



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

**Παραδοτέο Π.4.8.3:** Χαρακτηρισμός μικροβιώματος μέσω της χρήσης της εφαρμογής Illumina Metabarcoding (με χρήση διεθνούς μεθοδολογίας) για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων από επιλεγμένα συστήματα φυτών κάλυψης

### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.8.3**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΜΦΙ**

Συγγραφείς: **Δρ Δημοσθένης Χάχαλης, Δρ Δημοσθένης Κίζης, Δρ Ιωάννης Θεολογίδης**

Έκδοση: **1.1**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **19 - 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: TAEDR-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	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	4
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	5
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	14
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι .....	16

## 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 ασφάλειά 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

Στην ΕΕ4 θα αναπτυχθούν δράσεις που θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Θα γίνει βελτίωση της αρμοστικότητα των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Θα αναπτυχθούν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, θα διερευνηθεί η αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και θα ενισχυθεί η δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Θα αναπτυχθούν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Θα αναπτυχθούν τέλος καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

## Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π4.8.3

Στη συγκεκριμένη δράση πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση του πειράματος με μεμονωμένα ή μείγματα ψυχανθών και σιτηρών σε αμπελώνα. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία εδάφους ένα μήνα μετά την ενσωμάτωση με χρήση εδαφολήπτη.

Εν συνέχεια πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του μικροβιώματος δειγμάτων εδάφους σε επιλεγμένα περιβάλλοντα συστημάτων φυτών κάλυψης σε καλλιέργεια αμπέλου. Η δράση περιλάμβανε την εφαρμογή μεταγονιδιοματικής μέσω της πλατφόρμας Illumina και βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων για τον χαρακτηρισμό των βακτηριακών πληθυσμών που είναι κρίσιμης σημασίας για την γονιμότητα και υγεία του εδάφους.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η εδαφική μικροβιακή βιοποικιλότητα και πληθυσμιακή αφθονία (διαφορετικές δομές μικροβιακών κοινοτήτων), λειτουργούν ως δυναμικός πυρήνας που οδηγεί στην αποσύνθεση των φυτικών υπολειμμάτων, την ανοργανοποίηση, και την ανακύκλωση των χημικών στοιχείων στο έδαφος. Επιπρόσθετα, συσχετίζονται θετικά με την αυξημένη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα, την ολική περιεκτικότητα σε άζωτο (μέσω δέσμευσης αζώτου και διεργασιών νιτροποίησης και απονιτροποίησης) και διαθεσιμότητα ανόργανου και οργανικού φωσφόρου στο έδαφος. Η χρήση φυτών εδαφοκάλυψης στις καλλιέργειες τροποποιεί χαρακτηριστικά του εδάφους (π.χ., pH, θερμοκρασία, περιεκτικότητα σε νερό κ.α.), και μέσω των εκκρίσεων των ριζών, των εισροών φυτικών υπολειμμάτων και της ριζοαπόθεσης μπορεί να επηρεάσει τις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους, αυξάνοντας τη μικροβιακή βιοποικιλότητα και τους πληθυσμούς ευεργετικών μικροβίων όπως τα βακτήρια της ριζόσφαιρας.

Στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής δράσης αποτέλεσε η μελέτη των επιπτώσεων επιλεγμένων φυτικών ειδών εδαφοκάλυψης στη μικροβιακή λειτουργική ποικιλότητα του εδάφους. Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του βακτηριακού μικροβιώματος μέσω μεταγονιδιοματικής ανάλυσης για τον καθορισμό της σύνθεσης και της δομής των πληθυσμών από δείγματα εδάφους με διαφορετικές μεταχειρίσεις (σύγκριση μεταξύ δειγμάτων), και διαφορετικές χρονικές στιγμές (διαχρονικά σε έδαφος κάτω από την ίδια μεταχείριση), με σκοπό την παρακολούθηση της δυναμικής της οικολογικής διαδοχής των πληθυσμών/κοινοτήτων.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

Η εγκατάσταση του πειράματος πραγματοποιήθηκε σε αμπελώνα στην περιοχή της Άσκρης Βοιωτίας (38.314194; 23.111889) κατά την καλλιεργητική περίοδο 2023-2024. Ο αμπελώνας διαιρέθηκε σε τεμάχια ίσου εμβαδού, και σε κάθε ένα πραγματοποιήθηκε εδαφοκάλυψη με χρήση μεμονωμένων ή μειγμάτων ειδών ψυχανθών και σιτηρών. Επιλέχθηκαν φυτικά είδη ψυχανθών και σιτηρών και χρησιμοποιήθηκαν 5 φυτικά είδη εδαφοκάλυψης και μείγματα. Στο πείραμα εφαρμόστηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων (RCB) με δύο επαναλήψεις. Οι διαστάσεις του πειραματικού αγρού ήταν 20m (πλάτος) και 30m (μήκος). Η σπορά έγινε χύδην και κατόπιν ακολούθησε ελαφριά ενσωμάτωση στις 21 Νοεμβρίου 2023. Στα αντίστοιχα πειραματικά τεμάχια σπάρθηκαν: T1: Λαθούρι (*Lathyrus sativus*), T2: μπιζέλι (*Pisum sativum*), T3: κριθάρι (*Hordeum vulgare*), T4: τριφύλλι (*Trifolium subterraneum*), και T5: μείγμα κριθαριού και βίκου (*H. vulgare* & *Vicia sativa*). Πριν την σπορά το έδαφος είχε προετοιμαστεί κατάλληλα με την χρήση φρέζας. Πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες εδάφους. Η πρώτη έγινε στο χρονικό σημείο πριν την άνθηση των φυτών εδαφοκάλυψης και η δεύτερη έγινε ένα μήνα μετά την ενσωμάτωση της φυτομάζας των φυτών κάλυψης στο έδαφος. Κατά το παραπάνω χρονικό διάστημα έγινε πλήρης μελέτη των ζιζανίων και υπολογίστηκε η βιομάζα του υπέργειου μέρους τόσο για τα είδη φυτοκάλυψης όσο και για τα ζιζάνια. Αναφορά στο Π4.8.2. Ο ενεργός άνθρακας του εδάφους, ως δείκτης υγείας του εδάφους μετρήθηκε με την τυποποιημένη δοκιμή του υπερμαγγανικού.

Η δειγματοληψία για κάθε τεμάχιο (plot) εδάφους με την εκάστοτε μεταχείριση (μάρτυρας ή διαφορετικό είδος φυτού/μείγματος εδαφοκάλυψης, και ανά διαφορετική χρονική στιγμή) πραγματοποιήθηκε με λήψη 4 ανεξάρτητων δειγμάτων (από αντίστοιχα ισομεγέθη ως προς το εμβαδόν τμήματα εδάφους) κάθε ένα από τα οποία θα αποτελέσει μίγμα (pool) 8 επιμέρους δειγμάτων από βάθος 20 cm ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή αντιπροσώπευση των μικροβιακών κοινοτήτων στο σύνολο του εδαφικού τεμαχίου (plot). Συνολικά, ελήφθησαν 96 μικτά δείγματα και από τις δύο δειγματοληψίες εδάφους τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την διαδικασία εκχύλισης DNA. Το μικροβιακό DNA εκχυλίστηκε από τα δείγματα με χρήση εξειδικευμένου εμπορικού κιτ για δείγματα εδάφους, και ο έλεγχός του πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή PCR για την επιβεβαίωση ύπαρξης βακτηριακού DNA. Τα δείγματα απεστάλησαν για αλληλούχιση των περιοχών του γονιδιακού τόπου 16S rRNA χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα αποκωδικοποίησης DNA υψηλής απόδοσης (high-throughput sequencing) Illumina MiSeq.

Τα πρωτογενή δεδομένα (raw reads) φιλτραρίστηκαν, διορθώθηκαν ώστε να δημιουργηθούν οι βασικές μονάδες της ανάλυσης, τα amplicon sequence variants (ASVs), μέσω προγραμμάτων σε bash και R. Ακολούθησε απομάκρυνση των χιμαιρών και η επιδιόρθωση των ASVs με τη βοήθεια του πακέτου DADA2 στην R. Η ταξινομική αντιστοίχιση των αλληλουχιών επετεύχθη μέσω της χρήσης της βάσης δεδομένων SILVA nr99 v138.2.

Για την ανάλυση της οικολογικής ποικιλομορφίας (alpha & beta diversity), τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν (π.χ., σχετική αφθονία ή άλλοι τυπικοί μετασχηματισμοί). Χρησιμοποιήθηκαν τυπικά πρωτόκολλα ανάλυσης στην R με κεντρικά λογισμικά πακέτα τα phyloseq και metagenomeSeq. Οι χρονικές επιδράσεις (T1 έναντι T0) ελέγχθηκαν σε κάθε φυτικό είδος - χειρισμό. Η διαφορική αφθονία των ASV μεταξύ των ομάδων φυτών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το πακέτο DESeq2. Ορίστηκαν συγκρίσεις για όλους τους συνδυασμούς επιπέδων κάθε ομάδας χειρισμών και οι τιμές P διορθώθηκαν για πολλαπλές δοκιμές με βάση τη μέθοδο Benjamini-Hochberg. Όταν υπήρχε επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία εντός επαναλαμβανόμενων μονάδων, τα μοντέλα έλαβαν υπόψη τη δομή των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Ακολούθησε η πρόβλεψη του λειτουργικού δυναμικού των βιοκοινωνιών με τη χρήση του PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States, v2). (Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., et al. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38, 685–688). Τέλος, με βάση τους πίνακες που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διαφορικής αφθονίας σε λειτουργικό επίπεδο που περιλάμβανε το λογισμικό πακέτο limma-voom στην R.

## 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 2.2.1 Πειραματική Εγκατάσταση

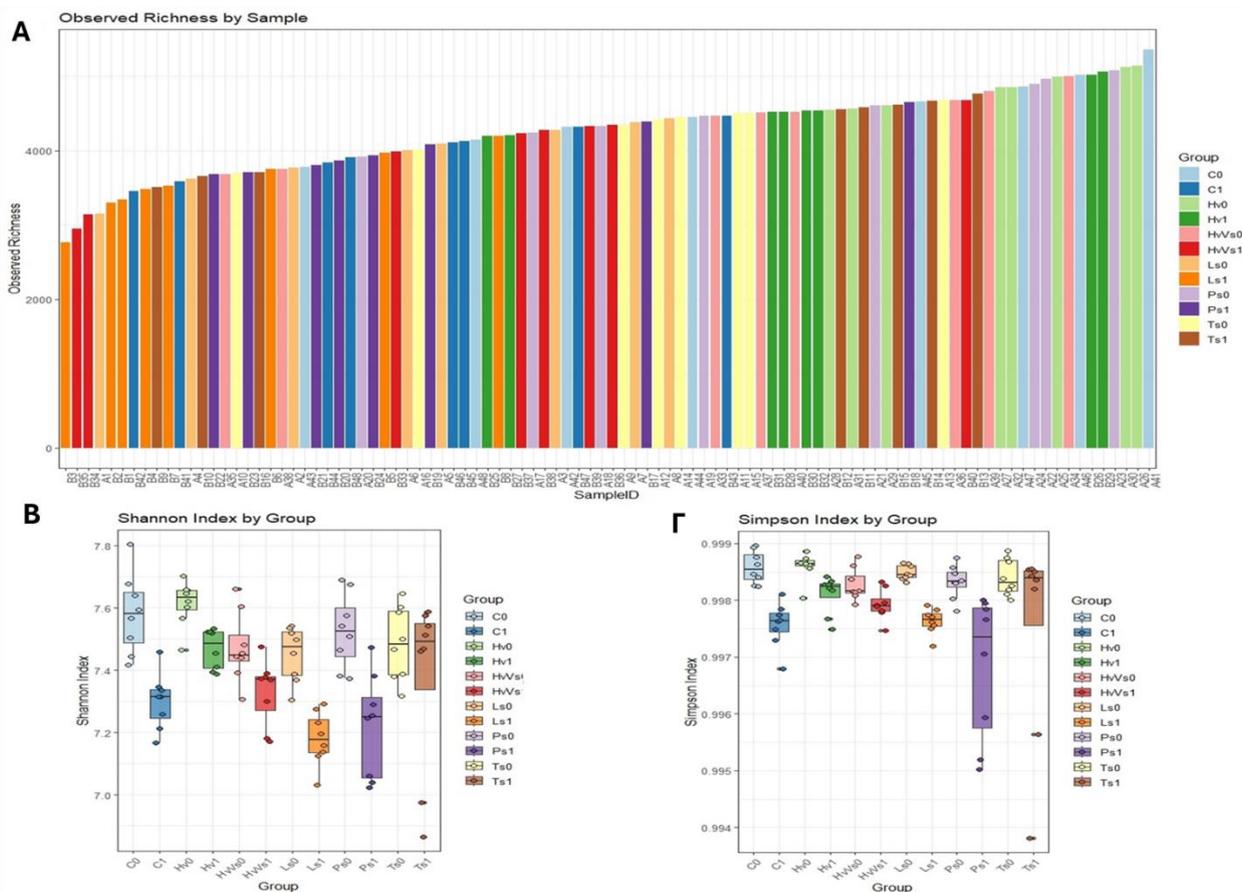
Στον πειραματικό αμπελώνα έγινε εγκατάσταση του πειράματος (Εικόνα 4.8.3-1) και χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα είδη και μίγματα φυτών εδαφοκάλυψης: T1:

Lathyrus sativus, T2: Pisum sativum, T3: Hordeum vulgare, T4: Trifolium subterraneum, T5: μίγμα Hordeum vulgare & Vicia sativa. Τα κύρια είδη ζιζανίων που αναγνωρίστηκαν στα αγροτεμάχια όλων των μεταχειρίσεων περιλάμβαναν τα: *Veronica persica Poir*, *Fumaria officinalis*, *Papaver rhoeas*, *Stellaria media (L.) Vill*, *Urtica spp*, *Calendula arvensis L.*, *Lamium amplexicaule L.*, *Capsella bursa-pastoris*, *Sinapis arvensis*, *Xanthium spinosum*, *Lolium spp.*, και *Sisymbrium orientale L.*



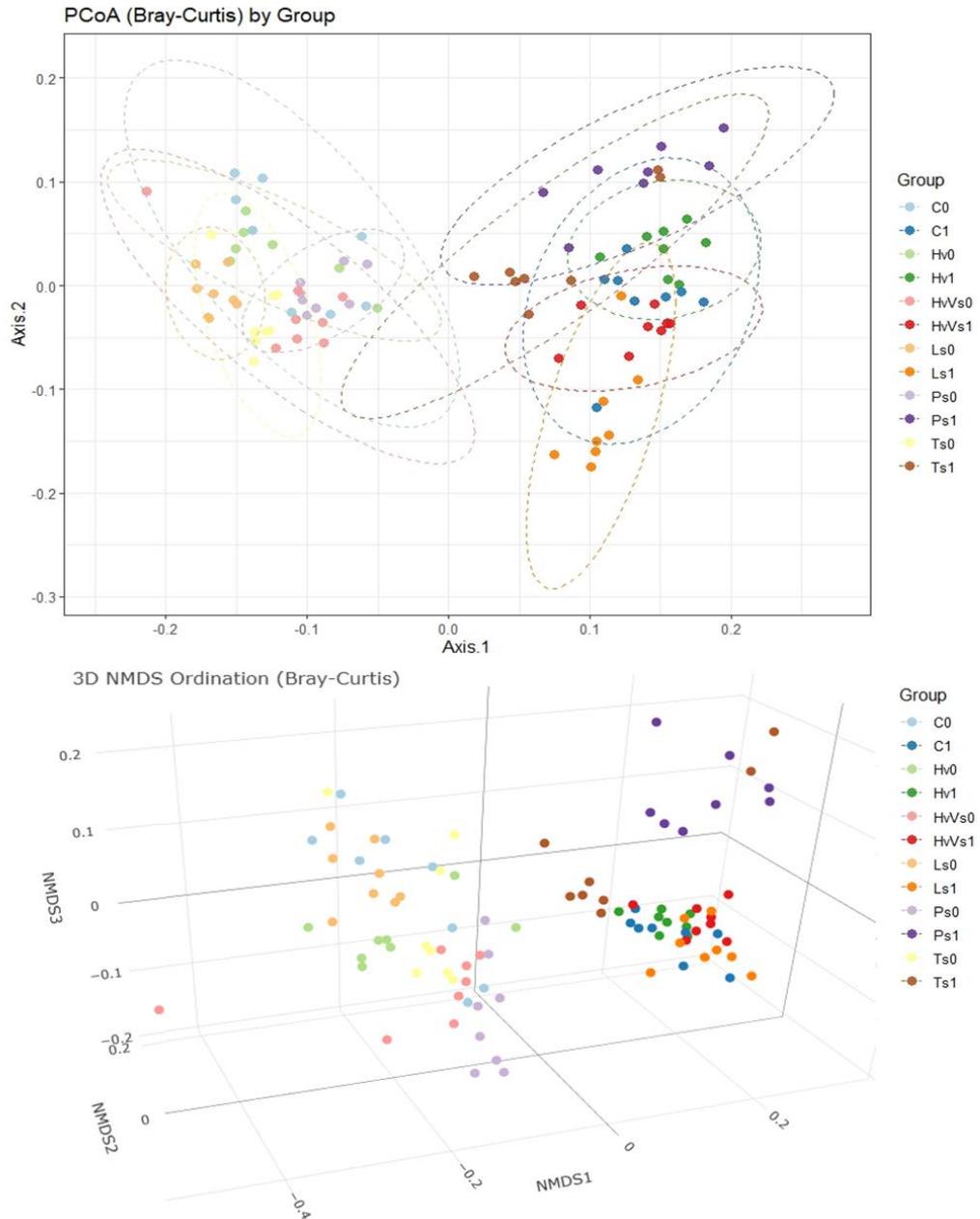
**Εικόνα 4.8.3-1. Πειραματικός αμπελώνας στην Άσκη Βοιωτίας.** Αμπελώνας χωρίς άρδευση που χρησιμοποιήθηκε για τις μονοετείς δοκιμές πεδίου, και τυπικές επιφάνειες αγροτεμαχίων που χρησιμοποιήθηκαν για δειγματοληψίες.

## 2.2.2 Μεταγονιδιαματική ανάλυση δειγμάτων εδάφους



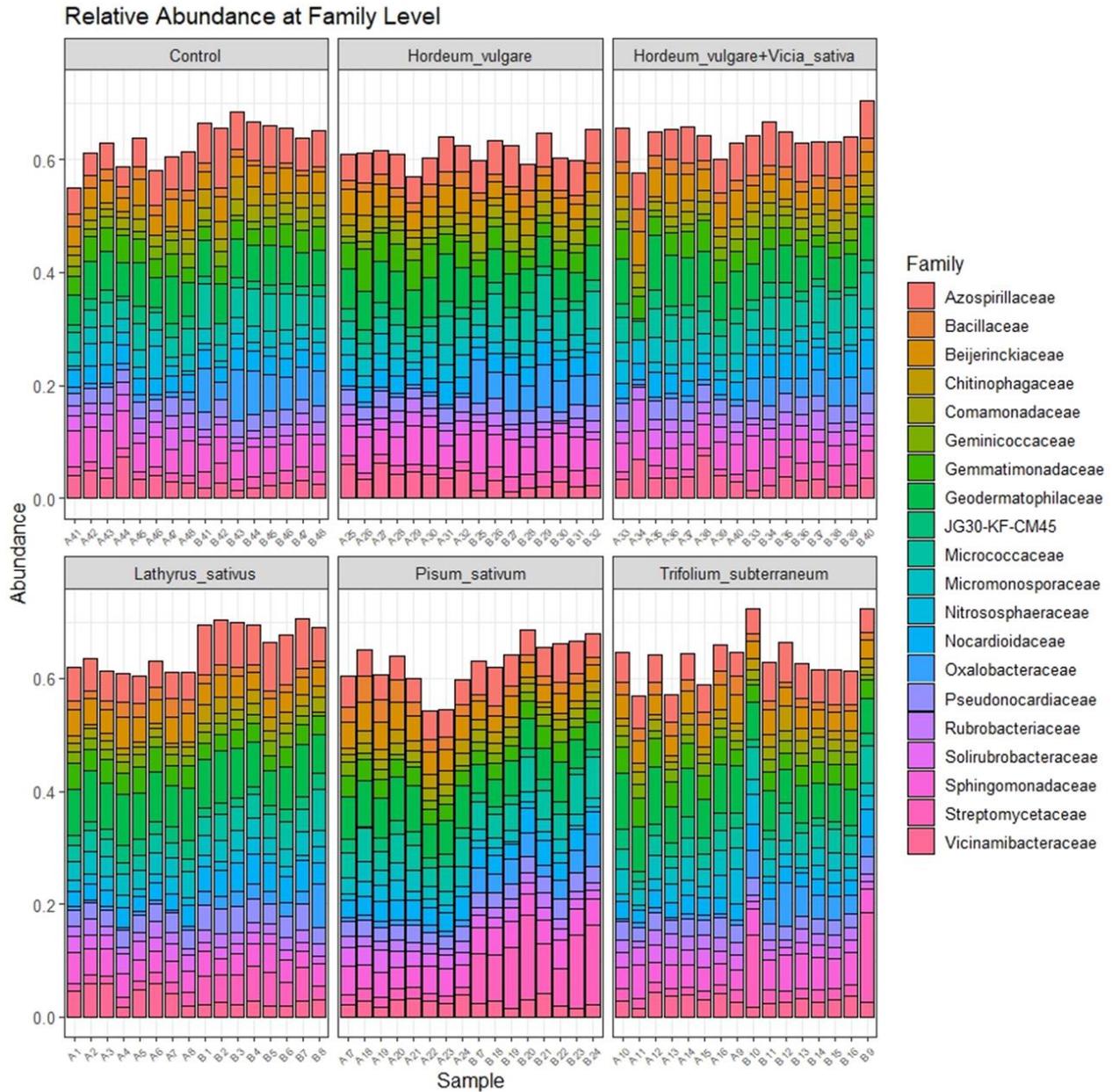
**Εικόνα 4.8.3-3. Άλφα ποικιλότητα μεταξύ των χειρισμών με την πάροδο του χρόνου.** Παρατηρούμενη οικολογική ποικιλότητα για κάθε δείγμα. Ο χρωματισμός υποδηλώνει κοινούς χειρισμούς (φυτικό είδος και χρονική στιγμή) (Α). Δείκτες Shannon (Β) και Simpson (Γ) με απεικόνιση της διασποράς μέσα σε κάθε ομάδα. Hv: *Hordeum vulgare*; HvVs: *Hordeum*

vulgare+Vicia sativa; Ls: Lathyrus sativus; Ps: Pisum sativum; Ts: Trifolium subterraneum; C: Control; 0, 1: Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.



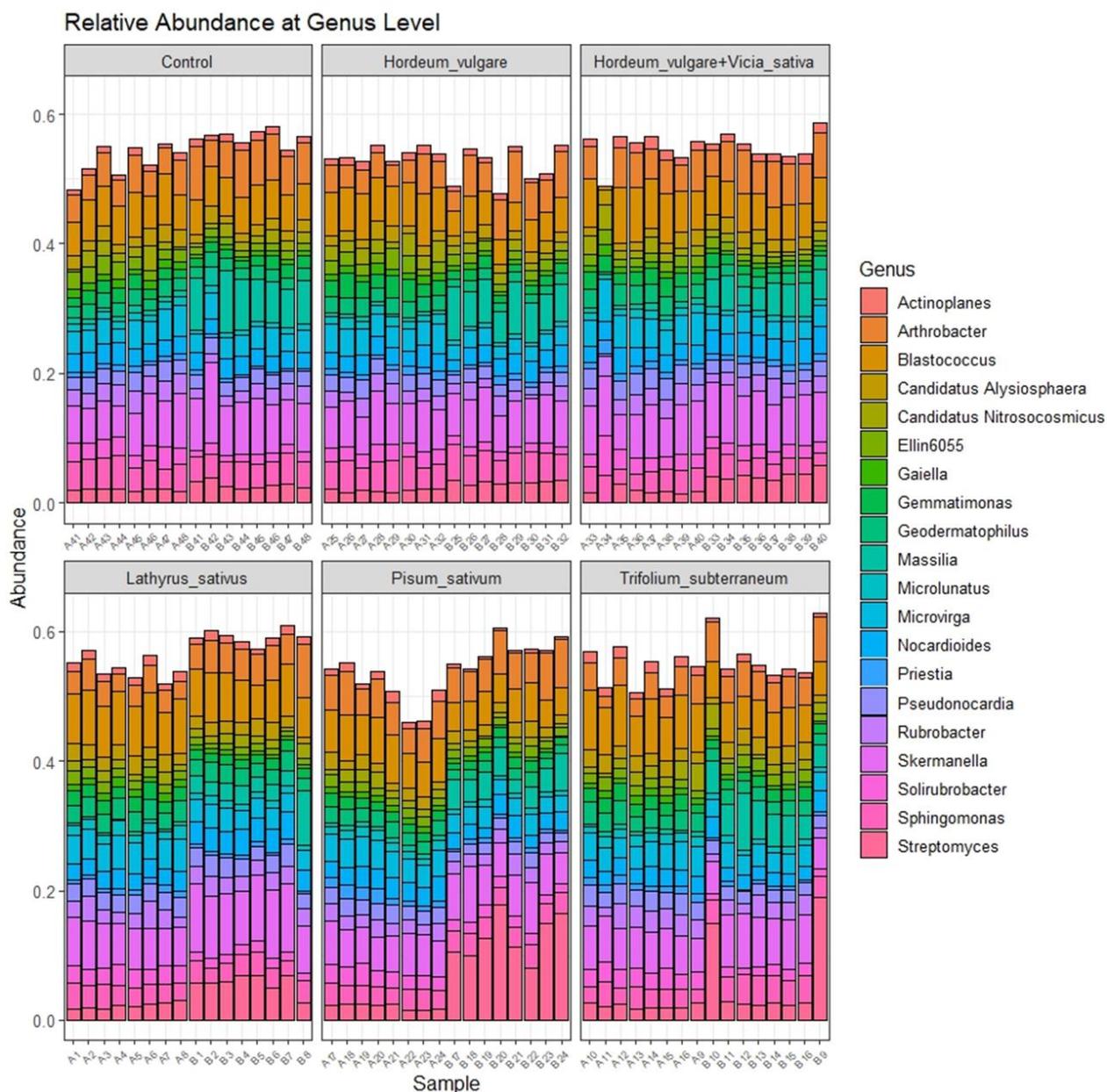
#### Εικόνα 4.8.3-4. Βήτα ποικιλότητα βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ χειρισμών

Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων (PCoA - επάνω) και τρισδιάστατο διάγραμμα NMDS (κάτω) με βάση τις αποστάσεις Bray-Curtis των μικροβιακών κοινοτήτων ανά πειραματικό χειρισμό. Οι ελλείψεις (PCoA) απεικονίζουν τη διασπορά και την επικάλυψη των ομάδων. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα δείγμα, ενώ τα χρώματα υποδηλώνουν τους χειρισμούς.

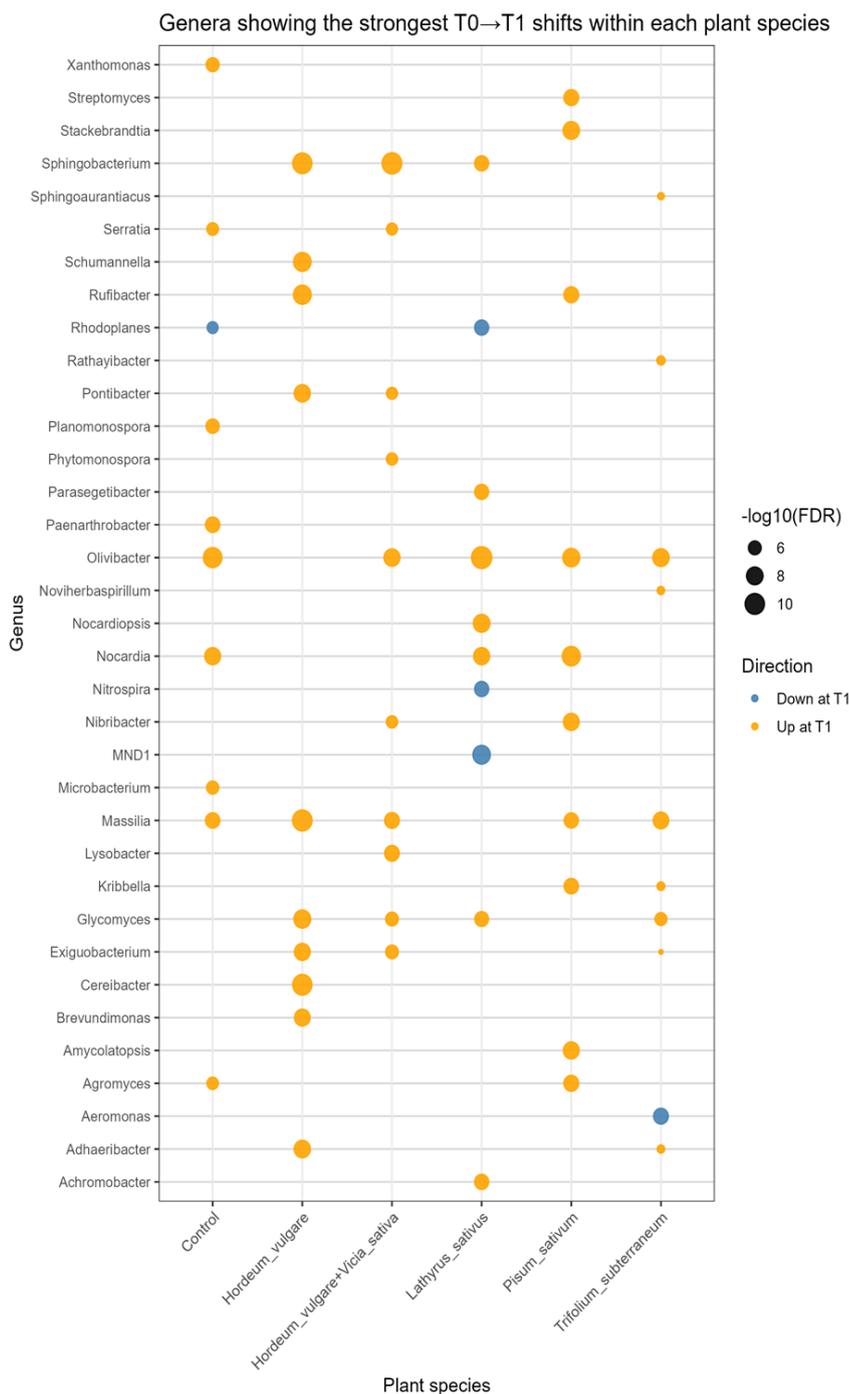


**Εικόνα 4.8.3-5. Σχετική Αφθονία των 20 Κορυφαίων Βακτηριακών Οικογενειών ανά δείγμα.**

Γράφημα σχετικής αφθονίας των 20 κορυφαίων βακτηριακών οικογενειών για κάθε δείγμα, ομαδοποιημένα ανά είδος φυτού - χειρισμού. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει ένα δείγμα. Η κωδικοποίηση του δείγματος υποδηλώνει τη χρονική στιγμή (A = 0, B = 1).

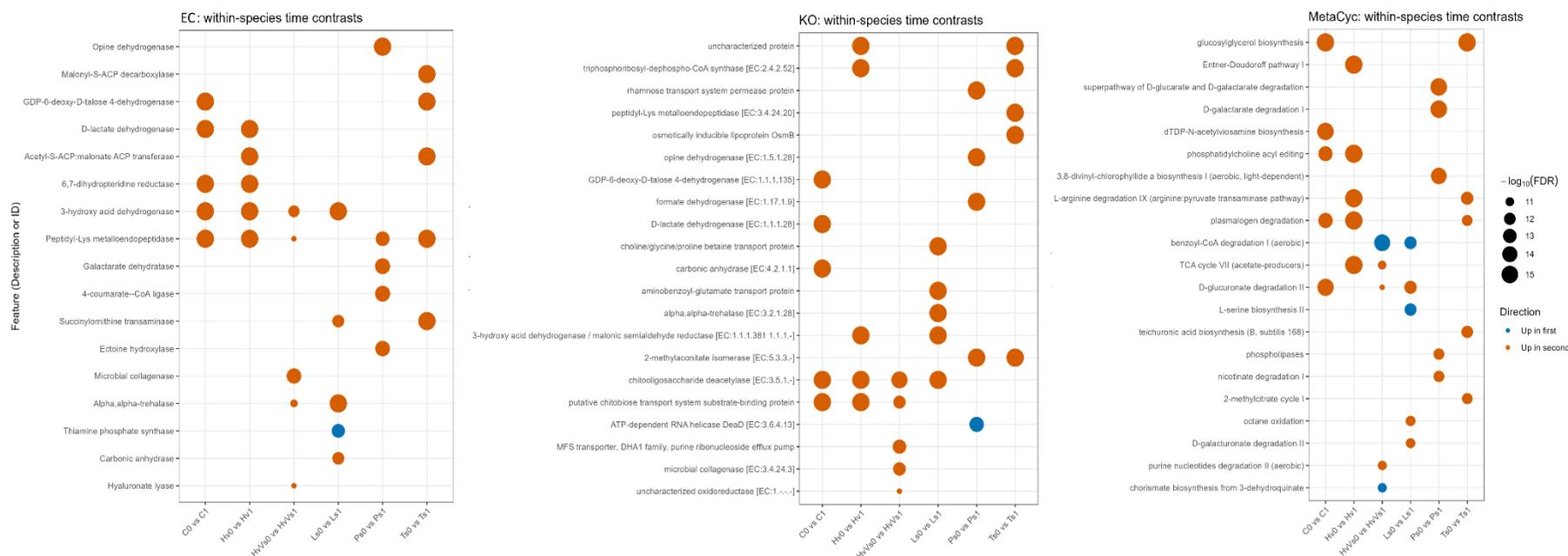


**Εικόνα 4.8.3-6. Σχετική Αφθονία των 20 Κορυφαίων Βακτηριακών Γένων ανά δείγμα.**  
Γράφημα σχετικής αφθονίας των 20 κορυφαίων βακτηριακών γένων για κάθε δείγμα, ομαδοποιημένα ανά είδος φυτού - χειρισμού. Κάθε ράβδος αντιπροσωπεύει ένα δείγμα. Η κωδικοποίηση του δείγματος υποδηλώνει τη χρονική στιγμή (A = 0, B = 1).



**Εικόνα 4.8.3-7. Διαφορική ανάλυση κατά γένος.**

Γράφημα με τις σημαντικότερες διαφορές στην αφθονία ανά χειρισμό στην πορεία του χρόνου (T0→T1). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα βακτηριακό γένος. Στον οριζόντιο άξονα παρατάσσονται τα είδη φυτών (χειρισμοί), ενώ στον κατακόρυφο παρατίθενται τα γένη που επιλέχθηκαν ως τα κορυφαία σημαντικά ανταποκρινόμενα ανά χειρισμό. Το μέγεθος του σημείου αντανακλά τη στατιστική σημαντικότητα (-log10 FDR) και το χρώμα του σημείου υποδηλώνει εάν ένα γένος αυξήθηκε (πορτοκαλί) ή μειώθηκε (μπλε) στο T1 σε σχέση με το T0. Συνολικά, τα περισσότερα γένη εμφανίζουν αυξημένη αφθονία στο T1 σε κάθε χειρισμό.



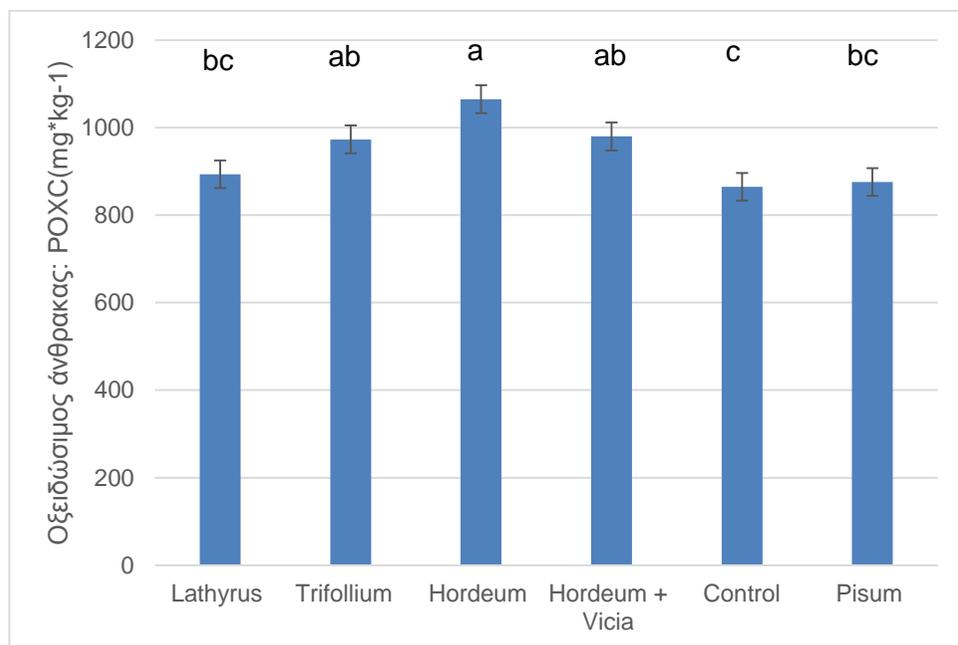
### Εικόνα 4.8.3-8. Διαφορικές λειτουργικές μεταβολές μεταξύ χειρισμών.

Διάγραμμα που απεικονίζει τις στατιστικά σημαντικότερες λειτουργικές μεταβολές για κάθε φυτικό είδος κατά τη σύγκριση των δύο χρονικών στιγμών δειγματοληψίας, σύμφωνα με τις βάσεις Enzyme Commission, (EC – A, ExplorEnz), KEGG (KEGG Orthology, KO – B) και MetaCyc (C). Κάθε κουκκίδα αντιπροσωπεύει έναν όρο, με το μέγεθος του σημείου να υποδηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα ( $-\log_{10}(\text{FDR})$ ) και το χρώμα την κατεύθυνση της μεταβολής (μπλε = υψηλότερη στο πρώτο χρονικό σημείο· πορτοκαλί = υψηλότερη στο δεύτερο).

Το σχήμα συνοψίζει τον τρόπο με τον οποίο το λειτουργικό δυναμικό των μικροβίων σε επίπεδο ενζύμων μεταβάλλεται χρονικά στη ριζόσφαιρα κάθε καλλιέργειας, αναδεικνύοντας τόσο κοινές όσο και ειδικές ανά είδος χρονικές δυναμικές. Παράλληλα, απεικονίζει την εξέλιξη του λειτουργικού δυναμικού των βακτηριακών γονιδίων από το αρχικό προς το μεταγενέστερο χρονικό σημείο της δειγματοληψίας για κάθε χειρισμό/μεταχείριση, αποκαλύπτοντας ειδικές μεταβολές σε βιοχημικές λειτουργίες, μεταφορείς, μεταβολικά μονοπάτια και ρυθμιστικά στοιχεία. Τέλος, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα διαφορετικά φυτικά είδη - χειρισμοί δημιουργούν διακριτά χρονικά πρότυπα στο μικροβιακό μεταβολικό δυναμικό, περιλαμβάνοντας μονοπάτια που

σχετίζονται με τη χρήση υδατανθράκων, τον μεταβολισμό αμινοξέων, τη βιοσύνθεση συμπαραγόντων και την αποδόμηση εξειδικευμένων υποστρωμάτων.

### 2.2.3 Αξιολόγηση του ενεργού οργανικού άνθρακα του εδάφους



Εικόνα 4.8.3-9. Ποσοστό οξειδώσιμου άνθρακα των μεταχειρίσεων

Το οξειδώσιμο οργανικό κλάσμα του άνθρακα (POXC) επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος της καλλιέργειας ( $p < 0,05$ ), γεγονός που καταδεικνύει τη διαφορετική συμβολή των φυτικών συστημάτων στη διαμόρφωση του ενεργού αποθέματος οργανικού άνθρακα του εδάφους. Η καλλιέργεια με *Hordeum vulgare* παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές (POXC), διαφέροντας στατιστικά από το μάρτυρα. Οι μεταχειρίσεις *Trifolium subterraneum* και *Hordeum vulgare + Vicia sativa* εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές (POXC), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από το *Hordeum vulgare*, γεγονός που υποδηλώνει ότι τόσο τα ψυχανθή όσο και οι συγκαλλιέργειες αγρωστωδών-ψυχανθών μπορούν να ενισχύσουν το ενεργό κλάσμα του οργανικού άνθρακα. Η παρατηρούμενη



**Ελλάδα 2.0**  
ΕΘΝΙΚΟ ΣΧΕΔΙΟ ΑΝΑΚΑΜΨΗΣ  
ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ



Με τη χρηματοδότηση  
της Ευρωπαϊκής Ένωσης  
NextGenerationEU

αυτή τάση μπορεί να αποδοθεί στη βελτιωμένη ποιότητα των φυτικών υπολειμμάτων και στη διαφοροποίηση της ριζόσφαιρας, που ευνοεί τη μικροβιακή δραστηριότητα. Αντίθετα, ο μάρτυρας (Control) εμφάνισε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (ΡΟΧC), γεγονός που καταδεικνύει τη μειωμένη ανανέωση του ενεργού οργανικού άνθρακα απουσία φυτικής κάλυψης. Οι καλλιέργειες *Lathyrus sativus* και *Pisum sativum* παρουσίασαν μέτριες τιμές (ΡΟΧC), σημαντικά υψηλότερες από τον μάρτυρα.

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αναλύει τη δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων της ριζόσφαιρας σε σχέση με την παρουσία διαφορετικών ειδών που δρουν ως φυτά κάλυψης, συνδυάζοντας αναλύσεις ποικιλότητας σε επίπεδο κοινότητας, διαφορική αφθονία ταξινομικών μονάδων και λειτουργική διαφοροποίηση. Μέσω της χρήσης αλληλοσυμπληρούμενων στατιστικών μεθόδων, προσαρμοσμένων στη δομή των δεδομένων, κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός τόσο γενικευμένων μεταβολών στη σύνθεση των κοινοτήτων όσο και ειδικών αποκρίσεων σε επίπεδο χαρακτηριστικών, τόσο χρονικών όσο και μεταξύ φυτικών ειδών κάλυψης.

Σε επίπεδο κοινότητας, οι αναλύσεις άλφα ποικιλότητας και πλούτου ειδών έδειξαν ότι οι χρονικές μεταβολές των μικροβιακών κοινοτήτων δεν ήταν ομοιόμορφες μεταξύ των φυτικών ειδών – χειρισμών. Ενώ ορισμένα είδη παρουσίασαν σχετικά σταθερή ποικιλότητα στην αρχή (T0) και στο τέλος (T1) της δειγματοληψίας, άλλα εμφάνισαν μετρήσιμες μεταβολές στους δείκτες πλούτου και ποικιλότητας. Οι αναλύσεις βήτα ποικιλότητας κατέδειξαν περαιτέρω ότι τα χρονικά αποτελέσματα συνοδεύονταν από μεταβολές στη συνολική σύνθεση των κοινοτήτων, όπως απεικονίστηκε μέσω αναλύσεων ταξινόμησης (ordination) και επιβεβαιώθηκε με πολυμεταβλητό έλεγχο υποθέσεων. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα μικροβιώματα της ριζόσφαιρας ακολουθούν διακριτά πρότυπα διαδοχής, τα οποία εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταυτότητα του φυτού κάλυψης.

Οι αναλύσεις διαφορικής αφθονίας σε επίπεδο ταξινομικής σύνθεσης ανέδειξαν τόσο κοινές όσο και φυτο-ειδικά ξεχωριστές αποκρίσεις μικροοργανισμών. Οι συγκρίσεις μεταξύ φυτικών ομάδων αποκάλυψαν υποσύνολα ASVs που διαφοροποιούν τις φυτο-συσχετιζόμενες μικροβιακές κοινότητες, αντανακλώνοντας σταθερά χαρακτηριστικά που συνδέονται με το φυτό κάλυψης. Παράλληλα, οι χρονικές συγκρίσεις έδειξαν ότι πολλοί μικροβιακοί ταξινομικοί δείκτες μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ T0 και T1, με την πλειονότητα των σημαντικών αποκρίσεων να αντιστοιχεί σε αυξημένη αφθονία στο όψιμο χρονικό σημείο. Η εφαρμογή στατιστικών μοντέλων που λαμβάνουν υπόψη την επαναληπτική δειγματοληψία εξασφάλισε ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές αντικατοπτρίζουν πραγματικές χρονικές διεργασίες και όχι διακύμανση μεταξύ επαναλήψεων.

Πέρα από τις ταξινομικές μεταβολές, η λειτουργική ανάλυση παρείχε πληροφορίες για το πώς η χρονική αναδιοργάνωση του μικροβιώματος της ριζόσφαιρας ενδέχεται να μεταφράζεται σε αλλαγές στο μεταβολικό του δυναμικό. Τα λειτουργικά προφίλ που προβλέφθηκαν ανέδειξαν συντονισμένες χρονικά μεταβολές σε επίπεδο ενζυμικών κατηγοριών, ορθόλογων ομάδων και μεταβολικών μονοπατιών. Οι λειτουργικές αυτές μεταβολές ήταν συχνά περισσότερο συντηρημένες μεταξύ φυτικών ειδών σε σύγκριση με τις μεμονωμένες ταξινομικές αποκρίσεις, υποδηλώνοντας την επίτευξη λειτουργικής ταυτότητας εντός του μικροβιώματος της ριζόσφαιρας. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα λειτουργικά αποτελέσματα ερμηνεύονται ως μεταβολές στο προβλεπόμενο

μεταβολικό δυναμικό των κοινοτήτων και όχι ως άμεσες μετρήσεις γονιδιακής έκφρασης ή ενζυμικής δραστηριότητας.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα μικροβιώματα της ριζόσφαιρας υφίστανται χρονική αναδιοργάνωση που είναι φυτοειδικά εξαρτώμενη αλλά λειτουργικά περιορισμένη. Παρότι οι επιμέρους μικροοργανισμοί που ανταποκρίνονται στην ανάπτυξη του φυτού διαφέρουν μεταξύ ειδών, οι λειτουργικές κατευθύνσεις που υποστηρίζονται συλλογικά παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σύγκλιση. Το εύρημα αυτό αναδεικνύει τη σημασία της ολοκληρωμένης ανάλυσης ταξινομικών, κοινοτικών και λειτουργικών επιπέδων για την κατανόηση τόσο της ευελιξίας όσο και της λειτουργικής σταθερότητας των φυτο-συσχετιζόμενων μικροβιακών κοινοτήτων. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της συγκέντρωσης του οξειδώσιμου οργανικού άνθρακα (POXC) επηρεάζεται σημαντικά από το είδος της καλλιέργειας. Οι αγρωστώδεις και οι συγκαλλιέργειες παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ οι μονοκαλλιέργειες ψυχανθών αύξησαν μετρίως το POXC σε σχέση με τον μάρτυρα. Η απουσία φυτικής κάλυψης συνδέθηκε με τις χαμηλότερες τιμές, υποδεικνύοντας περιορισμένη ανανέωση του ενεργού οργανικού άνθρακα.

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

- R Core Team (2025). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Phyloseq: McMurdie and Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 8(4):e61217
- Metagenomeseq: Paulson JN, Olson ND, Braccia DJ, Wagner J, Talukder H, Pop M, Bravo HC (2013). metagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing.. Bioconductor package, <http://www.cbcb.umd.edu/software/metagenomeSeq>.
- DESeq2: Love MI, Huber W, Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biology*, 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- PICRUSt2: Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., ... Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38, 685–688.
- Limma: Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. doi:10.1093/nar/gkv007.
- Weil R.R., Islam K.R., Stine M.A., Gruver J.B., Samson-Liebig S.E. 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture* 18:3–17
- Culman, S.W., Snapp, S.S., Schipanski, M.E., Freeman, M.A., Beniston, J., Drinkwater, L.E., Franzluebbers, A.J., Glover, J.D., Grandy, A.S., Lal, R., Lee, J., Maul, J.E., Mirsky, S.B., Six, J., Wander, M.M. 2012. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. *Soil Science Society of America Journal* 76:494–504
- Gruver, J. 2015. Evaluating the sensitivity and linearity of a permanganate-oxidizable carbon method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46: 490–510