπτωματικά πρέμνα μπορεί να συνδέεται με την ικανότητά του να προσαρμόζεται σε στρεσογόνες συνθήκες, ενώ η μείωση του Methylobacterium στα συμπτωματικά δείγματα ενδέχεται να υποδηλώνει περιορισμένη φυτοπροστατευτική δράση υπό συνθήκες ασθένειας. Η αύξηση του Sphingomonadaceae σε συμπτωματικά πρέμνα υποδηλώνει πιθανή σχέση με την εκδήλωση της ασθένειας ή με μια προσαρμοστική αντίδραση των φυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η σχετική σταθερότητα ορισμένων βακτηρίων, όπως τα Modestobacter και Hymenobacter, τα οποία εμφανίζουν μικρή αύξηση στα συμπτωματικά πρέμνα, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο στην εμφάνιση συμπτωμάτων ή στη διατήρηση μικροβιακής ισορροπίας. Συνολικά, η ανάλυση του βακτηριακού μικροβιώματος για την Κεντρική Ελλάδα υποδηλώνει ότι η σύνθεση των βακτηρίων επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων στα πρέμνα. Ορισμένα γένη φαίνεται να αυξάνονται σε συμπτωματικές συνθήκες, πιθανώς ως απόκριση στην εκδήλωση ασθενειών, ενώ άλλα μειώνονται λόγω απώλειας λειτουργιών που

σχετίζονται με την υγεία των φυτών και τη διατάραξη της ισορροπίας του μικροβιώματος.

Στη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-13b.), αν και παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στις σχετικές αφθονίες ορισμένων βακτηριακών γενών μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων, η γενική εικόνα παραμένει σχετικά σταθερή. Τα κυρίαρχα γένη που εμφανίζουν αυξημένη αφθονία σε συμπτωματικά πρέμνα ήταν τα *Actinomycetospora* (3.4% από 2.0%), *Methylobacterium* (4.3% από 3.3%), *Microbacteriaceae* (2.4% από 1.6%), *Mucilaginibacter* (5.5% από 4.4%) και *Sphingobacteriaceae* (3.3% από 2.6%). Αντιθέτως, στα ασυμπτωματικά πρέμνα υπερίσχυαν τα γένη *Caulobacteraceae* (2.3% από 1.7%), *Chitinophagaceae* (2.2% από 1.7%), *Modestobacter* (2.4% από 1.6%) και *Spirosoma* (3.3% από 2.0%). Επιπλέον, αρκετά γένη διατήρησαν σταθερή σχετική αφθονία ανεξαρτήτως συμπτωματολογίας, υποδεικνύοντας ότι αποτελούν το σταθερό, καλά εγκαθιδρυμένο βακτηριακό μικροβίωμα των πρέμνων της Βόρειας Ελλάδας, όπως τα *Abditibacterium*, *Amnibacterium*, *Beijerinckiaceae* και *Massilia*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία του *Sphingomonadaceae* σε συμπτωματικά πρέμνα πιθανόν αντανακλά είτε προσαρμοστική αντίδραση των φυτών στα συμπτώματα είτε τη σύνδεση αυτού του γένους με την εκδήλωση της ασθένειας, τάση που παρατηρείται και στις άλλες δύο περιοχές. Αντίθετα, η μείωση των *Caulobacteraceae* και του *Spirosoma* υποδηλώνει ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις των συμπτωμάτων σε φυσιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα συγκεκριμένα γένη. Συνολικά, η ανάλυση του βακτηριακού μικροβιώματος μέσω σχετικής αφθονίας για τη Βόρεια Ελλάδα υποδηλώνει ότι η παρουσία συμπτωμάτων επηρεάζει τη σύνθεση των κοινοτήτων, κυρίως μέσω μείωσης προστατευτικών ειδών και αύξησης μικροοργανισμών που ενδέχεται να σχετίζονται με την εξέλιξη ασθενειών στο ξύλο. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις καταδεικνύουν ότι το μικροβιακό οικοσύστημα βρίσκεται σε ευαίσθητη δυναμική ισορροπία, άμεσα επηρεαζόμενο από την υγεία των πρέμνων.

Για τη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-13c.) παρατηρείται μια ποικιλία βακτηριακών γενών με διαφοροποιήσεις στη σχετική αφθονία μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων. Από την ανάλυση διαφαίνεται ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί διατηρούν σχετικά σταθερή αφθονία ανεξαρτήτως συμπτωματολογίας, ενώ άλλοι παρουσιάζουν μικρές μεταβολές. Το *Methylobacterium*, γνωστό για τις φυτοπροστατευτικές του ιδιότητες, εμφανίζει μικρή μείωση στα συμπτωματικά πρέμνα, υποδηλώνοντας ενδεχομένως περιορισμένη προστατευτική δράση υπό συνθήκες ασθένειας. Αντίθετα, το *Sphingomonadaceae* καταγράφει μικρή αύξηση στα συμπτωματικά πρέμνα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή στην εκδήλωση συμπτωμάτων ή στην αντίδραση των φυτών απέναντι στις ασθένειες. Συνολικά, τα βακτηριακά γένη στη Νότια Ελλάδα εμφάνισαν τις μικρότερες μεταβολές συγκριτικά με τις άλλες περιοχές μελέτης.

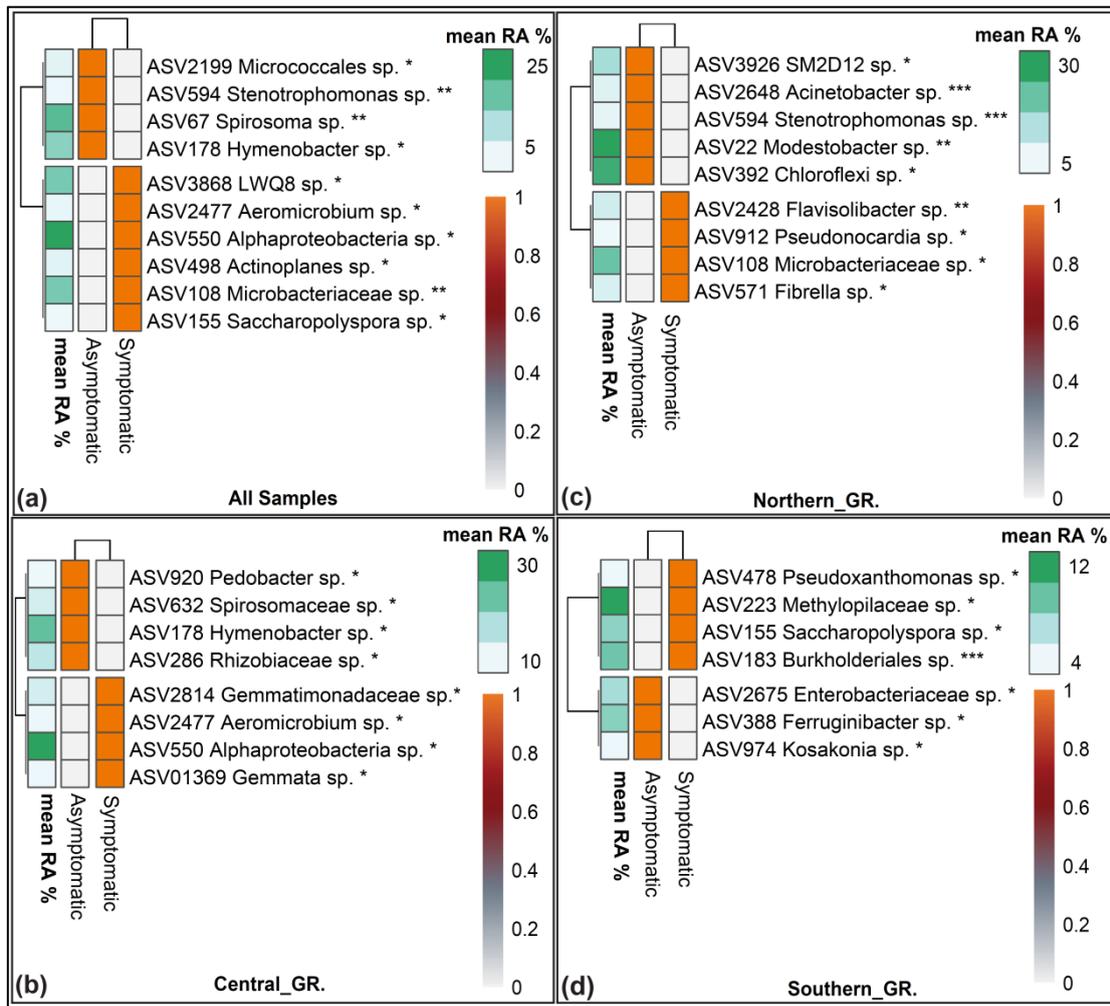


Εικόνα 4.5.8-13. Μπάρες ποσοστών σχετικής αφθονίας που δείχνουν τη σύνθεση των βακτηρίων (σε ταξινομικό επίπεδο γένους) στα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σύμφωνα με την περιοχή δειγματοληψίας και βάση των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων. Σε κάθε γράφημα απεικονίζονται τα 16 πιο κυρίαρχα βακτήρια με τα αντίστοιχα ποσοστά να αναγράφονται δίπλα από την ταξινόμησή τους γένους.

Στα συμπτωματικά πρέμνα, τα κυρίαρχα γένη περιλαμβάνουν τα Sphingobacteriaceae (2.5% από 1.8%), Sphingomonadaceae (6.8% από 6.2%) και Abditibacterium (2.7% από 2.4%). Αντίθετα, στα ασυμπτωματικά πρέμνα εμφανίζουν αύξηση τα Comamonadaceae (6.6% από 4.6%), Hymenobacter (6% από 5.3%), Rhizobiaceae (2.4% από 1.6%), Methylobacterium (3.8% από 3.2%) και Spirosoma (2.6% από 2.1%). Συμπερασματικά, η σχετική σταθερότητα ορισμένων βακτηριακών γενών στη Νότια Ελλάδα φαίνεται να αντανακλά προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα υποδηλώνει ότι η παρουσία ή απουσία συμπτωμάτων από ασθένειες του ξύλου δεν επηρεάζει σημαντικά τη σύνθεσή τους. Αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη σχετική ανθεκτικότητα του μικροβιώματος απέναντι σε παράγοντες στρες και ασθένειας στην περιοχή αυτή.

Το επόμενο επίπεδο ανάλυσης περιλάμβανε τη χρήση θερμικών χαρτών διαφορικής αφθονίας, με στόχο τον εντοπισμό βακτηριακών ASVs σε επίπεδο γένους που διαφοροποιούνται μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων, τόσο συνολικά για όλες τις περιοχές (Εικόνα 4.5.8-14a) όσο και για κάθε περιοχή ξεχωριστά: Κεντρική (Εικόνα 4.5.8-14b), Βόρεια (Εικόνα 4.5.8-14c) και Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-14d). Η συγκεντρωτική απεικόνιση για το σύνολο των περιοχών (Εικόνα 4.5.8-14a) δείχνει σαφείς διαφοροποιήσεις στην παρουσία και τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων βακτηριακών γενών μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων. Συνολικά, στελέχη που ανήκουν στα γένη Micrococcales, Stenotrophomonas, Spirosoma και Hymenobacter εμφανίζονται κυρίως σε ασυμπτωματικά πρέμνα, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο τους στη διατήρηση της υγείας των φυτών ή στη σταθερότητα του μικροβιώματος. Αντίθετα, τα γένη Aeromicrobium, Actinoplanes, Microbacteriaceae και Saccharopolyspora εντοπίζονται κυρίως σε συμπτωματικά πρέμνα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει σύνδεση με την εκδήλωση ασθενειών ή με μικροβιακές διεργασίες που ευνοούνται σε καταστάσεις στρες και υποβάθμισης των φυτών.

Περαιτέρω, για την Κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-14b) εντοπίζονται τα στελέχη Pedobacter, Spirosomaceae, Hymenobacter και Rhizobiaceae να σχετίζονται θετικά με ασυμπτωματικά πρέμνα, ενώ τα Gemmatimonadaceae, Aeromicrobium, Alphaproteobacteria και Gemmata εμφανίζουν θετική συσχέτιση με συμπτωματικά πρέμνα. Αντίστοιχα, για τη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-14c), τα βακτηριακά στελέχη Acinetobacter, Stenotrophomonas, Modestobacter και Chloroflexi παρουσιάζουν υψηλότερη αφθονία σε ασυμπτωματικές συνθήκες, ενώ τα Flavisolibacter, Pseudonocardia, Microbacteriaceae και Fibrella συνδέονται θετικά με συμπτωματικά πρέμνα. Τέλος, για τη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-14d), παρατηρείται θετική συσχέτιση των ασυμπτωματικών πρέμνων με τα στελέχη Pseudoxanthomonas, Methylophilaceae, Saccharopolyspora και Burkholderiales, ενώ τα συμπτωματικά πρέμνα παρουσιάζουν υψηλότερη σχετική αφθονία για τα Enterobacteriaceae, Ferruginibacter και Kosakonia.



Εικόνα 4.5.8-14. Θερμικοί χάρτες διαφορικής αφθονίας των Βακτηρίων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα για όλες της περιοχές δειγματοληψιών (a), για την Κεντρική (b.), Βόρεια (c.) και Νότια Ελλάδα (d.). Η μέση σχετική αφθονία για κάθε ASV υποδεικνύεται από τη λευκή-πράσινη στήλη στα αριστερά. Ο στατιστικός έλεγχος σημαντικότητας υποδεικνύεται δίπλα από κάθε γραμμή (p-value: *** 0 - 0.001, ** 0.001 - 0.01, * 0.01 - 0.05).

Περαιτέρω, και ολοκληρώνοντας τις αναλύσεις του βακτηριακού μικροβιώματος, διερευνήθηκε το πυρηνικό μικροβίωμα (core microbiome) των ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων της ποικιλίας Σουλτανίνα ανά περιοχή δειγματοληψίας, εφαρμόζοντας όρια Detection = 0.01/100 και Prevalence = 65/100. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η σύσταση του πυρηνικού μικροβιώματος και η διαφοροποίησή του μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών πρέμνων για κάθε περιοχή μελέτης (Κεντρική Ελλάδα- Πίνακας 4.5.8-4., Βόρεια Ελλάδα- Πίνακας 4.5.8-5., Νότια Ελλάδα- Πίνακας 4.5.8-6.).

Για την Κεντρική Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-4.), στο πυρηνικό μικροβίωμα των βακτηρίων των ασυμπτωματικών πρέμνων παρατηρείται υψηλή σχετική αφθονία των ASV17 Sphingomonadaceae sp. (7.7%) και ASV43 Actinomycetospora sp. (5.5%), τα οποία εμφανίζονται επίσης και στα συμπτωματικά πρέμνα, με ελαφρώς αυξημένες τιμές για το Actinomycetospora sp. (6.1%) ενώ για το Sphingomonadaceae sp. (9%). Η παρουσία των ASV80/ASV121 Comamonadaceae sp. (5.6%) και ASV564/ASV730 Hymenobacter sp. (5.5%) είναι επίσης αξιοσημείωτη στα ασυμπτωματικά δείγματα, αν και στα συμπτωματικά εμφανίζουν μειωμένες τιμές (4.5% και 3.8% αντίστοιχα). Ορισμένα ASVs ανιχνεύονται αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα, όπως το ASV67 Spirosoma sp. (3.1%), το ASV102 Psychroglaciecola sp. (1.3%) και το ASV349

Beijerinckiaceae sp. (1.3%), γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει πιθανό ρόλο τους στη μη εκδήλωση συμπτωμάτων και την καταστολή παθογόνων του ξύλου. Αντίθετα, στα συμπτωματικά δείγματα απαντώνται αποκλειστικά οι ASV141 Oxalobacteraceae sp. (1.5%), ASV179 Nocardioides sp. (1.4%) και ASV305 Microbacteriaceae sp. (1.6%), είδη που ενδέχεται να σχετίζονται έμμεσα ή άμεσα με φυτοπαθολογικές καταστάσεις. Άλλα ASVs, όπως τα ASV40/ASV31 Methylobacterium sp. (3.0% στα ασυμπτωματικά, 2.6% στα συμπτωματικά), ASV158 Rhizobiales sp. (1.2% και 1.6%) και ASV252 Acetobacteraceae sp. (1.7% και στις δύο συνθήκες), παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα αφθονίας μεταξύ των δύο ομάδων, υποδηλώνοντας σταθερότητα και ενδεχομένως ουδέτερο οικολογικό ρόλο σε σχέση με την εμφάνιση συμπτωμάτων. Στα συμπτωματικά πρέμνα σημειώνεται αύξηση για τα ASV1423/ASV5684 των Alphaproteobacteria sp. (από 1.9% σε 2.8%), ενώ τα ASV169/ASV284 Abditibacterium sp. εμφανίζουν μείωση (3.4% σε 2.3%). Τα ASV887/ASV718 Chitinophagaceae sp. και ASV2337/ASV2003 Actinobacteria sp. εντοπίζονται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις και στις δύο συνθήκες, υποδεικνύοντας πιθανή οικολογική σταθερότητα. Συνολικά, στο πυρηνικό μικροβίωμα της Κεντρικής Ελλάδας παρατηρείται ότι αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα απαντώνται τα ASV67 Spirosoma sp., ASV102 Psychroglaciecola sp. και ASV349 Beijerinckiaceae sp., ενώ αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα εντοπίζονται τα ASV141 Oxalobacteraceae sp., ASV179 Nocardioides sp. και ASV305 Microbacteriaceae sp. Η διαφοροποίηση αυτή καταδεικνύει πιθανές μικροβιακές ενδείξεις που σχετίζονται με ασυμπτωματικές και συμπτωματικές καταστάσεις των πρέμνων και των ασθενειών του ξύλου.

Πίνακας 4.5.8-4. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (core microbiome) των Βακτηρίων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από την Κεντρική Ελλάδα (Central). (Detection limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100).

Phylogenetic Classification	% Relative abundance (+ standard error)	
	Asymptomatic Central	Symptomatic Central
	n=30	n=30
(ASV17) Sphingomonadaceae sp.	7.7 (± 0.7)	9.0 (± 0.9)
(ASV28, ASV34) Sphingobacteriaceae sp.	4.1 (± 0.7)	3.5 (± 0.4)
(ASV40, ASV31) Methylobacterium sp.	3.0 (± 0.3)	2.6 (± 0.3)
(ASV43) Actinomycetospora sp.	-	6.1 (± 0.9)
(ASV67) Spirosoma sp.	3.1 (± 0.6)	-
(ASV80, ASV121) Comamonadaceae sp.	5.6 (± 0.7)	4.5 (± 0.5)
(ASV102) Psychroglaciecola sp.	1.3 (± 0.3)	-
(ASV141) Oxalobacteraceae sp.	-	1.5 (± 0.3)
(ASV158) Rhizobiales sp.	1.2 (± 0.2)	1.6 (± 0.3)
(ASV169, ASV284) Abditibacterium sp.	3.4 (± 0.5)	2.3 (± 0.3)
(ASV179) Nocardioides sp.	-	1.4 (± 0.2)
(ASV183) Burkholderiales sp.	0.7 (± 0.1)	0.7 (± 0.1)
(ASV252) Acetobacteraceae sp.	1.7 (± 0.2)	1.7 (± 0.2)
(ASV305) Microbacteriaceae sp.	-	1.6 (± 0.3)
(ASV349) Beijerinckiaceae sp.	1.3 (± 0.2)	-
(ASV564, ASV730) Hymenobacter sp.	5.5 (± 0.7)	3.8 (± 0.6)
(ASV887, ASV718) Chitinophagaceae sp.	2.3 (± 0.3)	2.3 (± 0.3)
(ASV1423, ASV5684) Alphaproteobacteria sp.	1.9 (± 0.3)	2.8 (± 0.3)
(ASV2337, ASV2003) Actinobacteria sp.	1.6 (± 0.3)	1.6 (± 0.2)
(ASV2711, ASV511) Tepidisphaera sp.	0.7 (± 0.2)	0.9 (± 0.2)
(ASV3532) Proteobacteria sp.	0.4 (± 0.1)	-
(ASV4405, ASV9101) Bacteroidia sp.	0.7 (± 0.1)	0.7 (± 0.1)

Για τη Βόρεια Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-5.), το πυρηνικό μικροβίωμα των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από υψηλή παρουσία του ASV17 Sphingomonadaceae sp., το οποίο εμφανίζει πολύ υψηλή και σχεδόν ισοδύναμη σχετική αφθονία τόσο στα ασυμπτωματικά (11.0%) όσο και στα συμπτωματικά πρέμνα (11.3%), υποδηλώνοντας σταθερότητα και πιθανό ουδέτερο οικολογικό ρόλο. Αντίστοιχα, υψηλή αφθονία καταγράφεται και για το ASV218/ASV123 Mucilaginitibacter sp. (4.3% και 5.0% αντίστοιχα), το οποίο φαίνεται

να επικρατεί και στις δύο συνθήκες. Στα ασυμπτωματικά δείγματα παρατηρείται αυξημένη παρουσία ορισμένων ASVs, όπως τα ASV22 *Modestobacter* sp. (2.3%), ASV32 *Amnibacterium* sp. (3.5%) και ASV67 *Spirosoma* sp. (2.8%), τα οποία στα συμπτωματικά δείγματα εμφανίζουν μειωμένη αφθονία. Αντίθετα, το ASV19/ASV18 *Actinomycetospora* sp. παρουσιάζει σχεδόν διπλάσια σχετική αφθονία στα συμπτωματικά πρέμνα (4.7%) σε σχέση με τα ασυμπτωματικά (2.4%), γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή του σε διεργασίες που συνδέονται με την εκδήλωση συμπτωμάτων στο ξύλο των πρέμνων. Αρκετά ASVs εντοπίζονται αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα, όπως τα ASV120 *Friedmanniella* sp. (1.2%), ASV241 *Beijerinckiaceae* sp. (1.1%) και ASV266 *Labrys* sp. (0.7%), που απουσιάζουν πλήρως από τα ασυμπτωματικά πρέμνα.

Πίνακας 4.5.8-5. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (*core microbiome*) των Βακτηρίων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από τη Βόρεια Ελλάδα (*Northern*). (*Detections limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100*).

Phylogenetic Classification	% Relative abundance (\pm standard error)	
	Asymptomatic Northern	Symptomatic Northern
	n=30	n=30
(ASV17) <i>Sphingomonadaceae</i> sp.	11.0 (\pm 0.9)	11.3 (\pm 0.7)
(ASV41) <i>Sphingomonas</i> sp.	-	1.8 (\pm 0.2)
(ASV19, ASV18) <i>Actinomycetospora</i> sp.	2.4 (\pm 0.4)	4.7 (\pm 2.0)
(ASV22) <i>Modestobacter</i> sp.	2.3 (\pm 0.3)	1.4 (\pm 0.2)
(ASV31) <i>Methylobacterium</i> sp.	3.6 (\pm 0.3)	3.6 (\pm 0.5)
(ASV32) <i>Amnibacterium</i> sp.	3.5 (\pm 0.4)	2.9 (\pm 0.3)
(ASV38, ASV34) <i>Sphingobacteriaceae</i> sp.	2.9 (\pm 0.3)	3.1 (\pm 0.4)
(ASV53) <i>Comamonadaceae</i> sp.	3.1 (\pm 0.3)	3.5 (\pm 0.4)
(ASV59, ASV76) <i>Geodermatophilus</i> sp.	2.5 (\pm 0.4)	2.4 (\pm 0.6)
(ASV67) <i>Spirosoma</i> sp.	2.8 (\pm 0.4)	1.8 (\pm 0.3)
(ASV108) <i>Microbacteriaceae</i> sp.	-	2.1 (\pm 0.2)
(ASV119) <i>Caulobacteraceae</i> sp.	2.1 (\pm 0.3)	1.9 (\pm 0.4)
(ASV120) <i>Friedmanniella</i> sp.	-	1.2 (\pm 0.2)
(ASV130) <i>Proteobacteria</i> sp.	-	0.3 (\pm 0.1)
(ASV158) <i>Rhizobiales</i> sp.	2.0 (\pm 0.3)	1.8 (\pm 0.2)
(ASV174) <i>Nakamurella</i> sp.	1.0 (\pm 0.1)	0.8 (\pm 0.1)
(ASV183) <i>Burkholderiales</i> sp.	0.8 (\pm 0.1)	0.5 (\pm 0.1)
(ASV212) <i>Beijerinckiaceae</i> sp.	2.2 (\pm 0.3)	2.0 (\pm 0.2)
(ASV241) <i>Beijerinckiaceae</i> (1174-901-12) sp.	-	1.1 (\pm 0.2)
(ASV217, ASV260) <i>Burkholderia</i> sp.	2.1 (\pm 0.4)	2.0 (\pm 0.3)
(ASV218, ASV123) <i>Mucilaginibacter</i> sp.	4.3 (\pm 0.4)	5.0 (\pm 0.6)
(ASV272, ASV714) <i>Acetobacteraceae</i> sp.	1.5 (\pm 0.1)	1.7 (\pm 0.2)
(ASV266) <i>Labrys</i> sp.	-	0.7 (\pm 0.1)
(ASV319, ASV342) <i>Chitinophagaceae</i> sp.	2.1 (\pm 0.2)	1.7 (\pm 0.3)
(ASV345, ASV453) <i>Hymenobacter</i> sp.	2.0 (\pm 0.3)	1.7 (\pm 0.3)
(ASV361) <i>Solirubrobacteraceae</i> sp.	-	0.5 (\pm 0.1)
(ASV376) <i>Devosiaceae</i> sp.	-	0.6 (\pm 0.1)
(ASV445) <i>Marmoricola</i> sp.	-	1.2 (\pm 0.2)
(ASV348, ASV763) <i>Abditibacterium</i> sp.	2.0 (\pm 0.3)	2.1 (\pm 0.3)
(ASV370, ASV525) <i>Isosphaeraceae</i> sp.	0.9 (\pm 0.1)	0.7 (\pm 0.1)
(ASV447, ASV1160) <i>Tepidisphaerales</i> sp.	1.0 (\pm 0.2)	1.1 (\pm 0.2)
(ASV1707) <i>Tepidisphaerales</i> (WD2101_soil_group) sp.	-	0.6 (\pm 0.1)
(ASV515) <i>Psychroglaciecola</i> sp.	-	1.4 (\pm 0.2)
(ASV617, ASV771) <i>Segetibacter</i> sp.	1.5 (\pm 0.2)	1.5 (\pm 0.2)
(ASV644, ASV550) <i>Alphaproteobacteria</i> sp.	2.0 (\pm 0.2)	1.8 (\pm 0.2)
(ASV720, ASV663) <i>Chthoniobacter</i> sp.	1.6 (\pm 0.2)	1.2 (\pm 0.2)
(ASV1546) <i>Acidobacteriaceae</i> (Subgroup_1) sp.	-	0.8 (\pm 0.2)
(ASV3038, ASV1395) <i>Actinobacteria</i> sp.	0.9 (\pm 0.1)	0.5 (\pm 0.1)
(ASV5219, ASV4808) <i>Bacteroidia</i> sp.	0.3 (\pm 0.05)	0.3 (\pm 0.1)

Παρόμοιο μοτίβο παρατηρείται και για τα ASV376 Devosiaceae sp., ASV445 Marmoricola sp., ASV515 Psychroglacielcola sp. και ASV1546 Acidobacteriaceae (Subgroup 1) sp., τα οποία καταγράφονται αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα και ενδέχεται να αποτελούν ενδείξεις διαταραχής της μικροβιακής ισορροπίας σε συνθήκες παρουσίασης συμπτωμάτων. Ορισμένα στελέχη εμφανίζονται σε παρόμοια επίπεδα στις δύο συνθήκες, όπως τα ASV31 Methylobacterium sp. (3.6%), ASV38/ASV34 Sphingobacteriaceae sp. (2.9% και 3.1%), ASV53 Comamonadaceae sp. (3.1% και 3.5%), καθώς και τα ASV348/ASV763 Abditibacterium sp. (2.0% και 2.1%). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν είδη με πιθανή οικολογική σταθερότητα σε πρέμνα της Βόρειας Ελλάδας, ανεξάρτητα από την εκδήλωση συμπτωμάτων. Συνολικά, το πυρηνικό βακτηριακό μικροβίωμα της Βόρειας Ελλάδας παρουσιάζει σαφείς διαφοροποιήσεις μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων.

Για τη Νότια Ελλάδα (Πίνακας 4.5.8-6.), το πυρηνικό μικροβίωμα των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από υψηλή παρουσία του ASV19 Actinomycetospora sp., το οποίο καταγράφεται με παρόμοια σχετική αφθονία τόσο στα ασυμπτωματικά (5.6%) όσο και στα συμπτωματικά πρέμνα (5.2%), υποδηλώνοντας έναν σταθερό και πιθανώς ουδέτερο οικολογικό ρόλο. Αντίστοιχα σταθερή εμφανίζεται και η αφθονία των ASV46/ASV54 Comamonadaceae sp. (4.7% και 4.3% αντίστοιχα), καθώς και των ASV178/ASV228 Hymenobacter sp. (4.4% και 4.3%). Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο συνθηκών. Το ASV31/ASV39 Methylobacterium sp. εμφανίζει υψηλότερη αφθονία στα ασυμπτωματικά δείγματα (3.5%) συγκριτικά με τα συμπτωματικά (2.7%), όπως επίσης και το ASV62 Xylanimonas sp. (4.2% και 3.4%). Αντίστοιχα, τα ASV166 Spirosoma sp. παρουσιάζουν μειωμένη παρουσία στα συμπτωματικά δείγματα (1.5%) σε σχέση με τα ασυμπτωματικά (2.1%), με στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση. Αντίθετα, το ASV35 Sphingobacteriaceae sp. καταγράφεται αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα (2.2%), απουσιάζοντας πλήρως από τα ασυμπτωματικά. Παρόμοια μοτίβα εμφανίζουν και τα ASV295 Rhizobiaceae sp. (1.2%), ASV380 Microbacteriaceae sp. (1.5%) και ASV2387 Beijerinckiaceae sp. (0.7%), τα οποία εντοπίζονται αποκλειστικά στα συμπτωματικά πρέμνα και ενδέχεται να σχετίζονται με διαταραχές της μικροβιακής ισορροπίας που συνδέονται με την παρουσία συμπτωμάτων ξύλου. Ορισμένα ASVs εμφανίζουν παρόμοια αφθονία και στις δύο ομάδες, όπως τα ASV24/ASV17 Sphingomonadaceae sp. (5.1% και 5.7% αντίστοιχα), τα ASV102 Psychroglacielcola sp. (1.2% και 1.4%) και τα ASV224/ASV262 Abditibacterium sp. (2.4% και 2.1%), γεγονός που υποδηλώνει πιθανή οικολογική σταθερότητα ανεξάρτητα από την εκδήλωση συμπτωμάτων. Συνολικά, στο πυρηνικό βακτηριακό μικροβίωμα της Νότιας Ελλάδας δεν εντοπίζονται ASVs αποκλειστικά στα ασυμπτωματικά πρέμνα, γεγονός που διαφοροποιεί τη Νότια Ελλάδα από τις άλλες γεωγραφικές περιοχές μελέτης. Η παρουσία και η αφθονία αυτών των ASVs υποδηλώνουν ότι το πυρηνικό μικροβίωμα της Νότιας Ελλάδας χαρακτηρίζεται κυρίως από είδη που διατηρούνται σταθερά ανεξαρτήτως συμπτωμάτων, αλλά και από ορισμένα που εμφανίζονται αποκλειστικά σε συμπτωματικές συνθήκες, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση με την ανάπτυξη των συμπτωμάτων σε πρέμνα της περιοχής.

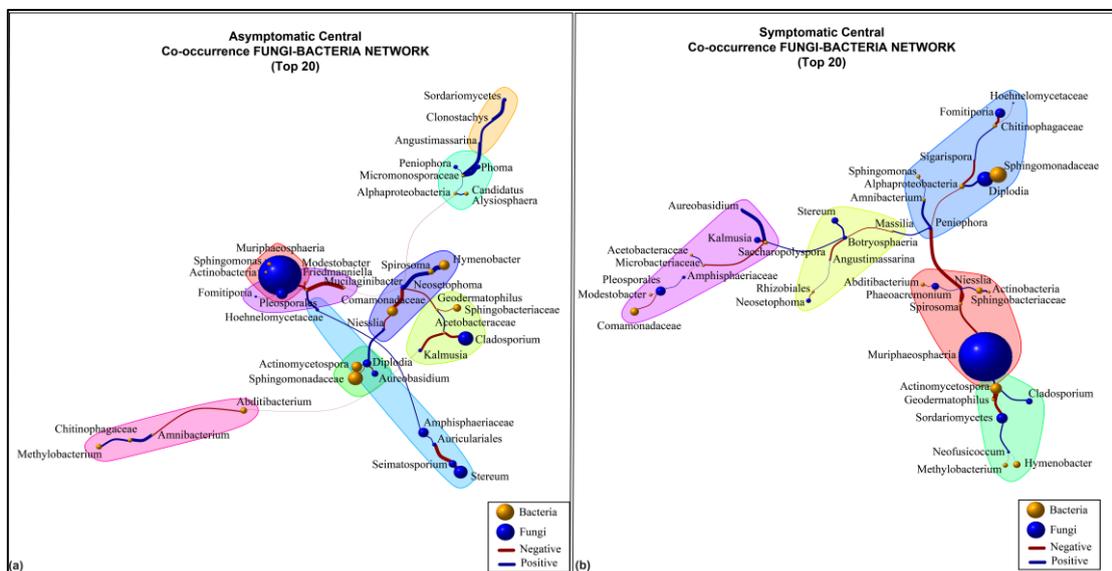
Πίνακας 4.5.8-6. Τα κύρια στελέχη του πυρηνικού μικροβιώματος (core microbiome) των Βακτηρίων για τα δείγματα ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από τη Νότια Ελλάδα (Southern). (Detections limits: Detection = 0.01/100, Prevalence = 65/100).

Phylogenetic Classification	% Relative abundance (+ standard error)	
	Asymptomatic Southern n=30	Symptomatic Southern n=30
(ASV19) Actinomycetospora sp.	5.6 (± 0.9)	5.2 (± 1.0)
(ASV22) Modestobacter sp.	-	1.9 (± 0.2)
(ASV24, ASV17) Sphingomonadaceae sp.	5.1 (± 0.6)	5.7 (± 0.6)
(ASV35) Sphingobacteriaceae sp.	-	2.2 (± 0.4)
(ASV31, ASV39) Methylobacterium sp.	3.5 (± 0.5)	2.7 (± 0.5)
(ASV46, ASV54) Comamonadaceae sp.	4.7 (± 2.5)	4.3 (± 1.6)
(ASV62) Xylanimonas sp.	4.2 (± 1.3)	3.4 (± 0.8)
(ASV102) Psychroglaciecola sp.	1.2 (± 0.1)	1.4 (± 0.2)
(ASV130) Proteobacteria sp.	-	0.8 (± 0.3)
(ASV156, ASV938) Nocardioides sp.	3.7 (± 0.6)	4.6 (± 1.2)
(ASV166) Spirosoma sp.	2.1 (± 0.3)	-
(ASV178, ASV228) Hymenobacter sp.	4.4 (± 0.7)	4.3 (± 0.9)
(ASV224, ASV262) Abditibacterium sp.	2.4 (± 0.4)	2.1 (± 0.3)
(ASV295) Rhizobiaceae sp.	-	1.2 (± 0.2)
(ASV253, ASV437) Rhizobiales sp.	1.0 (± 0.1)	1.2 (± 0.2)
(ASV380) Microbacteriaceae sp.	-	1.5 (± 0.3)
(ASV476, ASV272) Acetobacteraceae sp.	1.0 (± 0.1)	1.1 (± 0.1)
(ASV572, ASV435) Chitinophagaceae sp.	1.1 (± 0.1)	1.4 (± 0.2)
(ASV702, ASV391) Thermomicrobiales (JG30-KF-CM45) sp.	1.0 (± 0.2)	1.5 (± 0.3)
(ASV793, ASV933) Alphaproteobacteria sp.	1.4 (± 0.2)	1.9 (± 0.2)
(ASV2387) Beijerinckiaceae sp.	-	0.7 (± 0.2)
(ASV2121, ASV3519) Actinobacteria sp.	1.4 (± 0.4)	1.3 (± 0.3)
(ASV3898, ASV3517) Bacteroidia sp.	0.3 (± 0.1)	0.4 (± 0.1)

2.2.3 Αναλύσεις δικτύων συν-εμφάνισης μικροβιώματος μυκήτων & βακτηρίων ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα από ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα

Το τελευταίο κομμάτι των αναλύσεων που έγινε αφορούσε την κατασκευή δικτύων συν-εμφάνισης μυκήτων και βακτηρίων με στόχο τον εντοπισμό θετικών ή αρνητικών συσχετίσεων για τον εντοπισμό δικτύων αλληλεπιδράσεων. Οι αναλύσεις αφορούσαν κάθε περιοχή χωριστά για ασυμπτωματικά και συμπτωματικά πρέμνα από την Κεντρική (Εικόνα 4.5.8-15.), Βόρεια (Εικόνα 4.5.8-16.) και Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-17.). Για την Κεντρική Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-15.) παρατηρούμε ότι στο δίκτυο των ασυμπτωματικών πρέμνων (Εικόνα 4.5.8-15a.) συμμετέχουν μύκητες όπως οι *Muriphaeosphaeria*, *Angustimassarina*, *Cladosporium*, *Diplodia*, και *Sordariomycetes*. Αντίστοιχα για τα βακτήρια εντοπίζουμε την κυριαρχία των *Sphingomonadaceae*, *Modestobacter*, *Sphingobacteriaceae*, και *Amnibacterium*. Τα δίκτυα που εμφανίζονται μεταξύ μυκήτων-βακτηρίων παρουσιάζουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές αλληλεπιδράσεις καθώς και μοτίβα με αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ μικροοργανισμών στα ασυμπτωματικά πρέμνα, οι οποίες πιθανώς υποδεικνύουν ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Παρατηρούμε ότι μύκητες όπως ο *Muriphaeosphaeria*, *Sordariomycetes*, *Kalmusia*, *Diplodia* και *Fomitiporia* φαίνεται να έχουν αρνητικές συσχετίσεις με βακτηριακά στελέχη όπως το *Sphingomonas*, *Alphaproteobacteria*, *Acetobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* και *Mucilaginibacter*. Αυτές οι αρνητικές συσχετίσεις ενδέχεται να υποδηλώνουν μηχανισμούς ελέγχου του πληθυσμών των μυκήτων ή ανταγωνιστικές σχέσεις για θρεπτικά συστατικά. Αντίστοιχα, το *Cladosporium* στα ασυμπτωματικά πρέμνα, γνωστό για την καθολική παρουσία του σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα και συνθήκες αλλά και την ανταγωνιστική του δράση, εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με το *Acetobacteraceae* αλλά και με την *Kalmusia* η οποία αποτελεί γνωστό παθογόνο του ξύλου, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην

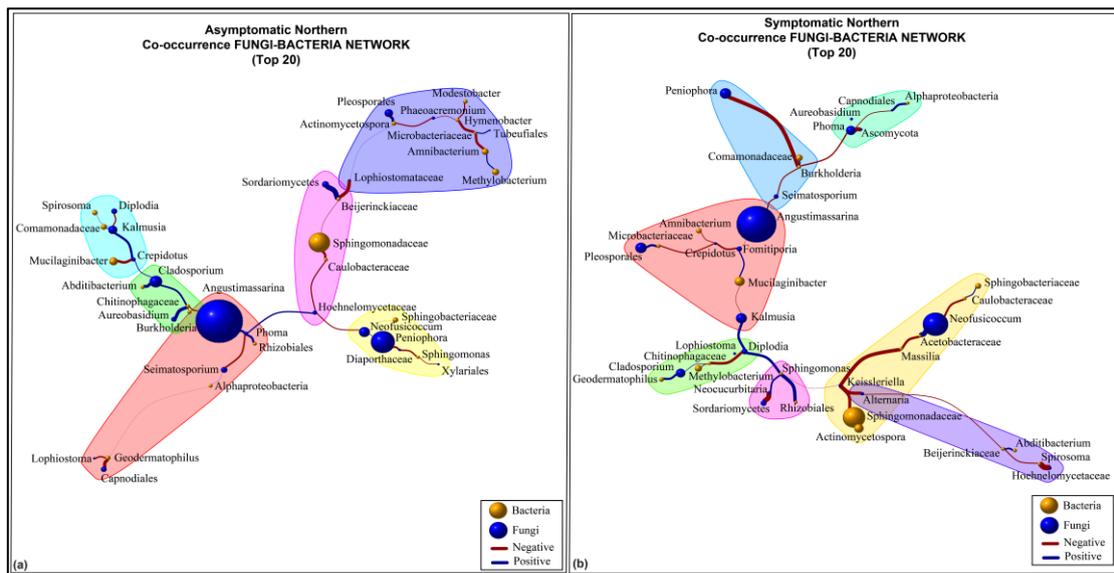
έλλειψη εμφανίσεις συμπτωμάτων και ενδεχομένως στην καταστολή του μύκητα *Kalmusia*. Η ανταγωνισμός που φαίνεται να εντοπίζεται σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να οφείλεται είτε σε χωρικό ανταγωνισμό στις επιφάνειες του ξύλου είτε στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών έναντι του παθογόνου. Σε κάθε περίπτωση οι ανταγωνιστικές αυτές σχέσεις φαίνεται να συμβάλλουν στη διατήρηση της ισορροπίας του μικροβιώματος και στη μη εκδήλωση συμπτωμάτων. Αντιθέτως, στα συμπτωματικά πρέμνα (Εικόνα 4.5.8-15b.), παρατηρείται μεγαλύτερη επικράτηση θετικών αλληλεπιδράσεων, ενδεχομένως ως αποτέλεσμα της εμφανίσεις ασθενειών του ξύλου και της διατάραξης ενός υγιούς μικροβιώματος. Επίσης, εντοπίζονται μύκητες όπως οι *Neofusicoccum*, *Phaeoacremonium*, *Neosetophoma* και *Kalmusia* με έντονη παθογόνα δράση, ενώ στα βακτήρια εμφανίζονται γένη όπως τα *Massilia* και *Rhizobiales*. Οι διαφοροποιήσεις στη σύνθεση των μικροοργανισμών και οι αλλαγές στις σχέσεις τους υποδεικνύουν την πιθανή επίδραση των ασθενειών του ξύλου στις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 4.5.8-15. Ανάλυση δικτύων συν-εμφάνισης μυκήτων και βακτηριών για τα ασυμπτωματικά (a) και συμπτωματικά (b) πρέμνα από την Κεντρική Ελλάδα. Οι μπλε και οι πορτοκαλί φυσαλίδες υποδηλώνουν γένη μυκήτων και βακτηριών αντίστοιχα, ενώ το μέγεθος κάθε φυσαλίδας δείχνει τη σχετική αφθονία κάθε μικροβιακού γένους. Οι μπλε και οι κόκκινοι σύνδεσμοι δηλώνουν θετική και αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συνδεδεμένων μικροοργανισμών, ενώ το πλάτος της γραμμής υποδηλώνει υψηλότερη ή χαμηλότερη συσχέτιση μεταξύ τους αντίστοιχα.

Στη Βόρεια Ελλάδα και για τις αναλύσεις δικτύου συν-εμφάνισης μυκήτων-βακτηριών (Εικόνα 4.5.8-16.), παρατηρούμε ότι στα ασυμπτωματικά πρέμνα (Εικόνα 4.5.8-16a.) οι μικροβιακές κοινότητες εμφανίζει ιδιαίτερη δυναμική, με σημαντικές αρνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μυκήτων και βακτηριών. Αυτές οι αρνητικές συσχετίσεις μπορεί να αντικατοπτρίζουν μηχανισμούς ανταγωνισμού, όπου συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών ή ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά και οικολογικό θώκο. Συγκεκριμένα, βακτήρια του γένους *Burkholderia* συνδέονται αρνητικά με αρκετά γένη μυκήτων, όπως τα *Angustimassarina* και *Cladosporium* (Εικόνα 4.5.8-16a.). Αυτή η αρνητική σχέση μπορεί να σηματοδοτεί έναν φυσικό μηχανισμό βιολογικού ελέγχου, όπου η παρουσία των συγκεκριμένων βακτηριών περιορίζει την εξάπλωση ορισμένων μυκήτων. Αντίστοιχα, αρνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηριών, όπως το *Methylobacterium* και το *Actinomyces*, με ομάδες μυκήτων δείχνουν έναν πιθανό ανταγωνισμό που ενδεχομένως να συμβάλλει στη σταθερότητα της μικροβιακής κοινότητας και στη μη εμφάνιση συμπτωμάτων από τους παθογόνους μύκητες. Η ύπαρξη αυτών των

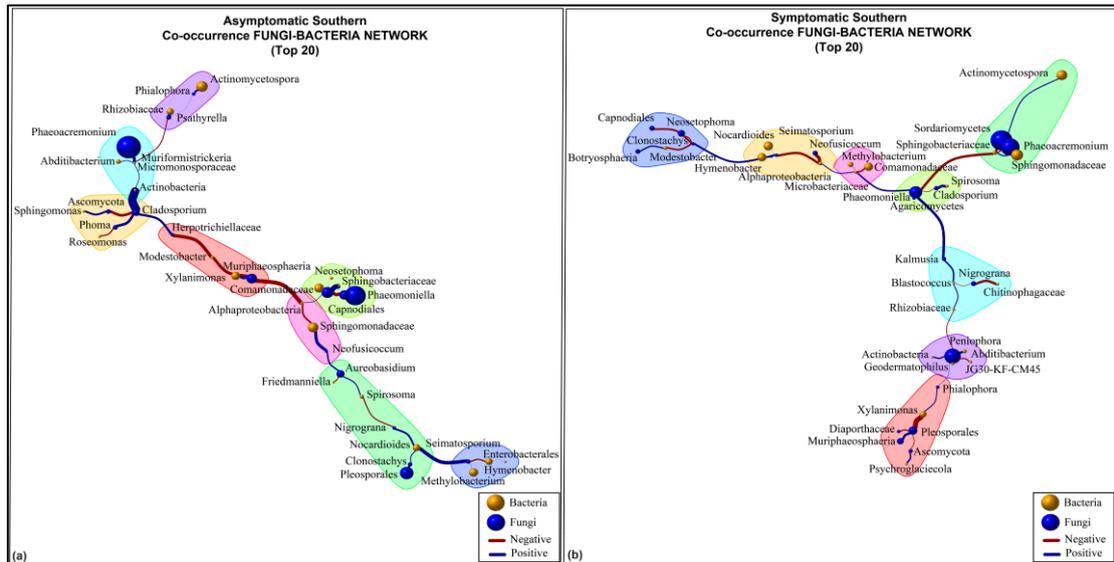
αρνητικών συσχετίσεων στα ασυμπτωματικά δείγματα υποδηλώνει έναν πιο ισορροπημένο μικροβιακό οικοσύστημα, στο οποίο οι ανταγωνιστικές σχέσεις περιορίζουν την κυριαρχία παθογόνων ή δυνητικά επιβλαβών μικροοργανισμών. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αποτελεί κλειδί για τη διατήρηση της υγείας των πρέμνων, καθώς ο φυσικός ανταγωνισμός μεταξύ μικροοργανισμών μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών. Σε αντίθεση με τα συμπτωματικά πρέμνα (Εικόνα 4.5.8-16b.), όπου ενδέχεται να υπάρχει αποσταθεροποίηση της μικροβιακής ισορροπίας, η παρουσία έντονων αρνητικών αλληλεπιδράσεων στα ασυμπτωματικά πρέμνα δείχνει έναν πιο αυτορρυθμιζόμενο και ανθεκτικό δίκτυο μικροβιωμάτων.



Εικόνα 4.5.8-16. Ανάλυση δικτύων συν-εμφάνισης μυκήτων και βακτηριών για τα ασυμπτωματικά (a) και συμπτωματικά (b) πρέμνα από τη Βόρεια Ελλάδα. Οι μπλε και οι πορτοκαλί φυσαλίδες υποδηλώνουν γένη μυκήτων και βακτηρίων αντίστοιχα, ενώ το μέγεθος κάθε φυσαλίδας δείχνει τη σχετική αφθονία κάθε μικροβιακού γένους. Οι μπλε και οι κόκκινοι σύνδεσμοι δηλώνουν θετική και αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συνδεδεμένων μικροοργανισμών, ενώ το πλάτος της γραμμής υποδηλώνει υψηλότερη ή χαμηλότερη συσχέτιση μεταξύ τους αντίστοιχα.

Στη συνέχεια έγιναν οι αναλύσεις δικτύου συν-εμφάνισης μυκήτων-βακτηρίων για τη Νότια Ελλάδα (Εικόνα 4.5.8-17.). Και σε αυτή την περίπτωση τα ασυμπτωματικά πρέμνα (Εικόνα 4.5.8-17a.) εμφανίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο σημαντικών αρνητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μυκήτων και βακτηρίων, γεγονός που ενδεχομένως να υποδηλώνει έναν ισχυρό ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών. Αυτές οι αρνητικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας των πρέμνων και πιθανώς στη μείωση της παρουσίας των παθογόνων και της εμφάνισης συμπτωμάτων. Ειδικότερα, οι μύκητες *Muriphaeosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Phaeoconiella*, *Neosetophoma* παρουσίασαν έντονες αρνητικές συσχετίσεις με βακτηριακά γένη όπως τα *Xylanimonas*, *Sphingomonadaceae*, *Alphaproteobacteria*, *Sphingobacteriaceae* και *Comamonadaceae* (Εικόνα 4.5.8-17a.). Η ύπαρξη αυτών των αρνητικών αλληλεπιδράσεων στα ασυμπτωματικά δείγματα μπορεί να υποδηλώνει έναν μηχανισμό προστασίας, όπου τα βακτήρια πιθανώς ανταγωνίζονται μύκητες που θα μπορούσαν να ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών ή να διαταράσσουν την ισορροπία του μικροβιώματος. Η πιο έντονη παρουσία αρνητικών συνδέσεων στα ασυμπτωματικά δείγματα, σε σύγκριση με τα συμπτωματικά (Εικόνα 4.5.8-17b.), ενισχύει την υπόθεση ότι η σταθερότητα του μικροβιώματος μπορεί να συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των φυτών. Οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να αποτρέπουν

την κυριαρχία δυνητικά επιβλαβών μικροοργανισμών, προσφέροντας έτσι μια φυσική άμυνα ενάντια σε ασθένειες. Η κατανόηση αυτών των αρνητικών συνδέσεων μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών βιολογικού ελέγχου, αξιοποιώντας την φυσική μικροβιακή κοινότητα για την πρόληψη ασθενειών και τη διατήρηση της υγείας των φυτών.



Εικόνα 4.5.8-17. Ανάλυση δικτύων συν-εμφάνισης μυκήτων και βακτηριών για τα ασυμπτωματικά (a) και συμπτωματικά (b) πρέμνα από τη Νότια Ελλάδα. Οι μπλε και οι πορτοκαλί φυσαλίδες υποδηλώνουν γένη μυκήτων και βακτηριών αντίστοιχα, ενώ το μέγεθος κάθε φυσαλίδας δείχνει τη σχετική αφθονία κάθε μικροβιακού γένους. Οι μπλε και οι κόκκινοι σύνδεσμοι δηλώνουν θετική και αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συνδεδεμένων μικροοργανισμών, ενώ το πλάτος της γραμμής υποδηλώνει υψηλότερη ή χαμηλότερη συσχέτιση μεταξύ τους αντίστοιχα.

3. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη του μικροβιώματος των μυκήτων του ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα προέκυψαν ορισμένα γενικά και ειδικά συμπεράσματα με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση και πρόληψη των ασθενειών.

Το μικροβίωμα των μυκήτων έδειξε σαφή διαφοροποίηση ανά περιοχή, υποδηλώνοντας ότι οι γεωγραφικές και περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά τη σύνθεση του μικροβιώματος του ξύλου. Η διαφοροποίηση αυτή υποδηλώνει ότι οι στρατηγικές αντιμετώπισης ασθενειών του ξύλου πρέπει να προσαρμόζονται στις τοπικές συνθήκες κλίματος και καλλιέργειας.

Η προληπτική παρακολούθηση των παθογόνων μυκήτων που εμφανίζονται σε κάθε περιοχή είναι κρίσιμη για την έγκαιρη αντιμετώπιση ασθενειών.

Η ηλικία των πρέμνων αποδείχθηκε σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σύνθεση των μυκήτων, ιδίως στη Νότια και Κεντρική Ελλάδα.

Οι μεγαλύτερης ηλικίας αμπελώνες εμφανίζουν πιο σταθερές και καλά εγκαθιδρυμένες κοινότητες μυκήτων, ενώ τα νεότερα πρέμνα παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε αλλαγές.

Η διαχείριση του ξύλου στα παλαιότερα πρέμνα πρέπει να περιλαμβάνει τακτικό καθαρισμό και ενδεχόμενη εφαρμογή βιολογικών σκευασμάτων για την ενίσχυση ή εγκαθίδρυση ωφέλιμων μικροοργανισμών ικανών να ανταγωνιστούν και να καταστείλουν τα παθογόνα του ξύλου.

Η παρουσία παθογόνων μυκήτων, όπως οι *Sordariomycetes* sp., *Fomitiporia* sp.,

Diplodia sp., *Neofusicoccum* sp., *Peniophora* sp. και *Kalmusia* sp. σχετίστηκε άμεσα με την εμφάνιση συμπτωμάτων ασθενειών του ξύλου και για τις τρεις περιοχές μελέτης. Η προληπτική παρακολούθηση των παραπάνω παθογόνων είναι κρίσιμη για την προστασία των καλλιεργειών αμπέλου ανά περιοχή. Η τοπική στρατηγική θα πρέπει να επικεντρωθεί στην ενίσχυση των ωφέλιμων ειδών και στη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας.

Στην Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα οι αυξήσεις αυτών των μυκήτων στα συμπτωματικά πρέμνα υποδηλώνουν την ανάγκη για προληπτικές επεμβάσεις όπως η χρήση αντιμυκητιακών ή βιολογικών παραγόντων.

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, όπως ο *Aureobasidium* sp. φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία των πρέμνων, καθώς η παρουσία του είναι εντονότερη στα ασυμπτωματικά δείγματα. Η μείωσή του στα συμπτωματικά δείγματα ενδέχεται να οφείλεται σε ανταγωνισμό με παθογόνους οργανισμούς. Η ενίσχυση αντίστοιχων μυκήτων μέσω βιολογικών σκευασμάτων μπορούν να λειτουργήσουν προληπτικά και προστατευτικά.

Η μείωση της σχετικής αφθονίας των παθογόνων *Phaeomoniella chlamydospora* και *Phaeoacremonium iranianum* στα συμπτωματικά πρέμνα της Νότιας Ελλάδας, παρά την κλασική συσχέτισή τους με ασθένειες του ξύλου, υποδηλώνει πιθανή καταστολή από άλλους παθογόνους ή ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Αυτή η παρατήρηση δείχνει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες σχετικά με τον ανταγωνισμό μεταξύ μυκήτων και την επίδρασή τους στην εμφάνιση ή καταστολή ασθενειών.

Οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών μπορεί να αποτρέπουν την κυριαρχία δυνητικά επιβλαβών μικροοργανισμών, προσφέροντας έτσι μια φυσική άμυνα ενάντια σε ασθένειες.

Η κατανόηση αυτών των αρνητικών συνδέσεων μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών βιολογικού ελέγχου, αξιοποιώντας την φυσική μικροβιακή κοινότητα για την πρόληψη ασθενειών και τη διατήρηση της υγείας των φυτών.

Οι παθογόνοι μύκητες *Rosellinia* sp., *Fomitiporia* sp., *Neofusicoccum* sp., *Sordariomycetes* sp., *Ceratobasidium* sp. και *Peniophora* sp. μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες εντοπισμού ασθενειών του ξύλου

Τα αποτελέσματα στο σύνολο τους δείχνουν ότι οι συνθήκες των περιοχών ενδεχομένως ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων, καθιστώντας απαραίτητη την εφαρμογή στοχευμένων επεμβάσεων.

Από το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη του βακτηριακού μικροβιώματος του ξύλου της ποικιλίας Σουλτανίνα προέκυψαν ορισμένα γενικά και ειδικά συμπεράσματα με στόχο την κατανόηση των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων και την ανάπτυξη στρατηγικών αντιμετώπισης των ασθενειών του ξύλου. Το βακτηριακό μικροβίωμα έδειξε σαφή διαφοροποίηση ανά γεωγραφική περιοχή μελέτης, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες, το μικροκλίμα και ενδεχομένως οι διαφορετικές καλλιεργητικές πρακτικές ανά περιοχή επηρεάζουν σημαντικά τη μικροβιακή δομή του ξύλου. Αυτό ενισχύει την ανάγκη για τοπικά προσαρμοσμένες στρατηγικές διαχείρισης.

Η ηλικία των πρέμνων αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα διαμόρφωσης του βακτηριακού μικροβιώματος, ιδίως στη Νότια και Κεντρική Ελλάδα. Παλαιότεροι αμπελώνες διαθέτουν πιο σταθερές βακτηριακές κοινότητες, ενώ νεότερα πρέμνα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε μεταβολές της μικροβιακής δομής. Η ανίχνευση κοινών πυρηνικών στελεχών (core microbiome) μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων καταδεικνύει ότι ορισμένα βακτήρια αποτελούν σταθερά μέλη του ξυλώδους ιστού ανεξαρτήτως φυτοϋγείας, αλλά οι μεταβολές στη σχετική αφθονία τους μπορεί να επηρεάζουν την υγεία του φυτού.

Σε όλες τις περιοχές μελέτης, ορισμένα βακτηριακά στελέχη συσχετίστηκαν θετικά με ασυμπτωματικά πρέμνα, υποδεικνύοντας πιθανό ρόλο τους ως ωφέλιμοι ή προστατευτικοί μικροοργανισμοί. Ενδεικτικά συσχετίστηκαν με ωφέλιμη δράση τα

στελέχη *Pedobacter*, *Spirosomaceae*, *Hymenobacter*, *Rhizobiaceae* στην Κεντρική Ελλάδα, τα στελέχη *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Modestobacter* στη Βόρεια Ελλάδα και τα στελέχη *Pseudoxanthomonas*, *Saccharopolyspora*, *Methylophilaceae*, *Burkholderia* στη Νότια Ελλάδα. Τα στελέχη αυτά ενδέχεται να συμβάλλουν στην ανταγωνιστική καταστολή παθογόνων και στη διατήρηση της σταθερότητας του μικροβιώματος.

Οι διαφοροποιήσεις του βακτηριακού μικροβιώματος μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών πρέμνων υποδηλώνουν ότι οι αλλαγές στη μικροβιακή ισορροπία μπορεί να λειτουργούν ως πρώιμος δείκτης εμφάνισης ασθενειών του ξύλου. Η συστηματική παρακολούθηση αυτών των μεταβολών θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για πρώιμη διάγνωση σε επίπεδο αμπελώννα.

Τα ωφέλιμα ή εν δυνάμει προστατευτικά βακτήρια θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες, μέσω σκευασμάτων που ενισχύουν τον ανταγωνισμό έναντι παθογόνων, τη σταθερότητα της μικροβιακής κοινότητας, και την ενίσχυση της φυσικής ανθεκτικότητας των πρέμνων.

Η κατανόηση των αρνητικών ή θετικών συσχετίσεων μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών βιολογικού ελέγχου. Η ενίσχυση ωφέλιμων ομάδων στελεχών, όπως τα *Sphingomonadaceae*, *Methylobacterium*, *Burkholderiales* και *Chitinophagaceae*, μπορεί να συμβάλει στη μείωση της εγκατάστασης παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων.

Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το βακτηριακό μικροβίωμα αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της υγείας του ξυλώδους ιστού και ότι η στοχευμένη μικροβιακή διαχείριση μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την πρόληψη και αντιμετώπιση των ασθενειών του ξύλου της αμπέλου.

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Abarenkov K, Zirk A, Piirmann T, Pöhönen R, Ivanov F, Nilsson R.H, Kõljalg Urmass, (2020). UNITE general FASTA release for eukaryotes 2. Version 04.02.2020. UNITE Community.

Bekris F, Vasileiadis S, Papadopoulou E, Samaras A, Testempasis S, Gkizi D, Tavlaki G, Tzima A, Paplomatas E, Markakis E, Karaoglanidis G, Papadopoulou KK, Karpouzas, DG (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(1), 23-23.

Bekris F, Papadopoulou E, Vasileiadis S, Karapetsas N, Theocharis S, Alexandridis TK, Koundouras S, Karpouzas DG (2025). Vintage and terroir are the strongest determinants of grapevine carposphere microbiome in the viticultural zone of Drama, Greece, *FEMS Microbiology Ecology*, 101(2), fiae008, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae008>

Csardi G, Nepusz T (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems* 1695, 1695

Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen KE, Lindahl BD (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol* 82, 666-677.

Katsoula A., Vasileiadis S., Sapountzi M., Karpouzas D.G., (2020) The response of soil and phyllosphere microbial communities to repeated application of the fungicide iprodione: Accelerated biodegradation or toxicity? *FEMS Microbiology Ecology*. Volume 96, Issue 6, June 2020, fiae056.

Papadopoulou E, Bekris F, Vasileiadis S, Papadopoulou KK, Karpouzas DG (2022). Different factors are operative in shaping the epiphytic grapevine microbiome across different geographical scales: biogeography, cultivar or vintage? *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 1(4): 287-301. <https://doi.org/10.1002/sae2.12030>

R Core Team (2020). — European Environment Agency. Accessed December 24, 2024. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006>.

Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA, Apprill A, Knight R. (2015). Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. 22:1(1):e00009-15. doi: 10.1128/mSystems.00009-15.

White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M, Gelfand D, Shinsky J and White T. eds. Academic Press), pp 315-322.

Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42(Database issue): D643-D648.