**Opdracht 1 (HTS barcode checker)**

1. Start Ubuntu op

2. Klik op het icoontje ‘Terminal’

*Hiermee start de LINUX shell op*

3. Tik ‘HTS-barcode-cheker’ -h

*Alle commando’s en opties van de HTS barcode checker worden nu weergegeven*

4. Tik ‘HTS-barcode-cheker -i HTS\_barcode\_checker\_test/ en dan een tab aanslaan

*Deze inputfiles zijn dan te zien: Aquilaria.fasta*

*Dendrobium.fasta*

*Dit zijn datasets van Ion Torrent reads gegenereerd uit in beslag genomen TCMs*

5. ‘HTS-barcode-cheker -i HTS\_barcode\_checker\_test/ en dan een tab aanslaan en type vervolgens Aquilaria.fasta in

*Hiermee wordt een inputfile geselecteerd*

6. Voeg -o toe gevolgd door naam naar keuze bijvoorbeeld

HTS\_barcode\_checker\_test/Aquilaria-output.csv

*Hiermee wordt een outputfile gemaakt die direct leesbaar is in Excel*

7. Type –cd /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/CITES\_db.csv

*Hiermee laden we een CITES database die voor het laatst updated is op 12 juni 2013; is deze inmiddels gewijzigd op* [*www.cites.org*](http://www.cites.org) *dan update de checker deze lijst automatisch. Dit kan vermeden worden met het commando –ad.*

8. Druk op ENTER

*De Aquilaria.fasta file wordt nu doorzocht op het voorkomen van CITES soorten*

9. Het doorzoeken duurt een aantal minuten. Als het erg druk is op de server van NCBI GenBank geeft de checker de waarschuwing ‘Failed to obtain blast results’ maar de checker probeert 10 keer achterelkaar te blasten. Als alles doorzocht is wordt dit gemeld met ‘done’.

10. Ga naar het icoontje ‘Documents’ in Ubuntu en dan naar de map HTS-barcode-checker-test

11. Klik op Aquilaria-output.csv

12. Importeer de data volgens de default values (Comma separated)

13. De data van 1 TCM (gelabeled met MID2) zijn nu te zien. Hieruit zijn een aantal contigs van Ion Torrent reads gegenereerd met hits op NCBI GenBank boven de 97% similariteit, minimale hit lengte van 100 bp en maximale E-value van 0.05. Dit is in de opties terug te vinden onder MI, MC en ME.

Te zien is dat veel schimmels in deze TCM voorkomen. Behalve de soortsnaam is ook het NCBI GenBank accessienummer gegeven met de hoogste overeenkomst, details over scores, en naam en taxon ID van de betreffende soorten.

Als een hit met een CITES soort is gevonden wordt dat ook aangegeven, inclusief de Appendix (1, 2 of 3). Contig 5 bevatte verschillende *Aquilaria* soorten die allemaal op Appendix 2 staan. Dit laatste werd al door de checker gemeld.

**Opdracht 2 (HTS barcode checker inclusief gebruik van reconciled names database)**

1. Ga terug naar Ubuntu

2. Klik op het icoontje ‘Terminal’

*Hiermee start de LINUX shell op*

3. Tik ‘HTS-barcode-cheker -i HTS\_barcode\_checker\_test/

en dan een tab aanslaan en type vervolgens Aquilaria.fasta in

*Hiermee wordt een andere inputfile geselecteerd*

4. Voeg -o toe gevolgd door naam naar keuze bijvoorbeeld

HTS\_barcode\_checker\_test/Aquilaria-output.csv

*Hiermee wordt een outputfile gemaakt die direct leesbaar is in Excel*

5. Type –cd /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/CITES\_db.csv

*Hiermee laden we een CITES database die voor het laatst updated is op 12 juni 2013; is deze inmiddels gewijzigd op* [*www.cites.org*](http://www.cites.org) *dan update de checker deze lijst automatisch. Dit kan vermeden worden met het commando –ad.*

6. Voeg toe /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/Reconciled\_names\_db.csv

7. Druk op ENTER

*De Aquilaria.fasta file wordt nu wederom doorzocht op het voorkomen van CITES soorten maar nu wordt bovendien gescreend op het gebruik van formeel nog niet gepubliceerde (=dus niet bestaande) taxonomische namen*

9. Het doorzoeken duurt weer een aantal minuten. Als het erg druk is op de server van NCBI GenBank geeft de checker de waarschuwing ‘Failed to obtain blast results’ maar de checker probeert 10 keer achterelkaar te blasten. Als alles doorzocht is wordt dit gemeld met ‘done’.

10. Ga naar het icoontje ‘Documents’ in Ubuntu en dan naar de map HTS-barcode-checker-test

11. Klik op Aquilaria-output.csv

12. Importeer de data volgens de default values (Comma separated)

13. De data van 1 TCM (gelabeled met MID2) zijn nu weer te zien. Hieruit zijn een aantal contigs van Ion Torrent reads gegenereerd met hits op NCBI GenBank boven de 97% similariteit, minimale hit lengte van 100 bp en maximale E-value van 0.05.

Dit is in de opties terug te vinden onder MI, MC en ME.

Te zien is dat veel schimmels in deze TCM voorkomen. Behalve de soortsnaam is ook het NCBI GenBank accessienummer gegeven met de hoogste overeenkomst, details over scores, en naam en taxon ID van de betreffende soorten.

Als een hit met een CITES soort is gevonden wordt dat ook aangegeven, inclusief de Appendix (1, 2 of 3). Contig 5 bevatte verschillende *Aquilaria* soorten die allemaal op Appendix 2 staan. Dit laatste werd al door de checker gemeld.

Bovendien wordt nu voor de hit *Panax omeiensis* gemeld dat deze hetzelfde is als *Panax ginseng* dus alsnog een CITES soort wordt. Deze soort werd bij de vorige opdracht niet gevonden omdat toen de reconciled names database niet mee werd gerund.

**Opdracht 3 (HTS barcode checker)**

1. Ga terug naar Ubuntu

2. Klik op het icoontje ‘Terminal’

*Hiermee start de LINUX shell op*

3. Tik ‘HTS-barcode-cheker -i HTS\_barcode\_checker\_test/

en dan een tab aanslaan en type vervolgens Dendrobium.fasta in

*Hiermee wordt een andere inputfile geselecteerd*

4. Voeg -o toe gevolgd door naam naar keuze bijvoorbeeld

HTS\_barcode\_checker\_test/Dendrobium-output.csv

*Hiermee wordt een outputfile gemaakt die direct leesbaar is in Excel*

5. Type –cd /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/CITES\_db.csv

*Hiermee laden we een CITES database die voor het laatst updated is op 12 juni 2013; is deze inmiddels gewijzigd op* [*www.cites.org*](http://www.cites.org) *dan update de checker deze lijst automatisch. Dit kan vermeden worden met het commando –ad.*

6. Voeg toe /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/Reconciled\_names\_db.csv

7. Druk op ENTER

*De Aquilaria.fasta file wordt nu wederom doorzocht op het voorkomen van CITES soorten maar nu wordt bovendien gescreend op het gebruik van formeel nog niet gepubliceerde (=dus niet bestaande) taxonomische namen*

9. Het doorzoeken duurt weer een aantal minuten. Als het erg druk is op de server van NCBI GenBank geeft de checker de waarschuwing ‘Failed to obtain blast results’ maar de checker probeert 10 keer achterelkaar te blasten. Als alles doorzocht is wordt dit gemeld met ‘done’.

10. Ga naar het icoontje ‘Documents’ in Ubuntu en dan naar de map HTS-barcode-checker-test

11. Klik op Dendrobium-output.csv

12. Importeer de data volgens de default values (Comma separated)

13. De data van 1 TCM (gelabeled met MID2) zijn nu weer te zien. Hieruit zijn een aantal contigs van Ion Torrent reads gegenereerd met hits op NCBI GenBank boven de 97% similariteit, minimale hit lengte van 100 bp en maximale E-value van 0.05.

Dit is in de opties terug te vinden onder MI, MC en ME.

Te zien is dat veel orchideeen, andere planten en schimmels in deze TCM voorkomen. Behalve de soortsnaam is ook het NCBI GenBank accessienummer gegeven met de hoogste overeenkomst, details over scores, en naam en taxon ID van de betreffende soorten.

Als een hit met een CITES soort is gevonden wordt dat ook aangegeven, inclusief de Appendix (1, 2 of 3). De TCM bevatte verschillende orchideeen die allemaal op Appendix 2 staan. Dit laatste werd al door de checker gemeld.

**Opdracht 4 (HTS barcode checker inclusief gebruik van blacklist)**

1. Ga terug naar Ubuntu

2. Klik op het icoontje ‘Terminal’

*Hiermee start de LINUX shell op*

3. Tik ‘HTS-barcode-cheker -i HTS\_barcode\_checker\_test/

en dan een tab aanslaan en type vervolgens Dendrobium.fasta in

*Hiermee wordt dezelfde inputfile geselecteerd*

4. Voeg -o toe gevolgd door naam naar keuze bijvoorbeeld

HTS\_barcode\_checker\_test/Dendrobium-output.csv

*Hiermee wordt een outputfile gemaakt die direct leesbaar is in Excel*

5. Type –cd /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/CITES\_db.csv

*Hiermee laden we een CITES database die voor het laatst updated is op 12 juni 2013; is deze inmiddels gewijzigd op* [*www.cites.org*](http://www.cites.org) *dan update de checker deze lijst automatisch. Dit kan vermeden worden met het commando –ad.*

6. Voeg /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/CITES\_db.csv –bl /usr/local/src/HTS-barcode-checker/resources/Blacklist.csv

7. Druk op ENTER

*De Dendrobium.fasta file wordt nu wederom doorzocht op het voorkomen van CITES soorten maar nu wordt bovendien gescreend op het gebruik van onjuist gedetermineerde DNA barcodes*

9. Het doorzoeken duurt weer een aantal minuten. Als het erg druk is op de server van NCBI GenBank geeft de checker de waarschuwing ‘Failed to obtain blast results’ maar de checker probeert 10 keer achterelkaar te blasten. Als alles doorzocht is wordt dit gemeld met ‘done’.

10. Ga naar het icoontje ‘Documents’ in Ubuntu en dan naar de map HTS-barcode-checker-test

11. Klik op Dendrobium-output.csv

12. Importeer de data volgens de default values (Comma separated)

13. De data van 1 TCM (gelabeled met MID2) zijn nu weer te zien. Hieruit zijn een aantal contigs van Ion Torrent reads gegenereerd met hits op NCBI GenBank boven de 97% similariteit, minimale hit lengte van 100 bp en maximale E-value van 0.05.

Dit is in de opties terug te vinden onder MI, MC en ME.

Te zien is dat veel orchideeen en andere plantensoorten en schimmels in deze TCM voorkomen. Behalve de soortsnaam is ook het NCBI GenBank accessienummer gegeven met de hoogste overeenkomst, details over scores, en naam en taxon ID van de betreffende soorten.

Als een hit met een CITES soort is gevonden wordt dat ook aangegeven, inclusief de Appendix (1, 2 of 3). De TCM bevatte verschillende orchideeensoorten die allemaal op Appendix 2 staan. Dit laatste werd al door de checker gemeld.

Bovendien zijn beide hits van *Gastrodia elata* verdwenen omdat deze verkeerd gedetermineerd waren en in werkelijkheid Nyctaginaceae zijnen dus geen CITES soorten. Deze fout werd bij de vorige opdracht niet gevonden omdat toen de blacklist niet mee werd gerund.

Alle hierboven beschreven handelingen zijn in een web interface opgenomen op een momenteel nog niet draaiende webservice die in de nabije toekomst op een server binnen Naturalis zal komen te staan.