

Bilaga E – eDNA analys.....	2
1. Introduktion	2
1.1 Information för läsaren.....	2
2. Analysmetoder och jämförelser inom dessa	4
2.1 OTU/ASV analysis and taxonomic annotation	4
2.1.1 Venn and flower diagraml detta avsnitt analyseras venn diagram i avseende av både enskilda prover samt gruppjämförelser. Venndiagrammen baseras på ASVs.	5
Markör ITS2 (svampar), hädanefter benämnd svampar:	5
2.2 Alpha Diversity Analysis	10
2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index	10
2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha	13
2.3 Beta Diversity Analysis.....	18
2.3.1 Beta diversity heatmap.....	18
2.3.2 Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (based on Weighted Unifrac distance).....	22
2.4 Community differences analysis.....	25
2.4.1 Analysis of Similarity (Anosim)	25
2.4.2 Multi-response permutation procedure (MRPP) analysis.....	26
3. Sammanfattning av analyser	29
APPENDIX.....	31

Bilaga E – eDNA analys

Amanda Andreasson

1. Introduktion

Detta är en bilaga till kandidatarbetet *jämförelse av jordkvalitet mellan olika typer av markanvändning i jordbruk*. På grund utav tidsbrist exkluderades analys av de efterskickade eDNA-resultaten från kandidatarbetet och redovisas istället i denna bilaga. Analysen skickades med hjälp av IVL svenska miljöinstitutet till genomikföretaget Novogene. eDNA-analysen som efterskickades baserades på metabarcoding och sekvensering av svamp (markör ITS2) och bakterier (markör 16S).

eDNA-analysen från Novogene redovisades med hjälp utav ett antal rapporter samt filer innehållandes de erhållna resultaten. I detta dokument analyseras 8 olika redovisningsformer givna från eDNA-analysen utförd av Novogene. Dessa redovisningsformer är kopplade till någon utav följande övergripande analysmetod: community difference analysis, alpha diversity, OTU/ASV analysis and taxonomic annotation eller beta analysis. För att minimera risken för missförstånd och feltolkningar kommer titlarna på samtliga redovisningsformer och analysmetoder vara identiska med de som givits av Novogene, därav kommer dessa vara skrivna på engelska. Vissa termer kommer också vara skrivna på engelska. Dokumentet kommer att kort beskriva de övergripande analysmetoderna som återfinnes i Novogenes rapporter, samt ge en kort förklaring kring de redovisningsformer som har analyserats i detta dokument. Syftet med dessa beskrivningar och förklaringar är att läsaren skall kunna förstå resultatet som analyserats och informationen kring detta är baserad på de rapporter som erhöles från Novogene.

Information kring provtagningsplatser, specifika prover, grupper och resonemang kring varför dessa valdes återfinnes i kandidatarbetet *jämförelse av jordkvalitet mellan olika typer av markanvändning i jordbruk*. Viss information återgives i detta dokument under avsnitt 1.1, för att underlätta för läsaren.

1.1 Information för läsaren

11 prover togs och undersöktes, i detta dokument benämns dessa prover nästan i enlighet med hur de benämns i det nämnda kandidatarbetet, med skillnaden att det står ett "p" framför samtliga prov (exempelvis 1A i kandidatarbetet benämns här p1A). Utöver detta skapades 5 grupper baserade på de 11 proverna (g1, g2, g3, g4, g5) dessa benämns i detta dokument som "separata grupper". I Novogenes analys finns också gruppen g5.2, vilket är identisk med grupp g5. Utifrån dessa 5 grupper skapades sedan två större grupper (g1g4, g2g3) som i detta dokument benämns som "kombinerade grupper". Om observationerna gäller både separata grupper och kombinerade grupper benämns detta endast som "grupper".

Grupperna inkluderar olika antal prover enligt nedan;

g1: 2 prover

g2: 1 prov

g3: 3 prover

g4: 2 prover

g5, g5.2: 3 prover

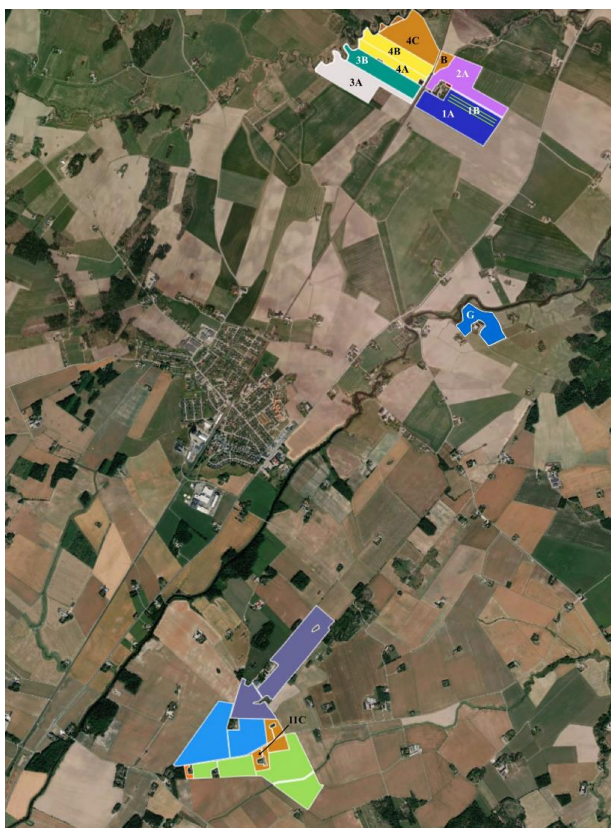
g1g4: 4 prover

g2g3: 4 prover

Prov pB benämns i denna rapport som “dunge med björkträd”, “björkdunge” och “orörd mark med träd” utifrån olika situationer, men samtliga beskrivningar hänvisar till pB.

För att förtydliga vad som diskuteras färgmarkeras första raden beroende på vad som diskuteras; **markör ITS2 (svampar)**, **markör 16S (bakterier)**, **både svampar och bakterier**.

Nedan återfinnes tabeller och figurer från nämnt kandidatarbete som kan vara extra hjälpsamma vid genomläsning av detta dokument:



Figur 1: Karta över områden med provtagna fält angivna.

Tabell 1: Beskrivning av provtagningsfält, nuvarande grödor samt växtodlingsföljd tillbaka till 2015.

Fält	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
1A	Havre, rödklöver	Rödklöver	Havre, timotej	Timotej	Timotej 2	Timotej	Timotej	Vall	Konservärter
Agroforestry, 1B	Havre, Rödklöver	Rödklöver	Havre, timotej	Timotej	Timotej 2	Timotej	Timotej	Vall	Konservärter, med träd (två äpple, en hassel)
2A	Träda	Rörsvingel, höstraps	Rörsvingel	Vitklöver, havre	Vitklöver	Havre	Höstvete	Havre, ängssvingel	Ängssvingel
3A	Åkerböna	Timotej, havre	Timotej	Timotej	Timotej 3	Timotej	Höstraps	Höstvete, vitklöver insädd	Vitklöver
3B							Grönfoder	Höstraps	Höstvete
4A						Värvete	Havre	Höstråg	Höstraps
4B								Träda	Höstraps
4C							Havre, slåtter, betesvall	Vall	Betesvall 2
Grannen, G						Vall	Vall	Vall	Vall
11C Vall, Salbo	Vall	Vall	Vall	Vall	Vall	Träda, betesvall	Betesvall 1	Betesvall 2	Betesvall 2
Björkdunge									

Tabell 2: Grupperingar för fälten utifrån deras egenskaper.

Grupp 1	Grupp 2	Fält	Beskrivning
g1	g1g4	1A, 1B	Nyligen plöjd mark
g4		2A, 3A	Ettårig vall
g2	g2g3	B	Orörd mark med träd
g3		4C, G, 11C	Flerårig vall
g5		3B, 4A, 4B	Ej vall

2. Analysmetoder och jämförelser inom dessa

Detta kapitel beskriver de övergripande analysmetoder samt redovisningsformer som undersöktes. Resultaten kopplade till de undersökta redovisningsformerna visas och diskuteras.

2.1 OTU/ASV analysis and taxonomic annotation

Vid brusreduktion av datan används en metod kallad DADA2. Från denna fås deduplicerade sekvenser, en sådan sekvens kallas ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) eller *feature sequence*. Novogene använder sedan QIIME2's classify-sklearn algoritmen och med hjälp av en förtränad Naive Bayes klassifier kan de undersöka vad för organismer som representeras av varje ASVs (species annotation). Utifrån information kring vad för organismer som representeras av varje enskild ASVs, och den relativa representationen för denna organism i de olika proverna, kan tabeller genereras som beskriver populationstätheten för olika arter inom proverna (species abundance tables).

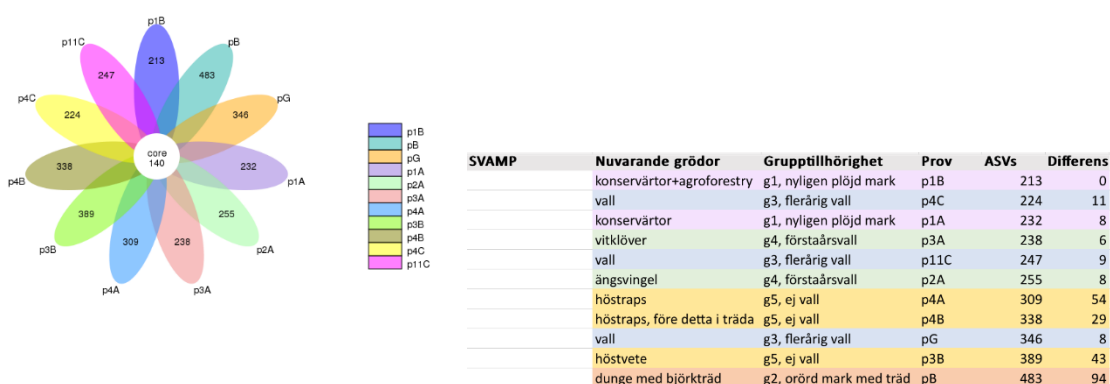
2.1.1 Venn and flower diagram

I detta avsnitt analyseras venn diagram i avseende av både enskilda prover samt gruppjämförelser. Venndiagrammen baseras på ASVs.

Markör ITS2 (svampar), hädanefter benämnd svampar:

Jämförelse av enskilda prover:

Tabell 3: Tabellen visar hur många unika ASVs för svamp som registrerades i varje prov, samt information om respektive prov; vilka grödor som odlas där för tillfället och en beskrivning av den enskilda grupp som provet tillhör. Grupptillhörigheten är också färgmarkerad. Proverna är ordnade från lägsta värde till högsta. Differenskolumnen visar differensen gällande ASVs mellan provet på den aktuella raden och prov från en rad tidigare.



Figur 2: Venndiagram över samtliga enskilda prover avseende svampar

Observationer:

Differensen mellan det högsta värdet och minsta värdet är 270. Prov pB (som utgör g2) har överlägset högst värde. Samtliga prov från gruppen g5 (ej vall) och g2 (orörd mark med träd) är på det övre spektrumet. Proverna som tillhör g3 (flerårig vall) är inte enhetliga, men den äldsta vallen (pG) ligger i det övre spektrumet. De prover som tillhör g4 (ettårig vall) ligger mot mitten av spektrumet, och prover som ingår i g1 (nyligen plöjd mark) ligger i det undre spektrumet. Det ses inte några indikationer på att prover som ligger geografiskt bredvid varandra också har liknande värden.

Utstickande värden inom enskilda prover för svampar:

Relativt få: Ingen stor differens mellan de värdena som är låga (6 stycken utan stor differens), här tycks det inte vara några stora utstickare.

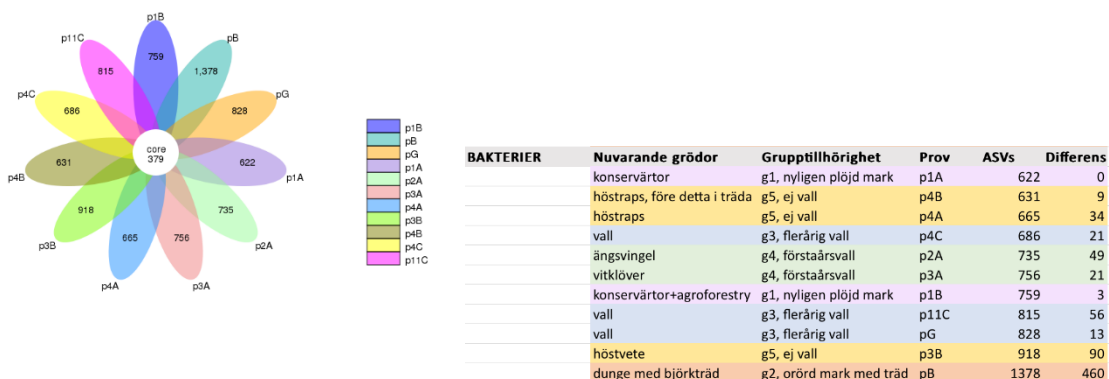
Relativt många: p3B (389), pB (483)

Markör 16S (Bakterier), härifrån benämnd bakterier:

Jämförelse av enskilda prover:

Tabell 4: Tabellen visar hur många unika ASVs för bakterier som registrerades i varje prov, samt information om respektive prov; vilka grödor som odlas där för tillfället och en beskrivning av den enskilda gruppen som provet tillhör.

Grupptillhörigheten är också färgmarkerad. Proverna är ordnade från lägsta värde till högsta. Differenskolumnen visar differensen gällande ASVs mellan provet på den aktuella raden och prov från en rad tidigare.



Figur 3: Venndiagram över samtliga enskilda prover avseende bakterier (markör 16S)

Observationer:

Skillnaden mellan högsta och minsta värdet är 756. Prov pB (som utgör g2) har överlägset högst värde. Samtliga prover innehållandes vall, g4 (ettårig vall) och g3 (flerårig vall), ligger i mitten av spektrumet. Den vall som är äldst (pG) får högst värde av vallarna, men det gäller i allmänhet inte att de äldre vallarna har högre värden. Proverna tillhörande g1 (nyligen plöjd mark) och g5 (ej vall) kan ej ses någon trend inom. Det ses inte några indikationer på att prover som ligger geografiskt bredvid varandra också har liknande värden.

Utstickande värden inom enskilda prover för bakterier:

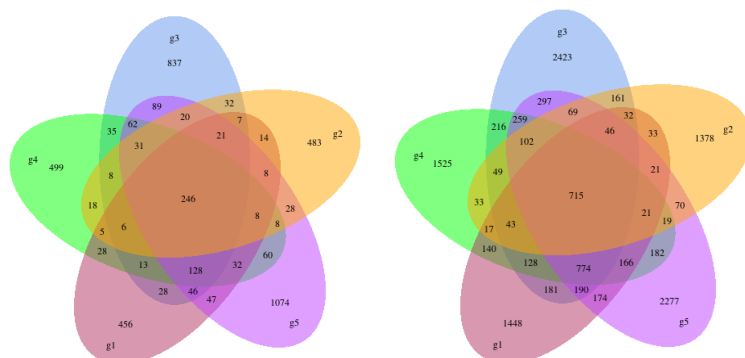
Relativt få: p1A (622), p4B (631)

Relativt många: p3B (918), pB (1378)

Kommentarer vid jämförelse mellan resultaten för enskilda prov av svampar och bakterier:

Avsevärt fler hittade ASVs för bakterier jämfört med svampar. Värt att notera är att p3B (höstvete), pB (dunge med björkträd), pG (flerårig vall) får höga poäng både på svamp och bakterier. p4B (höstraps, före detta i träda) samt p1B (konservärtor och agroforestry) får väldigt olika ranking om man jämför resultaten från svampar och bakterier.

Jämförelse mellan prover och grupper som ansågs vara intressanta jämförelser (se kandidatarbete för närmare beskrivning kring varför dessa var intressanta att jämföra):



Figur 4: Venndiagram av grupperna g1-g2-g3-g4-g5. Den vänstra grafen avser svampar, medan den högra grafen avser bakterier.

Tabell 5: Tabellen visar jämförelser för prover och grupper som ansågs intressanta att jämföra mellan. Jämförelserna gjordes både i avseende av svampar och bakterier, och är baserade på venn diagram som återfinnes i appendix under: 2.1.1 Venn diagram. Kolumnen "Gemensamt" beskriver hur många gemensamma ASVs som återfanns för den specifika jämförelsen, kolumnerna "Prov 1" och "Prov 2" hänvisar till den förstnämnda respektive sistnämnda provet/gruppen i respektive rad, beskriven i kolumnen "Prov/grupp". Kolumnen "Differens 1-2" beskriver differensen mellan Prov 1 och Prov 2 inom den aktuella raden. Det prov/grupp som har högst värde vid respektive jämförelse markeras med grön bakgrund, och stora värden inom differenskolumnen markeras med gul bakgrund.

SVAMP:	Prov/grupp	Gemensamt	Prov 1	Prov 2	Differens 1-2
	p1A-p1B	343	414	336	78
	p4A-p4B	366	527	472	55
	g3-g4	529	1080	658	422
	g3-g4-g1-g5-g2	246			
	g3-g5	643	966	1265	-299
	g1g4-g2g3	692	1122	1489	-367
	g5.2-g1g4	697	1211	1117	94
	g5.2-g2g3	695	1213	1486	-273
	g3-g1g4	631	978	1183	-205
BAKTERIER:	Prov/grupp	Gemensamt	Prov 1	Prov 2	Differens 1-2
	p1A-p1B	1448	1263	1418	-155
	p4A-p4B	1187	1421	1307	114
	g3-g4	2286	3399	2103	1296
	g3-g4-g1-g5-g2	715			
	g3-g5	2452	3233	2930	303
	g1g4-g2g3	2879	3635	4398	-763
	g5.2-g1g4	2669	2713	3845	-1132
	g5.2-g2g3	2583	2799	4694	-1895
	g3-g1g4	2735	2950	3779	-829

Värt att notera är att grupperna innehåller olika antal prov (varje prov motsvarar ett fält), sannolikheten att det återfinnes fler ASVs på fler antal prov är trolig, oavsett hur fälten där proverna togs har brukats. Därav kan de jämförelser som inkluderar grupper med olika antal prover inte med säkerhet sägas bero på hur marken brukas, utan antalet prover skulle kunna ha en stor påverkan på resultatet. Exempelvis är björkdungen, pB, bäst av alla enskilda prover, men g2 (som endast innehåller pB) har ett lågt värde vid gruppjämförelser (samtliga andra grupper innehåller fler än 1 prov).

Jämförelser:

- p1A-p1B (nyligen plöjd mark - nyligen plöjd mark med agroforestry): ingen tydlig slutsats kan dras.
- p4A-p4B (höstraps - höstraps, före detta i träda): ingen tydlig slutsats kan dras.
- g3-g4 (3 flerårig vall, 3 fält - ettårig vall, 2 fält): g3 markant högre värden inom både svamp och bakterier.
- g1-g2-g3-g4-g5 (nyligen plöjd mark, 2 fält - orörd mark med träd, 1 fält - flerårig vall, 3 fält - ettårig vall, 2 fält - ej vall, 3 fält): g3 och g5 utmärker sig med höga värden på både svampar och bakterier (se figur 3).
- g3-g5 (flerårig vall, 3 fält - ej vall, 3 fält): ingen tydlig slutsats kan dras.

- g1g4-g2g3 (nyligen plöjd mark & ettårig vall, 4 fält - orörd mark med träd & flerårig vall, 4 fält): g2g3 markant högre värden inom både svampar och bakterier.
- g5.2-g1g4 (ej vall, 3 fält - nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 fält): g1g4 markant högre värde för bakterier, liten differens gällande svampar.
- g5.2-g2g3 (ej vall, 3 fält - orörd mark med träd & flerårig vall, 4 fält): g2g3 högre värde för både svamp och bakterier (markant högre bakterier).
- g3-g1g4 (flerårig vall, 3 fält - nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 fält): g1g4 högre värden inom både svamp och bakterier.

Slutsatser från ovan jämförelser:

Skillnaden mellan grupper innehållandes samma antal prov:

- g2g3 högre värden än g1g4

Skillnad finnes, men är en större osäkerhet kring slutsatsen då jämförelserna är mellan grupper som innehåller olika antal prov (kan inte dra någon slutsats att det är markanvändningen som är anledningen till skillnaderna, men kan däremot vara indikationer kring markanvändningens påverkan):

- g3 markant högre värden än g4
- g3 och g5 högre värden än resterande enskilda grupper
- g1g4 högre värde än g5.2, men endast inom bakterier
- g2g3 högre värden än g5.2
- g1g4 högre värden än g3, inte så stor skillnad inom svamp men större inom bakterier.

Sammanfattning avsnitt 2.1.1:

Avsevärt fler ASVs hittades för bakterier jämfört med svampar. Inom jämförelser mellan enskilda prover får p3B (höstvetete), pB (dunge med björkträd) och pG (flerårig vall) höga värden inom både svamp och bakterier, där pB har markant högre värden än resterande prover. p4B (höstraps, före detta i träda) samt p1B (konservärtor och agroforestry) skiljer mycket i sina placeringar vid jämförelse mellan respektive provs resultat från svampar och bakterier. För svampar har samtliga prov från gruppen g5 (ej vall) höga värden, medan prover som ingår i g1 (nyligen plöjd mark) erhåller låga värden. För bakterier kan en trend ses att samtliga prover innehållandes vall, g4 (ettårig vall) och g3 (flerårig vall), ligger i mitten av spektrumet.

Angående jämförelser mellan grupper kan det vara svårt att dra slutsatser kring grupper som innehåller olika antal prov, då det är sannolikt att resultatet förutom brukande av marken också kan påverkas av antalet prov som gruppen innehåller. Däremot sågs en tydlig skillnad mellan g2g3 (björkdunge & flerårig vall) och g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall), vilket innehåller samma antal prov, där g2g3 får högre värden inom både svamp och bakterier.

2.2 Alpha Diversity Analysis

Alfadiversitet undersöker artrikedom och homogenitet av de mikrobiella samhällena inom de olika proverna.

2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index

Shannon diversity index undersöker diversitet och "species evenness" inom organismsamhällen. Indexet tar hänsyn till abundansen och artrikedomen i ett prov. Om indexet får ett högt värde motsvarar det hög diversitet inom organismsamhället och att abundansen som hittas i provet är jämnt fördelad mellan olika ASVs.

SVAMPAR:

Tabell 6: Tabellen visar värdet för Shannon diversity index avseende svampar för olika prover och grupper, samt information om respektive prov och grupp. Tabellen är uppdelad i tre delar, där en ny del markeras med en blankrad. Den första delen av tabellen visar enskilda prover, därefter visas enskilda grupper och den sista delen visar kombinerade grupper.

Proverna/grupperna är ordnade från högsta värde till lägsta värde av Shannon diversity index, delarna rankas separat från varandra.

Gröda	Grupp	Prov	Shannon
höstvet	Ej vall	p3B	7.27
dunge med björkträd	Orörd mark med träd	pB	7.068
höstraps	Ej vall	p4A	7.024
höstraps, före detta i träda	Ej vall	p4B	6.352
ängsvingel	Förstaårsvall	p2A	6.317
vall	Flerårig vall	pG	6.295
konservärtor	Nyligen plöjd mark	p1A	5.824
konservärtor+agroforestry	Nyligen plöjd mark	p1B	5.697
vall	Flerårig vall	p11C	5.537
vall	Flerårig vall	p4C	5.125
vitklöver	Förstaårsvall	p3A	5.05
	Ej vall, 3 prover	g5	7.317
	Orörd mark med träd, 1 prov	g2	7.068
	Flerårig vall, 3 prover	g3	6.645
	Förstaårsvall, 2 prover	g4	5.96
	Nyligen plöjd mark, 2 prover	g1	5.926
	Björkdunge & flerårig vall, 4 prover	g2g3	7.278
	Nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover	g1g4	6.352

Observationer:

Det är en tydlig trend att proverna som ingår i gruppen "ej vall" samtliga har höga värden. pB får också hög ranking. Samtliga vallar och också proverna som tillhör gruppen "nyligen plöjd mark" ligger på den nedre delen av spektrumet, däremot har proverna som innefattar gruppen "förstaårsvall" mycket skilda ranking. Vid jämförelser mellan enskilda grupper får g1 och g4 liknande värden. Vid jämförelse med kombinerade grupper får g2g3 högre värden än g1g4. Vid jämförelse av samtliga prover och grupper har g5, ej vall, högst värde. Värt att notera är att grupperna innefattar olika antal prover, vilket kan vara en faktor som påverkar resultatet. Det syns däremot inga tydliga trender inom detta.

BAKTERIER:

Tabell 7: Tabellen visar värdet för Shannon diversity index avseende bakterier för olika prover och grupper, samt information om respektive prov och grupp. Tabellen är uppdelad i tre delar, där en ny del markeras med en blankrad. Den första delen av tabellen visar enskilda prover, därefter visas enskilda grupper och den sista delen visar kombinerade grupper.

Proverna/grupperna är ordnade från högsta värde till lägsta värde av Shannon diversity index, delarna rankas separat från varandra.

Gröda	Grupp	Prov	Shannon
höstvet	Ej vall	p3B	10.405
vitklöver	Förstaårsvall	p3A	10.358
konservärtor+agroforestry	Nyligen plöjd mark	p1B	10.343
ängsvingel	Förstaårsvall	p2A	10.3
konservärtor	Nyligen plöjd mark	p1A	10.231
vall	Flerårig vall	pG	10.211
vall	Flerårig vall	p4C	10.215
vall	Flerårig vall	p11C	10.193
höstraps	Ej vall	p4A	10.185
dunge med björkträd	Orörd mark med träd	pB	10.005
höstraps, före detta i träda	Ej vall	p4B	9.97
	Flerårig vall, 3 prover	g3	10.629
	Förstaårsvall, 2 prover	g4	10.577
	Ej vall, 3 prover	g5	10.539
	Nyligen plöjd mark, 2 prover	g1	10.475
	Orörd mark med träd, 1 prov	g2	10.005
	Björkdunge & flerårig vall, 4 prover	g2g3	10.792
	Nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover	g1g4	10.722

Observationer:

Proverna som innefattar gruppen "ej vall" får väldigt skilda värden, medan resterande prover är mer enhetliga (då pB är ensam i sin grupp kan ej något sägas om hur enhetlig denna grupp är). Proverna som innefattar grupperna "förstaårsvall" och "nyligen plöjd mark" får höga värden, medan proverna som tillhör gruppen "flerårig vall" ligger i mitten av spektrumet. Prov pB ligger i nedre delen av spektrumet.

Vid jämförelse av enskilda grupper rankas båda vallgrupperna (g3 & g4) högt. Därefter rankas g5, vilket är intressant då denna grupp har två av tre prover som rankas väldigt lågt. g1 och g2 rankas båda lågt, där g2 har ett markant lägre värde jämfört med andra enskilda grupper. Då kombinerade grupper jämförs får g2g3 högre värden jämfört med g1g4. Vid jämförelse av samtliga prov och grupper har g2g3, björkdunge & flerårig vall, högst värde. Värt att notera är att grupperna innefattar olika antal prover, vilket kan vara en faktor som påverkar resultatet. Det syns däremot inga tydliga trender inom detta.

En anmärkning är att resultatet för gruppjämförelserna skiljer sig från resultatet för jämförelser mellan enskilda prover. Exempelvis rankas g3 högre än g4 och g1, men samtliga prover som innefattar g4 och g1 får högre värden jämfört med de prover som innefattar g3.

Sammanfattning avsnitt 2.2.1:

Prov som innefattas av gruppen "ej vall" samt prov pB har hög ranking på Shannon diversity index för svampar, däremot får de låg ranking för bakterier (exklusive p3B). **Något som är värt att anmärka är att prov p3B rankas högst av de enskilda proverna för både svampar och bakterier.** Prover där det odlas vall samt de prover som innefattas av gruppen "nyligen plöjd mark" erhåller lägre ranking för svampar jämfört med bakterier.

Vid jämförelser mellan grupper får g2g3 högst ranking av de kombinerade grupperna för både svamp och bakterier. Av de separata grupperna får g1 låga värden för både svampar och bakterier. g2 samt g5 får högst ranking inom svampar men lägre ranking inom bakterier, tvärtomot får g3 och g4 lägre ranking inom svampar och hög ranking inom bakterier. Vid jämförelse av g3, flerårig vall, och g4, förstaårsvall, får g3 högre värden för både svampar och bakterier.

2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha

Graferna "Rank abundance curves of alpha" visar artrikedom och "species evenness". ASVs rankas beroende på antalet individer av varje ASVs som hittas i provet. Den ASVs som det har funnits flest individer inom provet får rankingen 1, den ASVs som det har funnits näst flest individer inom provet får rankingen 2 och så vidare.

Y-axeln "relative abundance" representerar hur många individer som hittades av en ASVs, relativt till hur många individer som hittades av andra ASVs.

X-axeln "species rank" rankar olika ASVs utifrån abundansen för varje ASVs inom provet.

Om lutningen på grafen är hög indikerar detta en låg "species evenness", då högt rankade ASVs har mycket fler individer per prov jämfört med lågrankade ASVs. En låg lutning på grafen indikerar tvärtom en hög "species evenness".

För att förenkla för läsaren och förhindra att samma budskap skrivs flera gånger noteras nedan några observationer som angår samtliga jämförelser för både svampar och bakterier, innan dessa jämförs var för sig:

"Species evenness": Detta verkar vara relativt lika vid jämförelse mellan de olika proven, samt mellan de olika grupperna. De prov och grupper som har en högre artrikedom har också mindre lutning på sin kurva, och därmed en högre "species evenness". Detta illustreras tydligt då g2 (som endast innefattar pB) har en hög lutning vid jämförelse med andra grupper, men pB har en liknande lutning som resterande enskilda prover.

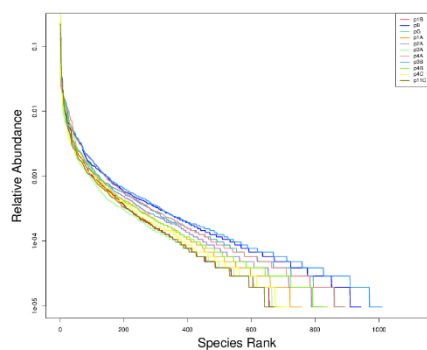
Artrikedom:

Värt att notera är att olika grupper består utav olika antal prov. Om en grupp består utav fler prov är det också mer troligt att det innehåller fler ASVs. De grupper som innehåller samma antal prov är därför extra intressanta att undersöka då sannolikheten är högre att skillnader i grupperna är på grund av hur marken brukas, och inte påverkas av olikheter i antal prov. Allmänt kan ses att grupper som innehåller fler prover också har hög artrikedom.

Samtliga kurvor får en mindre lutning vid lägre värden för "relative abundance" (relativ abundans). Detta innebär att det är några få ASVs med många individer inom provet, sedan finns det fler ASVs som det finns färre individer utav inom provet.

SVAMPAR:

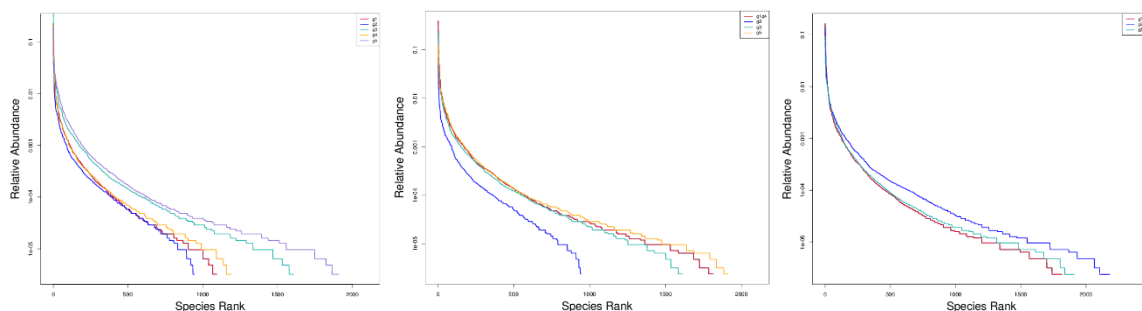
Tabell 8: Tabellen visar rankingen baserat på "rank abundance curves of alpha" avseende svampar för enskilda prover, samt information om respektive prov. Proverna är ordnade från högsta till lägsta ranking.



Gröda	Grupptillhörighet	Prov	Ranking
höstvete	Ej vall	p3B	1
dunge med björkträd	Orörd mark med träd	pB	2
höstraps	Ej vall	p4A	3
vall	Flerårig vall	pG	4
höstraps, före detta i träda	Ej vall	p4B	5
ängsvingel	Förstaårsvall	p2A	6
konservärtor	Nyligen plöjd mark	p1A	7
vall	Flerårig vall	p4C	8
vitklöver	Förstaårsvall	p3A	9
konservärtor+agroforestry	Nyligen plöjd mark	p1B	10
vall	Flerårig vall	p11C	11

Figur 5: Rank abundance curves of alpha, svampar, enskilda prover.

Observationer: Alla prov som tillhör gruppen "ej vall" är högt rankade. pB är också högt rankad. Ingen tydlig trend kan ses för fleråriga vallar. Samtliga ettåriga vallar och nyligen plöjda marker har mindre artrikedom jämfört med de prover som tillhör gruppen "ej vall". Vissa av fälten som ligger bredvid varandra i rankingen ligger också bredvid varandra geografiskt, men detta är ingen genomgående trend.



Figur 6: Rank abundance curves of alpha. Figuren visar 3 olika grafer som visar olika gruppjämförelser avseende svampar.

Observationer för respektive graf:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover):

Ranking: g5, g3, g4, g1, g2.

De grupper som innehåller fler prover/fält har betydligt högre artrikedom.

Vid jämförelse av de grupper som har samma antal fält:

g5-g3: g5 större artrikedom då den har fler arter med lägre "relative abundance".

g4-g1: Inte lika stor skillnad i artrikedom som g5-g3, g4 har större artrikedom än g1.

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov):

Ranking: g5, g1g4, g3, g2.

Vad som är intressant här är att g5 har bäst resultat trots att den endast innehåller 3 prover. g2 som endast har ett prov har utstickande låga värden och har dessutom en betydligt brantare lutning jämfört med resterande grupper.

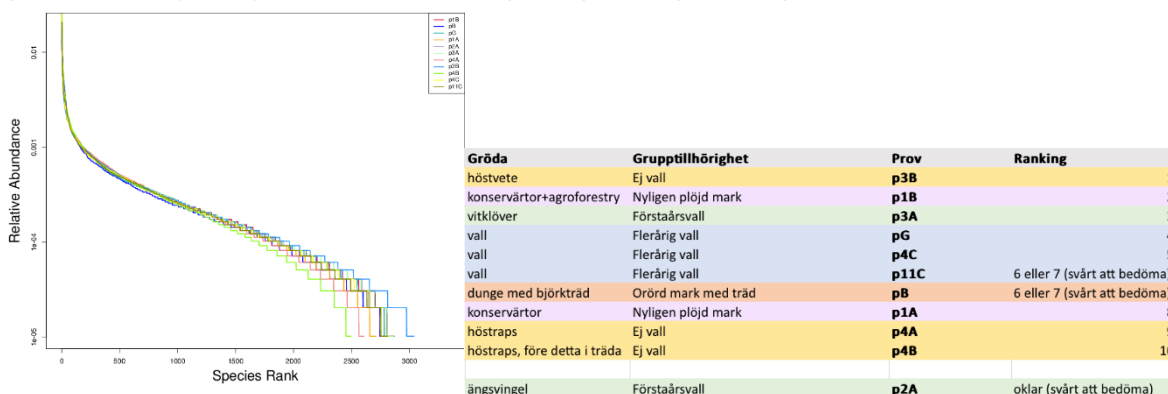
g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) - **g5.2** (ej vall, 3 prover):

Ranking: g2g3, g5.2, g1g4.

g2g3 skiljer ut sig (hög artrikedom) medan g1g4 och g5.2 är relativt lika. En intressant notering är att g5.2 har färre prov jämfört med resterande grupper, men ändå högre artrikedom än g1g4.

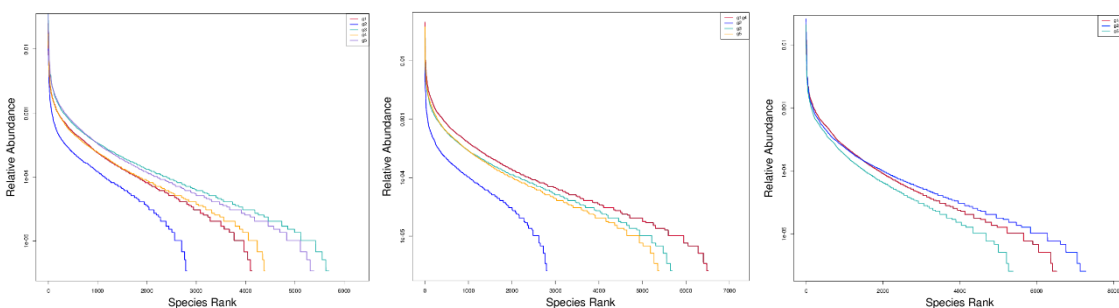
BAKTERIER:

Tabell 9: Tabellen visar rankingen baserat på "rank abundance curves of alpha" avseende bakterier för enskilda prover, samt information om respektive prov. Proverna är ordnade från högsta till lägsta ranking.



Figur 7: Rank abundance curves of alpha, bakterier, enskilda prover.

Observationer: p3B sticker ut med mycket hög artrikedom, medan p1A, p4A och p4B sticker ut med låg artrikedom. Prover som tillhör "ej vall" får mycket skilda värden för artrikedom, med p3B högst ranking och p4A samt p4B med lägst ranking. De nyligen plöjda vallarna får också väldigt olika ranking. Prov pB är i mitten av spektrumet, likaså är de fleråriga vallarna, som är mycket enhetliga. p3A får hög ranking, tyvärr går det inte att urskilja p2A i den nedre delen av grafen. Det kan inte ses några trender att fälten som ligger bredvid varandra geografiskt har liknande ranking.



Figur 8: Rank abundance curves of alpha. Figuren visar 3 olika grafer som visar olika gruppjämförelser avseende bakterier.

Observationer för respektive graf:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover):

Ranking: g3, g5, g4, g1, g2.

g3, den fleråriga vallen, har högst artrikedom. g4 har mer artrikedom än g1 och dessa två har samma antal prover. Ser en tydlig skillnad mellan artrikedomen hos g3, g5; g4, g1; g2 (de med samma antal prover i sig har mer likt resultat).

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) – **g2** (orörd mark med träd, 1 prov):

Ranking: g1g4, g3, g5, g2.

g1g4 sticker ut med hög artrikedom, men är också den enda gruppen med 4 prover/fält. g3 högre artrikedom än g5 (samma antal prov). g2 sticker ut med en låg artrikedom (1 prov).

g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) – **g5.2** (ej vall, 3 prover):

Ranking: g2g3, g1g4, g5.2

Vi kan se att g2g3 har större artrikedom än g1g4, båda har samma antal prover. g5.2 har mindre artrikedom men har också mindre antal prover.

Jämförelse av grupper för både svampar och bakterier:

Tabell 10: Tabellen visar rankingen baserat på "rank abundance curves of alpha" avseende svampar och bakterier för samtliga grupper, samt information om respektive prov. Proverna är ordnade från högsta till lägsta ranking (svampar och bakterier rankas separat).

SVAMP	Grupptillhörighet	Prov	Ranking
	Björkdunge & flerårig vall, 4 prover	g2g3	1
	Ej vall, 3 prover	g5	2
	Nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover	g1g4	3
	Flerårig vall, 3 prover	g3	4
	Förstaårsvall, 2 prover	g4	5
	Nyligen plöjd mark, 2 prover	g1	6
	Orörd mark med träd, 1 prov	g2	7
BAKTERIER	Grupptillhörighet	Prov	Ranking
	Björkdunge & flerårig vall, 4 prover	g2g3	1
	Nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover	g1g4	2
	Flerårig vall, 3 prover	g3	3
	Ej vall, 3 prover	g5	4
	Förstaårsvall, 2 prover	g4	5
	Nyligen plöjd mark, 2 prover	g1	6
	Orörd mark med träd, 1 prov	g2	7

Observationer: Allmänt kan ses att grupper som innehåller fler prover/fält också har hög artrikedom.

Jämförelse mellan grupper som har samma antal prov/fält:

- 3 prover: g5 (ej vall) - g3 (flerårig vall): I avseende av svampar har g5 större artrikedom, däremot för bakterier har g3 högre artrikedom än g5.
- 2 prover: g4 (förstaårsvall) -g1 (plöjd mark): g4 har större artrikedom än g1 för både svampar och bakterier.
- 4 prover: g1g4 (plöjd mark & förstaårsvall) -g2g3 (björkdunge & flerårig vall): g2g3 har större artrikedom än g1g4 för både svampar och bakterier.

Sammanfattning avsnitt 2.2.2:

"Species evenness":

Detta verkar vara relativt lika vid jämförelse mellan de olika proven, samt vid jämförelse mellan de olika grupperna. De prov och grupper som har en högre artrikhet har också en plattare kurva, och därmed en större jämnhet bland arterna.

Artrikedom:

Samtliga kurvor får en mindre lutning vid lägre värden för "relative abundance" (relativ abundans). Detta innebär att det är några få ASVs med många individer inom provet, sedan finns det fler ASVs som det finns färre individer utav inom provet.

Vid jämförelse av enskilda prov är p3B högst rankad för både svampar och bakterier. Prover som tillhör gruppen "ej vall" får hög ranking inom svampar men låg inom bakterier, samma sak gäller för pB. De fleråriga vallarna har inte tydlig trend för svampar, men är enhetliga inom bakterier där de ligger i mitten utav spektrumet. P1B (nyligen plöjd mark) samt p3A (förstaårsvall) får låg ranking för svampar men hög ranking för bakterier, medan p1A (nyligen plöjd mark) ligger i det nedre delen av spektrumet för både svampar och bakterier.

Vid gruppjämförelser har de grupper som innehåller fler prover betydligt högre artrikedom, enda undantaget för detta är g5 (3 fält) för svampar, som har högre värde jämfört med g1g4 (4 fält). Då denna tydliga trend ses är det intressant att jämföra grupper som innehåller samma antal fält, då sannolikheten är högre att skillnaderna i artrikedom är på grund utav hur marken brukas och inte påverkas av olikheter i antal fält. Vid denna jämförelse uppenbarades att inga slutsatser kan dras om vilken grupp som har högst artrikedom av ej vall och flerårig vall. Däremot har förstaårsvall en högre artrikedom än nyligen plöjd mark för både svampar och bakterier, samma gäller för gruppen Björkdunge & flerårig vall vid jämförelse med gruppen Nyligen plöjd mark & förstaårsvall.

2.3 Beta Diversity Analysis

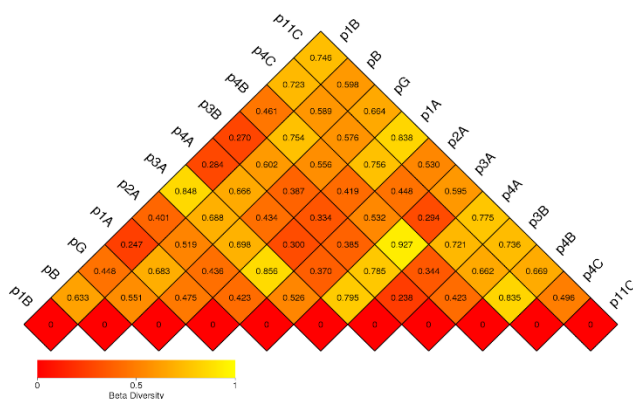
Beta diversity analysis undersöker olika strukturella skillnader inom mikrobiella samhällen för olika prover.

2.3.1 Beta diversity heatmap

Beta diversity heatmap undersöker olikheter (dissimilarity coefficient) mellan prov/grupper genom att göra parvisa jämförelser mellan olika prov/grupper. Resultaten som visas är plottade med "Weighted Unifrac distances".

SVAMPAR:

Jämförelse av enskilda prover:



Figur 9: Beta diversity heatmap, svampar, enskilda prover. En intensivare röd färg innebär lägre värden.

Observationer:

Prover som erhåller många låga värden: p1B, p4A, p3B

Prover som erhåller många höga värden: p3A, p4C, p11C

Vissa prover som förekommer ofta inom nedan jämförelser färgmarkeras för att förenkla för läsaren.

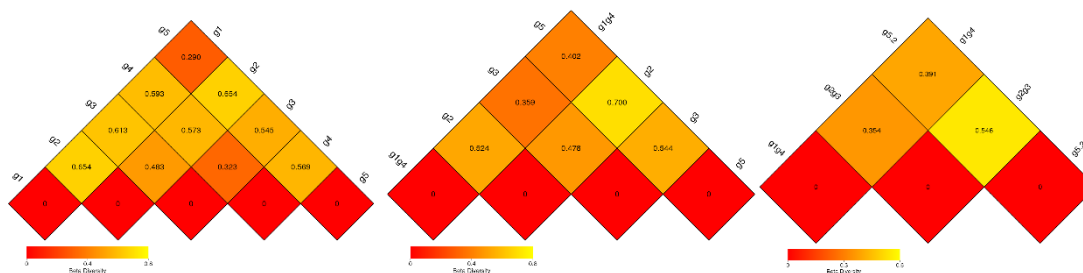
Jämförelser som sticker ut med att ha stora skillnader relativt andra prover (värde över 0.8):

- p3A-p1B
- p1A-p11C
- p3A-p1A
- p3A-p4B
- p4B-p4C

Jämförelser som sticker ut med att ha små skillnader relativt andra prover (värde under 0.3):

- p1B-p1A
- p1B-p4A
- p1B-p3B
- p3A-p4C intressant då p4C annars allmänt har lite högre värden.
- p4A-p3B

Gruppjämförelser:



Figur 10: Beta diversity heatmap. Figuren visar 3 olika grafer som visar olika gruppjämförelser avseende svampar. En intensivare röd färg innebär lägre värden.

Observationer för respektive graf:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover):

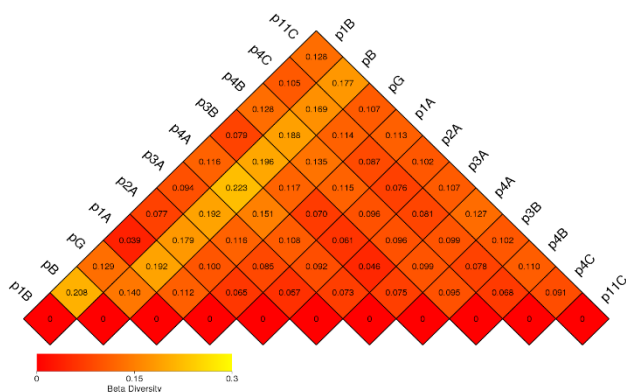
- g5-g1 lågt (0.290) (lägst)
- g3-g4 lågt (0.323)
- g2-g5 (0.654) & g2-g1 (0.654) högsta, men inte markant högt värde jämfört med andra

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov): g2-g5 skiljer sig med ett högre värde (0.700), de andra värdena är relativt lika varandra.

g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) - **g5.2** (ej vall, 3 prover): Grupperna g2g3 - g5.2 har störst skillnad (0.546), de andra två värdena relativt lika varandra.

BAKTERIER:

Jämförelse av enskilda prover:



Figur 11: Beta diversity heatmap, svampar, enskilda prover. En intensivare röd färg innebär lägre värden.

Observationer kring enskilda prover:

PB mycket höga värden vid jämförelse med andra prov.

Vissa prover som förekommer ofta inom nedan jämförelser färgmarkeras för att förenkla för läsaren.

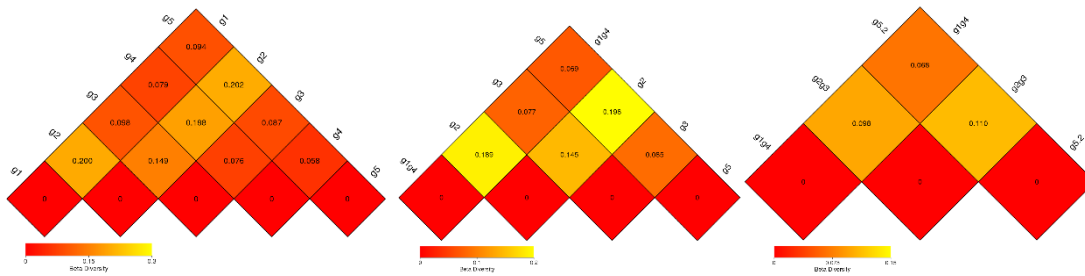
Jämförelser som sticker ut med att ha stora skillnader relativt andra prover (värde över 0.19):

- pB-p1B
- pB-p3B
- pB-p4A
- pB-p3A
- pB-p1A

Jämförelser som sticker ut med att ha små skillnader relativt andra prover (värde under 0.07):

- p1A-p2A
- p2A-p3A
- p2A-p3B
- p3A-p3B
- p4B-p4C

Gruppjämförelser:



Figur 12: Beta diversity heatmap. Figuren visar 3 olika grafer som visar olika gruppjämförelser avseende bakterier. En intensivare röd färg innebär lägre värden.

Observationer för respektive graf:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover): g4-g5 lågt värde, g2 allmänt höga värden mot alla

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov): g2 sticker ut med höga värden.

g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) - **g5.2** (ej vall, 3 prover): g2g3 sticker ut men inte lika mycket som vid jämförelse med endast g2.

Sammanfattning avsnitt 2.3.1:

Vi rör oss mellan väldigt mycket lägre värden för bakterier jämfört med svampar, vilket tyder på mindre olikheter mellan proven för bakterier jämfört med svampar. Det tycks inte vara någon likhet vid jämförelse av utstickande prover mellan svampar och bakterier.

Jämförelse för svampar:

För svampar får de enskilda proverna p1B, p4A och p3B många låga värden i jämförelse med andra prov. p3A, p4C och p11C får däremot många höga värden i jämförelse med andra prov. En del prover som har grupptillhörighet g1 samt g5 har små skillnader mellan varandra relativt andra prover, vilket också ses i gruppjämförelsen g1-g5 då denna jämförelse får ett lågt värde. Något som är intressant att anmärka på är att jämförelsen p3A-p4C har låga värden, då 4C allmänt har lite högre värden vid jämförelse mellan andra prover, samt att p3A har stora skillnader mot flera andra prov.

Jämförelse för bakterier:

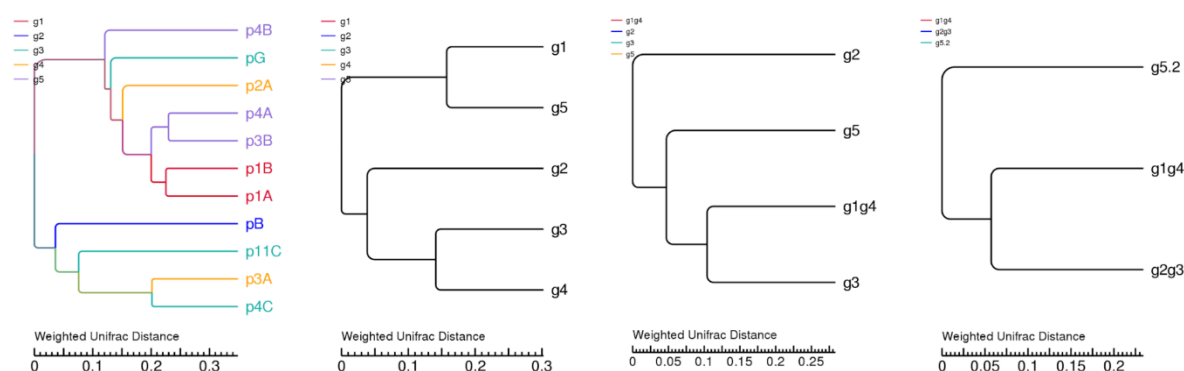
Provet/gruppen pB/g2 har mycket höga värden vid jämförelse med andra prov/grupper. Prov p2A har 3 st jämförelser med väldigt små skillnader.

Jämförelsen mellan g4-g5 har mycket låga värden, vilket tyder på att skillnaden mellan dessa inte är så stor.

2.3.2 Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (based on Weighted Unifrac distance)

UPGMA använder sig av träd-diagram för att hierarkiskt para ihop de prover/grupper som uppvisar mest likheter inom betadiversitet. Resultaten som visas är plottade med "Weighted Unifrac distances". Resultaten som erhöles från Novogene visar förutom träd-diagram också den relativa abundansen av ASVs för proverna/grupperna, inom den taxonomiska rangen fylum. Analys utav detta utelämnas och endast träd-diagrammen undersöks, men fullständiga plottar från Novogene kan hittas i Appendix under: 2.3.2 UPGMA fullständiga plottar.

SVAMPAR:



Figur 13: Träd-diagram inom svampar från UPGMA för samtliga prover och grupper.

Observationer enskilda prover:

Proverna pG och 2A är olik resterande vallar, vilka klumpar ihop sig tillsammans med pB. Proverna som tillhör g1 är lika varandra, vilket kan indikera på att agroforestryn som p1B har i detta avseendet inte gör någon massiv skillnad (värt att notera är dock att träden fortfarande är väldigt unga). Inom g5 är p4A mer lik p3B jämfört med p4B. Detta är intressant då både p4A och p4B brukas för höstraps i nuläget, medan det odlas höstvetete på p3B. p4B har varit i träda innan, vilket skulle kunna vara en orsak till den större olikheten. Medan vissa fält som är kopplade till varandra också ligger nära geografiskt (p1A, p1B; p4A, p3B) så är det fler fält som inte gör det, vilket indikerar på att den geografiska platsen inte har så stor påverkan.

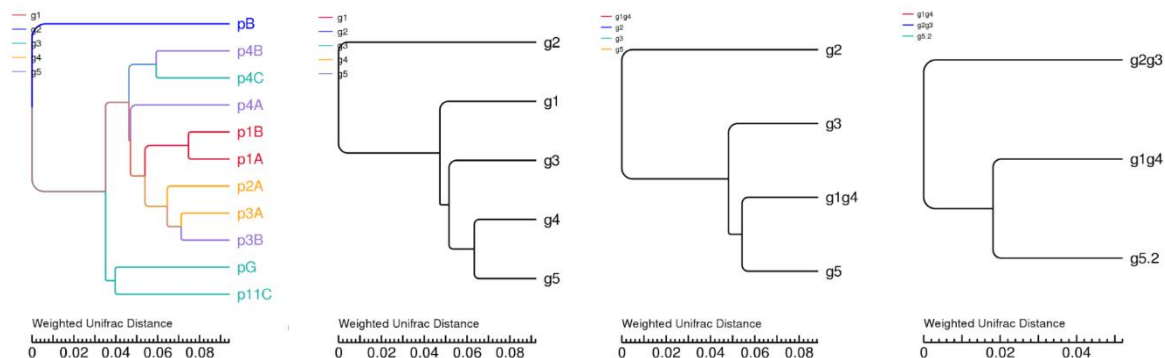
Observationer grupper:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover): g4 och g3 är lika varandra, dessa liknar i sin tur pB. De som inte har vall på sig nu, g1 & g5, liknar varandra mer än de andra.

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov): g1g4 och g3 är mer lika g5 än g2, vilket är intressant då g3 och g4 är mer lika g2 än g5 i de separata gruppjämförelserna. Troligen påverkar g1 mycket här då denna är lik g5 separat.

g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) - **g5.2** (ej vall, 3 prover): g5.2 liknar de andra proverna minst, vilka båda två har vallodlingar inom gruppen. Detta är intressant då g1 egentligen liknar g5 mer, men i kombinationsgrupperna är g1g4 mer lik g2g3 än g5.2.

BAKTERIER:



Figur 14: Träddiagram inom bakterier från UPGMA för samtliga prover och grupper.

Observationer enskilda prover:

pB är mest olik alla. Det kan inte ses något mönster för vall i allmänhet, men de ettåriga vallarna är lika varandra (ej nära geografiskt), dock är de inte lika någon av de fleråriga vallarna utan mer lika de nyligen plöjda markerna. Proverna som tillhör g5 är ej lika varandra. De prover som tillhör g1 är lika varandra, dessa fält ligger också bredvid varandra. Vad som kan ses är att många av de prover som är lika är också nära geografiskt (p3A, p3B; p1A, p1B; p4C, p4B). Något att anmärka på är att pG och p11C är mer lika varandra jämfört med andra prov, båda dessa provtagningsplatser ligger långt bort från resterande provtagningsplatser. Prov pB ligger däremot geografiskt nära samtliga prover exklusive pG och p11C, vilket gör det ännu mer intressant att pB är mest olik från samtliga andra prover.

Observationer grupper:

g1 (nyligen plöjd mark, 2 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov) - **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g4** (förstaårsvall, 2 prover) - **g5** (ej vall, 3 prover): Något som är intressant att notera är att g4 (ettårig vall) är mer lik g5 (icke vall) än g3 (flerårig vall). g2 är mest olik resterande prov. En annan intressant aspekt är att vid jämförelser av separata prov är prover som tillhör g1 lika prover som tillhör g4, men att g1 och g4 inte är lika varandra i denna jämförelse.

g5 (ej vall, 3 prover) – **g1g4** (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g3** (flerårig vall, 3 prover) - **g2** (orörd mark med träd, 1 prov): Här är g5 mer lik g1g4 än g3. g2 är mest olik resterande grupper.

g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårsvall, 4 prover) – **g2g3** (björkdunge & flerårig vall, 4 prover) - **g5.2** (ej vall, 3 prover): g2g3 mest olik resterande grupper.

Jämförelse för prover/grupper mellan svampar och bakterier:

Vid jämförelse av resultat mellan svampar och bakterier inom separata fält kan ses att p1B och p1A är närmst varandra för båda, annars kan inga tydliga likheter identifieras. Vid jämförelse av separata grupper är g4 och g3 hyfsat lika varandra för både svampar och bakterier, annars ses inga tydliga likheter. Vid jämförelse av kombinerade grupper ges inga tydliga indikationer.

Sammanfattning avsnitt 2.3.2:

Jämförelse för svampar:

De flesta vallar är lika varandra. Inom g5 är p4A mer lik p3B än p4B, vilket är intressant då p4A och p4B båda för tillfället brukas för höstraps (p3B höstvetete). p4B har innan varit i träda innan, vilket skulle kunna vara en orsak till den större olikheten. I de separata gruppjämförelserna är vallarna mest lik g2 än andra grupper, medan g1 och g5 är mest lika varandra. Medan vissa fält som är kopplade till varandra också ligger nära geografiskt så är det fler fält som inte gör det, vilket indikerar på att den geografiska platsen inte har så stor påverkan.

Jämförelse för bakterier:

Ett tydligt resultat är att prov pB, och grupp g2 (som endast innehåller pB), är mest olik från resterande prov.

Inget mönster kan ses för vall i allmänhet, men de ettåriga vallarna är lika varandra, dock är de inte lika någon utav de fleråriga vallarna. Många utav de prover som är lika ligger nära varandra geografiskt vilket gör det svårare att veta om det är platsen eller odlingsättet som har mest påverkan på resultatet. Något som är intressant är att g4 (ettårig vall) är mer lik g5 (icke vall) än g3 (flerårig vall).

Vid jämförelse av likheter inom resultaten för svampar och bakterier kunde det ses att p1B och p1A är lika varandra inom båda aspekter.

2.4 Community differences analysis

Community difference analysis undersöker variabiliteten inom samhällsstrukturen mellan olika grupper.

2.4.1 Analysis of Similarity (Anosim)

Denna analys undersöker om variationen mellan grupper är signifikant jämfört med variationen inom grupperna. Analysen ger ett R-värde och ett P-värde. P-värdet står för konfidensgraden och kräver ett värde lägre än 0,05 för att anse att det finns en statistisk signifikans, därmed har resultat med P-värden som är större än 0,05 ingen trovärdighet. R-värdet varierar mellan -1 och 1, där positiva R-värden medför att variationen mellan olika grupper anses vara större än variationer inom grupper.

Tabell 11: Tabellerna visar resultat för Anosim avseende svampar (vänster) respektive bakterier (höger) för olika gruppjämförelser. De P-värden som tyder på en statistisk signifikans är markerade med grön textfärg, medan värden som inte tyder på en statistisk signifikans är markerade med röd textfärg.

Markör ITS2 (svampar)			Markör 16S (Bakterier)		
Group	R	P	Group	R	P
g3-g5	0.1111	0.3	g1g4-g3	0.53704	0.03
g1g4-g2g3	-0.04167	0.61	g1g4-g5	0.25926	0.174
g1g4-g5.2	0.31481	0.1	g3-g5	0.22222	0.2
g2g3-g5.2	-0.09259	0.804	g3-g5	0.22222	0.2
g1g4-g3	0.16667	0.168	g1g4-g2g3	0.34375	0.032
g1g4-g5	0.31481	0.121	g1g4-g5.2	0.25926	0.189
g3-g5	0.11111	0.3	g2g3-g5.2	0.07407	0.327

Vi kan se en signifikant skillnad mellan:

- grupp g1g4 - g3 (plöjd mark & förstaårsvall vs flerårig vall) inom bakterier, där variationen mellan grupper anses vara signifikant större än variationen inom nämnda grupper, R-värde: 0.53704
- grupp g1g4 - g2g3 (plöjd mark & förstaårsvall vs björkdunge & flerårig vall) inom bakterier, variationen mellan grupper anses vara signifikant större än variationen inom nämnda grupper. R-värde: 0.34375

Skillnaderna mellan g1g4 - g3 är större än skillnaderna mellan g1g4 - g2g3. En intressant anmärkning är att det endast finns signifikanta skillnader inom bakterier och ej inom svampar.

2.4.2 Multi-response permutation procedure (MRPP) analysis

MRPP analysen undersöker om det finns någon signifikant skillnad i den mikrobiella samhällsstrukturen mellan grupper. Analysen ger fyra olika värden; A, observed-delta, expected-delta samt significance.

A: positivt betyder att variationen mellan grupper är större än variationen inom grupper, negativt innebär att variationen inom grupper är större än variationen mellan grupper.

observed-delta: ett litet värde på observed-delta betyder att variationen inom gruppen är liten.

expected-delta: ett stort värde på expected-delta betyder att variationen mellan grupper är stor

significance: skillnaderna är signifikanta om värdet för significance är mindre än 0,05

Tabell 12: Tabellerna visar resultat för MRPP avseende svampar (vänster) respektive bakterier (höger) för olika gruppjämförelser. De värden för significance som tyder på att skillnaderna är signifikanta är markerade med grön textfärg, medan värden som inte tyder på en statistisk signifikans är markerade med röd textfärg.

Markör ITS2 (svampar)				Markör 16S (Bakterier)					
Group	A	observed-delta	expected-delta	significance	Group	A	observed-delta	expected-delta	significance
g3-g5	0.07583	0.58427	0.63222	0.1	g1g4-g3	0.04517	0.37424	0.39194	0.049
g1g4-g2g3	0.04724	0.66066	0.69342	0.09	g1g4-g5	0.0269	0.34899	0.35864	0.163
g1g4-g5.2	0.05768	0.48242	0.51195	0.076	g3-g5	0.03	0.38565	0.39758	0.2
g2g3-g5.2	0.07875	0.63128	0.68524	0.023	g3-g5	0.03018	0.38561	0.39761	0.2
g1g4-g3	0.05512	0.6246	0.66104	0.081	g1g4-g2g3	0.05699	0.42065	0.44607	0.024
g1g4-g5	0.05764	0.48242	0.51193	0.076	g1g4-g5.2	0.02691	0.34921	0.35887	0.143
g3-g5	0.07594	0.58421	0.63223	0.1	g2g3-g5.2	0.0448	0.43683	0.45732	0.102

Vi kan se en signifikant skillnad mellan:

Svampar:

- g2g3 - g5.2 (björkdunge & flerårig vall vs ej vall)
Mellan dessa grupper är variationen mellan grupperna större än variationen inom grupperna, och det är också den största variationen av de prov som har påvisat signifikanta skillnader. Denna jämförelse har också de högsta värdena på observed-delta (variationen inom gruppen är stor) samt expected-delta (variationen mellan grupperna är stor) av de jämförelser som har påvisat signifikanta skillnader.

Bakterier:

- g1g4 - g3 (plöjd mark & förstaårsvall vs flerårig vall)
Mellan dessa grupper är variationen mellan grupperna större än variationen inom grupperna, och det är den minsta variationen av de prov som har påvisat signifikanta skillnader. Denna jämförelse har också de minsta värdena på observed-delta (variationen inom gruppen är stor) samt expected-delta (variationen mellan grupperna är stor) av de jämförelser som har påvisat signifikanta skillnader.
- g1g4 - g2g3 (plöjd mark & förstaårsvall vs björkdunge & flerårig vall)
Mellan dessa grupper är variationen mellan grupperna större än variationen inom grupperna, och samtliga värden för A, observed-delta (variationen inom gruppen är stor) samt expected-delta (variationen mellan grupperna är stor) ligger i mitten av de jämförelser som har påvisat signifikanta skillnader.

Sammanfattning avsnitt 2.4.2:

De jämförelser som påvisade signifikanta skillnader för svamp var mellan grupperna g2g3 - g5.2 (björkdunge&flerårig vall - ej vall). För bakterier uppvisades signifikanta skillnader mellan g1g4 - g3 (plöjd mark & förstaårsvall - flerårig vall) samt g1g4 - g2g3 (plöjd mark & förstaårsvall - björkdunge & flerårig vall). Jämförelsen mellan grupperna g2g3 - g5.2 fick genomgående högst värden av de jämförelser som har påvisat signifikanta skillnader, medan grupperna g1g4 - g3 hade lägst värden och grupperna g1g4 - g2g3 låg mitt emellan.

2.4.3 T-test

T-test undersöker vilka arter som har en signifikant variation mellan jämförda grupper. Novogene ger svar för olika taxonomiska ranker, där detta avsnitt undersöker den taxonomiska ranken "family". Novogenes resultat ger specifikt vilka arter som skiljer mellan de jämförda grupperna, men denna jämförelse har avgränsats till att endast undersöka antal arter som skiljer sig mellan de jämförda grupperna och inte undersökt mer specifikt vilka arter som skiljer sig åt.

Tabell 13: Tabellen visar resultat för T-test avseende svampar (vänster) respektive bakterier (höger) för olika gruppjämförelser. Relativt låga värden markeras med röd färgruta, medan relativt höga värden markeras med grön textruta.

SVAMPAR		BAKTERIER	
Grupper	Antal arter med signifikant skillnad	Grupper	Antal arter med signifikant skillnad
g3-g5	8	g3-g5	3
g1g4-g2g3	1	g1g4-g2g3	16
g5.2-g1g4	3	g5.2-g1g4	11
g5.2-g2g3	10	g5.2-g2g3	4
g3-g1g4	1	g3-g1g4	14

Här ses en tydlig trend att om jämförelser har lågt värde avseende svampar, har den istället höga värden avseende bakterier. Om jämförelser har lågt värde avseende bakterier, har den höga värden avseende svampar.

3. Sammanfattning av analyser

Allmänt kan sägas att de jämförelserna som erhöll ett lågt värde avseende svampar hade ofta höga värden avseende bakterier och tvärtom. De grupper som innehöll fler prover erhöll oftast högre biodiversitet.

Inom Avsnitt 2.1 OTU/AVS analysis and taxonomic annotation (2.1.1 Venn and flower diagram) och avsnitt 2.2 Alpha Diversity Analysis (2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index och 2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha) kan flertalet saker noteras:

Ett av de prover som har utmärkt sig mest är **p3B (ej vall, höstvet)**, som får höga värden för svampar och bakterier inom avsnitten 2.1.1 (venn and flower diagram), 2.2.1 (Alpha diversity indices: Shannon diversity index) samt 2.2.2 (Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha), vilket tyder på en god biodiversitet. p3B får också många låga värden för svampar inom avsnitt 2.3.1 (Beta diversity heatmap), vilket tyder på små skillnader relativt andra prover.

Tabell 14: Höga värden för avsnitten representeras med grön ruta, medan låga värden representeras med röd ruta.

Prov p3B		
Avsnitt	Svampar	Bakterier
2.1.1 Venn and flower diagram		
2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index		
2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha		

Ett annat prov som utmärker sig är **pB (orörd mark med träd)**, som får höga värden för svampar och bakterier i avsnitt 2.1.1, samt höga värden för svampar men låga värden för bakterier inom avsnitten 2.2.1 och 2.2.2. pB får också höga värden inom avsnitt 2.3.1 (Beta diversity heatmap).

Tabell 15: Höga värden för avsnitten representeras med grön ruta, medan låga värden representeras med röd ruta.

Prov pB		
Avsnitt	Svampar	Bakterier
2.1.1 Venn and flower diagram		
2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index		
2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha		

Prov som innefattar gruppen g5 (notera att p3B är med i denna grupp) utmärker sig också med höga värden för svamp inom avsnitten 2.1.1, 2.2.1, 2.2.2, men låga värden för bakterier inom avsnitten 2.2.1 och 2.2.2.

Tabell 16: Höga värden för avsnitten representeras med grön ruta, medan låga värden representeras med röd ruta. Vit ruta indikerar att värdena inte var utmärkande höga eller låga.

Prov inom g5		
Avsnitt	Svampar	Bakterier
2.1.1 Venn and flower diagram		
2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index		
2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha		

Grupper som innehöll fler prover erhöll ofta högre värden i avsnitten, därför är det intressant att undersöka grupper som innehåller samma antal prover.

Tabell 17: Resultaten för jämförelser som innehöll samma antal prov i avsnitten 2.1.1, 2.2.1 samt 2.2.2. Om en grupp står inskriven innebär det att denna grupp erhöll högre värden för det specifika avsnittet, jämfört med gruppen som den jämfördes med. Vid “-” kan ingen slutsats dras kring dessa jämförelser i det avsnittet.

Avsnitt	g1-g4	g3-g5	g1g4-g2g3
2.1.1 Venn and flower diagram	-	g3	g2g3
2.2.1 Alpha diversity indices: Shannon diversity index	g4	-	g2g3
2.2.2 Biodiversity curves: rank abundance curves of alpha	g4	-	g2g3

För avsnitt 2.3, Beta Diversity Analysis, (2.3.1 Beta diversity heatmap och 2.3.2 Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (based on Weighted Unifrac distance)) kan ses att grupperna g1 och g5 har minst olikheter i avseende svampar, och g4 och g5 har minst olikheter i avseende bakterier. Prov pB (och grupp g2) visar en tydlig olikhet mot resterande prov/grupper i avseende bakterier.

För avsnitt 2.4 Community differences analysis (2.4.1 Analysis of Similarity (Anosim), 2.4.2 Multi-response permutation procedure (MRPP) analysis, 2.4.3 T-test) påvisar både avsnitt 2.4.1 och avsnitt 2.4.2 att det är signifikanta skillnader inom bakterier mellan grupperna g1g4 - g3 samt g1g4 - g2g3.

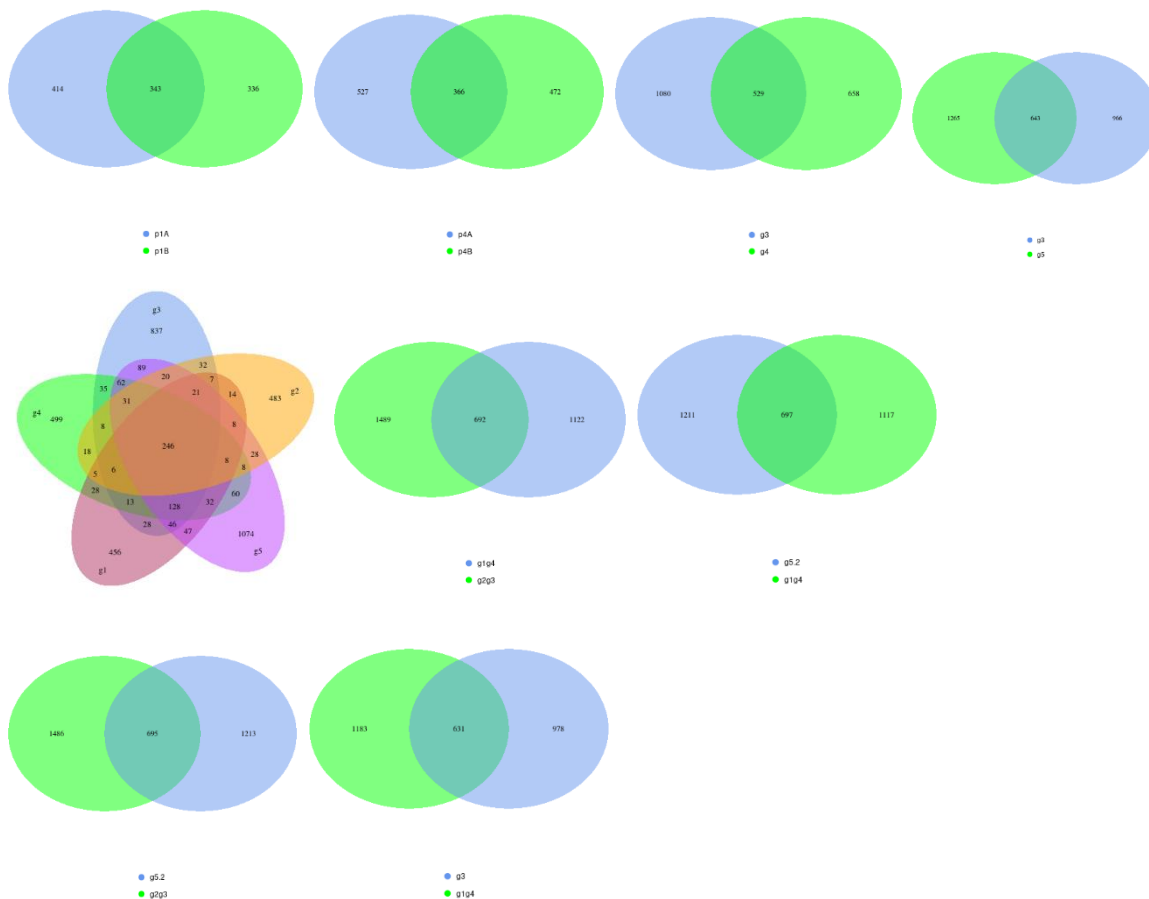
Sammanfattningsvis sticker prov **p3B (höstvet)** ut med höga värden inom biodiversitet, och prov **pB (dunge med björkträd)** sticker ut med höga värden för biodiversitet inom markör ITS2 (svampar), men låga värden inom alfadiversitet för markör 16S (bakterier). Det kan också ses att prov pB är mest olik resterande enskilda fält för markör 16S (bakterier). Prover som finns med i gruppen **g5 (ej vall)** ses också tydliga trender inom då dessa prover får höga värden inom markör ITS2 (svampar), däremot får de låga värden inom markör 16S (bakterier). Vid jämförelse av kombinerade grupper märks en signifikant skillnad mellan grupperna g1g4 (nyligen plöjd mark & förstaårvall) och g2g3 (björkdunge & flerårig vall), där **g2g3** får högre värden inom avsnitt 2.1.1 samt alfadiversitet.

APPENDIX

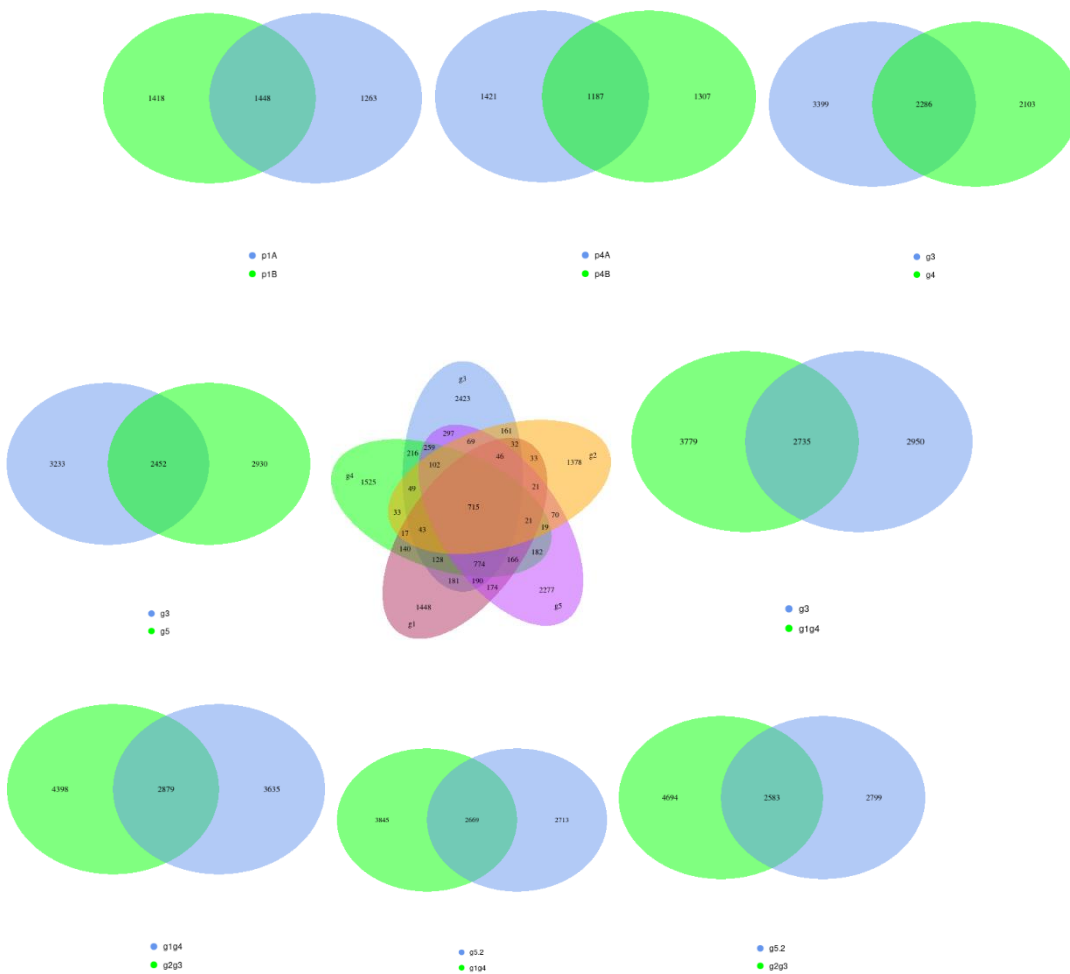
2.1.1 Venn diagram

Venn diagram baserade på ASV mellan olika prover och grupper.

MARKÖR ITS2 (svampar):



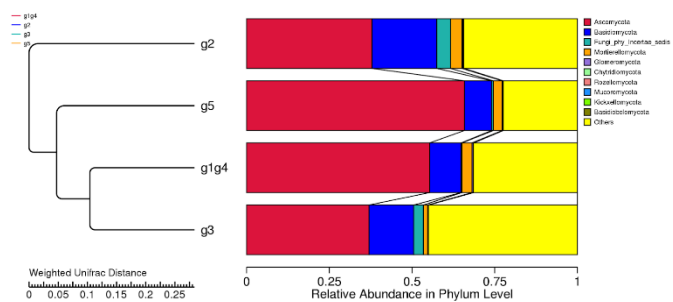
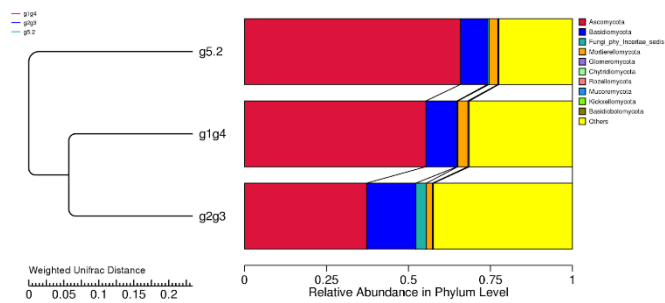
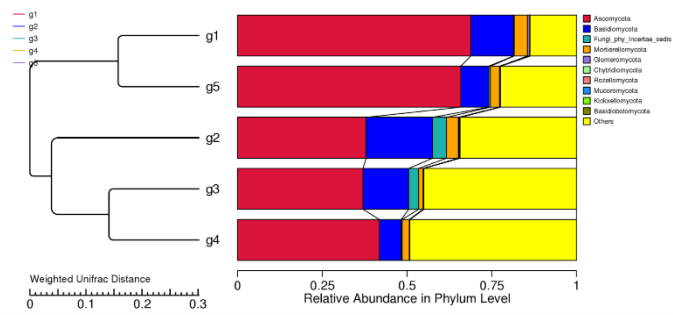
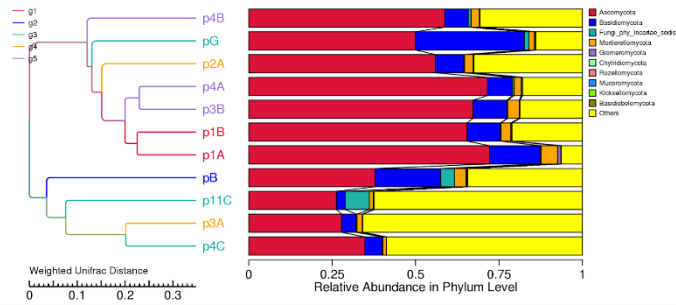
MARKÖR 16S (bakterier):



2.3.2 UPGMA fullständiga plottar

UPGMA använder sig av trädidiagram för att hierarkiskt para ihop de prover/grupper som uppvisar mest likheter inom betadiversitet.

MARKÖR ITS2 (svampar):



MARKÖR 16S (bakterier):

