

## ΕΕ2 (Μ6-Μ36): Μελέτη του μικροβιακού «terroir» (μικροβίωμα τού ιδιαίτερου αγροπεριβάλλοντος) με χρήση –ομικών τεχνολογιών και χαρτογράφηση των εδαφών

### ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ Π2.1 & Π2.2

#### Υλικά και Μέθοδοι

##### Φυτικό υλικό και απομόνωση DNA

Για την απομόνωση των βακτηριακών κοινοτήτων, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 5 κιλά εδάφους/αγροτεμάχιο καλλιέργειας πατάτας (*Solanum tuberosum* L.). Το έδαφος συλλέχθηκε από έξι περιοχές της Δράμας (Χρυσοκέφαλο, Νευροκόπι, Λευκόγεια, Δασωτό, Εξοχή και Περιθώρι) (Εικόνα 1Α) σε δύο εποχές συγκομιδής (Άνοιξη και Φθινόπωρο, 2023). Η καλλιέργεια της πατάτας σε κάθε γεωγραφική περιοχή ακολούθησε τις ίδιες τεχνικές διαχείρισης της καλλιέργειας (συμβατικές). Τα σύνθετα δείγματα εδάφους διατηρήθηκαν δροσερά σε ψυγείο με πάγο και επιστράφηκαν στο εργαστήριο σε σακούλες Ziploc εντός 24 ωρών. Μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο, τα δείγματα εδάφους ομογενοποιήθηκαν και κοσκινίστηκαν για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους, ενώ ένα aliquot από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε αμέσως για την απομόνωση βακτηριακού DNA.

##### Δεδομένα δειγματοληψίας

Τα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τις ακόλουθες περιοχές και σε δύο εποχές συγκομιδής (Άνοιξη και Φθινόπωρο) (Πίνακας 1):

**Πίνακας 1.** Καταγραφή των περιοχών συγκομιδής, αντίστοιχων αγροτεμαχίων, εποχών συγκομιδής και κωδικών δειγμάτων.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΓΡΟΤΕΜΑΧΙΟ	ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΤΕΣΣΕΡΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R1S1.1
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΜΑΔΡΕΝΙΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R1S1.2
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΣΑΡΠΟΥΖΙ	ΑΝΟΙΞΗ	R1S1.3
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΦΑΣΟΛΑΚΙΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R1S1.4
ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΓΑΡΜΑΔΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R2S1.1
ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΛΕΙΒΑΔΙΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R2S1.2
ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΚΑΡΠΟΥΖΛΟΥΚΙ	ΑΝΟΙΞΗ	R2S1.3
ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΚΟΥΤΛΟΥΚΙ	ΑΝΟΙΞΗ	R2S1.4
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΑΓΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΑΝΟΙΞΗ	R3S1.1
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΑΣΠΡΑ ΧΩΜΑΤΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R3S1.2
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΔΕΥΤΕΡΕΣ ΜΕΡΕΣ	ΑΝΟΙΞΗ	R3S1.3
ΔΑΣΩΤΟ	ΑΓΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΑΝΟΙΞΗ	R4S1.1
ΔΑΣΩΤΟ	ΠΑΡΑΓΚΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R4S1.2
ΔΑΣΩΤΟ	ΒΑΣΙΛΙΚΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R4S1.3
ΕΞΟΧΗ	ΠΟΜΠΟΝΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R5S1.1
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΣΚΟΥΡΙΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R6S1.1
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΤΣΕΡΒΕΝΑΚΙΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R6S1.2
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΒΑΣΙΛΙΚΑ	ΑΝΟΙΞΗ	R6S1.3
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΤΕΣΣΕΡΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R1S2.1
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΜΑΔΡΕΝΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R1S2.2

ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΣΑΡΠΟΥΖΙ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R1S2.3
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΦΑΣΟΛΑΚΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R1S2.4
ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ	ΓΑΡΜΑΔΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R2S2.1
ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ	ΛΕΙΒΑΔΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R2S2.2
ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ	ΚΑΡΠΟΥΖΛΟΥΚΙ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R2S2.3
ΝΕΥΡΟΚΟΠΙ	ΚΟΥΤΛΟΥΚΙ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R2S2.4
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΑΓΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R3S2.1
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΑΣΠΡΑ ΧΩΜΑΤΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R3S2.2
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΔΕΥΤΕΡΕΣ ΜΕΡΕΣ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R3S2.3
ΔΑΣΩΤΟ	ΑΓΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R4S2.1
ΔΑΣΩΤΟ	ΠΑΡΑΓΚΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R4S2.2
ΔΑΣΩΤΟ	ΒΑΣΙΛΙΚΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R4S2.3
ΕΞΟΧΗ	ΠΟΜΙΟΝΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R5S2.1
ΕΞΟΧΗ	ΜΠΑΝΙΑΣΙΑ Ή ΜΠΟΥΑΣΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R5S2.2
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΣΚΟΥΡΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R6S2.1
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΤΣΕΡΒΕΝΑΚΙΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R6S2.2
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	ΒΑΣΙΛΙΚΑ	ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	R6S2.3

## Ιδιότητες του εδάφους

Τα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από το ανώτερο στρώμα των 30 εκατοστών (όπου βρίσκεται το κύριο μέρος του ριζικού συστήματος των φυτών πατάτας και προσλαμβάνονται κυρίως τα θρεπτικά συστατικά) των δύο γεωγραφικών περιοχών. Κάθε εδαφικό δείγμα αποτελούνταν από πέντε υποδείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε χωράφι και αναμείχθηκαν για να καθοριστεί το ομογενοποιημένο εδαφικό δείγμα. Τα εδαφικά δείγματα θρυμματίστηκαν μηχανικά, ξηράνθηκαν στον αέρα, κοσκινίστηκαν με κόσκινο 2 mm και προετοιμάστηκαν για την αξιολόγηση της υφής του εδάφους μέσω της ανάλυσης του μεγέθους των σωματιδίων με τη μέθοδο του υδρομέτρου (ή Bouyoucos) (Gee and Bauder 1986). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθοι προσδιορισμοί: % οργανική ουσία με τη μέθοδο υγρής χώνευσης (Walkley and Black 1934), % CaCO<sub>3</sub> με τη μέθοδο οπισθοτιτλοδότησης (Loeppert and Suarez 1996), pH μετρούμενο σε κορεσμένη πάστα και ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) μετρούμενη σε εκχύλισμα κορεσμού εδάφους για τον προσδιορισμό της εδαφικής αλατότητας. Το νιτρικό άζωτο εκχυλίστηκε με τη χρήση 2M KCl (Clesceri and Greenberg 1998), ο διαθέσιμος φώσφορος σύμφωνα με τη μέθοδο Olsen (Watanabe and Olsen 1965), το ανταλλάξιμο Ca, K και Mg με οξικό αμμώνιο σε pH = 7,0 (Thomas 1982), ο Cu, Mn, Fe και Zn με τη χρήση DTPA (Lindsay and Norvell 1978) και το εκχυλίσσιμο βόριο με τη μέθοδο azomethine-H (Bingham 1982). Οι συγκεντρώσεις των ανταλλάξιμων κατιόντων και των εξαγωγίμων μικροθρεπτικών συστατικών (Ca, Mg, K, Fe, Mn, Zn και Cu) μετρήθηκαν με ICP (OPTIMA 2100 DV, φασματόμετρο οπτικής εκπομπής, Perkin Elmer, Waltham, MA, ΗΠΑ). Εφαρμόστηκε το t-test του Student (τιμή  $p \leq 0,05$ ) για τον προσδιορισμό των διαφορών στις ιδιότητες του εδάφους μεταξύ των δύο περιοχών. Για την ομαδοποίηση των περιοχών δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ομαδοποίησης Average Linage με ευκλείδειες αποστάσεις, με τη χρήση του ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

## Επεξεργασία και αλληλούχιση δειγμάτων

Το DNA εξήχθη από συνολικά 37 δείγματα, χρησιμοποιώντας το kit απομόνωσης Qiagen DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Carlsbad, USA), σύμφωνα με τις

οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του DNA ελέγχθηκαν με το φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific™ NanoDrop™ (Massachusetts, USA) και επιβεβαιώθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης. Το DNA χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της ταξινομικής ποικιλότητας των βακτηριακών κοινοτήτων και διατηρήθηκε σε υπερκαταψύκτη στους -80°C.

Το απομονωμένο DNA υποβλήθηκε σε PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν την υπερμεταβλητή περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA (341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3', 806R: 5'-GGACTACCVGGGTATCTAAT-3'). Τα ενισχυμένα αμπλικόνια 16S rDNA από κάθε δείγμα αναλύθηκαν με αλληλούχιση σε ζεύγη άκρων (2 × 250) στην πλατφόρμα Illumina NovaSeq 6000, σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

### **Επεξεργασία των αλληλουχιών**

Οι παραγόμενες αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε μεταγενέστερη επεξεργασία χρησιμοποιώντας το λογισμικό FLASH (V1.2.7) (Magoč and Salzberg, 2011). Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες καθαρίστηκαν για να ληφθούν υψηλής ποιότητας διαβάσματα με τη χρήση του λογισμικού Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, <http://qiime.org/index.html>) (V1.7.0) (Caporaso et al., 2010). Οι καθαρές αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν ανεξάρτητα με τη βάση δεδομένων SILVA 138 για την ομαδοποίηση τους σε κάθε ταξινομική κατάταξη, ενώ με τη χρήση του αλγορίθμου UCHIME (V 4.2.40) αφαιρέθηκαν οι αλληλουχίες που ήταν ύποπτες για χίμαιρα (Edgar et al., 2011). Οι υπόλοιπες αλληλουχίες συγκεντρώθηκαν σε Ταξινομικές Μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTUs) σε επίπεδο ομοιότητας 97 %, χρησιμοποιώντας το λογισμικό UPARSE (V7.0.1090, <http://drive5.com/uparse/>).

Για κάθε αντιπροσωπευτική αλληλουχία, ο σχολιασμός επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Mothur και τη βάση δεδομένων SSUrRNA του SILVA138 (με όριο 0,8-1) για τον σχολιασμό ειδών σε κάθε ταξινομική κατάταξη (Wang et al., 2007; Quast et al., 2013). Η αφθονία των OTUs κανονικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο αριθμού ακολουθίας που αντιστοιχεί στο δείγμα με τις ελάχιστες αλληλουχίες. Η επακόλουθη ανάλυση της άλφα και βήτα ποικιλομορφίας διαφοροποιήθηκε με βάση αυτά κανονικοποιημένα δεδομένα (normalized data). Τέλος, πριν τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων σε περιοδικό με κριτές, οι μη επεξεργασμένες αλληλουχίες θα υποβληθούν στη βάση δεδομένων GenBank- Sequence Read Archive.

### **Ανάλυση δεδομένων**

Οι δείκτες άλφα-ποικιλότητας (οι εκτιμήσεις πλούτου SChao1, οι δείκτες Shannon και Simpson, αλλά και ο αριθμός των παρατηρούμενων ειδών) υπολογίστηκαν για όλα τα δείγματα με το λογισμικό QIIME (Version 1.7.0) και οπτικοποιήθηκαν με το πακέτο 'phyloseq' στο R (V2.15.3) (McMurdie and Holmes, 2013). Οι μετρήσεις 'Rarefaction' υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον κώδικα alpha\_rarefaction.py στο πακέτο QIIME (Kuczynski et al., 2011), ενώ οι θερμικοί χάρτες της σχετικής αφθονίας των OTUs δημιουργήθηκαν επίσης στο R (Ling et al., 2014a).

Η βήτα-ποικιλότητα αξιολογήθηκε επίσης με το QIIME χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS) με βάση το σταθμισμένο (αξιολόγηση της δομής της κοινότητας λαμβάνοντας υπόψη την αφθονία των OTU) και το μη σταθμισμένο (αξιολόγηση της ιδιότητας μέλους της κοινότητας λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία/απουσία OTU) matrix απόστασης UniFrac (Lozupone and Knight, 2005).

Επιπλέον, δημιουργήθηκαν δένδρογράμματα για την ανάλυση της δομής της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου χρησιμοποιώντας την ανάλυση Method with Arithmetic Means (UPGMA) με Weighted Unifrac αποστάσεις, καθώς και με Unweighted Unifrac.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση T-test για την σύγκριση της αφθονίας βακτηριακών γενών και T-test για την ανάλυση των προβλεπόμενων λειτουργικών διαφορών στο μικροβίωμα. Η τελευταία ανάλυση, βασίστηκε σε προβλέψεις από τη βάση δεδομένων Pfam χρησιμοποιώντας το εργαλείο PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States).

## Αποτελέσματα

### Ιδιότητες εδάφους

#### Μηχανική σύσταση

Η μηχανική σύσταση των εδαφών, όπως περιγράφεται στον **Πίνακα 2**, δείχνει μια ποικιλία τύπων εδάφους, με επικράτηση μεσαίων και ελαφρών εδαφών. Οι περιοχές προσαρμόστηκαν ελαφρώς από την Άνοιξη στο Φθινόπωρο, με ορισμένες περιοχές να μετατρέπονται σε ελαφρότερα εδάφη.

**Πίνακας 2.** Μηχανική σύσταση του εδάφους σε έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα.

Περιοχή	Άνοιξη	Φθινόπωρο	Σύσταση
ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	L, CL, SCL, SL	L, CL, SL	βαριά, ελαφρά και μεσαία εδάφη
ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	L, SL	L, SL	μεσαία, ελαφρά εδάφη
ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	L, SL	SL	μεσαία, ελαφρά εδάφη
ΔΑΣΩΤΟ	L, SL	L, SL	μεσαία, ελαφρά εδάφη
ΕΞΟΧΗ	SL, CL	L, SL	βαριά, ελαφρά και μεσαία εδάφη
ΠΕΡΙΘΩΡΙ	L, SL	L, SL	μεσαία, ελαφρά εδάφη

#### Φυσικοχημικές ιδιότητες

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα ποικίλλουν, με σημαντικές διαφορές ανάλογα με την εποχή και το στάδιο καλλιέργειας - πριν τη σπορά (**Πίνακας 3**) και κατά τη συγκομιδή (**Πίνακας 4**).

#### Ιδιότητες εδάφους πριν τη σπορά

Ο **Πίνακας 3**, παρουσιάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους πριν τη σπορά. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιοχών. Συνοπτικά, το Χρυσοκέφαλο, η Λευκόγεια και το Περιθώρι είχαν υψηλότερα επίπεδα οργανικής ουσίας, ενώ το Νευροκόπι, το Δασωτό και η Εξοχή είχαν χαμηλότερα επίπεδα. Το pH ποικίλλει από ελαφρώς όξινο (pH 5,48 στη Λευκόγεια) έως ελαφρώς αλκαλικό (pH 6,26 στο Χρυσοκέφαλο). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα (Ec) που σχετίζεται με την εδαφική αλατότητα ήταν υψηλότερη στο Περιθώρι και τη Λευκόγεια, και χαμηλότερη στο Νευροκόπι και το Δασωτό.

Τα επίπεδα νιτρικού αζώτου (NO<sub>3</sub>) ήταν υψηλότερα στο Περιθώρι και τη Λευκόγεια και χαμηλότερα στο Δασωτό και το Νευροκόπι. Τα επίπεδα αζώτου (N), φωσφόρου (P) και καλίου (K) διέφεραν επίσης μεταξύ των περιοχών, με ορισμένες περιοχές να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις από άλλες. Τα επίπεδα μαγνησίου (Mg), νατρίου (Na) και σιδήρου (Fe) ποικίλλουν επίσης, με το Χρυσοκέφαλο, τη Λευκόγεια και το Περιθώρι να έχουν υψηλότερα επίπεδα Mg και Na. Τα επίπεδα ψευδαργύρου (Zn), μαγγανίου (Mn) και χαλκού (Cu) ήταν χαμηλότερα στο Δασωτό σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές.

**Πίνακας 3.** Φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους πριν την σπορά (άνοιξη) σε έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα.

Φυσικοχημικές ιδιότητες	ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΔΑΣΩΓΟ	ΕΞΟΧΗ	ΠΕΡΙΘΩΡΙ
Αμμος:Αργίλος:Ίλος (%)	48:19:26	59:16:26	50:16:34	62:13:21	51:25:24	58:13:29
pH	6.26 ± 0.4	5.65 ± 0.4	5.48 ± 0.3	5.95 ± 0.6	5.69 ± 0.2	6.03 ± 0.3
Ec (mS/cm)	0.583 ± 0.11	0.437 ± 0.06	0.731 ± 0.07	0.419 ± 0.08	0.442 ± 0.11	0.782 ± 0.02
Organic matter	1.53 ± 0.32	1.00 ± 0.13	1.37 ± 0.16	1.24 ± 0.22	1.73 ± 0.32	1.45 ± 0.24
NO <sub>3</sub> (ppm)	72.30 ± 23.7	58.99 ± 21.1	126.4 ± 37.2	64.42 ± 11.6	72.34 ± 10.2	200.4 ± 51.3
N (ppm)	15.84 ± 6.7	18.06 ± 7.2	28.53 ± 8.4	13.74 ± 3.8	16.34 ± 2.3	42.45 ± 14.6
P (ppm)	29.41 ± 8.9	35.28 ± 14.1	57.43 ± 5.6	52.86 ± 6.3	47.77 ± 11.0	31.78 ± 1.3
K (ppm)	845.9 ± 252.0	172.8 ± 86.8	233.7 ± 66.7	169.0 ± 60.6	176.5 ± 48.8	190.3 ± 97.5
Mg (ppm)	159.8 ± 30.0	92.0 ± 22.3	157.7 ± 13.6	99.7 ± 35.7	178.0 ± 50.9	145.3 ± 20.0
Na (ppm)	64.7 ± 5.0	48.5 ± 11.4	58.1 ± 11.0	50.5 ± 5.4	46.9 ± 1.8	60.3 ± 7.3
Ca (ppm)	1217.5 ± 160.9	624.0 ± 149.4	1262.0 ± 149.7	974.7 ± 243	1042 ± 133.6	1535.0 ± 184.6
Fe (ppm)	125 ± 26.5	121 ± 31.9	119 ± 25.6	59.2 ± 11.3	101 ± 28.9	81.2 ± 11.1
Zn (ppm)	5.8 ± 2.1	8.7 ± 2.9	8.4 ± 3.2	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.2
Mn (ppm)	16.8 ± 7.9	36.4 ± 4.2	27.7 ± 9.4	15.2 ± 2.1	45.2 ± 10.4	28.3 ± 8.3
Cu (ppm)	3.0 ± 1.6	4.7 ± 2.2	8.0 ± 3.0	2.0 ± 0.9	4.9 ± 0.4	2.8 ± 1.4
B (ppm)	0.9 ± 0.5	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.5	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.1

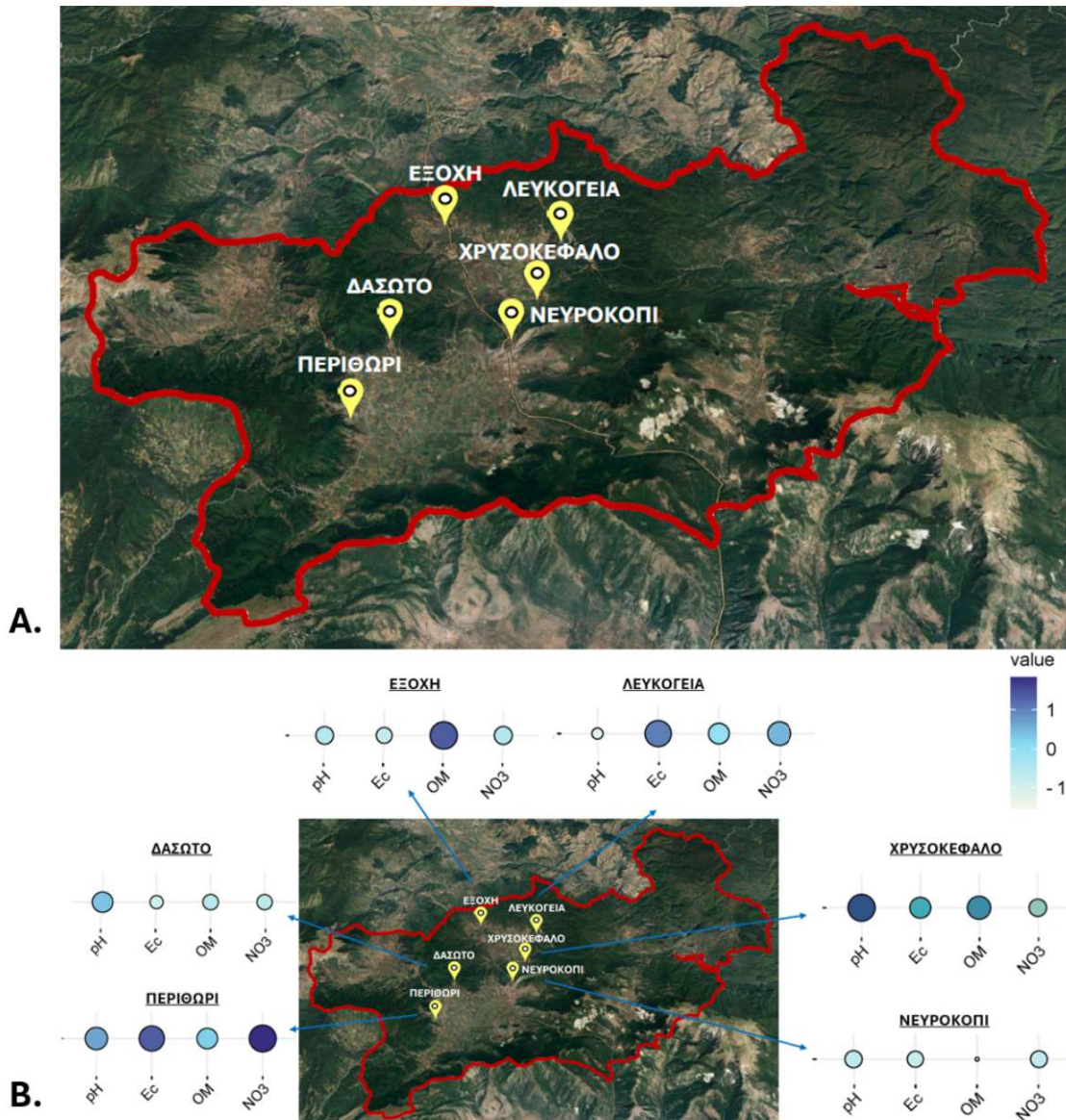
#### *Ιδιότητες εδάφους κατά τη συγκομιδή*

Ο **Πίνακας 4**, παρουσιάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους κατά τη συγκομιδή της πατάτας. Παρατηρήθηκαν κάποιες αλλαγές σε σύγκριση με τα προ-σποράς επίπεδα. Τα επίπεδα οργανικής ουσίας παρέμειναν σχετικά σταθερά, με μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των περιοχών. Το pH μειώθηκε σε όλες τις περιοχές, με τη Λευκόγεια και το Περιθώρι να έχουν τις μεγαλύτερες μειώσεις. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυξήθηκε σε όλες τις περιοχές, με το Νευροκόπι, την Εξοχή και το Περιθώρι να εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις.

Τα επίπεδα NO<sub>3</sub> αυξήθηκαν σε όλες τις περιοχές, με το Χρυσοκέφαλο και το Περιθώρι να έχουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις. Τα επίπεδα N, P και Mg παρουσίασαν διακυμάνσεις, με ορισμένες περιοχές να εμφανίζουν αυξήσεις και άλλες μειώσεις. Τα επίπεδα K αυξήθηκαν σε όλες τις περιοχές, με το Χρυσοκέφαλο και τη Λευκόγεια να έχουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις. Τα επίπεδα Na μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, εκτός από το Χρυσοκέφαλο, όπου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση.

Τα επίπεδα Fe μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, με τη Λευκόγεια να έχει τη μεγαλύτερη μείωση. Τα επίπεδα Zn, Mn και Cu παρουσίασαν διακυμάνσεις, με ορισμένες περιοχές να εμφανίζουν αυξήσεις και άλλες μειώσεις. Τα επίπεδα βορίου (B) μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, εκτός από το Χρυσοκέφαλο, όπου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση.

Η **Εικόνα 1B** παρέχει μια οπτική αναπαράσταση του χάρτη της Δράμας με τις έξι περιοχές δειγματοληψίας, υπογραμμίζοντας τις διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους μεταξύ των περιοχών καλλιέργειας πατάτας κατά την περίοδο της Άνοιξης.



**Εικόνα 1.** Α. Χάρτης του Νομού Δράμας, με τις έξι περιοχές δειγματοληψίας επισημασμένες (Χρυσοκέφαλο, Νευροκόπι, Λευκόγεια, Δασωτό, Εξοχή και Περιθώρι). Β. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους απεικονίζονται με κύκλους διαφορετικών μεγεθών και αποχρώσεων μπλε, με σκούρο μπλε να υποδεικνύει υψηλότερες τιμές. Οι περιοχές από αριστερά προς τα δεξιά είναι: Περιθώρι, Δασωτό, Εξοχή, Λευκόγεια, Χρυσοκέφαλο και Νευροκόπι. Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τις τιμές των ιδιοτήτων κατά τη συγκομιδή, με το μέγεθος και την ένταση του χρώματος να υποδεικνύουν τη σχετική τιμή κάθε στοιχείου. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν οργανική ουσία, pH, ηλεκτρική αγωγιμότητα (Ec), νιτρικό άζωτο (NO<sub>3</sub>).

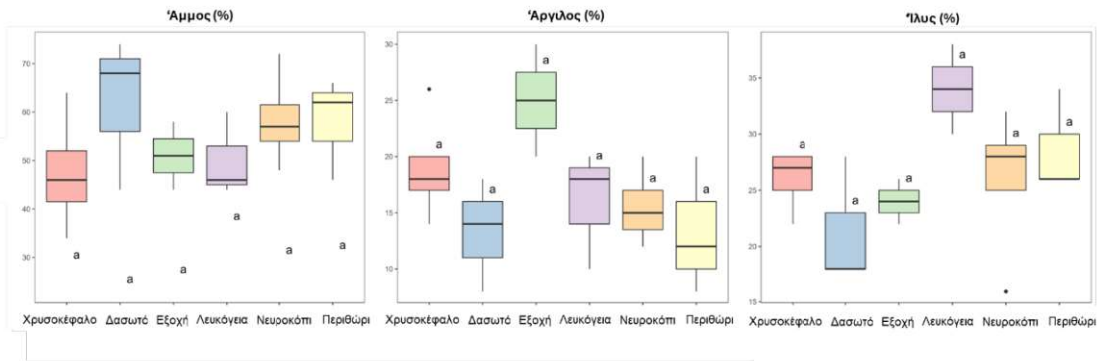
Αυτές οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους κατά τη συγκομιδή μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες, όπως η δραστηριότητα των μικροοργανισμών, η αποικοδόμηση της οργανικής ύλης, η απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών από το έδαφος και η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά. Οι διαφορές μεταξύ των περιοχών μπορεί να σχετίζονται με τις αρχικές ιδιότητες του εδάφους, τις πρακτικές διαχείρισης της καλλιέργειας και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

**Πίνακας 4.** Φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους κατά τη συγκομιδή (φθινόπωρο) σε έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα.

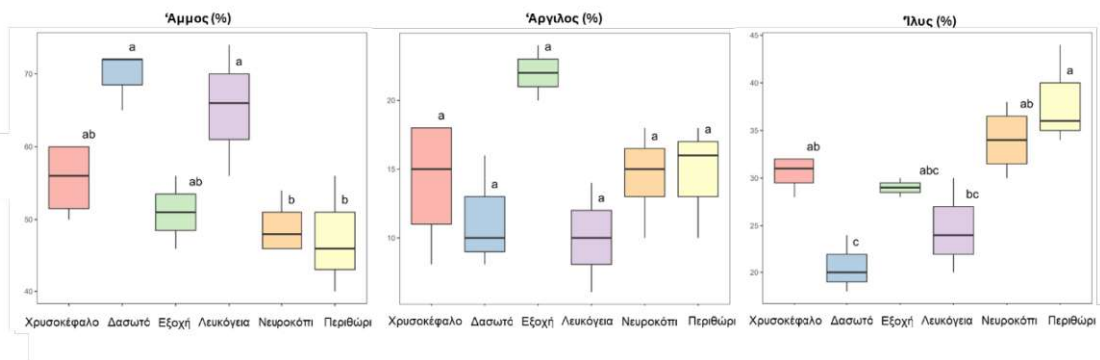
Φυσικοχημικές ιδιότητες	ΧΡΥΣΟΚΕΦΑΛΟ	ΝΕΥΡΟΚΟΠΗ	ΛΕΥΚΟΓΕΙΑ	ΛΑΣΩΤΟ	ΕΞΟΧΗ	ΠΕΡΙΘΩΡΙ
Άμμος:Αργίλος:Ίλος (%)	56:14:31	49:15:34	65:10:25	70:11:21	51:22:29	47:15:38
pH	5.77 ± 0.5	5.58 ± 0.55	6.04 ± 0.6	5.24 ± 0.5	5.48 ± 0.3	5.15 ± 0.4
Ec (mS/cm)	0.641 ± 0.20	1.189 ± 0.23	0.755 ± 0.01	1.100 ± 0.11	0.873 ± 0.01	1.08 ± 0.33
Organic matter	1.52 ± 0.10	1.33 ± 0.22	1.42 ± 0.27	0.92 ± 0.10	1.18 ± 0.25	1.45 ± 0.16
NO <sub>3</sub> (ppm)	164.9 ± 55.0	97.25 ± 25.8	122.1 ± 22.6	98.04 ± 29.8	125.4 ± 12.4	123.8 ± 19.3
N (ppm)	27.11 ± 9.4	21.96 ± 5.8	25.55 ± 8.3	22.12 ± 6.7	28.31 ± 2.8	27.94 ± 4.4
P (ppm)	24.00 ± 8.4	50.43 ± 9.0	26.25 ± 8.3	58.27 ± 7.4	52.03 ± 7.7	54.09 ± 12.5
K (ppm)	118.0 ± 34.3	121.5 ± 35.1	187.0 ± 53.1	98.7 ± 23.7	175.0 ± 15.6	192.7 ± 20.1
Mg (ppm)	145.3 ± 25.5	149.0 ± 67.9	168.3 ± 49.9	92.7 ± 11.4	135.0 ± 49.5	137.3 ± 39.9
Na (ppm)	62.6 ± 14.3	43.1 ± 6.1	69.0 ± 19.2	46.6 ± 6.9	52.9 ± 6.5	55.9 ± 6.9
Ca (ppm)	1949.3 ± 699.9	1003.0 ± 319.1	1401.0 ± 554.5	842.0 ± 124.4	869.5 ± 212.8	1244.0 ± 262.5
Fe (ppm)	79.3 ± 22.3	104 ± 15.4	57.44 ± 20.2	82.6 ± 23.8	71.8 ± 26.5	91.0 ± 37.4
Zn (ppm)	4.2 ± 1.3	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1
Mn (ppm)	44.0 ± 17.8	28.9 ± 18.0	19.9 ± 7.8	48.7 ± 20.8	56.3 ± 12.4	58.7 ± 20.8
Cu (ppm)	4.4 ± 1.2	2.2 ± 0.3	5.4 ± 1.1	1.6 ± 0.2	3.5 ± 1.0	4.4 ± 2.1
B (ppm)	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1

Οι **Εικόνες 2** έως **9** παρέχουν ένα σύνολο πληροφοριών σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους σε έξι διαφορετικές περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα, κατά τις περιόδους του φθινοπώρου και της άνοιξης, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας θηκογράμματα, οι εικόνες απεικονίζουν με σαφήνεια την κατανομή των τιμών για κάθε ιδιότητα του εδάφους, επιτρέποντάς μας να συγκρίνουμε και να αναλύσουμε τις διακυμάνσεις μεταξύ των περιοχών. Από τις διαφορετικές χρωματικές αποδόσεις και τα μοτίβα, μπορούμε να διακρίνουμε εύκολα κάθε περιοχή και να παρατηρήσουμε πώς διαφέρουν οι ιδιότητες του εδάφους σε κάθε τοποθεσία. Οι παράμετροι που απεικονίζονται περιλαμβάνουν την παρουσία ιλύος, αργίλου και άμμου, καθώς και διάφορες χημικές ιδιότητες, όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα, τα επίπεδα αζώτου και θρεπτικών ουσιών.

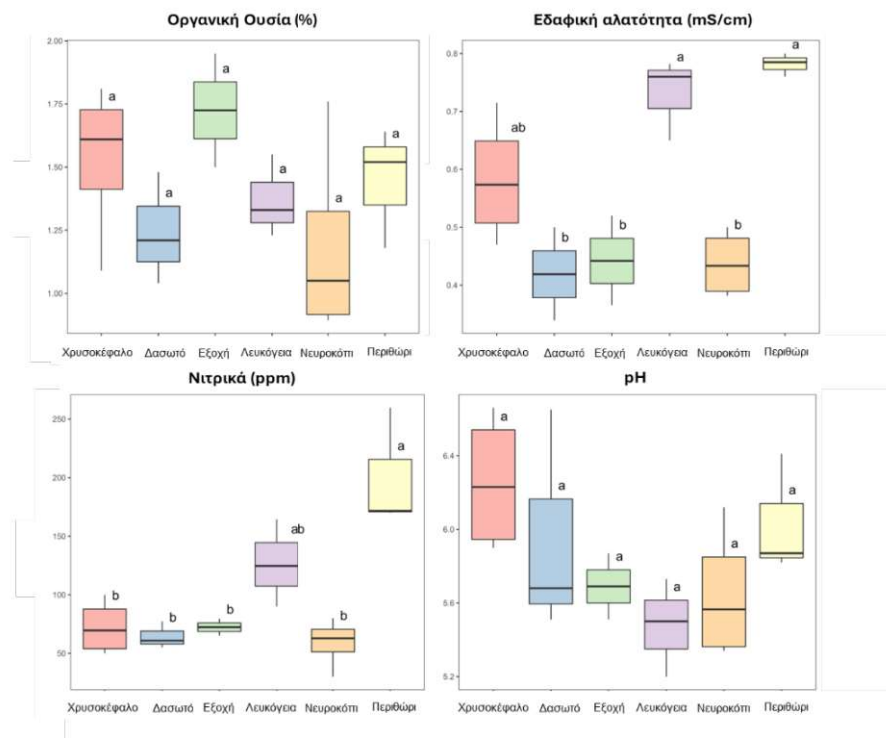
Η ανάλυση των θηκογραμμάτων αποκαλύπτει ένα ευρύ φάσμα τιμών στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους, με σημαντικές διακυμάνσεις τόσο μεταξύ των περιοχών καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα όσο και μεταξύ φθινοπώρου και άνοιξης. Δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο ή τάση στις τιμές, υποδεικνύοντας ότι κάθε περιοχή παρουσιάζει μια μοναδική σύνθεση εδάφους. Οι διαφορές αυτές υπογραμμίζουν τη μοναδικότητα κάθε τοποθεσίας και την επίδραση που έχουν οι εποχές στις ιδιότητες του εδάφους. Η διακύμανση είναι εμφανής στους διάφορους θρεπτικούς και χημικούς δείκτες, με τις περιοχές να παρουσιάζουν διαφορετικές κατανομές και ακραίες τιμές. Αυτό υποδεικνύει ότι το έδαφος κάθε περιοχής έχει τη δική του ξεχωριστή "υπογραφή", με μοναδικά επίπεδα ιλύος, αργίλου, αζώτου, θρεπτικών συστατικών και pH. Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ φθινοπώρου και άνοιξης δείχνει ότι οι εποχές διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στις ιδιότητες του εδάφους, με πιθανές διακυμάνσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις πρακτικές διαχείρισης της καλλιέργειας.



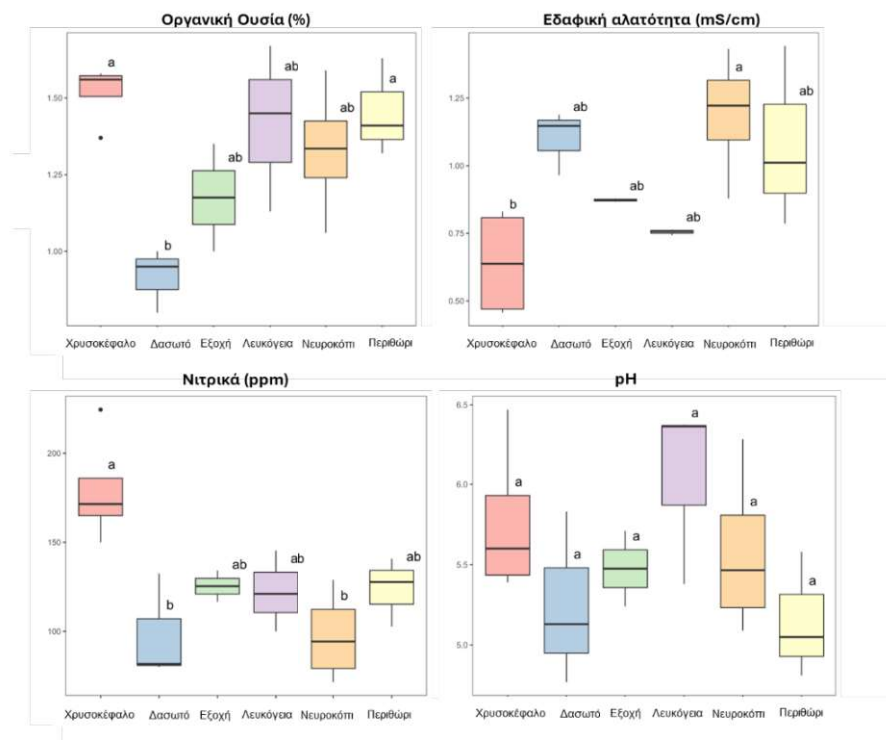
**Εικόνα 2.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση της μηχανικής σύστασης του εδάφους κατά την περίοδο της άνοιξης στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (%) σε Ίλυ (Si), Άργιλο (Clay), και Άμμο (sand).



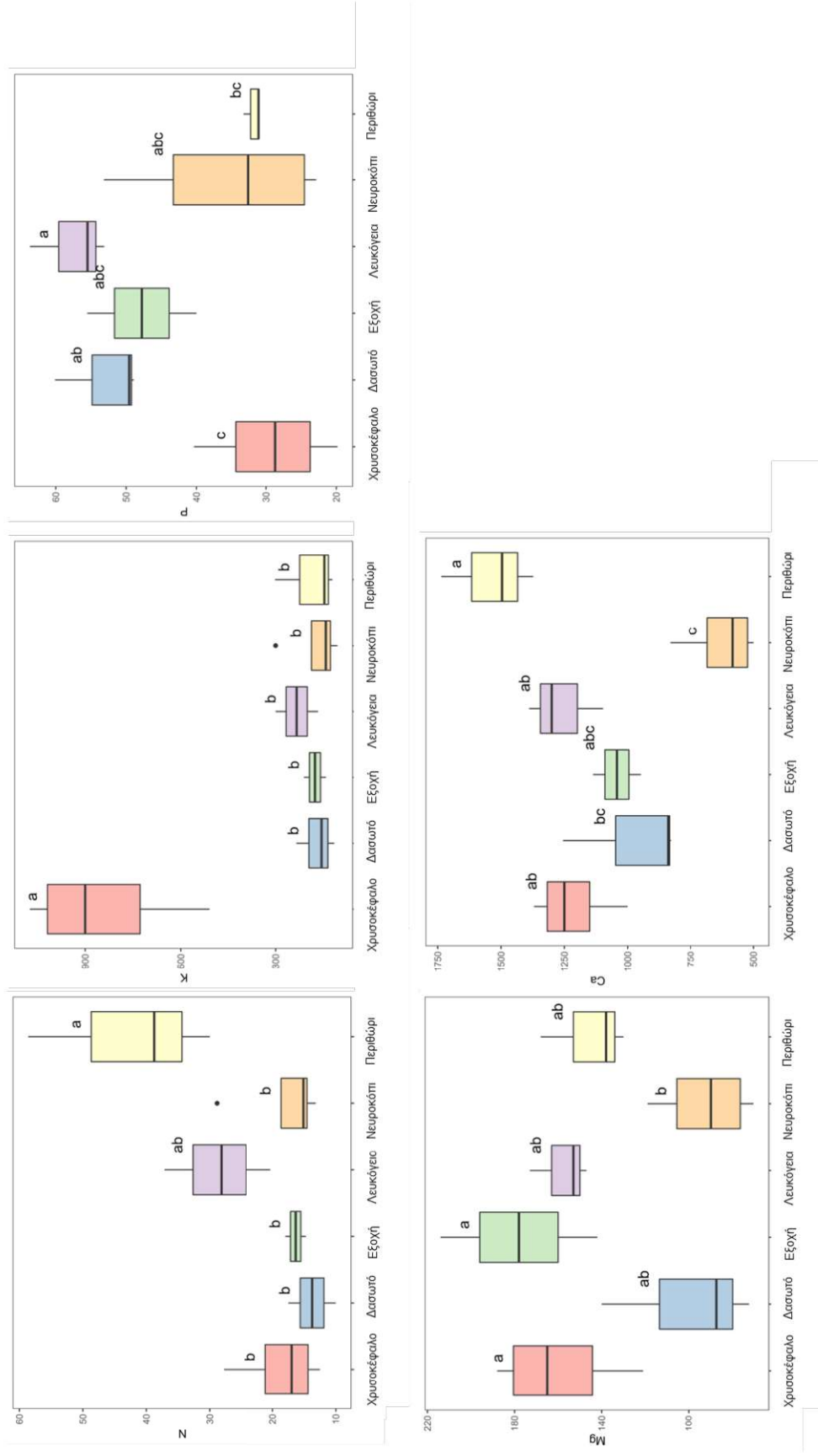
**Εικόνα 3.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση της μηχανικής σύστασης του εδάφους κατά την περίοδο του φθινοπώρου στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (%) σε Ίλυ (Si), Άργιλο (Clay), και Άμμο (sand).



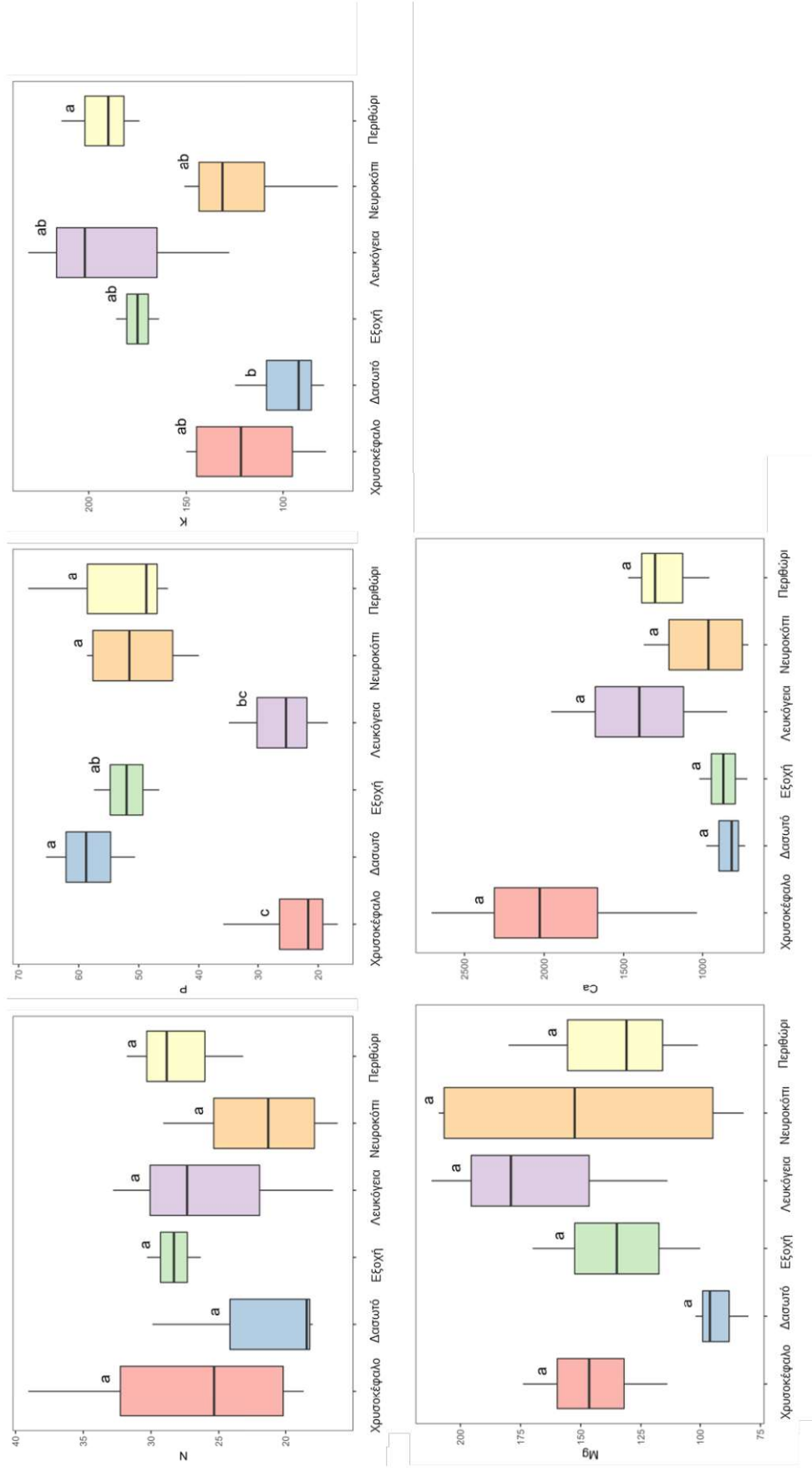
**Εικόνα 4.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους κατά την περίοδο της άνοιξης στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα οργανική ουσία (%), την εδαφική αλατότητα (mS/cm), τα νιτρικά (ppm), και το pH.



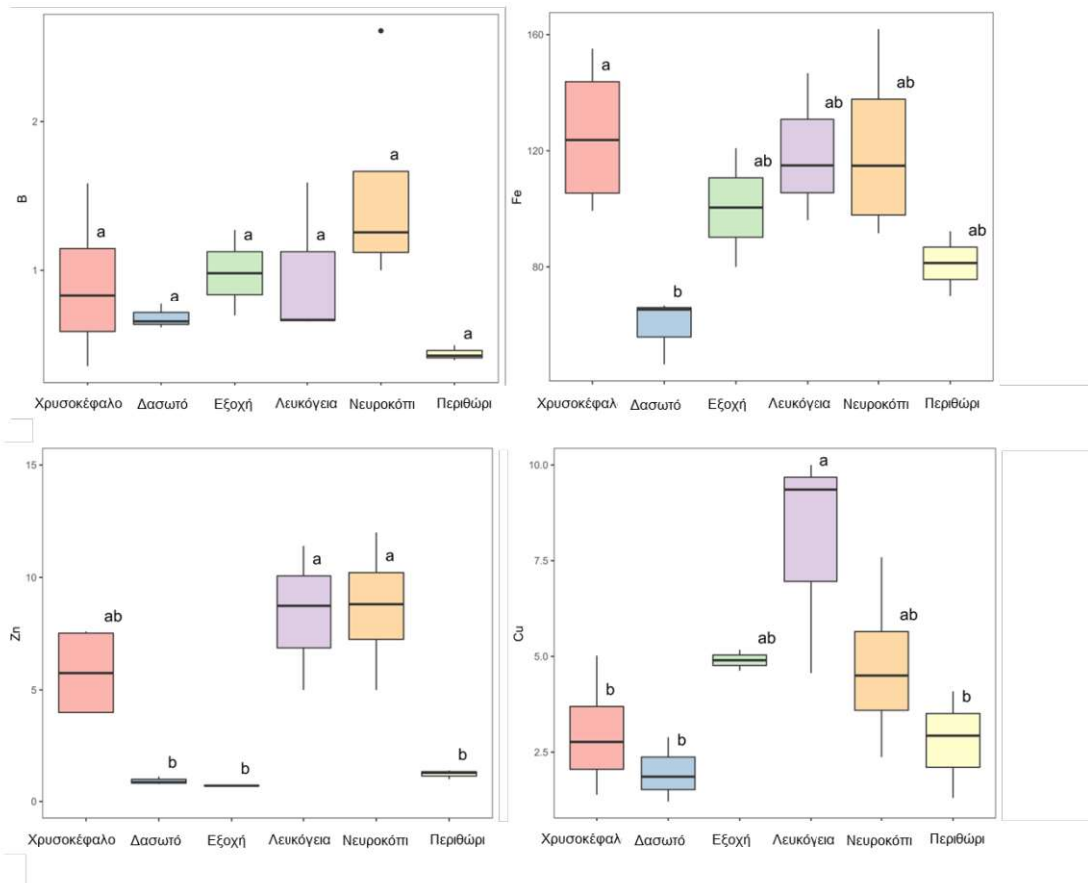
**Εικόνα 5.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους κατά την περίοδο του φθινοπώρου στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα οργανική ουσία (%), την εδαφική αλατότητα (mS/cm), τα νιτρικά (ppm), και το pH.



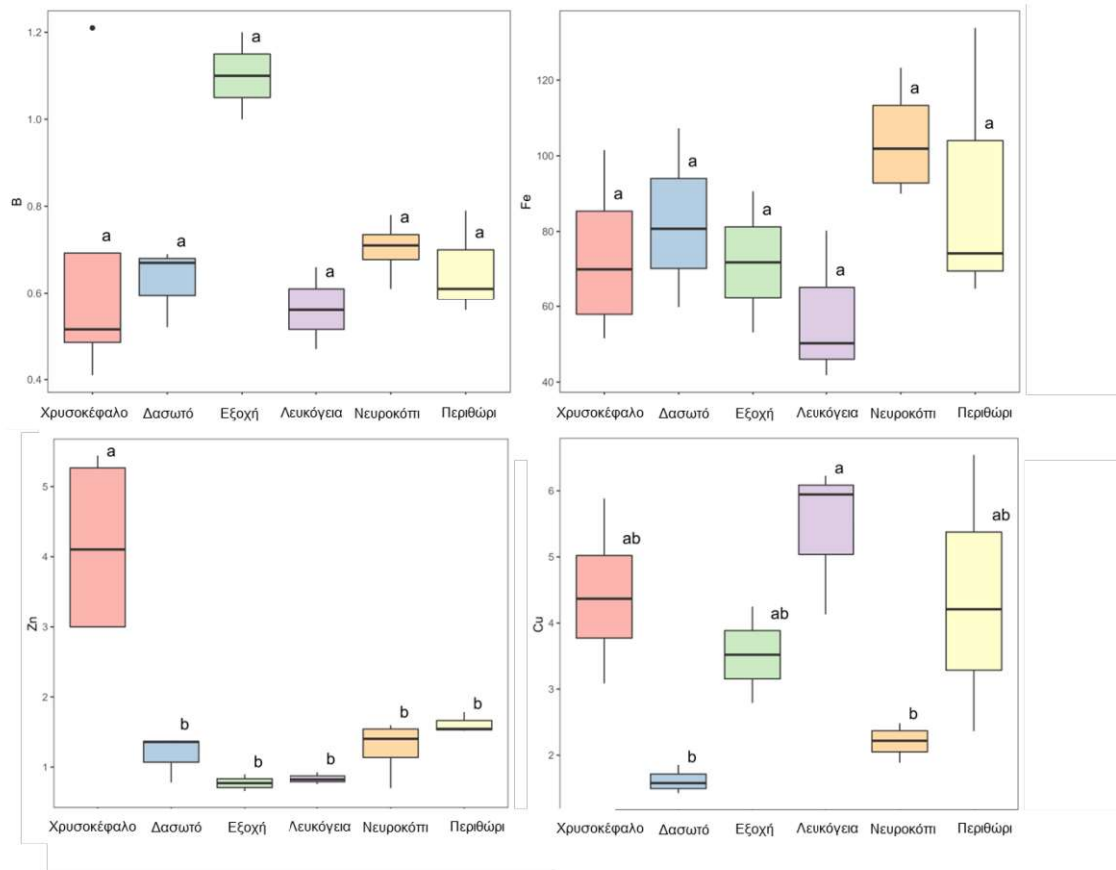
**Εικόνα 6.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε μακροστοιχεία κατά την περίοδο της άνοιξης στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (ppm) σε N, P, K, Mg, Ca.



**Εικόνα 7.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε μακροστοιχεία κατά την περίοδο του φθινοπώρου στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (ppm) σε N, P, K, Mg, Ca.



**Εικόνα 8.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε μικροστοιχεία κατά την περίοδο της άνοιξης στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (ppm) σε B, Fe, Zn, και Cu.

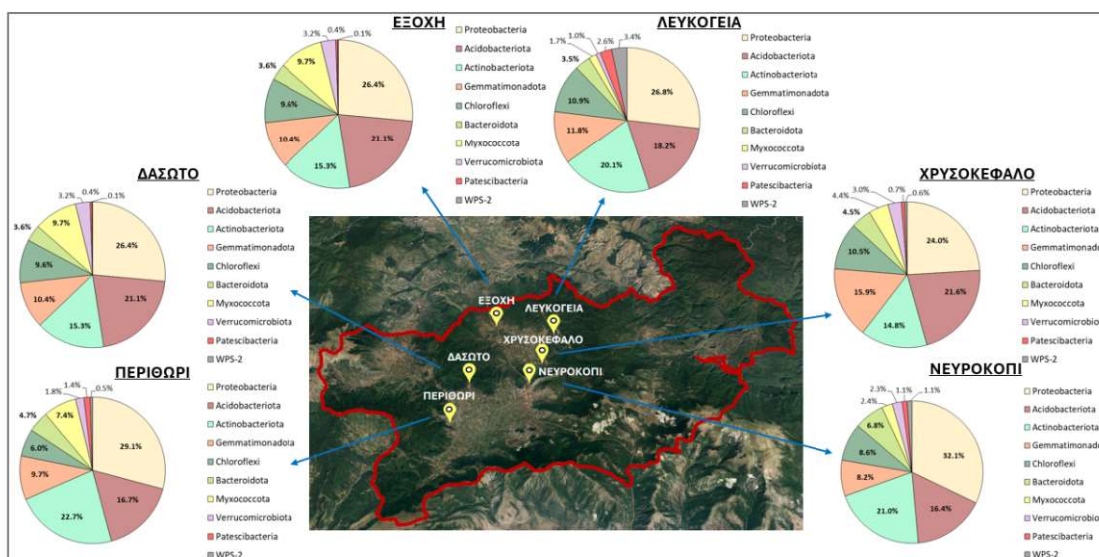


**Εικόνα 9.** Θηκογράμματα που απεικονίζουν τη διακύμανση σε μικροστοιχεία κατά την περίοδο του φθινοπώρου στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα. Οι ιδιότητες περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα (ppm) σε B, Fe, Zn, και Cu.

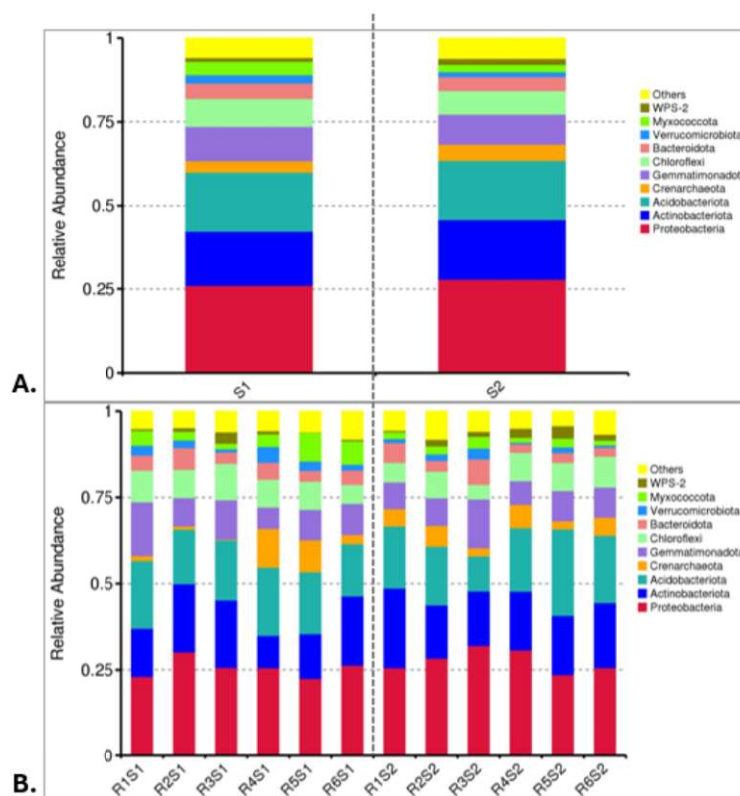
## Σύνθεση βακτηριακών κοινοτήτων

Οι **Εικόνες 10** και **11** προσφέρουν μια λεπτομερή απεικόνιση του μικροβιακού πληθυσμού που υπάρχει στις έξι διαφορετικές περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα, αποκαλύπτοντας τη σύνθεση και τη σχετική αφθονία των βακτηριακών φύλων. Η μεταταξονομική ανάλυση στα κυκλικά διαγράμματα και τα διαγράμματα ράβδων, παρέχει μια βαθύτερη κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων που διαβιούν σε κάθε περιοχή.

Η ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων σε επίπεδο φύλου αποκάλυψε μια εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας της Δράμας. Παρόλο που υπήρχαν κάποιες διακυμάνσεις στις σχετικές αφθονίες, εννιά βακτηριακά φύλα ήταν παρόντα σε όλες τις περιοχές, ανεξάρτητα από την εποχή: Proteobacteria, Acidobacteriota, Actinobacteriota, Gemmatimonadota, Chloroflexi, Bacteroidota, Myxococcota, Verrucomicrobiota, και Patescibacteria. Αυτό υποδεικνύει ότι αυτά τα συγκεκριμένα φύλα μπορεί να αποτελούν βασικά στοιχεία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους της πατάτας στην περιοχή. Επιπλέον, το φύλο WPS-2 ήταν επίσης κοινό και βρέθηκε σε όλες τις τοποθεσίες.



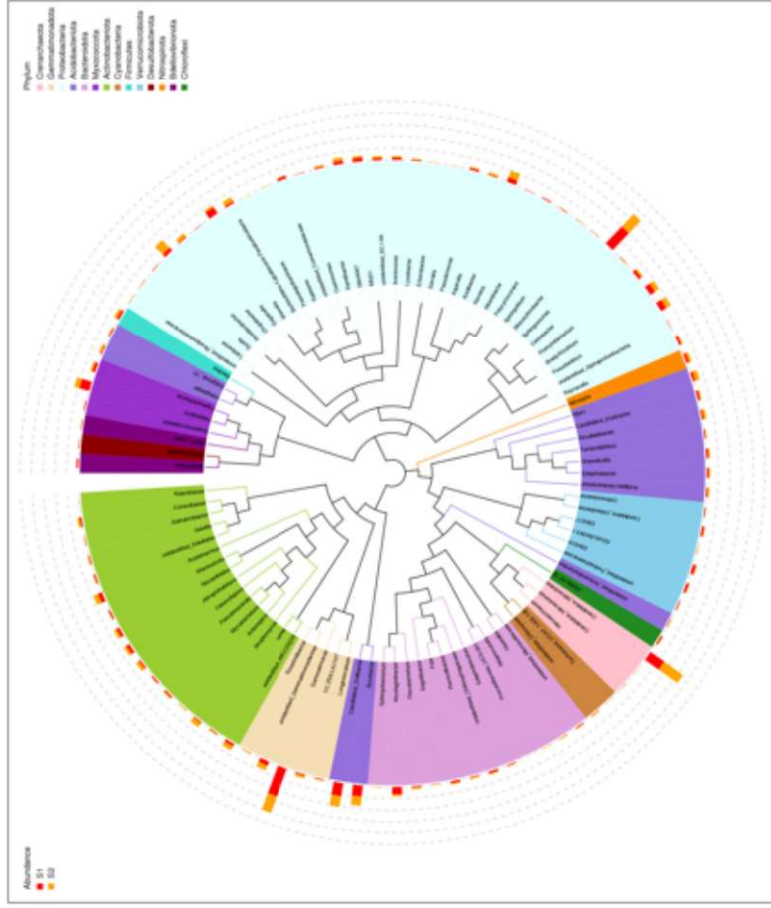
**Εικόνα 10.** Μεταταξονομική κατάταξη μεταξύ των έξι περιοχών της Δράμας (Χρυσοκέφαλο, Νευροκόπι, Λευκόγεια, Δασωτό, Εξοχή και Περιθώρι). Τα κυκλικά διαγράμματα παρουσιάζουν τις κορυφαίες ταξινομημένες ομάδες σε επίπεδο φύλου για τις έξι περιοχές.



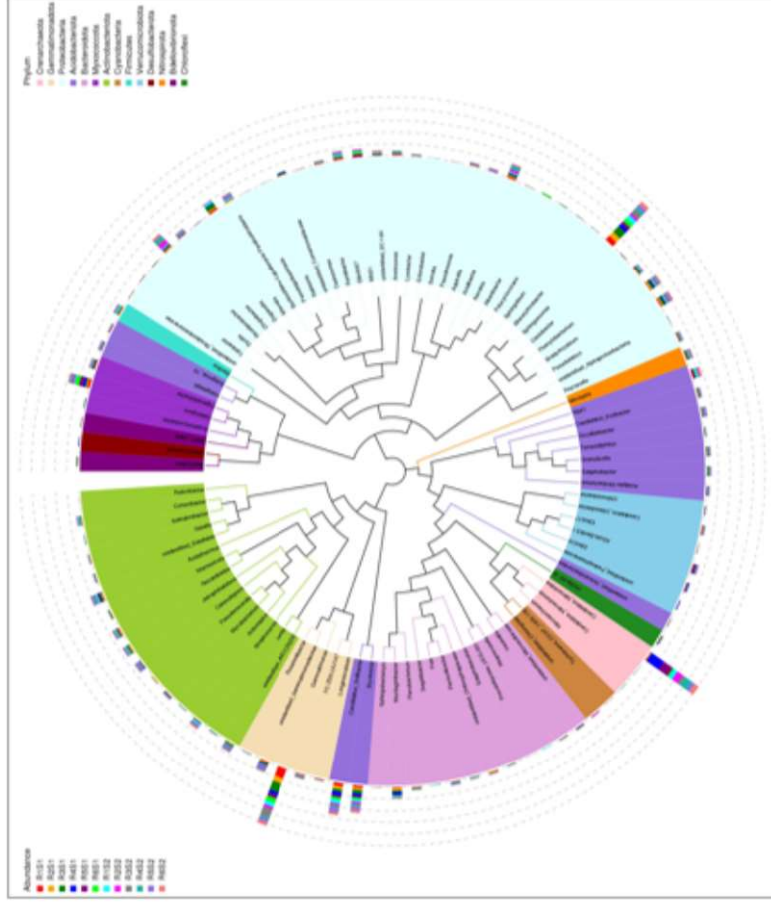
**Εικόνα 11.** Α-Β. Διαγράμματα συσσωρευμένων ράβδων με την σχετική αφθονία των 10 κορυφαίων φύλων μεταξύ των 6 περιοχών την άνοιξη (S1) και το φθινόπωρο (S2). Αυτή η απεικόνιση παρέχει μια σύγκριση της σχετικής αφθονίας των βακτηριακών φύλων μεταξύ των δυο δειγματοληψιών, υποδεικνύοντας πιθανές εποχιακές διακυμάνσεις στα κυρίαρχα βακτήρια.

Η **Εικόνα 12** προσφέρει μια λεπτομερή ανάλυση των βακτηριακών γενών που βρίσκονται στις περιοχές καλλιέργειας πατάτας, εξετάζοντας τόσο την επίδραση της εποχής όσο και τη γεωγραφική διακύμανση. Στο δενδρόγραμμα που βασίζεται στην εποχή (**Εικόνα 12Α**), αποκαλύπτεται μια ενδιαφέρουσα εικόνα των κορυφαίων 100 βακτηριακών γενών που σχετίζονται με την άνοιξη και το φθινόπωρο. Επιπλέον, το δενδρόγραμμα που βασίζεται στην περιοχή (**Εικόνα 12Β**) παρέχει μια γεωγραφική προοπτική, παρουσιάζοντας τα πιο κοινά βακτηριακά γένη σε κάθε τοποθεσία.

Παρόλο που υπήρχαν κάποιες διακυμάνσεις στη σχετική αφθονία, εντοπίστηκαν κοινά γένη βακτηρίων σε όλες τις περιοχές, ανεξάρτητα από την εποχή. Αυτά τα γένη περιλάμβαναν μια ποικιλία μικροοργανισμών, υποδεικνύοντας ότι αποτελούν πιθανά βασικά στοιχεία της μικροβιακής κοινότητας που σχετίζεται με την καλλιέργεια της πατάτας στην περιοχή. Η παρουσία αυτών των κοινών γενών υποδεικνύει ότι μπορεί να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις διαδικασίες του εδάφους και στην αλληλεπίδραση με τα φυτά της πατάτας, ανεξάρτητα από τις γεωγραφικές και εποχιακές διαφορές. Ενώ αναμένεται κάποια διακύμανση λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων, τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν μια γενική συνοχή στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων.



**A.**

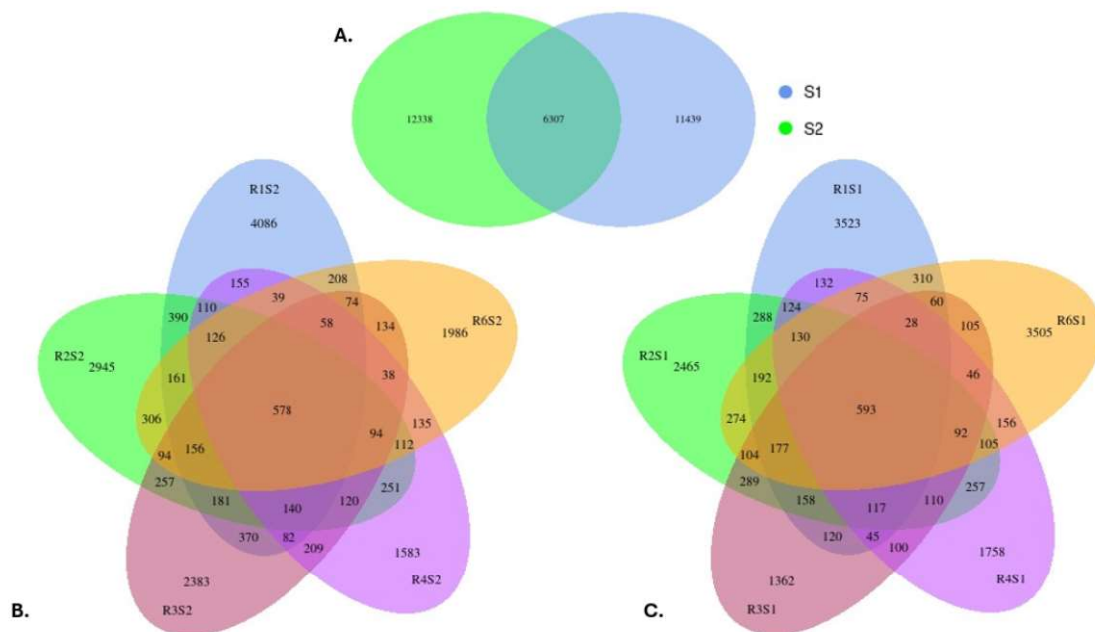


**B.**

**Εικόνα 12.** Α. Δενδρόγραμμα βασισμένο στην εποχή δειγματοληψίας εδάφους (Άνοιξη, Φθινόπωρο): Η Εικόνα 12Α απεικονίζει τα κορυφαία 100 γένη βακτηρίων που βρέθηκαν στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας κατά την άνοιξη (S1) και το φθινόπωρο (S2). Το δενδρόγραμμα παρέχει μια επισκόπηση της σχετικής αφθονίας αυτών των γενών μεταξύ των εποχών, με τα χρώματα να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές εποχές (Κόκκινο S1-Άνοιξη, Πορτοκαλί S2-Φθινόπωρο). Β. Δενδρόγραμμα βασισμένο στην περιοχή: Η Εικόνα 12B παρουσιάζει τα κορυφαία 100 γένη βακτηρίων σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Το δενδρόγραμμα απεικονίζει στα πιο κονιά βακτηριακά γένη σε κάθε τοποθεσία, με τα χρώματα να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές περιοχές. Αυτή η απεικόνιση αποκαλύπτει τις γεωγραφικές διακυμάνσεις στα βακτηριακά γένη που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας.

Οι **Εικόνες 13A** και **13B** χρησιμοποιούν διαγράμματα Venn για να απεικονίσουν με σαφή και κατανοητό τρόπο την κατανομή των βακτηριακών κοινοτήτων στις περιοχές καλλιέργειας πατάτας, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή και τη δυναμική τους. Το διάγραμμα Venn για την άνοιξη και το φθινόπωρο (Εικόνα 13A) αποκαλύπτει τα κοινά και μοναδικά βακτηριακά taxa μεταξύ των εποχών, υποδεικνύοντας πιθανές εποχιακές διακυμάνσεις στη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων. Επιπλέον, τα διαγράμματα Venn για κάθε περιοχή (Εικόνα 13B) προσφέρουν μια λεπτομερή ματιά στις γεωγραφικές διακυμάνσεις, παρουσιάζοντας τα μοναδικά και κοινά taxa σε κάθε τοποθεσία.

Η ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων κατά την άνοιξη και το φθινόπωρο αποκάλυψε λεπτομέρειες σχετικά με τη δομή και τη δυναμική τους. Κατά την άνοιξη (S1), εντοπίστηκαν συνολικά 12.338 μοναδικά βακτηριακά taxa, ενώ το φθινόπωρο (S2) είχε ελαφρώς μικρότερο αριθμό, με 11.439 μοναδικά taxa. Ωστόσο, το πιο αξιοσημείωτο εύρημα ήταν ο μεγάλος αριθμός κοινών βακτηρίων μεταξύ των εποχών, με **6.307 taxa** που βρέθηκαν και την άνοιξη και το φθινόπωρο. Αυτό υποδεικνύει μια βασική μικροβιακή κοινότητα που παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από τις εποχιακές αλλαγές.



**Εικόνα 13.** Α. Διάγραμμα Venn για την Άνοιξη και το Φθινόπωρο: Η Εικόνα 13Α παρουσιάζει ένα διάγραμμα Venn που απεικονίζει την κατανομή των OTUs (Operational Taxonomic Units) στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας κατά την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Οι επικαλυπτόμενοι κύκλοι υποδεικνύουν τα κοινά OTUs μεταξύ των εποχών, ενώ τα μοναδικά OTUs για κάθε εποχή εμφανίζονται στα μη επικαλυπτόμενα τμήματα. Αυτή η απεικόνιση παρέχει μια άμεση οπτική σύγκριση της δομής της βακτηριακής κοινότητας και των δυναμικών της μεταξύ των εποχών. Β. Διαγράμματα Venn για Άνοιξη και Φθινόπωρο ανά Περιοχή: Η Εικόνα 13B αποτελείται από δύο διαγράμματα Venn, το ένα για την Άνοιξη (B) και το άλλο για το Φθινόπωρο (C), τα οποία απεικονίζουν την κατανομή των OTUs σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Τα διαγράμματα αποκαλύπτουν τις μοναδικές και κοινές OTUs σε κάθε περιοχή, προσφέροντας μια λεπτομερή ματιά στις βακτηριακές κοινότητες που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες και εποχές.

Η **Εικόνα 14** παρέχει παρουσίαση δυναμικές αλλαγές στα βακτηριακά γένη μεταξύ της άνοιξης και του φθινοπώρου, αποκαλύπτοντας πιθανές εποχιακές διακυμάνσεις στη μικροβιακή κοινότητα. Η ανάλυση t-test, που απεικονίζεται στο διάγραμμα, συγκρίνει

τα επίπεδα αφθονίας των βακτηριακών γενών μεταξύ των εποχών. Τα σημεία στο διάγραμμα προσφέρουν μια άμεση οπτική απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διαφορών. Τα γένη που βρίσκονται πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή ( $p < 0,05$ ) παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διακυμάνσεις στην αφθονία τους μεταξύ της άνοιξης και του φθινοπώρου. Τα γένη προς τα δεξιά του κατακόρυφου άξονα ευδοκίμουν περισσότερο το φθινόπωρο, υποδεικνύοντας μια πιθανή προτίμηση στις πιο δροσερές συνθήκες, ενώ τα γένη προς τα αριστερά ευδοκίμουν περισσότερο την άνοιξη.

Όσον αφορά το R1S1 (δείγμα R1, Άνοιξη) και το R1S2 (δείγμα R1, Φθινόπωρο) τα βακτηριακά γένη και οι διαφορές τους παρουσιάζονται στην **Εικόνα 14Α**. Εμφανίζονται τα γένη *Gemmatimonas* περισσότερο στο R1S1 ενώ τα γένη *Streptomyces* και *Conexibacter*, *Kitasatospora* και *Raenibacillus*, εμφανίζονται πιο άφθονα στο R1S2. Τέλος, το *Opitutus* είναι πιο άφθονο στο R1S1. Τα γένη πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή, συμπεριλαμβανομένων των *Gemmatimonas* και του *Opitutus*, ήταν πιο άφθονα την άνοιξη, υποδεικνύοντας μια προτίμηση για πιο θερμές συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, τα γένη *Streptomyces*, *Conexibacter*, *Kitasatospora* και *Raenibacillus* ευδοκίμησαν περισσότερο το φθινόπωρο, προτιμώντας ένα πιο δροσερό περιβάλλον.

Όσον αφορά το δείγμα R2S1 σε σχέση με το R2S2 και για τα βακτηριακά γένη *Massilia*, *Phenylobacterium*, *Caulobacter* και *Arthrobacter*, φαίνεται να είναι πιο άφθονα και με στατιστικά σημαντική διαφορά την άνοιξη (**Εικόνα 14Β**).

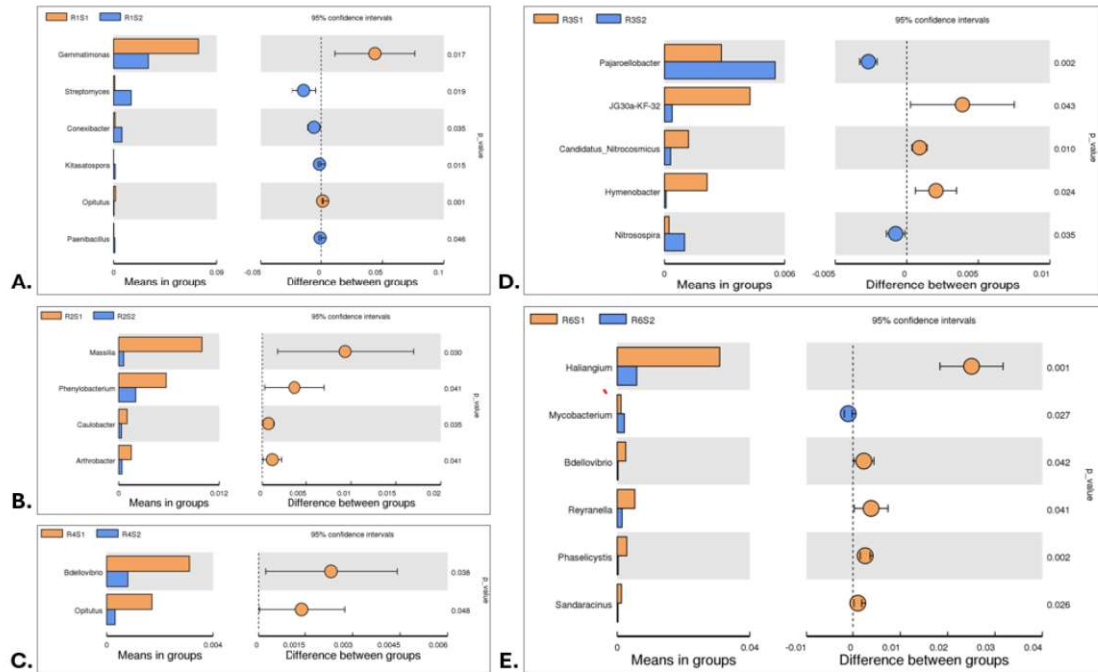
Για το R4S1 σε σχέση με το R4S2, τα γένη *Bdellovibrio* και *Opitutus* φαίνεται να είναι πιο άφθονα στα δείγματα της άνοιξης (**Εικόνα 14C**), υποδεικνύοντας συγκεκριμένες προτιμήσεις στις περιβαλλοντικές συνθήκες της εποχής.

Όσον αφορά τα R3S1 και R3S2, τα πιο άφθονα βακτήρια με στατιστικά σημαντικές διαφορές είναι τα *Pajaroellobacter*, *JG30a-KF-32*, *Candidatus Nitrocosmicus*, *Hymenobacter* και *Nitrospira* (**Εικόνα 14D**). Πιο άφθονα την Άνοιξη ήταν τα *JG30a-KF-32*, *Candidatus Nitrocosmicus* και *Hymenobacter*, ενώ για το Φθινόπωρο ήταν τα *Pajaroellobacter* και *Nitrospira*.

Τέλος, η ανάλυση των δειγμάτων R6 (Άνοιξη) και R6 (Φθινόπωρο), αποκάλυψε ότι τα γένη *Haliangium*, *Bdellovibrio*, *Reyranella*, *Phaselicystis* και *Sandaracinus* ήταν πιο άφθονα την Άνοιξη, ενώ το γένος *Mycobacterium* ήταν πιο άφθονο κατά την περίοδο του Φθινοπώρου (**Εικόνα 14Ε**).

Η ανάλυση των δειγμάτων R1 έως R6, την άνοιξη και το φθινόπωρο, αποκάλυψε εποχιακές διακυμάνσεις στις μικροβιακές κοινότητες. Ειδικότερα, ορισμένα βακτηριακά γένη παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφθονία τους μεταξύ των εποχών. Για παράδειγμα, τα γένη *Gemmatimonas*, *Opitutus* και *Haliangium* ήταν πιο άφθονα την άνοιξη, υποδεικνύοντας προτίμηση σε πιο θερμές συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, βακτηριακά γένη όπως τα *Streptomyces*, *Conexibacter*, *Pajaroellobacter* και *Nitrospira* ευδοκίμησαν περισσότερο το φθινόπωρο, προτιμώντας ένα πιο δροσερό περιβάλλον.

Επιπλέον, ορισμένα βακτηριακά γένη παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές στην αφθονία τους μέσα στην ίδια εποχή. Για παράδειγμα, τα *Massilia*, *Phenylobacterium*, *Caulobacter* και *Arthrobacter* ήταν πιο άφθονα σε ορισμένα δείγματα της άνοιξης, ενώ τα *Bdellovibrio*, *Candidatus Nitrocosmicus* και *Hymenobacter* παρουσίασαν υψηλότερη αφθονία σε δείγματα του φθινοπώρου.



**Εικόνα 14.** T-test ανάλυση για σύγκριση της αφθονίας βακτηριακών γενών: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης t-test που πραγματοποιήθηκε για να συγκριθούν τα επίπεδα αφθονίας βακτηριακών γενών μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Τα σημεία στο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν τα διάφορα βακτηριακά γένη, με τον οριζόντιο άξονα να υποδεικνύει τις τιμές p και τον κατακόρυφο άξονα να αντιπροσωπεύει το λογάριθμο της αναλογίας αφθονίας ( $\log_2$  fold change) μεταξύ των εποχών. Τα γένη που βρίσκονται πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή ( $p < 0,05$ ) θεωρούνται στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των εποχών. Τα γένη προς τα δεξιά του κατακόρυφου άξονα είναι πιο άφθονα το φθινόπωρο, ενώ τα γένη προς τα αριστερά είναι πιο άφθονα την άνοιξη. Αυτή η ανάλυση αποκαλύπτει δυναμικές αλλαγές στα βακτηριακά γένη που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας μεταξύ των εποχών.

## Ανάλυση άλφα-ποικιλότητας

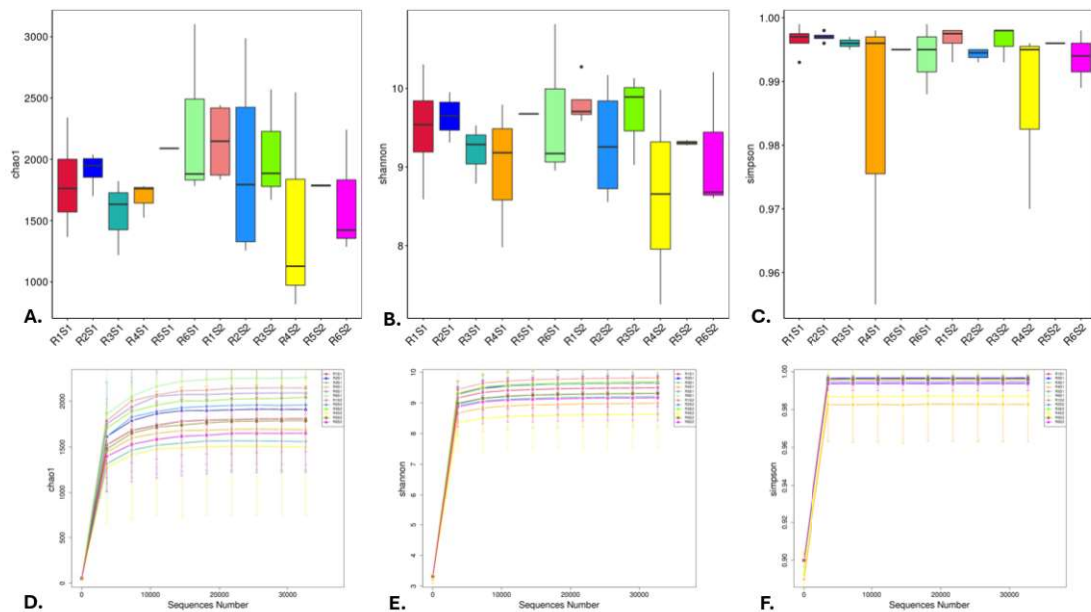
Οι **Εικόνες 15** και **16** προσφέρουν μια περιεκτική ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας και της επάρκειας της δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας διάφορους δείκτες. Οι δείκτες Chao, Shannon και Simpson χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν τη μικροβιακή ποικιλότητα, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τον αριθμό των ειδών όσο και την αφθονία και την ομοιομορφία τους. Τα θηκογράμματα και οι καμπύλες rarefaction παρέχουν μια άμεση οπτική σύγκριση μεταξύ των περιοχών και των εποχών. Οι **Εικόνες 15A, 15D** και **16A, 16D**, που χρησιμοποιούν τον δείκτη Chao, αποκαλύπτουν τη σύγκριση της πλούσιας ποικιλότητας μεταξύ των περιοχών κατά την άνοιξη και το φθινόπωρο, αντίστοιχα, ενώ οι καμπύλες rarefaction επιβεβαιώνουν την επάρκεια της δειγματοληψίας. Οι εικόνες **15B, 15E** και **16B, 16E** χρησιμοποιούν τον δείκτη Shannon και προσφέρουν πληροφορίες τόσο για την αφθονία όσο και για την ομοιομορφία των ειδών, παρέχοντας μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας. Οι εικόνες **15C, 15F** και **16C, 16F** χρησιμοποιούν τον δείκτη Simpson, ο οποίος εξετάζει την πιθανότητα εύρεσης του ίδιου είδους, προσφέροντας μια διαφορετική προοπτική στην ποικιλότητα των βακτηρίων.

Αναφορικά με τον δείκτη Chao (**Εικόνα 15A** και **15D**), ο οποίος εκτιμά τον πλούτο των ειδών (παρατηρηθέντων και μη παρατηρηθέντων), τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, με εξαίρεση τα R5 και R6, όλα τα δείγματα παρουσίαζαν μεγαλύτερη εκτιμώμενη ποικιλότητα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου σε σύγκριση με την άνοιξη.

Η ανάλυση του δείκτη Shannon, που απεικονίζεται στην **Εικόνα 15B** και **15E**, παρέχει πληροφορίες σχετικά με την άλφα ποικιλότητα, λαμβάνοντας υπόψη τόσο την αφθονία

όσο και την ομοιομορφία των βακτηριακών ειδών. Όσον αφορά τα δείγματα R3 και R4, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μεγαλύτερη ποικιλότητα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, υποδεικνύοντας ότι η βακτηριακή κοινότητα μπορεί να είναι πιο ποικίλη σε αυτές τις περιοχές κατά τη διάρκεια των πιο δροσερών εποχών. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα R4, R5 και R6 παρουσίασαν υψηλότερη ποικιλότητα την άνοιξη, υποδεικνύοντας μια δυναμική αλλαγή στην ποικιλομορφία των βακτηρίων ανάλογα με την εποχή. Τα υπόλοιπα δείγματα, R1 και R2, εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα ποικιλομορφίας και στις δύο εποχές, υποδεικνύοντας μια πιο σταθερή βακτηριακή κοινότητα ανεξάρτητα από τις εποχιακές αλλαγές.

Η εξέταση του δείκτη Simpson, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 15C** και **15F**, προσφέρει επιπλέον πληροφορίες, σχετικά με την άλφα ποικιλότητα, μετρώντας την πιθανότητα δύο τυχαία επιλεγμένα άτομα να ανήκουν στο ίδιο είδος. Τα αποτελέσματα για τα δείγματα R3 και R6 υποδεικνύουν μεγαλύτερη ποικιλότητα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, υποδηλώνοντας ότι η βακτηριακή κοινότητα σε αυτές τις περιοχές τείνει να είναι πιο ποικίλη κατά τη διάρκεια αυτής της εποχής. Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα R2, R4 και R5 παρουσίασαν υψηλότερη ποικιλότητα την άνοιξη, υποδεικνύοντας μια δυναμική απάντηση στην αλλαγή των εποχών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το δείγμα R1, το οποίο φαίνεται να έχει παρόμοια επίπεδα ποικιλομορφίας και στις δύο εποχές, υποδεικνύοντας ότι η βακτηριακή κοινότητα σε αυτή την περιοχή μπορεί να είναι ανθεκτική στις εποχιακές διακυμάνσεις.



**Εικόνα 15.** A, D. Chao Index: Η Εικόνα 15A απεικονίζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Chao μεταξύ των έξι περιοχών καλλιέργειας πατάτας κατά την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Τα θηκογράμματα παρέχουν μια σύγκριση της εκτιμώμενης πλούσιας ποικιλότητας (άθροισμα των παρατηρηθέντων και μη παρατηρηθέντων ειδών) μεταξύ των περιοχών, ενώ οι καμπύλες rarefaction δείχνουν τον βαθμό επάρκειας της δειγματοληψίας. B, E. Shannon Index: Η Εικόνα 15B παρουσιάζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Shannon, ο οποίος λαμβάνει υπόψη τόσο την αφθονία όσο και την ομοιομορφία των ειδών. Τα θηκογράμματα συγκρίνουν την προβλεπόμενη ποικιλότητα των ειδών μεταξύ των περιοχών κατά την Άνοιξη και το Φθινόπωρο, ενώ οι καμπύλες rarefaction αξιολογούν την επάρκεια της δειγματοληψίας. C, F. Simpson Index: Η Εικόνα 15C απεικονίζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Simpson, ο οποίος μετρά την ποικιλότητα με βάση την πιθανότητα δύο τυχαία επιλεγμένα άτομα να ανήκουν στο ίδιο είδος. Τα θηκογράμματα συγκρίνουν την προβλεπόμενη πιθανότητα αυτή μεταξύ των περιοχών κατά την Άνοιξη και το Φθινόπωρο, ενώ οι καμπύλες rarefaction δείχνουν τον βαθμό στον οποίο η δειγματοληψία κατέγραψε επαρκώς την ποικιλότητα.

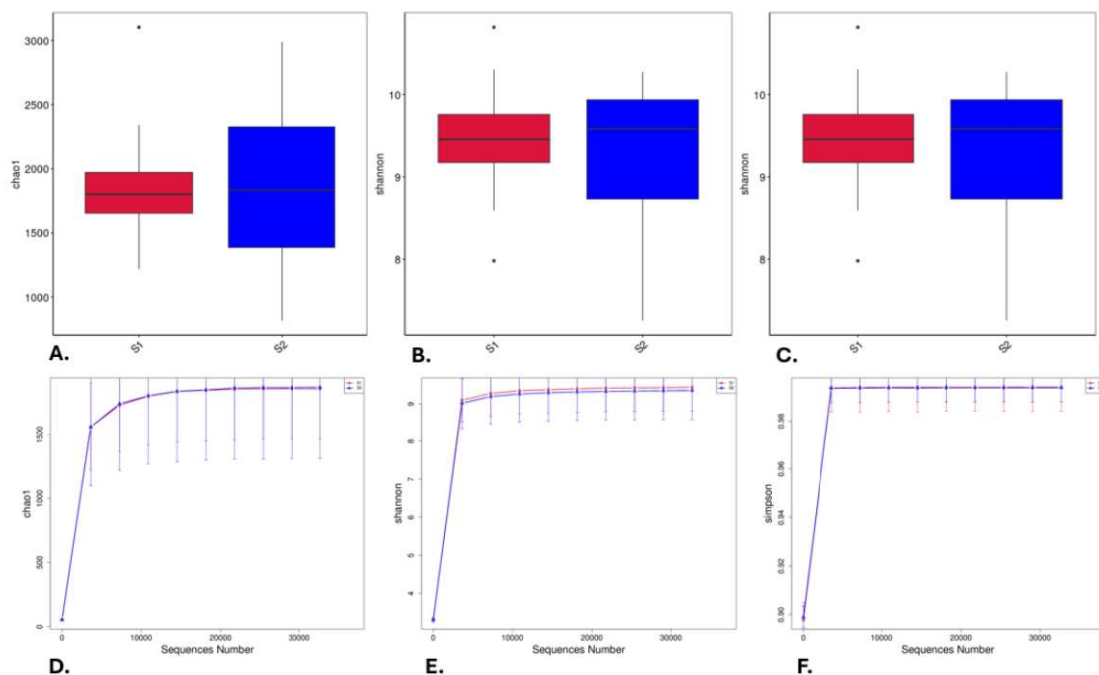
Η **Εικόνα 16** προσφέρει μια συνοπτική επισκόπηση της άλφα ποικιλότητας αποκλειστικά σε σχέση με τις εποχές, αποκαλύπτοντας πληροφορίες σχετικά με τις

βακτηριακές κοινότητες την άνοιξη και το φθινόπωρο. Και οι τρεις δείκτες - ο δείκτης Chao, ο δείκτης Shannon και ο δείκτης Simpson - παρουσιάζουν ανοδικές τάσεις και μεγαλύτερο εύρος τιμών κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου.

Ο δείκτης Chao, που απεικονίζεται στις υποεικόνες 16A και 16D, εκτιμά τον πλούτο των ειδών, συμπεριλαμβανομένων των μη παρατηρηθέντων. Τα θηκογράμματα και οι καμπύλες rarefaction υποδεικνύουν ότι η εκτιμώμενη ποικιλότητα των βακτηρίων είναι υψηλότερη και πιο ποικίλη κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου σε σύγκριση με την άνοιξη. Αυτό υποδεικνύει μια γενική τάση αυξημένης ποικιλότητας βακτηριακών ειδών καθώς οι εποχές κλίνουν προς το τέλος του έτους.

Ο δείκτης Shannon, που παρουσιάζεται στις υποεικόνες 16B και 16E, λαμβάνει υπόψη τόσο την αφθονία όσο και την ομοιομορφία των ειδών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προβλεπόμενη ποικιλότητα των βακτηρίων είναι υψηλότερη το φθινόπωρο, με τις καμπύλες rarefaction να τείνουν προς μια πλατό φάση, υποδηλώνοντας επαρκή δειγματοληψία. Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει την αυξημένη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία της βακτηριακής κοινότητας κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου.

Τέλος, ο δείκτης Simpson, που απεικονίζεται στις υποεικόνες 16C και 16F, μετρά την πιθανότητα δύο τυχαία επιλεγμένα άτομα να ανήκουν στο ίδιο είδος. Τα θηκογράμματα και οι καμπύλες rarefaction αποκαλύπτουν ότι η ποικιλότητα των βακτηρίων είναι υψηλότερη και πιο ποικίλη το φθινόπωρο. Αυτή η τάση είναι σταθερή και στους άλλους δείκτες, υποδεικνύοντας μια πιο δυναμική και ποικίλη μικροβιακή κοινότητα καθώς οι εποχές μεταβαίνουν από την άνοιξη στο φθινόπωρο.



**Εικόνα 16.** A, D. Chao Index: Η Εικόνα 16A απεικονίζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Chao κατά την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Τα θηκογράμματα παρέχουν μια σύγκριση της εκτιμώμενης πλούσιας ποικιλότητας (άθροισμα των παρατηρηθέντων και μη παρατηρηθέντων ειδών) μεταξύ των περιοχών, ενώ οι καμπύλες rarefaction δείχνουν τον βαθμό επάρκειας της δειγματοληψίας. B, E. Shannon Index: Η Εικόνα 16B παρουσιάζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Shannon, ο οποίος λαμβάνει υπόψη τόσο την αφθονία όσο και την ομοιομορφία των ειδών. Τα θηκογράμματα συγκρίνουν την προβλεπόμενη ποικιλότητα των ειδών μεταξύ των περιοχών κατά την Άνοιξη και το Φθινόπωρο, ενώ οι καμπύλες rarefaction αξιολογούν την επάρκεια της δειγματοληψίας. C, F. Simpson Index: Η Εικόνα 16C απεικονίζει θηκογράμματα και καμπύλες rarefaction για τον δείκτη Simpson, ο οποίος μετρά την ποικιλότητα με βάση την πιθανότητα δύο τυχαία επιλεγμένα άτομα να ανήκουν στο ίδιο είδος. Τα θηκογράμματα συγκρίνουν την προβλεπόμενη πιθανότητα αυτή

μεταξύ των περιοχών κατά την Άνοιξη και το Φθινόπωρο, ενώ οι καμπύλες rarefaction δείχνουν τον βαθμό στον οποίο η δειγματοληψία κατέγραψε επαρκώς την ποικιλότητα.

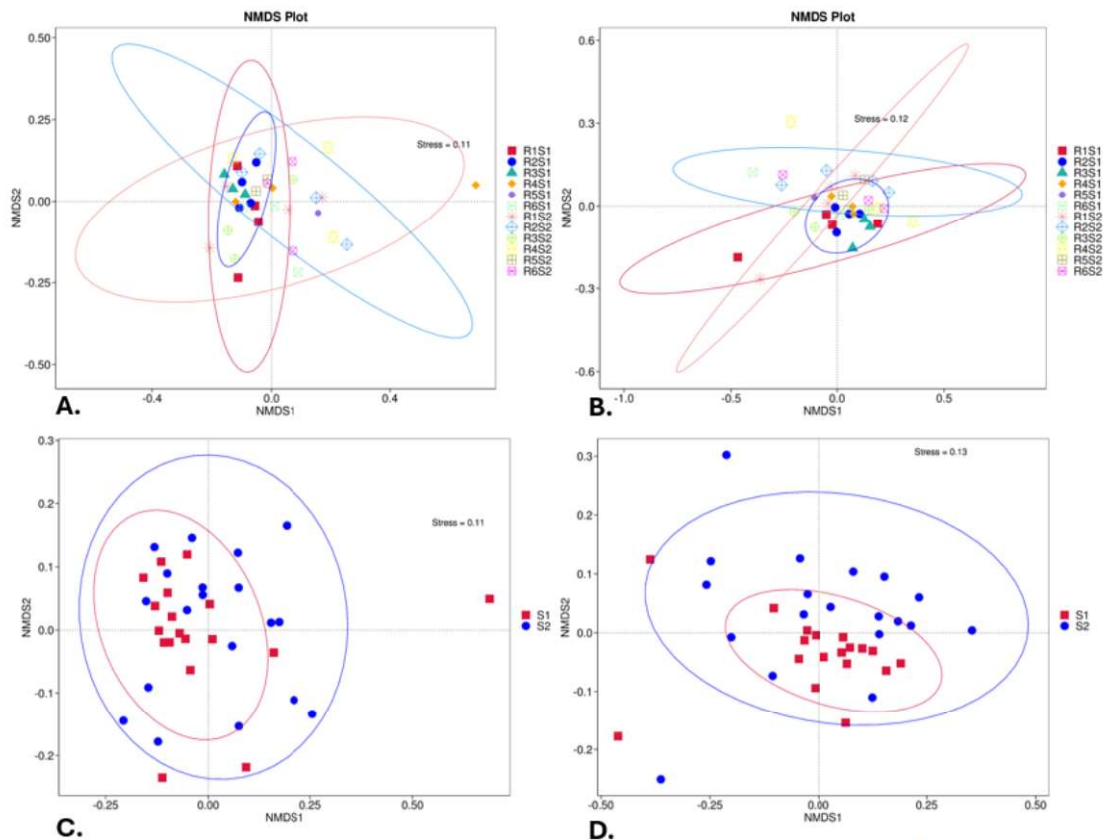
## Ανάλυση βήτα-ποικιλότητας

Η **Εικόνα 17** παρέχει μια λεπτομερή ανάλυση της β-ποικιλότητας, εξερευνώντας τη δομή και τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας χρησιμοποιώντας NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) και τις αποστάσεις Weighted και Unweighted Unifrac.

Στην **Εικόνα 17A** και **17D**, η ανάλυση NMDS με την απόσταση Weighted Unifrac αποκαλύπτει μια ενδιαφέρουσα κατανομή των δειγμάτων. Τα περισσότερα σημεία τείνουν να συσσωρεύονται κοντά στο κέντρο του διαγράμματος, υποδεικνύοντας ομοιότητες στη δομή της βακτηριακής κοινότητας. Ωστόσο, το δείγμα R4S1 στην **Εικόνα 17A** και το δείγμα R4S2 στην **Εικόνα 17B** φαίνονται να αποκλίνουν από τα υπόλοιπα, υποδεικνύοντας μοναδικά χαρακτηριστικά στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας σε αυτές τις συγκεκριμένες περιοχές και εποχές.

Η **Εικόνα 17B** και **17E**, που χρησιμοποιούν την απόσταση Unweighted Unifrac, εστιάζουν στην παρουσία ή απουσία των OTUs. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν μια πιο ποικίλη κατανομή, υποδεικνύοντας διαφορές στη δομή της βακτηριακής κοινότητας μεταξύ των περιοχών καλλιέργειας πατάτας. Το R4S2 στην **Εικόνα 17B** φαίνεται να αποκλίνει περαιτέρω, υποδεικνύοντας σημαντικές αλλαγές στην παρουσία συγκεκριμένων OTUs σε αυτή την περιοχή κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου.

Οι **Εικόνες 17C** και **17F** παρέχουν μια σύγκριση ανά εποχή, χρησιμοποιώντας τις αποστάσεις Weighted και Unweighted Unifrac αντίστοιχα. Αυτές οι απεικονίσεις υπογραμμίζουν πιθανές εποχιακές αλλαγές στη δομή και σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας. Η ανάλυση ανά εποχή αποκαλύπτει μια σαφή τάση για διασπορά των δειγμάτων μεταξύ άνοιξης και φθινοπώρου, υποδεικνύοντας δυναμικές αλλαγές στη βακτηριακή κοινότητα που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας σε διαφορετικές εποχές.

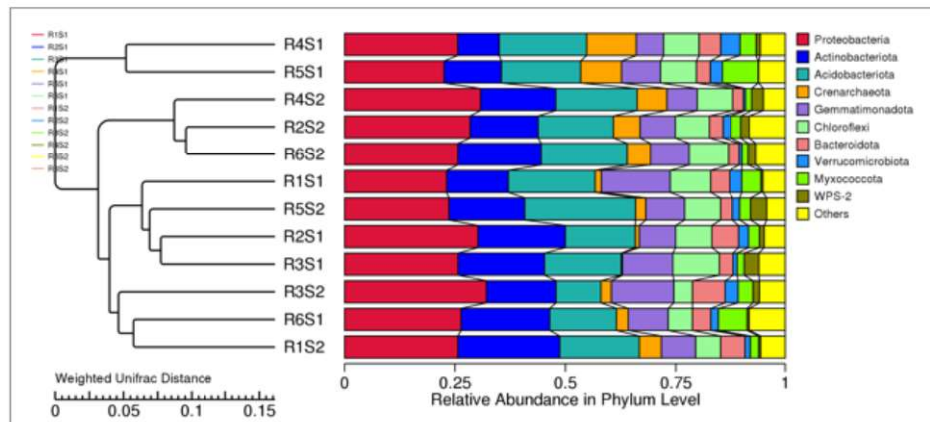


**Εικόνα 17.** NMDS ανάλυση για την αξιολόγηση της δομής της βακτηριακής κοινότητας: A. NMDS με Weighted Unifrac απόσταση: Η Εικόνα 17A παρουσιάζει μια ανάλυση NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) χρησιμοποιώντας την απόσταση Weighted Unifrac μεταξύ των έξι περιοχών καλλιέργειας πατάτας κατά την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Η ανάλυση αυτή λαμβάνει υπόψη τις αφθονίες των OTUs και παρέχει μια οπτική αναπαράσταση της δομής της βακτηριακής κοινότητας, με κάθε σύμβολο να αντιπροσωπεύει μια περιοχή. B. NMDS με Unweighted Unifrac απόσταση: Η Εικόνα 17B απεικονίζει την ανάλυση NMDS χρησιμοποιώντας την απόσταση Unweighted Unifrac, η οποία δίνει έμφαση στην παρουσία/απουσία των OTUs. Η απεικόνιση αποκαλύπτει τη δομή της βακτηριακής κοινότητας με βάση την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων OTUs μεταξύ των περιοχών κατά την Άνοιξη και το Φθινόπωρο. C. NMDS με Weighted Unifrac απόσταση ανά Εποχή: Η Εικόνα 17C παρουσιάζει την ανάλυση NMDS με βάση την απόσταση Weighted Unifrac, χωρισμένη ανά εποχή. Η απεικόνιση παρέχει μια σύγκριση της δομής της βακτηριακής κοινότητας μεταξύ της Άνοιξης (S1) και του Φθινοπώρου (S2), υποδεικνύοντας πιθανές εποχιακές αλλαγές στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας. D. NMDS με Unweighted Unifrac απόσταση ανά Εποχή: Η Εικόνα 17D απεικονίζει την ανάλυση NMDS χρησιμοποιώντας την απόσταση Unweighted Unifrac, επίσης χωρισμένη ανά εποχή. Αυτή η απεικόνιση αποκαλύπτει τις διαφορές στην παρουσία/απουσία των OTUs μεταξύ της Άνοιξης και του Φθινοπώρου, υπογραμμίζοντας δυναμικές αλλαγές στη βακτηριακή κοινότητα που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας.

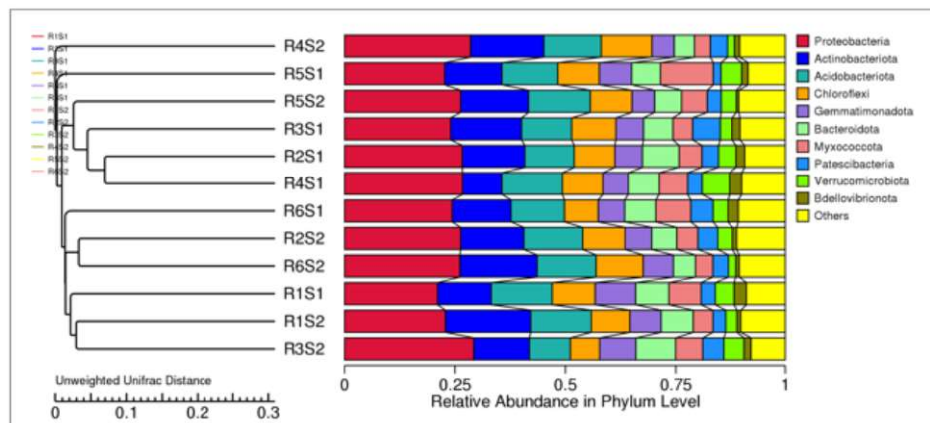
## Ανάλυση φυλογενετικών δέντρων με τη μέθοδο UPGMA

Η **Εικόνα 18** παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) για την εξερεύνηση της δομής της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου. Στην **Εικόνα 18A**, το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας την απόσταση Weighted Unifrac αποκαλύπτει δύο διακριτές ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα δείγματα R4S1 και R5S1, υποδεικνύοντας ομοιότητες στη δομή της βακτηριακής κοινότητας σε αυτές τις συγκεκριμένες περιοχές. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα υπόλοιπα δείγματα, υποδεικνύοντας κάποιες διαφορές στη σύνθεση των βακτηριακών φύλων. Η **Εικόνα 18B**, που χρησιμοποιεί την απόσταση Unweighted Unifrac, επικεντρώνεται στην παρουσία ή απουσία των OTUs σε κάθε φύλο. Το δενδρόγραμμα αποκαλύπτει δύο ομάδες με κάποια αλληλεπικαλυπτόμενα δείγματα. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα

R4S2, R5S1, R5S2, R3S1, R2S1 και R4S1, υποδεικνύοντας ομοιότητες στη δομή της βακτηριακής κοινότητας που βασίζονται στην παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων OTUs. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τα υπόλοιπα δείγματα.



**A.**



**B.**

**Εικόνα 18.** Δενδρογράμματα UPGMA για την ανάλυση της δομής της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου: A. Δενδρογράμμα UPGMA με Weighted Unifrac απόσταση: Η Εικόνα 18A παρουσιάζει ένα δενδρογράμμα που δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την απόσταση Weighted Unifrac σε επίπεδο φύλου μεταξύ των έξι περιοχών καλλιέργειας πατάτας κατά την Άνοιξη (S1) και το Φθινόπωρο (S2). Το δενδρογράμμα παρέχει μια ιεραρχική αναπαράσταση της δομής της βακτηριακής κοινότητας, με τα κοντινά φύλα να ομαδοποιούνται μαζί. Η ανάλυση αυτή λαμβάνει υπόψη τις αφθονίες των OTUs σε κάθε φύλο. B. Δενδρογράμμα UPGMA με Unweighted Unifrac απόσταση: Η Εικόνα 18B απεικονίζει ένα δενδρογράμμα που κατασκευάστηκε με βάση την απόσταση Unweighted Unifrac σε επίπεδο φύλου. Αυτή η ανάλυση εστιάζει στην παρουσία/απουσία των OTUs σε κάθε φύλο, αποκαλύπτοντας τη δομή της βακτηριακής κοινότητας με βάση την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων OTUs σε κάθε φύλο. Τα δενδρογράμματα προσφέρουν μια οπτική αναπαράσταση των σχέσεων μεταξύ των βακτηριακών φύλων και των περιοχών καλλιέργειας, υποδεικνύοντας πιθανές ομοιότητες και διαφορές.

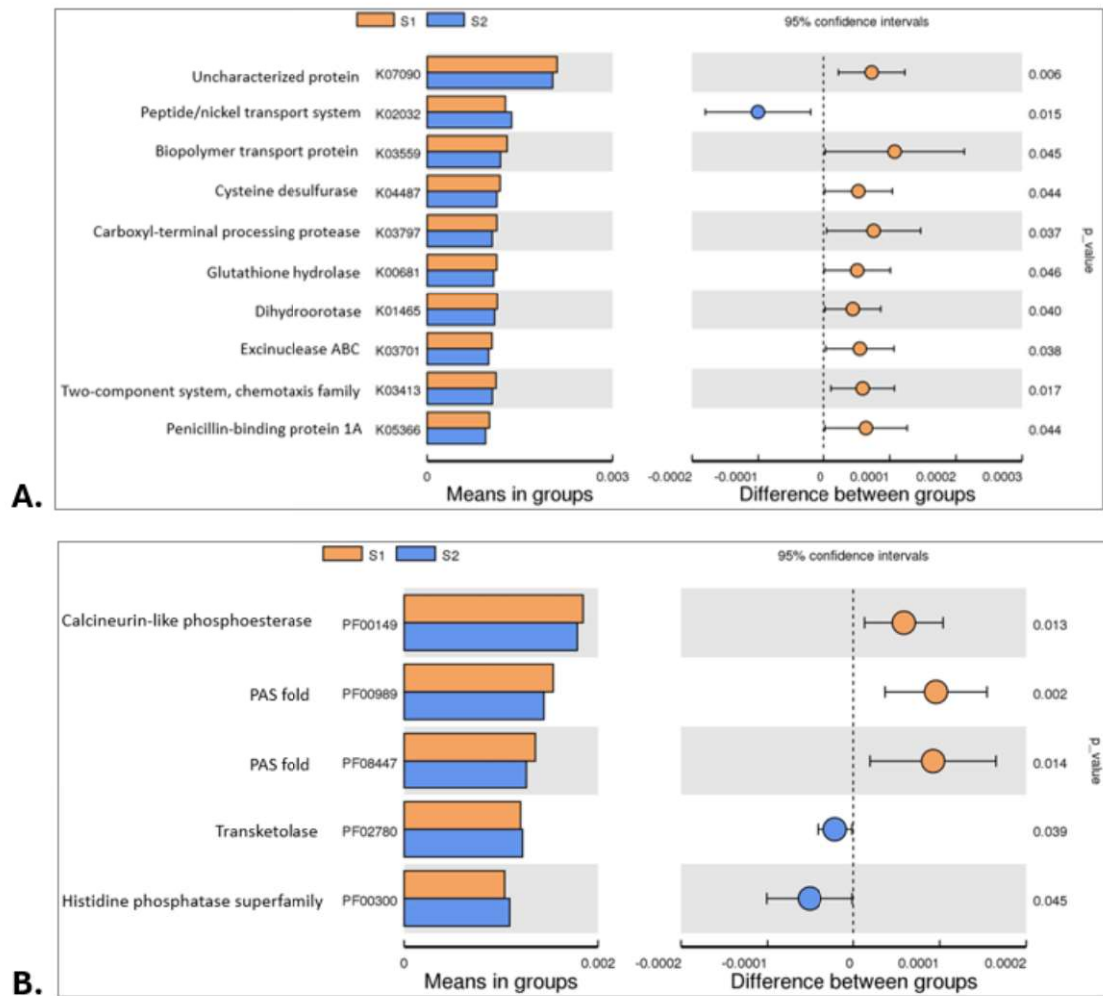
## Ανάλυση του εποχιακού μικροβιώματος του εδάφους με το εργαλείο PICRUSt και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η **Εικόνα 19** παρουσιάζει τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης t-test που διερεύνησε τις προβλεπόμενες λειτουργικές διαφορές στο μικροβίωμα των περιοχών καλλιέργειας πατάτας μεταξύ της άνοιξης (S1) και του φθινοπώρου (S2). Η ανάλυση βασίστηκε σε προβλέψεις από τη βάση δεδομένων KEGG Orthology (KO) και Pfam, χρησιμοποιώντας το εργαλείο PICRUSt.

Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν δυναμικές αλλαγές στις προβλεπόμενες λειτουργίες του μικροβιώματος που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας σε διαφορετικές εποχές. Συγκεκριμένα, η ανάλυση αναγνώρισε αρκετές λειτουργίες που ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές μεταξύ της άνοιξης και του φθινοπώρου. Τα σημεία πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή ( $p < 0,05$ ) υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές, με την άνοιξη (S1) να υπερέχει σε σχεδόν όλες τις προβλέψεις.

Οι προβλεπόμενες λειτουργίες που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές περιλαμβάνουν την Uncharacterized protein (KO7090), η οποία ήταν πιο άφθονη την άνοιξη (**Εικόνα 19A**). Επιπλέον, η Peptide/nickel transport system (KO2032) ήταν πιο ενεργή το φθινόπωρο, υποδεικνύοντας πιθανές προσαρμογές στις διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών ή μεταλλικών ιόντων. Η Biopolymer transport protein (KO3559) ήταν επίσης στατιστικά σημαντικά διαφορετική, με υψηλότερη αφθονία την άνοιξη, υποδεικνύοντας πιθανές αλλαγές στις ανάγκες μεταφοράς πολύπλοκων μορίων. Επιπλέον, οι προβλεπόμενες λειτουργίες Cysteine desulfurase (KO4487), Carboxyl-terminal processing protease (KO3797) και Glutathione hydrolase (KO0681) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες την άνοιξη, υποδεικνύοντας δυναμικές αλλαγές στις πρωτεϊνικές διεργασίες και την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Οι λειτουργίες Dihydroorotase (KO1465), Excinuclease ABC (KO3701) και Two-component system, chemotaxis family (KO3413) ήταν επίσης στατιστικά σημαντικά υψηλότερες την άνοιξη, υποδεικνύοντας πιθανές προσαρμογές σε ανοσολογικές αποκρίσεις και χημειοταξία. Τέλος, η Penicillin-binding protein 1A (KO5366) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη την άνοιξη, υποδεικνύοντας πιθανές αλλαγές στην αλληλεπίδραση με αντιβιοτικά ή στην κυτταρική τοίχωμα σύνθεση.

Η ανάλυση t-test που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας προβλέψεις από τη βάση δεδομένων Pfam αποκάλυψε διαφορές στις προβλεπόμενες λειτουργίες του μικροβιώματος μεταξύ της άνοιξης και του φθινοπώρου (**Εικόνα 19B**). Την άνοιξη, τρεις προβλεπόμενες λειτουργίες ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες. Αυτές περιλαμβάνουν την Calcineurin-like phosphoesterase (PF00149), η οποία εμπλέκεται στην επεξεργασία φωσφορικών εστέρων, και τις PAS fold (PF00989) και PAS fold (PF08447), οι οποίες είναι δομικές προβλέψεις που βρίσκονται σε διάφορα ένζυμα και υποδοχείς. Αυτές οι λειτουργίες υπερέχουν την άνοιξη, υποδεικνύοντας πιθανές προσαρμογές στις μεταβολικές απαιτήσεις και την περιβαλλοντικές ανταπόκριση των μικροβιακών κοινοτήτων. Από την άλλη πλευρά, το φθινόπωρο, δύο προβλεπόμενες λειτουργίες ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες. Αυτές περιλαμβάνουν την Transketolase (PF02780), ένα ένζυμο που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, και την Histidine phosphatases superfamily (PF00300), η οποία περιλαμβάνει φωσφατάσες που χρησιμοποιούν ιστοιδίνη ως καταλυτικό υπόστρωμα. Αυτές οι λειτουργίες υπερέχουν το φθινόπωρο, υποδεικνύοντας πιθανές αλλαγές στις ενεργειακές απαιτήσεις και την επεξεργασία σημάτων των μικροβιακών κοινοτήτων κατά τη διάρκεια αυτής της εποχής.



**Εικόνα 19.** T-test ανάλυση των προβλεπόμενων λειτουργικών διαφορών στο μικροβίωμα: Απεικονίζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης t-test που πραγματοποιήθηκε για να αξιολογήσει τις προβλεπόμενες λειτουργικές διαφορές στο μικροβίωμα των περιοχών καλλιέργειας πατάτας μεταξύ της Άνοιξης και του Φθινοπώρου. Η ανάλυση βασίστηκε σε προβλέψεις από τη βάση δεδομένων KEGG Orthology (KO) και Pfam χρησιμοποιώντας το εργαλείο PICRUST. Τα σημεία στο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν τις προβλεπόμενες λειτουργίες, με τον οριζόντιο άξονα να υποδεικνύει τις τιμές p και τον κατακόρυφο άξονα να αντιπροσωπεύει το λογάριθμο της αναλογίας αφθονίας (log2 fold change) μεταξύ των εποχών. Οι λειτουργίες πάνω από τη διακεκομμένη γραμμή ( $p < 0,05$ ) θεωρούνται στατιστικά σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των εποχών.

## Σύνοψη

Η μηχανική σύσταση των εδαφών στις έξι περιοχές καλλιέργειας πατάτας στη Δράμα δείχνει μια ποικιλία τύπων εδάφους, με επικράτηση μεσαίων και ελαφρών εδαφών. Οι περιοχές παρουσίασαν μικρές αλλαγές από την Άνοιξη στο Φθινόπωρο, με ορισμένες περιοχές να μετακινούνται προς ελαφρότερα εδάφη.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους πριν τη σπορά παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιοχών. Το Χρυσοκέφαλο, η Λευκόγεια και το Περιθώρι είχαν υψηλότερα επίπεδα οργανικής ουσίας, ενώ το Νευροκόπι, το Δασωτό και η Εξοχή είχαν χαμηλότερα επίπεδα. Το pH κυμαίνεται από ελαφρώς όξινο (pH 5,48 στη Λευκόγεια) έως ελαφρώς αλκαλικό (pH 6,26 στο Χρυσοκέφαλο). Η αλατότητα ήταν υψηλότερη στο Περιθώρι και τη Λευκόγεια και χαμηλότερη στο Νευροκόπι και το Δασωτό. Τα επίπεδα νιτρικού αζώτου ήταν υψηλότερα στο Περιθώρι και τη Λευκόγεια και χαμηλότερα στο Δασωτό και το Νευροκόπι. Τα επίπεδα αζώτου, φωσφόρου και καλίου διέφεραν επίσης μεταξύ των περιοχών, με ορισμένες περιοχές να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις από άλλες. Τα επίπεδα μαγνησίου, νατρίου και σιδήρου ποικίλλουν επίσης, με το Χρυσοκέφαλο, τη Λευκόγεια και το Περιθώρι να έχουν υψηλότερα επίπεδα μαγνησίου και νατρίου. Τα επίπεδα ψευδαργύρου, μαγγανίου και χαλκού ήταν χαμηλότερα στο Δασωτό σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές.

Κατά τη συγκομιδή, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους παρουσίασαν ορισμένες αλλαγές. Τα επίπεδα οργανικής ουσίας παρέμειναν σχετικά σταθερά, με μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των περιοχών. Το pH μειώθηκε σε όλες τις περιοχές, με τη Λευκόγεια και το Περιθώρι να έχουν τις μεγαλύτερες μειώσεις. Η αλατότητα αυξήθηκε σε όλες τις περιοχές, με το Νευροκόπι, την Εξοχή και το Περιθώρι να εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις. Τα επίπεδα νιτρικού αζώτου αυξήθηκαν σε όλες τις περιοχές, με το Χρυσοκέφαλο και το Περιθώρι να έχουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις. Τα επίπεδα αζώτου, φωσφόρου και μαγνησίου παρουσίασαν διακυμάνσεις, με ορισμένες περιοχές να εμφανίζουν αυξήσεις και άλλες μειώσεις. Τα επίπεδα καλίου αυξήθηκαν σε όλες τις περιοχές, με το Χρυσοκέφαλο και τη Λευκόγεια να έχουν τις μεγαλύτερες αυξήσεις. Τα επίπεδα νατρίου μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, εκτός από το Χρυσοκέφαλο, όπου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση. Τα επίπεδα σιδήρου μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, με τη Λευκόγεια να έχει τη μεγαλύτερη μείωση. Τα επίπεδα ψευδαργύρου, μαγγανίου και χαλκού παρουσίασαν διακυμάνσεις, με ορισμένες περιοχές να εμφανίζουν αυξήσεις και άλλες μειώσεις. Τα επίπεδα βορίου μειώθηκαν σε όλες τις περιοχές, εκτός από το Χρυσοκέφαλο, όπου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση.

Οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους μετά τη σπορά μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες, όπως η δραστηριότητα των μικροοργανισμών, η αποικοδόμηση της οργανικής ύλης, η απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών από το έδαφος και η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά. Οι διαφορές μεταξύ των περιοχών μπορεί να σχετίζονται με τις αρχικές ιδιότητες του εδάφους, τις πρακτικές διαχείρισης της καλλιέργειας και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ανάλυση των θεκογραμμάτων αποκαλύπτει σημαντικές διακυμάνσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους μεταξύ των περιοχών και των εποχών, χωρίς κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο ή τάση, υποδεικνύοντας μοναδική σύνθεση εδάφους για κάθε περιοχή και εποχή.

Η ανάλυση των δεικτών Chao, Shannon και Simpson αναδεικνύει τις εποχιακές διακυμάνσεις στη μικροβιακή ποικιλότητα, με τα δείγματα να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ποικιλότητας και σύνθεσης κατά τις εποχές της άνοιξης και του φθινοπώρου. Η πιο πλούσια ποικιλότητα παρατηρείται κατά τη διάρκεια του

φθινοπώρου (περίοδος συγκομιδής), υποδεικνύοντας μια γενική τάση αύξησης της ποικιλότητας βακτηριακών ειδών προς το τέλος του έτους. Ειδικότερα, ο δείκτης Chao αποκαλύπτει μια αυξημένη εκτιμώμενη ποικιλότητα κατά το φθινόπωρο, ενώ οι δείκτες Shannon και Simpson προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την αφθονία και την ομοιομορφία των ειδών, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα και την ποικιλομορφία της βακτηριακής κοινότητας κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου.

Βασιζόμενοι στην ανάλυση της βήτα-ποικιλότητας με χρήση της τεχνικής NMDS και των αποστάσεων Weighted και Unweighted Unifrac στην **Εικόνα 17**, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα: Παρατηρούμε μια ομοιογενή δομή στη βακτηριακή κοινότητα με την κατανομή των δειγμάτων να συσσωρεύεται κοντά στο κέντρο των γραφημάτων, υποδεικνύοντας ομοιότητες σε διάφορες περιοχές και εποχές. Ωστόσο, παρατηρούνται και ορισμένες αποκλίσεις, κυρίως σε συγκεκριμένα δείγματα και περιοχές, όπως τα R4S1 και R4S2, προδίδοντας μοναδικά χαρακτηριστικά στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας. Επιπλέον, οι αναλύσεις ανά εποχή αποκαλύπτουν πιθανές διαφορές στη βακτηριακή κοινότητα μεταξύ της άνοιξης και του φθινοπώρου, υποδεικνύοντας την επίδραση της εποχικότητας στη δομή και τη σύνθεσή της.

Η ανάλυση UPGMA κατέδειξε διακριτές ομάδες στη βακτηριακή κοινότητα, υποδεικνύοντας τόσο ομοιότητες όσο και διαφορές στη δομή και σύνθεσή της. Η πρώτη ομάδα φαίνεται να συγκεντρώνεται γύρω από συγκεκριμένα δείγματα, ενώ η δεύτερη ομάδα παρουσιάζει πιο μεγάλη ποικιλία. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών δομών και πιθανών παραμέτρων που επηρεάζουν τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας, όπως οι συνθήκες περιβάλλοντος και οι πρακτικές καλλιέργειας.

Η ανάλυση του εποχιακού μικροβιώματος του εδάφους με το εργαλείο PICRUSt και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε δυναμικές αλλαγές στις προβλεπόμενες λειτουργίες του μικροβιώματος που σχετίζονται με την καλλιέργεια της πατάτας σε διαφορετικές εποχές. Οι προβλεπόμενες λειτουργίες που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αποκάλυψαν μια ποικιλία αλλαγών στην πολυπλοκότητα του μικροβιώματος κατά τη διάρκεια της χρονικής αυτής διαδικασίας. Η χρήση της βάσης δεδομένων KEGG Orthology (KO) και Pfam σε συνδυασμό με το εργαλείο PICRUSt επέτρεψε την αναγνώριση προβλεπόμενων λειτουργικών αλλαγών που ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ των δύο εποχών. Αυτές οι αλλαγές περιλάμβαναν την προσαρμογή στις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες και μεταλλικά ιόντα, την προσαρμογή στις ανάγκες μεταφοράς πολύπλοκων μορίων, και την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, αναδείχθηκαν πιθανές προσαρμογές σε ανοσολογικές αποκρίσεις και χημειοταξία, καθώς και αλλαγές στην αλληλεπίδραση με αντιβιοτικά ή στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

## Βιβλιογραφία

- Bingham, F. T. (1982). Methods of soil analysis. Part 2. In A. L. Page (Ed.), *Boron* (pp. 431–448). American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Caporaso, J. G., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336.
- Clesceri, L. S., & Greenberg, A. E. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (19th ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
- Edgar, R. C., et al. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200.
- Gee, G. N., & Bauder, J. W. (1986). Particle size distribution. In A. Klute (Ed.), *Physical and mineralogical methods* (2nd ed., pp. 383–411). Agronomy Society of America/Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 10, Unit 10.7–10.7. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Lindsay, W. L., & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3), 421–428. <https://doi.org/10.2136/SSSAJ1978.03615995004200030009X>
- Ling, Z., Li, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Tong, X., et al. (2014a). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2546–2554. <https://doi.org/10.1128/aem.00003-14>
- Loeppert, R. H., & Suarez, D. L. (1996). Carbonate and gypsum. In D. L. Sparks, et al. (Eds.), *SSSA Book Series No. 5* (pp. 437–474). Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Quast, C., Pruesse, E., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, D590–D596.
- Thomas, G. W. (1982). Exchangeable cations. In A. Page, R. Miller, & D. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties* (2nd ed., pp. 159–165). American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.
- Walkley, A. J., & Black, I. A. (1934). Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29–38.
- Wang, Q., et al. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267.
- Watanabe, F. S., & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal*, 29, 677–678.  
<https://doi.org/10.2136/SSSAJ1965.03615995002900060025X>