

# Manual para uso do programa eDNAalyzer

O software é dividido em duas partes “Processamento inicial e aplicação do threshold” e “Construção de tabelas de resultado final”, cada uma dessas com um arquivo de entrada específico.

## Processamento inicial e aplicação do *threshold*

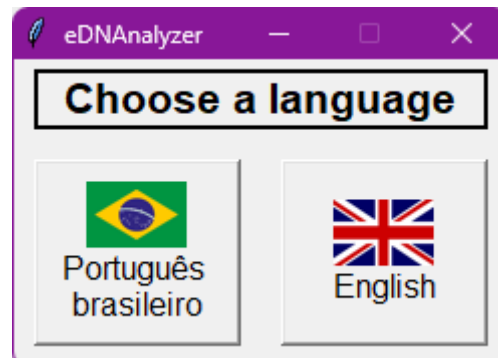
Esse processo irá separar a tabela proveniente da etapa de atribuição taxonômica nas corridas de sequenciamento, calculará o *threshold* de *reads* (valor padrão 0,05%) para cada uma, salvará uma lista com o *threshold* de cada corrida, eliminará as OTUS que estiverem abaixo do *threshold* e salvará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

**Arquivo de entrada:** Monte uma tabela em Excel (preferencialmente em formato .xlsx) com os resultados da atribuição taxonômica que contenha as colunas Corrida (representando a corrida de sequenciamento), Amostra (indicando área de coleta e amostrador, certifique-se de identifica-los de maneira não ambígua para não ocorrer erros na separação, separe a área da amostrador por um underscore (área\_amostrador), Ponto (indicando o ponto de coleta), N\_reads (número de *reads* da OTU) e Espécie (espécie definida partir da atribuição taxonômica). Caso as amostras tenham sido separadas em alíquotas na extração, incluir coluna Alíquota, com sua devida identificação. Nessa tabela podem existir outras colunas com outros nomes sem problema nenhum, como mostra o exemplo a seguir:

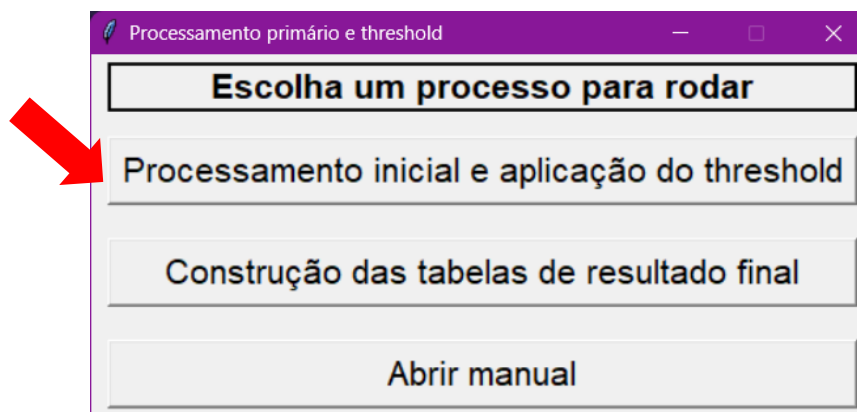
Corrida	Tag	Amostra	Ponto	Alíquota	Otu	N_reads	id_%	Espécie
C1	TA	A1_MC	1	1	1	89654	100	Alouatta belzebul
C1	TA	A1_MC	1	1	2	542	100	Bos taurus
C1	TA	A1_MC	1	1	3	20	98.45	Bradypus variegatus
C1	TB	A1_MC	1	2	1	75234	100	Homo sapiens
C1	TB	A1_MC	1	2	2	400	99.95	Alouatta belzebul
C1	TB	A1_MC	1	2	3	45	98.98	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	Gracilianus 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:

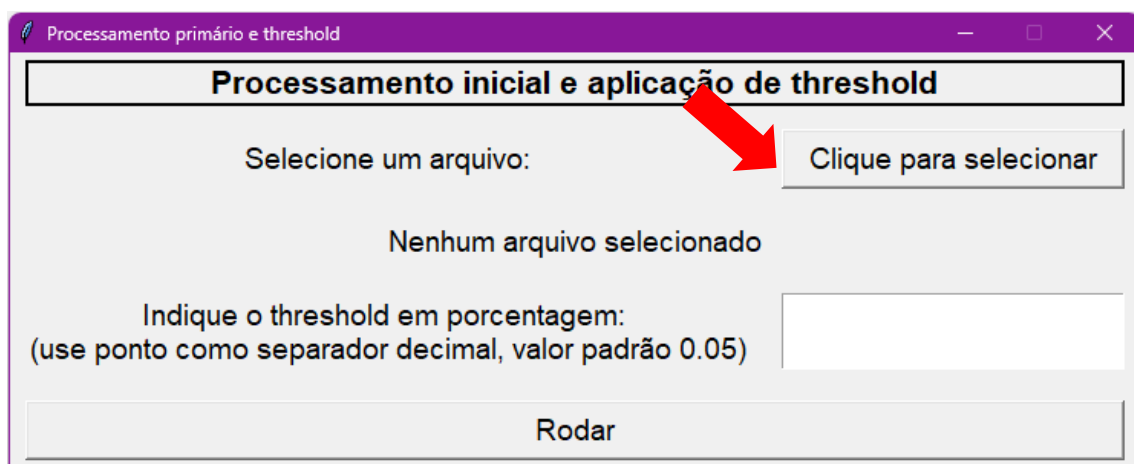
**Passo 1:** Selecione o idioma



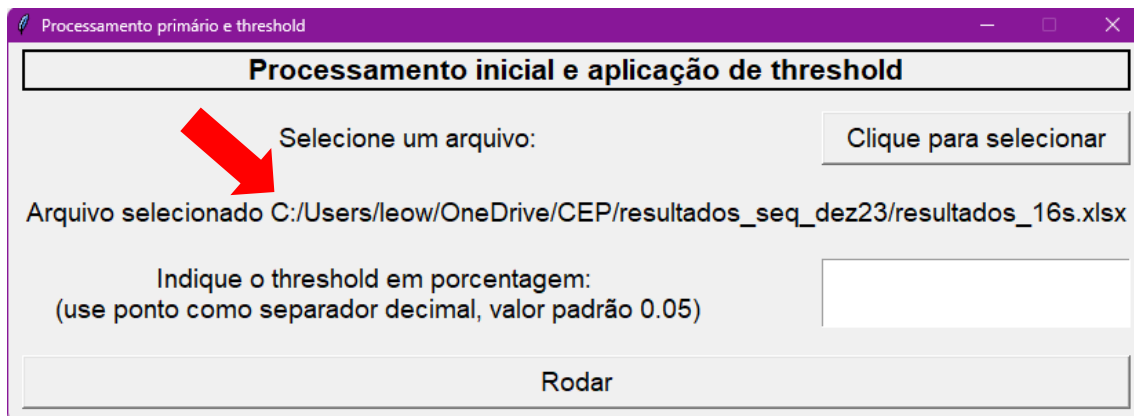
**Passo 2:** Clique no botão “Processamento da inicial a aplicação do threshold”



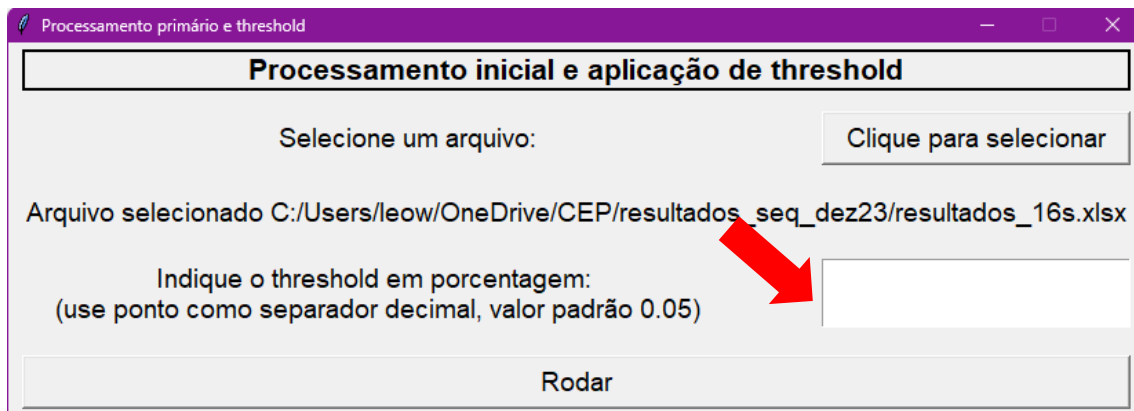
**Passo 2:** Selecione a tabela



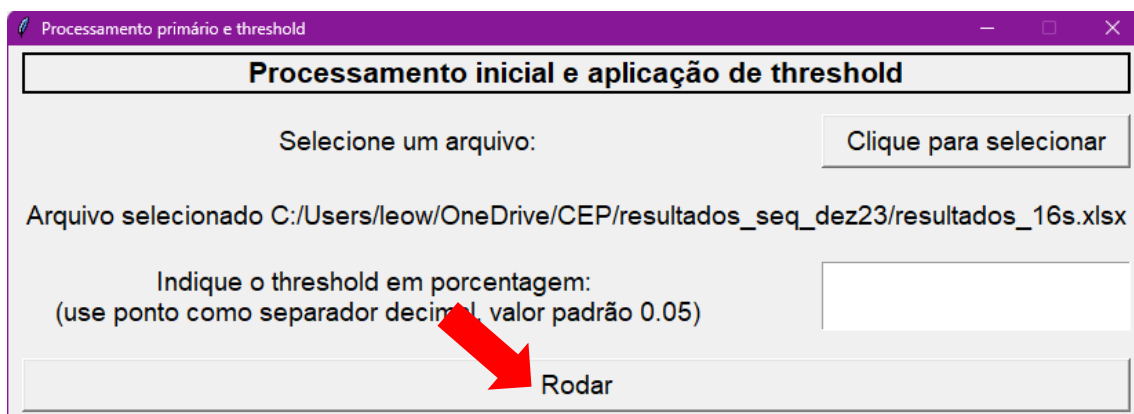
Assim que selecionar o arquivo o seu caminho será exibido, confira se está tudo certo.



**Passo 3:** 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



**Passo 3:** Clique em rodar



**Passo 4:** Salve a tabela Excel (.xlsx) com o processamento que foi feito através do *threshold*.

**Passo 4:** Salve a tabela Excel (.xlsx) com as OTUs que foram eliminadas.

**Passo 6:** Salve a tabela Excel (.xlsx) com a lista de *threshold* calculados por corrida de sequenciamento.

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 *reads* abaixo do *threshold*.

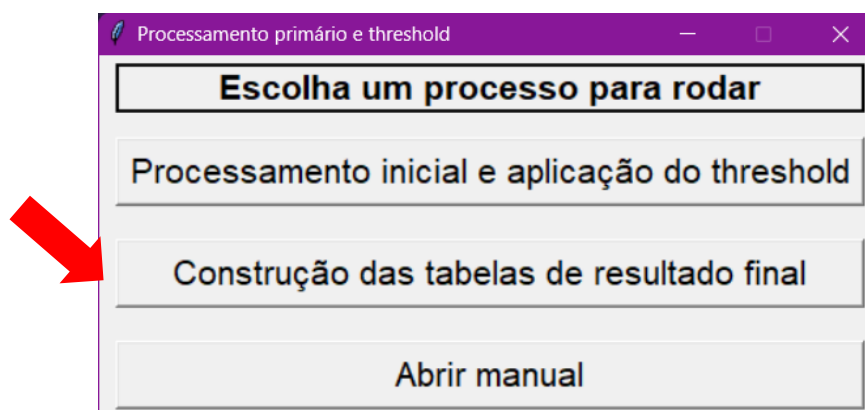
## Construção de tabelas de resultado final

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

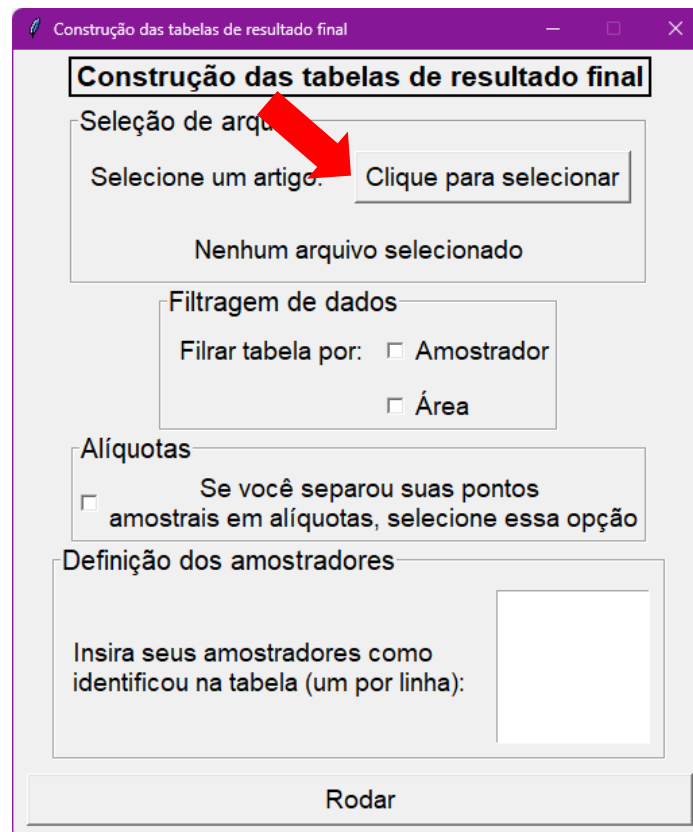
**Arquivo de entrada:** O arquivo de entrada é a tabela de Excel (preferencialmente em formato .xlsx) com os resultados do processo anterior levemente alterada, deverá ser acrescentada uma coluna nomeada **OTUFinal**, que deverá conter a atribuição taxonômica definitiva após revisão dos resultados do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

A partir daqui siga os seguintes passos:

**Passo 1:** Clique no botão “Construção de tabelas de resultado final”



**Passo 2:** Selecione a tabela



**Construção das tabelas de resultado final**

Seleção de arquivo

Selecione um artigo: Clique para selecionar

Nenhum arquivo selecionado

Filtragem de dados

Filtrar tabela por: ☐ Amostrador ☐ Área

Alíquotas

☐ Se você separou suas pontos amostrais em alíquotas, selecione essa opção

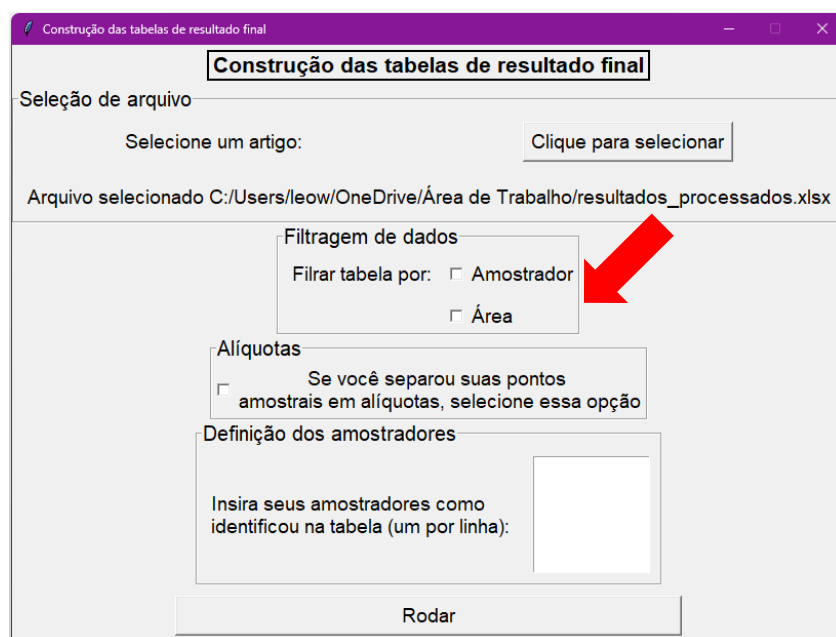
Definição dos amostradores

Insira seus amostradores como identificou na tabela (um por linha):

Rodar

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

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



**Construção das tabelas de resultado final**

Seleção de arquivo

Selecione um artigo: Clique para selecionar

Arquivo selecionado C:/Users/leow/OneDrive/Área de Trabalho/resultados\_processados.xlsx

Filtragem de dados

Filtrar tabela por: ☐ Amostrador ☒ Área

Alíquotas

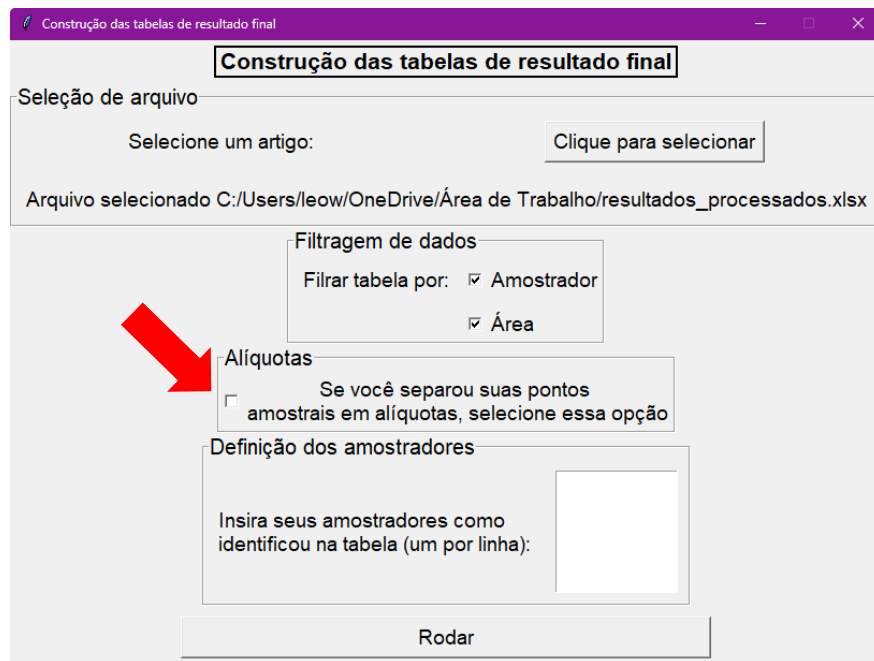
☐ Se você separou suas pontos amostrais em alíquotas, selecione essa opção

Definição dos amostradores

Insira seus amostradores como identificou na tabela (um por linha):

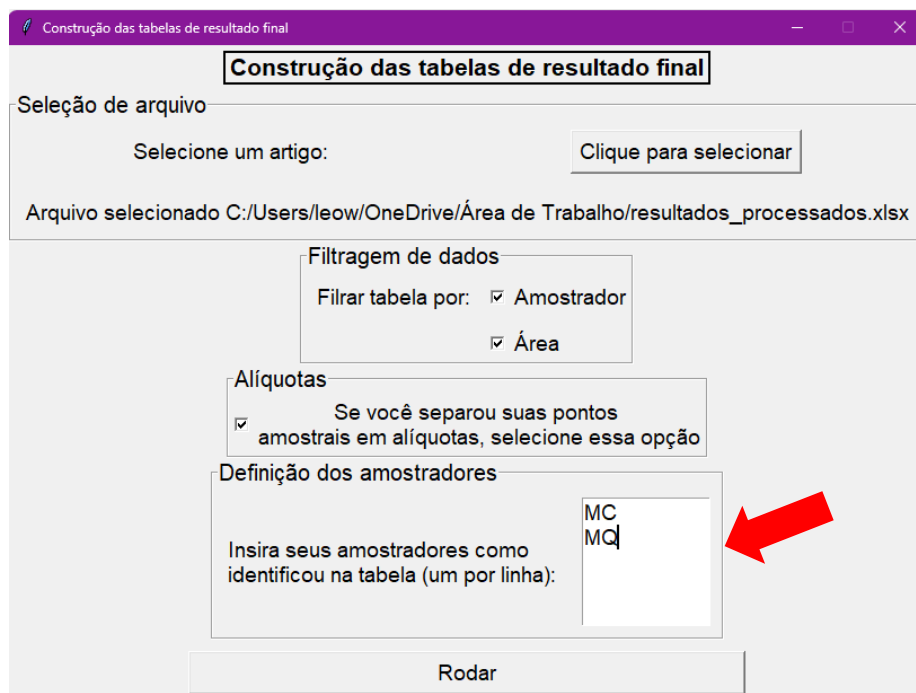
Rodar

**Passo 4:** Caso tenha usado alíquotas na extração de suas amostras selecione a opção de Alíquotas.



The screenshot shows a software window titled "Construção das tabelas de resultado final". It has several sections: "Seleção de arquivo" with a button "Clique para selecionar" and a text field showing "Arquivo selecionado C:/Users/leow/OneDrive/Área de Trabalho/resultados\_processados.xlsx"; "Filtragem de dados" with checkboxes for "Amostrador" and "Área", both checked; "Alíquotas" with a checkbox that is currently unchecked, and a red arrow pointing to it; and "Definição dos amostradores" with a text input field and a "Rodar" button at the bottom.

**Passo 5:** 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.



This screenshot shows the same window as the previous one, but with the "Alíquotas" checkbox now checked. In the "Definição dos amostradores" section, the text input field contains two lines of text: "MC" and "MQ", separated by a line break. A red arrow points to this input field. The "Rodar" button remains at the bottom.

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

### **Passo 6:** Clique em “Rodar”

Construção das tabelas de resultado final

Seleção de arquivo

Selecione um artigo: Clique para selecionar

Arquivo selecionado C:/Users/leow/OneDrive/Área de Trabalho/resultados\_processados.xlsx

Filtragem de dados

Filtrar tabela por: ☒ Amostrador ☒ Área

Alíquotas

☒ Se você separou suas pontos amostrais em alíquotas, selecione essa opção

Definição dos amostradores

Insira seus amostradores como identificou na tabela (um por linha):

MC
MQ

Rodar

**Passo 7:** Se escolheu apenas uma opção no **Passo 3**, salve a tabela com os as listas de espécie finais em Excel (.xlsx)

Se escolheu ambas as opções no **Passo 3**, salve a tabela com listas gerais de espécie para cada amostrador e depois as listas de espécies finais (será gerado um arquivo por amostrados), todas as tabelas geradas estarão no formato (.xlsx).

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