

# Manual para uso do programa eDNAlyzer

O software é dividido em duas partes “Aplicação do threshold” e “Consolidação dos resultados”, cada uma dessas com um arquivo de entrada específico.

## Aplicação do *threshold*

Esse processo irá separar a tabela proveniente da etapa de atribuição taxonômica, calculará o *threshold* de *contigs* (valor padrão 0,05%) para cada amostra sequenciada, salvará uma lista com o *threshold* de cada amostra de sequenciamento, eliminará as OTUS que estiverem abaixo do *threshold* e salvará uma nova tabela com as OTUS eliminadas.

### Arquivo de entrada:

Monte uma tabela (em formato .xlsx ou .csv) contendo os resultados da atribuição taxonômica com as seguintes colunas:

- amostra\_sequenciamento (identificação das amostras de sequenciamento)
- area\_amostrador (indicando a área de coleta e o amostrador; certifique-se de que tanto as áreas quanto os amostradores sejam identificados de forma não ambígua para evitar erros durante a separação. Use um *underscore* para separar a área do amostrador: área\_amostrador).
- ponto (indicando o ponto de coleta)
- n\_contigs (número de contigs da OTU)
- taxon (táxon definido a partir da atribuição taxonômica).

Outras colunas com nomes diferentes também podem ser incluídas sem problema, como mostrado no exemplo a seguir:

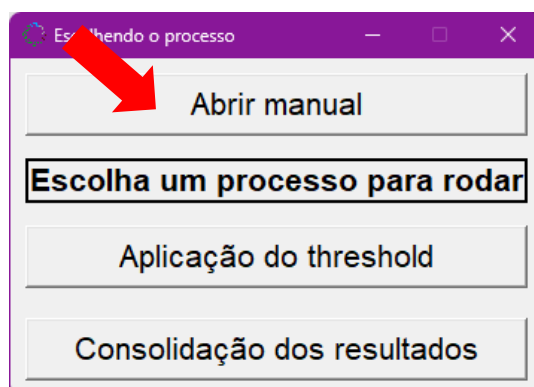
amostra_sequenciamento	tag	area_amostrador	ponto	aliquota	otu	n_contigs	id_%	taxon
C1	TA	A1_MC	1	1	1	89654	100	Alouatta belzebul
C1	TA	A1_MC	1	1	2	542	100	Bos taurus
C1	TA	A1_MC	1	1	3	20	98.45	Bradypus variegatus
C1	TB	A1_MC	1	2	1	75234	100	Homo sapiens
C1	TB	A1_MC	1	2	2	400	99.95	Alouatta belzebul
C1	TB	A1_MC	1	2	3	45	98.98	Coendou prehensilis
C2	TA	A2_MC	2	1	1	47219	100	Homo sapiens
C2	TA	A2_MC	2	1	2	371	100	Bos taurus
C2	TB	A2_MC	2	2	1	65597	100	Sapajus flavius
C2	TB	A2_MC	2	2	2	586	97.56	Coendou sp.
C3	TA	A1_MQ	1	0	1	56076	100	Alouatta belzebul
C3	TA	A1_MQ	1	0	2	692	98.45	Gracilanus agilis
C3	TB	A1_MQ	2	0	1	66490	100	Homo sapiens
C3	TB	A1_MQ	2	0	2	293	98.68	Alouatta belzebul
C3	TB	A1_MQ	2	0	3	198	96.45	Didelphis sp.
C4	TA	A1_AG	1	0	1	79758	99.78	Bos taurus
C4	TA	A1_AG	1	0	2	550	100	Sylvilagus brasiliensis
C4	TA	A1_AG	1	0	3	60	98.45	Bradypus variegatus
C4	TB	A2_AG	1	0	1	71586	100	Homo sapiens
C4	TB	A2_AG	1	0	2	509	100	Alouatta belzebul

A partir daqui abra o programa e siga os seguintes passos:

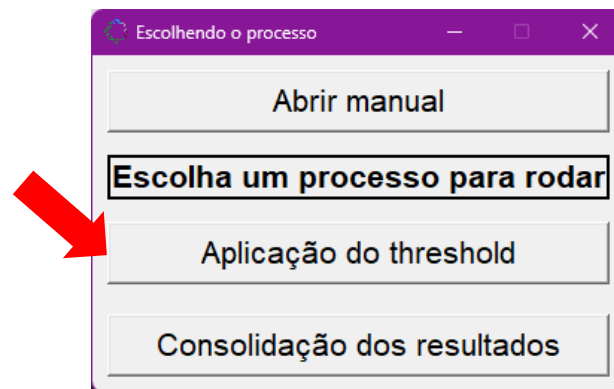
**Passo 1:** Selecione o idioma



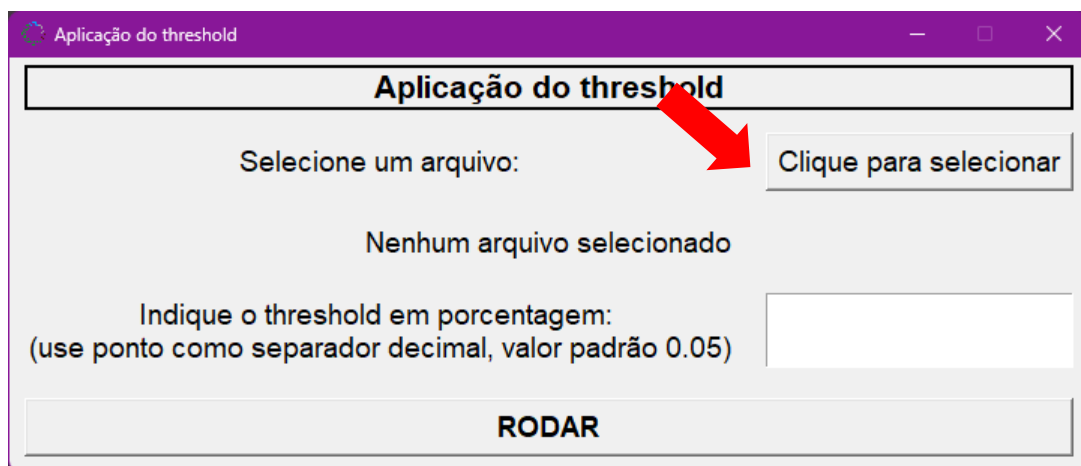
**Passo 2:** Você pode acessar o manual do programa clicando no botão “Abrir manual”



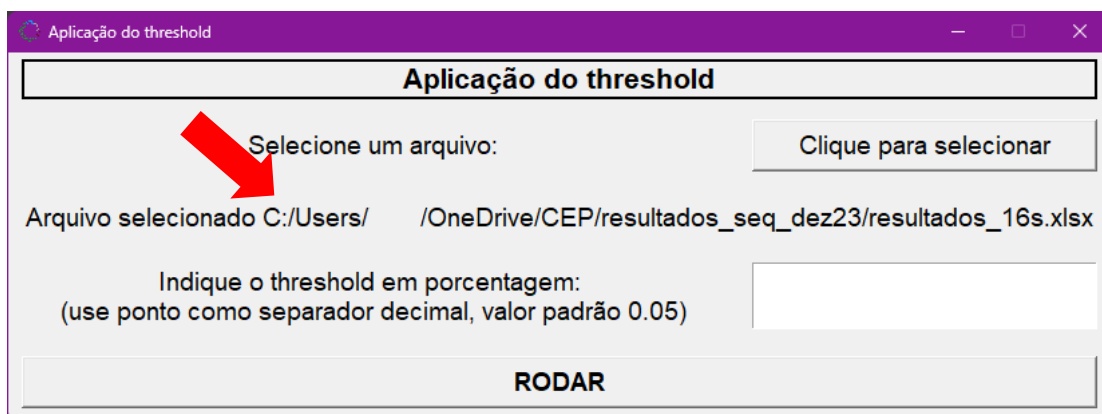
**Passo 3:** Clique no botão “Processamento da inicial a aplicação do threshold”



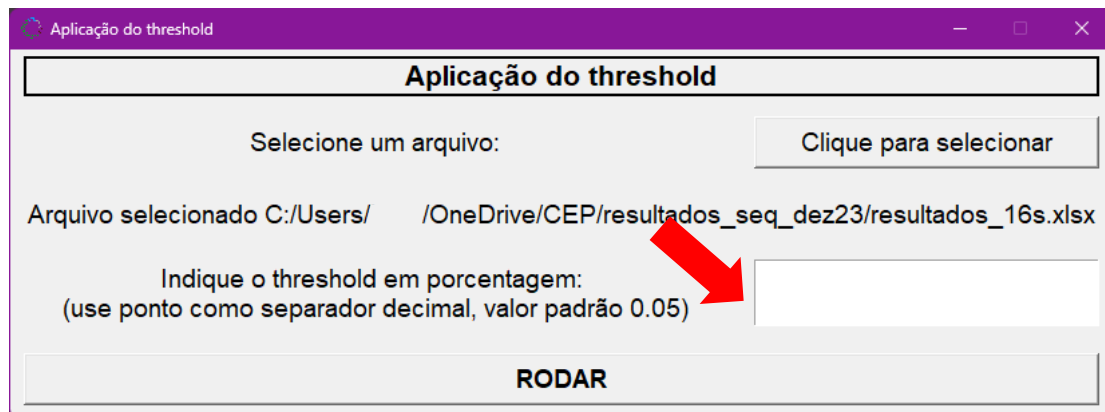
**Passo 4:** Selecione a tabela



Assim que selecionar o arquivo o seu caminho será exibido, confira se está tudo certo.

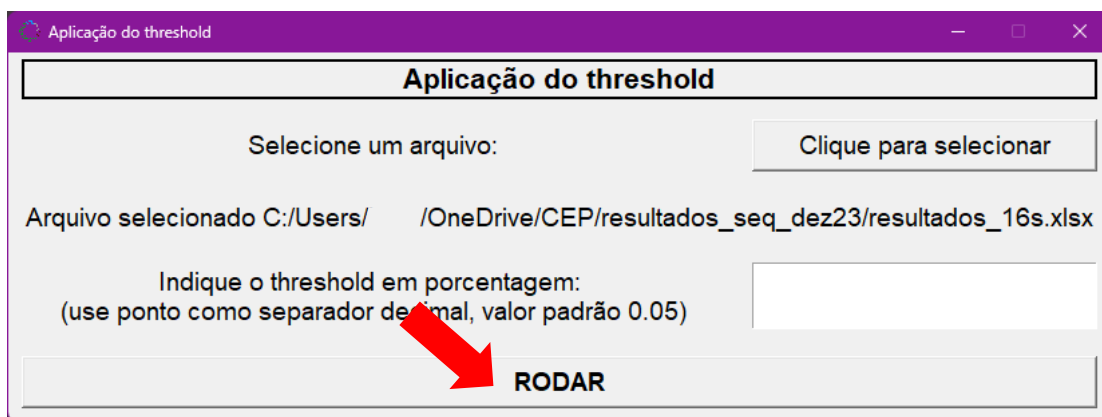


**Passo 5:** O valor padrão para o *threshold* é de 0,05%, porém se desejar usar outro valor informe na caixa de texto usando ponto (.) como separador decimal



The screenshot shows a window titled 'Aplicação do threshold'. It has a header bar with the same title. Below the header, there is a section 'Selecionar um arquivo:' with a button 'Clique para selecionar'. Below that, it says 'Arquivo selecionado C:/Users/ /OneDrive/CEP/resultados\_seq\_dez23/resultados\_16s.xlsx'. Then, there is a label 'Indique o threshold em porcentagem: (use ponto como separador decimal, valor padrão 0.05)' and an empty text input field. A red arrow points to this input field. At the bottom, there is a large button labeled 'RODAR'.

**Passo 6:** Clique em “RODAR”



This screenshot is identical to the previous one, but the red arrow now points to the 'RODAR' button at the bottom of the window.

**Passo 7:** Salve a tabela com o processamento que foi feito através do *threshold*.

**Passo 8:** Salve a tabela com as OTUs que foram eliminadas.

**Passo 9:** Salve a tabela com a lista de *threshold* calculados por amostra de sequenciamento.

Todas as tabelas podem ser salvas em formato .xlsx e .csv.

Dessa forma você terá uma tabela semelhante a tabela que utilizou como arquivo de entrada, porém com a remoção das OTUs com a quantidade de *contigs* abaixo do *threshold*.

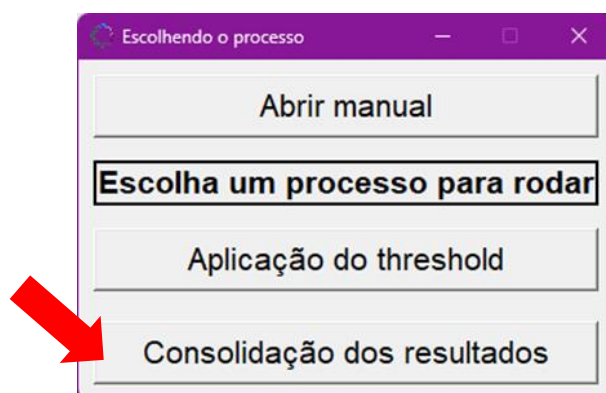
## Consolidação dos resultados

Esse processo irá criar tabelas com os resultados, as listas de espécies com o seu número de detecções e de *contigs*. As tabelas poderão ser geradas separando as listas por amostrador, por área ou por ambos.

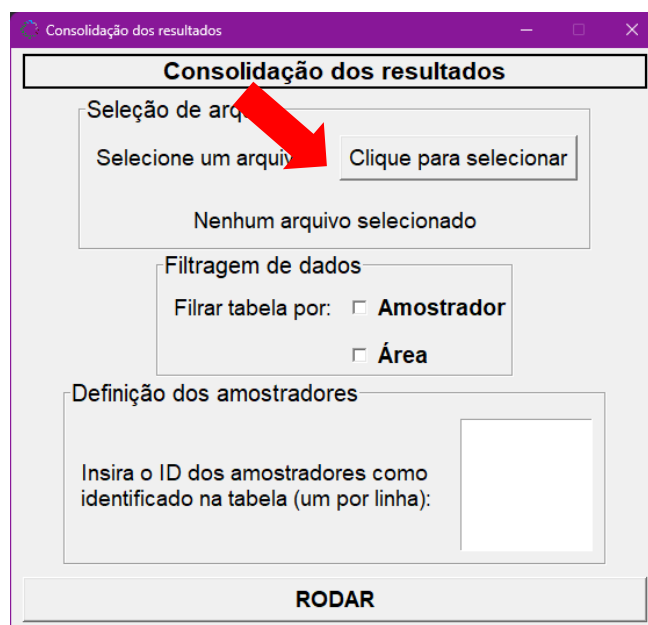
**Arquivo de entrada:** O arquivo de entrada é a tabela (em formato .xlsx ou .csv) com os resultados do processo anterior levemente alterada, deverá ser acrescentada uma coluna nomeada **otu\_final**, que deverá conter a atribuição taxonômica definitiva após revisão dos resultados do processo anterior.

A partir daqui siga os seguintes passos:

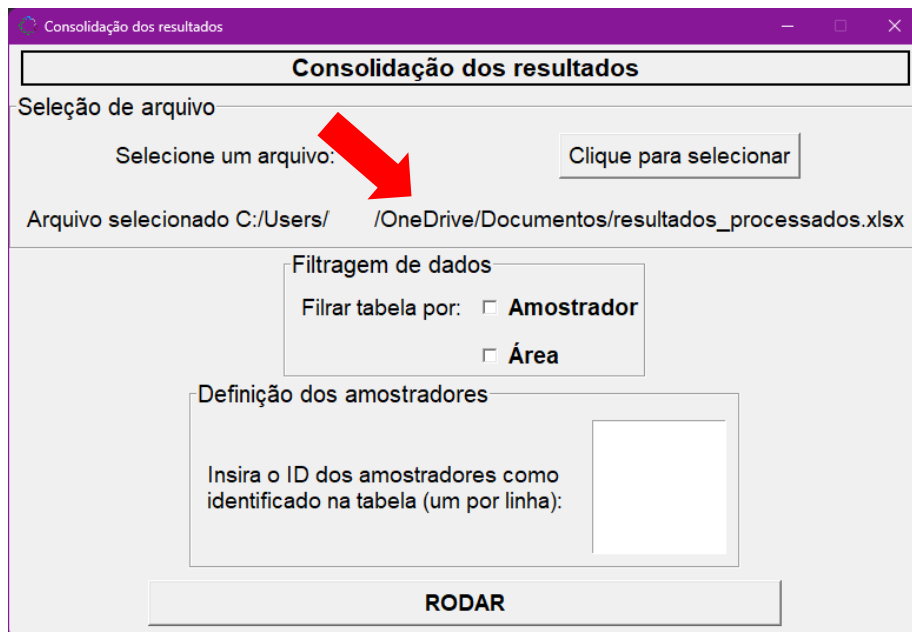
**Passo 1:** Clique no botão “Construção das tabelas de resultados consolidados”



**Passo 2:** Selecione a tabela

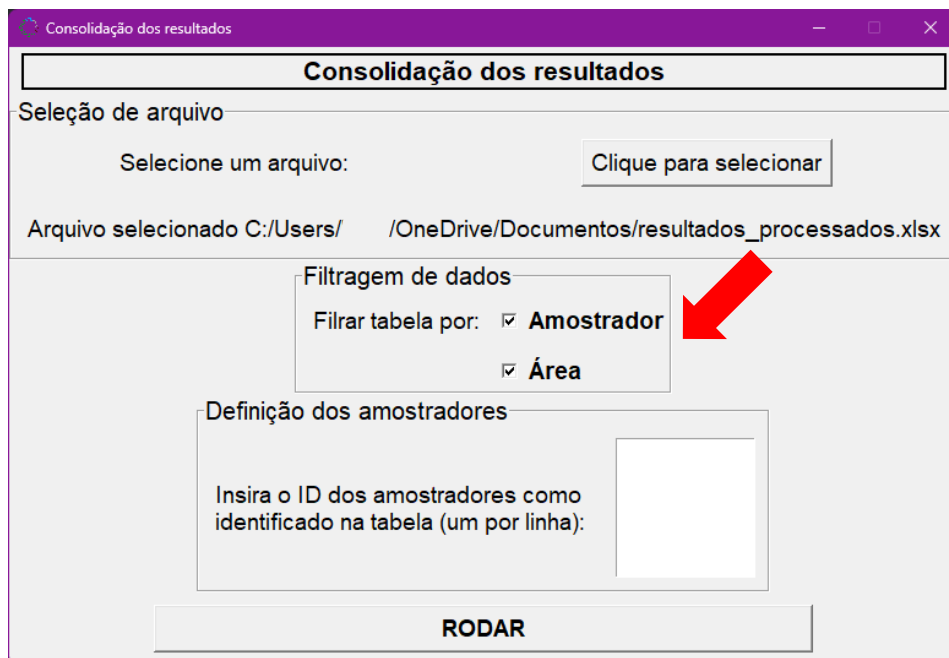


Assim que selecionar o arquivo o seu caminho será exibido, confira se está tudo certo.



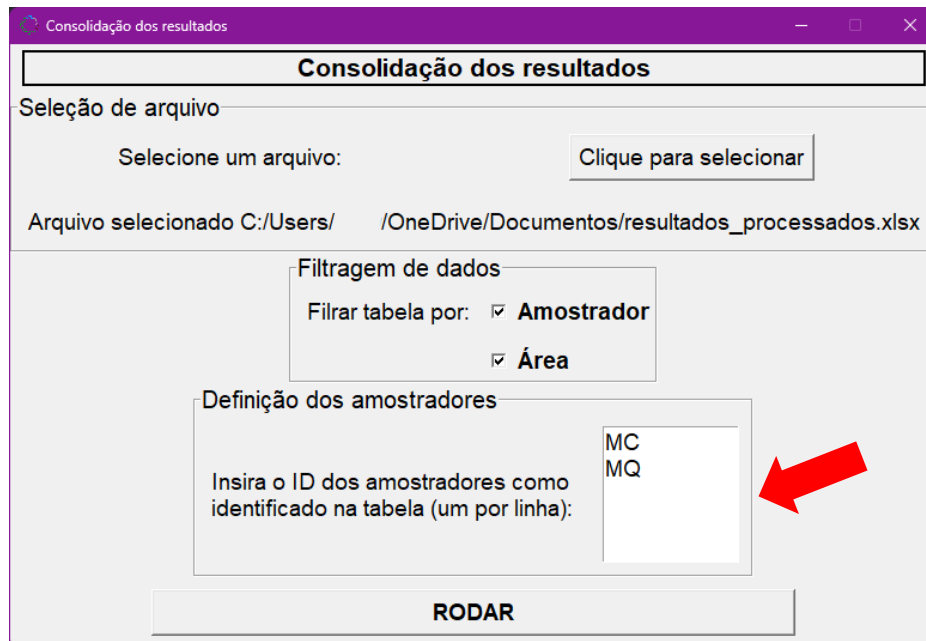
The screenshot shows a window titled "Consolidação dos resultados". Under the "Seleção de arquivo" section, there is a label "Selecione um arquivo:" with a red arrow pointing to it. To the right is a button labeled "Clique para selecionar". Below this, the text "Arquivo selecionado C:/Users/ /OneDrive/Documentos/resultados\_processados.xlsx" is displayed. The "Filtragem de dados" section contains the label "Filtrar tabela por:" followed by two unchecked checkboxes: "Amostrador" and "Área". The "Definição dos amostradores" section has the instruction "Insira o ID dos amostradores como identificado na tabela (um por linha):" and an empty text input field. At the bottom is a large button labeled "RODAR".

**Passo 3:** Após isso, selecione com qual critério deseja separar seus resultados, por amostrador, por área ou por ambos.



This screenshot shows the same window as before, but with the filtering options selected. In the "Filtragem de dados" section, both checkboxes "Amostrador" and "Área" are now checked. A red arrow points to the "Amostrador" checkbox. The rest of the interface, including the file path, the input field for IDs, and the "RODAR" button, remains the same.

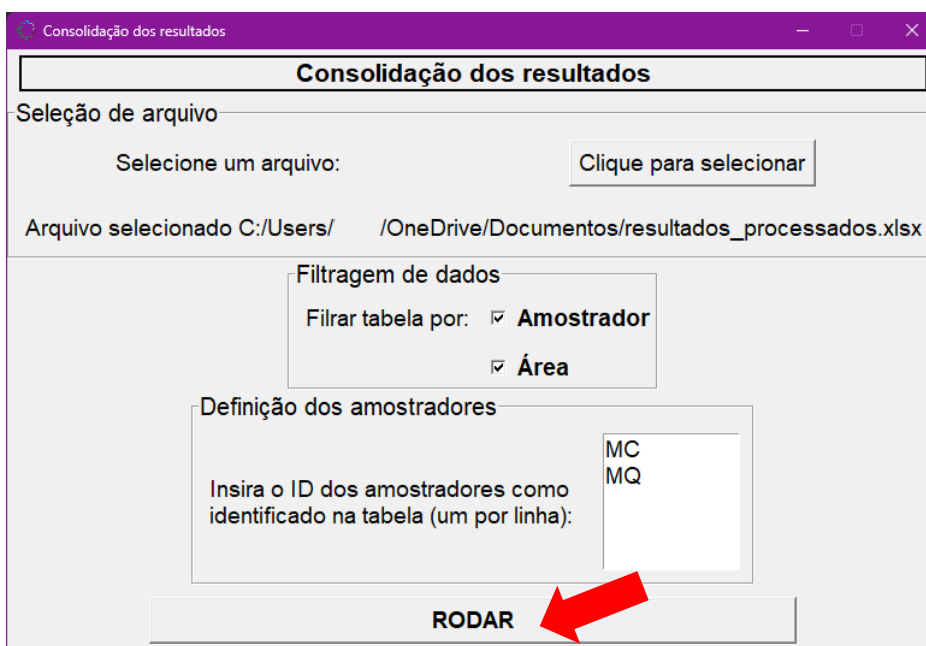
**Passo 4:** Caso tenha selecionado a opção “Amostrador”, indique no próximo campo como identificou seus amostradores na tabela, separe-os por um Enter, de maneira que fiquem um debaixo do outro.



The screenshot shows a window titled "Consolidação dos resultados". It has three main sections: "Seleção de arquivo", "Filtragem de dados", and "Definição dos amostradores". In the "Seleção de arquivo" section, there is a button "Clique para selecionar" and the text "Arquivo selecionado C:/Users/ /OneDrive/Documentos/resultados\_processados.xlsx". In the "Filtragem de dados" section, there are two checked checkboxes: "Filtrar tabela por: Amostrador" and "Área". In the "Definição dos amostradores" section, there is a text input field with the placeholder text "Insira o ID dos amostradores como identificado na tabela (um por linha):". The input field contains the text "MC" on the first line and "MQ" on the second line. A red arrow points to the input field. At the bottom of the window, there is a button labeled "RODAR".

Se não selecionou a opção “Amostrador” no passo anterior deixe esse campo em branco.

**Passo 5:** Clique em “RODAR”



This screenshot is identical to the previous one, showing the same "Consolidação dos resultados" window. However, a red arrow now points to the "RODAR" button at the bottom of the window, indicating the next step in the process.

**Passo 6:** Salve a tabela com uma lista geral de táxons.

**Passo 7:** Salve as tabelas com as listas finais filtradas de acordo com as escolhas. Para salvar em formato .csv escolha a opção de salvar no formato .zip, assim as tabelas serão geradas em um arquivo compactado.

Todas as tabelas podem ser salvas em formato .xlsx e .csv.

Dessa forma você terá tabelas com sua lista final de táxons com informações sobre o número de *contigs* que aquele táxon apresentou e quantas vezes foi detectado.