

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	050001
參展科別	動物學
作品名稱	果蠅緯度相關晝夜節律特徵：穩定性、活動量 分佈與演化意義 Latitude-Dependent Circadian Traits in Drosophila: Stability, Activity Peaks, and Evolutionary Implications
得獎獎項	一等獎 美國國際科技展覽會 ISEF
就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	丁照棟 吳雅嵐
作者姓名	林蔓伶
關鍵詞	<u>果蠅、晝夜節律、緯度</u>

作者簡介



我是林蔓伶，今年就讀於北一女中科學班。高一下時，我進入了台大生科系的實驗室，開始進行專題研究。研究過程中遇到了不少挫折，但感謝教授和老師的指導與支持，他們不僅協助我發想主題和討論期刊內容，還給予我許多寶貴的建議。儘管面臨困難，整個過程依然令我興奮且充滿成就感，很高興可以在這裡和大家分享我的成果。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：北區

科 別：動物科

作品名稱：果蠅緯度相關晝夜節律特徵：穩定性、活動量分佈與演化
意義

**Latitude-Dependent Circadian Traits in Drosophila: Stability, Activity Peaks,
and Evolutionary Implications**

關鍵詞：果蠅、晝夜節律、緯度

編號：

摘要

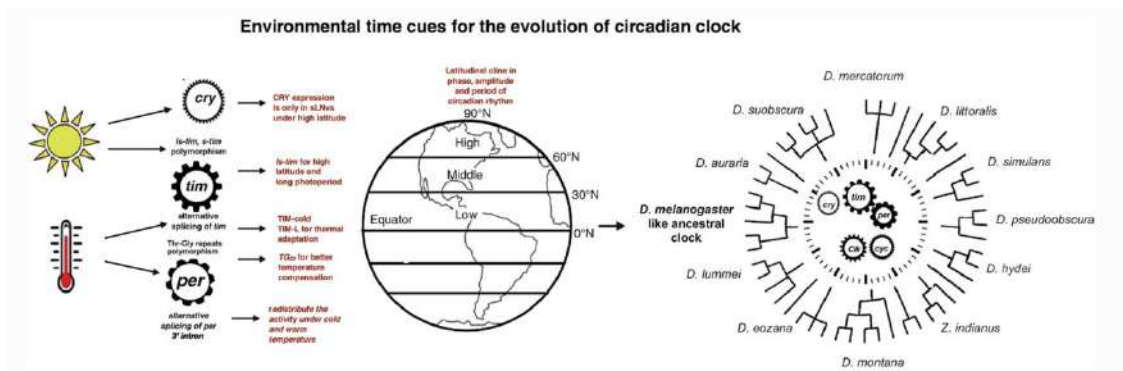
生物時鐘可對生物體的行為與生理造成影響，在探討晝夜節律特徵的差異時，過去研究常侷限於北美大陸的品系，缺少赤道及南半球品系的晝夜節律特徵探討。有鑒於黑腹果蠅在全球各大洲的廣泛分佈，因此我們以黑腹果蠅（近赤道與中高緯度品系）為材料，研究果蠅是否因緯度而有相異的晝夜節律特徵？結果顯示不同緯度的果蠅品系展現出相異的晝夜節律特徵。赤報品系在全暗狀態下仍維持原本光暗 12 小時的穩定節律，而南北半球的中高緯度品系則具有相似節律特徵，即在全暗狀態下的節律不對齊原本正常光源的穩定節律，其他如活動量、週期、及節律強度等皆有著品系間的差異。更進一步比對實驗中各個品系基因序列，研究發現 *per* 和 *tim* 在調控區段有許多 SNP 變異，顯示其與晝夜節律特徵的關係，有助於後續尋找更多造成晝夜節律特徵差異的可能遺傳變異並探討。

The biological clock can influence the behavior and physiology of organisms. In exploring differences in circadian rhythm characteristics, past studies often focused on strains from North America, lacking an investigation into the circadian rhythm characteristics of strains from the equator and the Southern Hemisphere. The *Drosophila melanogaster* is a widely distributed specie across various continents. Thus, we used *Drosophila* (equatorial and mid-high latitude strains) as the subject to study whether flies exhibit different circadian rhythm characteristics due to latitude. The results show that *Drosophila* strains from different latitudes exhibit distinct circadian rhythm characteristics. Equatorial strains demonstrate a more stable rhythm in complete darkness like the one in LD 12:12, while mid- high latitude strains from the Northern and Southern Hemispheres share similar rhythm characteristics, showing an unstable rhythm that does not align with the stable rhythm under normal light conditions in complete darkness. Additionally, there are strain-specific differences in activity levels, period, and rhythm strength. Further comparison of gene sequences in various strains in the experiment revealed many SNP variations in the regulatory regions of *per* and *tim*, indicating a relationship with circadian rhythm characteristics, in order to identify potential genetic variations responsible for the differences in circadian rhythm characteristics.

壹、研究動機

光線作為果蠅晝夜節律當中很大的一項環境刺激，也因此，環境中的亮暗循環被認為是推動生理時鐘演化最主要的力量。溫帶和極地緯度地區日長的季節性變化可能對生理時鐘的演變造成額外的限制。因此，科學家預期居住在不同緯度的物種，其生理時鐘可能會演化出不同特性（Sheeba et al., 2023）。

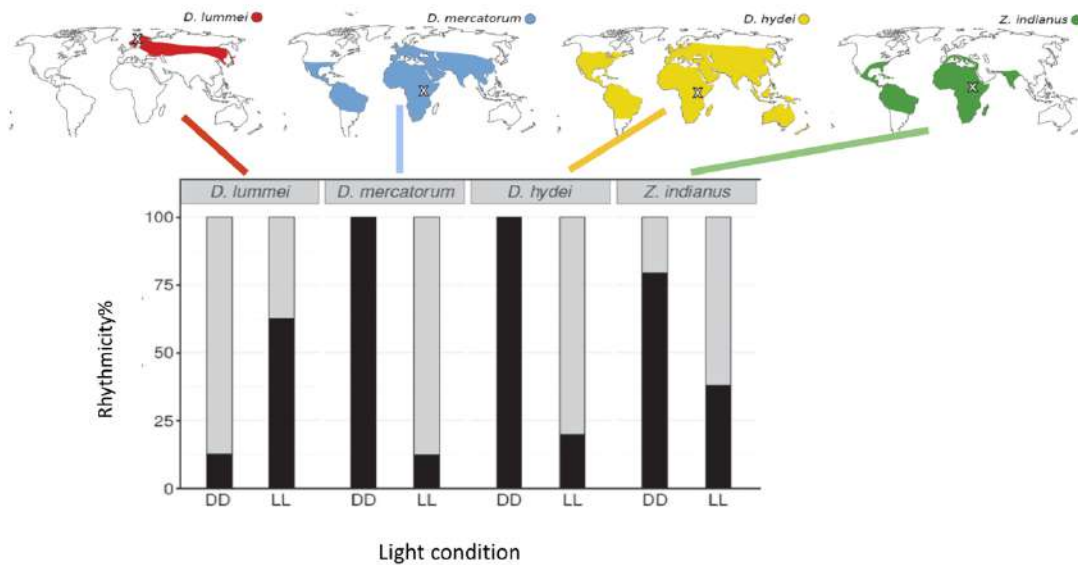
如圖一所示，不同緯度的果蠅品種會因光線和溫度的變化，影響分子生物時鐘基因的變異性，並與果蠅生物時鐘的演化有關。



圖一、影響晝夜節律特徵隨緯度變化的因素與其對應的蛋白質

圖片來源：（Sheeba et al., 2023）

過去有許多研究專注於不同品種果蠅如何適應高緯度的環境，包括寒冷適應性、應對長光週期的調節等。統整目前有關果蠅在高緯度長光週期所產生的晝夜節律特徵如高緯度的果蠅種較能有效的追蹤長日照時間的黃昏，使黃昏的活動量高峰對齊正確黃昏時間；熱帶地區果蠅活動量常有早晨跟黃昏的雙峰構造，但此構造在高緯度的果蠅較不明顯，而是在下午出現廣泛的活動帶，並一直延伸到黃昏，表明其晝夜節律的特徵較不穩定（Menegazzi et al., 2019）；大部分的果蠅在全暗 DD 環境下會呈現內源時鐘的穩定節律，而在全亮 LL 環境下較不能呈現穩定的節律，唯高緯度的果蠅在全亮環境下可以較有效的維持節律，反而在全暗的環境會些許失去節律，這或許與他們所生存的環境擁有較長光週期有關（Helfrich-Förster et al., 2018），如圖二所標示的四個不同品種的果蠅在 DD 和 LL 下的節律程度差異；以及高緯度果蠅的 M（早晨最大活動量 Morning peak）和 E（黃昏最高活動量 Evening peak）之間的相位角（黎明和黃昏的活動高峰之間的時間）較大，代表高緯度的果蠅可以藉由改變活動量特徵的方式對齊環境光源特徵（Menegazzi et al., 2019）。



圖二、不同品種緯度的果蠅在 DD 和 LD 下不同的晝夜節律特徵

圖片來源：（Helfrich-Förster et al., 2018）

針對以上晝夜節律特徵的差異，前人有以下討論，不同種的果蠅之間有神經元構造上的差異（Helfrich-Förster et al., 2017），使他們的中央生物時鐘因為這項差異而有不同的晝夜節律特徵。同種（黑腹果蠅）有時鐘基因 *period* (*per*) 和 *timeless* (*tim*) 的多態性（Helfrich-Förster et al., 2022），如不同核苷酸鏈長度的 *tim* 可能造成對環境溫度的敏感性，進而影響到晝夜節律的呈現。以及生存於高緯度環境中果蠅品種的晝夜節律失去節律，可能是透過核心時鐘內分子振盪的失去或核心時鐘與其輸出之間缺乏耦合所造成（Menegazzi et al., 2019）。

我們想探討同是黑腹果蠅的不同品系，不同緯度的品系是否具有不同的內源時鐘，以及他們在全暗環境下所呈現的晝夜節律特徵有何差異。

過去研究選擇的果蠅族群品系大多聚集在歐洲、北美等範圍，較少探討非洲族群晝夜節律特徵，因此本實驗選擇非洲近赤道地區及更南緯（16、24 度南緯）的果蠅作為研究對象。

我初步預測高緯度地區的黑腹果蠅在持續黑暗環境下應較難維持晝夜節律的節律性，因為當高緯度的光週期因為季節變化而產生過短或過長的光週期使其難以引導生物時鐘產生準確的訊息，節律性較低或具有彈性的時鐘較能夠快速適應環境中有利或不利的變化。而低緯度，如非洲接近赤道的果蠅品系族群，因為其生存環境光週期變化不大，較能在全暗的環境也能維持一定的節律性，其規律的光暗環境提供他們較穩定的節律性。

最後，藉由了解緯度差異對黑腹果蠅品系生物時鐘的影響，我們或許可以得知隨著緯度變化，不同品系果蠅適應當地條件的可能機制，其適應行為如何與當地環境同步，以及其調整活動模式的能力是否反映了優化適應度的演化。

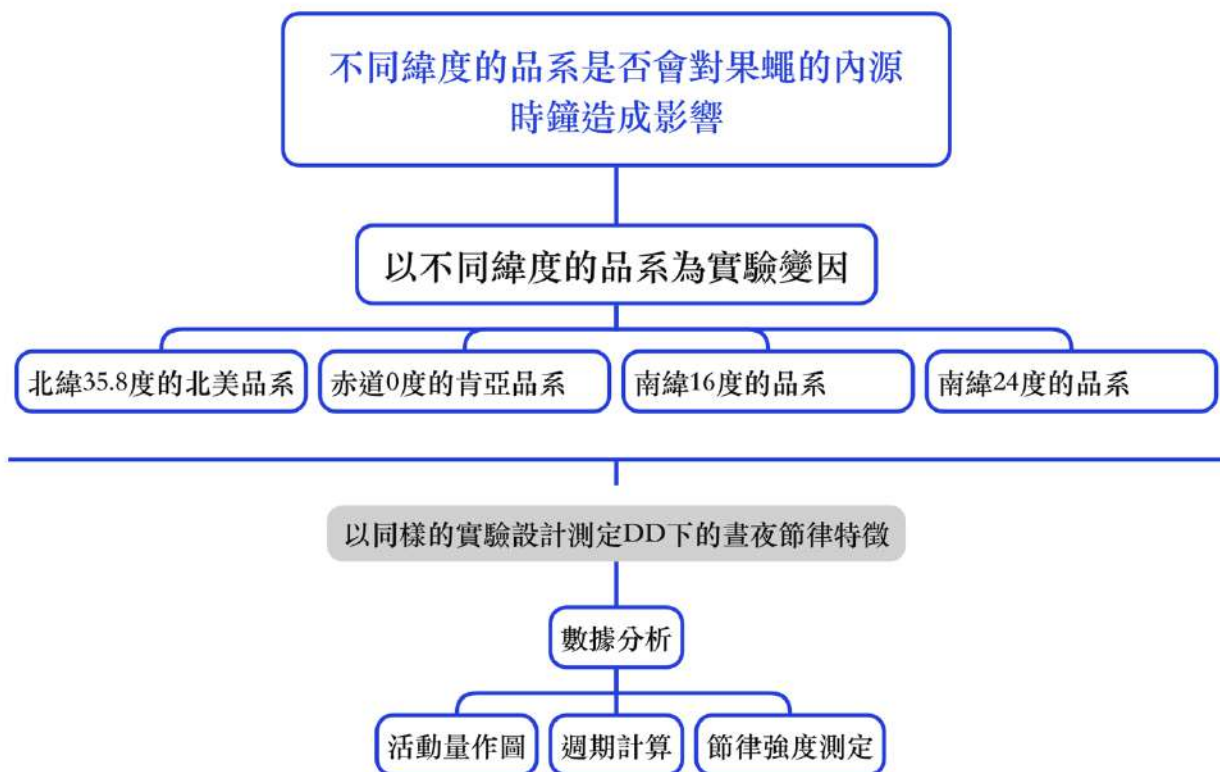
貳、研究目的

- 一、探討黑腹果蠅不同緯度品系之晝夜節律在全暗狀態下的特徵差異
- 二、探討不同緯度品系果蠅維持晝夜節律基因的遺傳變異與演化

參、研究方法

一、研究架構圖：（作者自行繪製）

為了探討不同緯度的果蠅品系是否有內源時鐘的差異，我獲取不同緯度的果蠅品系，分佈橫跨北緯 35.8 度、赤道、南緯 16 度和南緯 24 度。接著以同樣的實驗設計，測定牠們在全暗環境（DD）下的自由運行節律。再獲去活動量數據後，進行活動量做圖、計算週期、以及節律強度測定等數據分析。

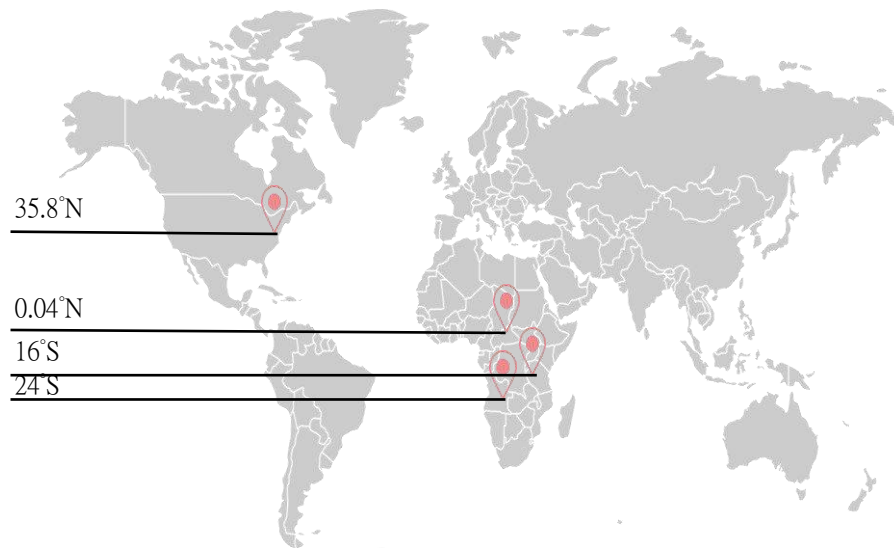


二、測定 DD 下的晝夜節律

首先，將監測儀連上 DAM system，並每分鐘以紅外光偵測一次果蠅的移動次數數據。實驗會先以三天的 12LD 當 entrainment 使果蠅一開始活動與光暗光亮同步。將環境改為全暗（DD）後，完整記錄六天的數據，最後將數據合併為 30 分鐘一筆數據以進行後續的分析。

三、實驗材料

（一）黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）品系的位置



圖三、果蠅品系分佈緯度地圖

（圖片來源：作者自行繪製）

獲取的果蠅分佈從北緯 35.8 度到南緯 24 度，其所在地區的地名與品系代號列如下：（圖片來源：作者自行繪製）

緯度	所在地區	品系代號
35.8°N	北卡羅納州	BL-
0.04°N（赤道）	肯亞	KN-/KR-
16°S	尚比亞、辛巴威	ZI-/ZK-
24°S	南非	SP-

（二）果蠅食物

1. 果蠅培養基（正常飼養情況）：（圖片來源：作者自行繪製）

成分	克重
玉米粉	2250
糖	1000
酵母粉	750
瓊脂	250
水	20L

2. 放入 locomotion monitor 後果蠅的食物培養基：因為正常飼養情況下的培養基容易在活動管中乾燥，因此更改與正常飼養情況不同的培養基配方：

5% sugar + 1.5% agar (圖片來源：作者自行繪製)

成分	克重
蔗糖	2.5
瓊脂	1.5
水	加入適量水使其達到 50ml

(三)、使用儀器

1. 型號：TriKinetics DAM IV Drosophila Activity Monitor
2. 數量：2 台 (每一個有 32 個活動管)

(四)、使用程式

1. DAMSystem311X
用於搜集果蠅移動次數 (Ct) 的程式，將其以時間順序紀錄
2. DAMFileScan113
用以確保所有資料紀錄完成，沒有間隙或重複讀數
3. FaasX software
對 DAM System 收集的晝夜節律活動進行表格繪製和資料分析，包括 Actogram、Cycle_p、Autocorrelation、MESA、和相位分析
4. Shiny-R DAM (Cichewicz K et al., 2018)
利用 chi-squared 方法分析晝夜節律的強度
5. CIRCADA-S
可以合成隨機時間序列，用以探討實驗參數的設計與分析方式
6. Microsoft Excel

四、實驗前置準備

(一) 果蠅飼養

果蠅在 25°C 下使用標準培養基食物在 12:12 光:暗 (LD) 循環下進行飼養。

(二) 活動行為分析

使用 Drosophila Activity Monitors (TriKinetics system, Waltham, MA, USA) 分析每個品系的雄性後代的運動活動行為。根據前人的研究，因為雌性的產卵活動可能影響晝夜節律系統的結果，故僅使用雄性果蠅進行實驗。進行實驗的果蠅皆為孵化後成熟 3~5 天才進行後續實驗。

（三）準備活動管

一端以棉花填塞，另一端填滿 agar food 後（約 1~1.5cm）以蠟封住以避免水分散失（圖四），使食物可以放置一週以上不乾燥。



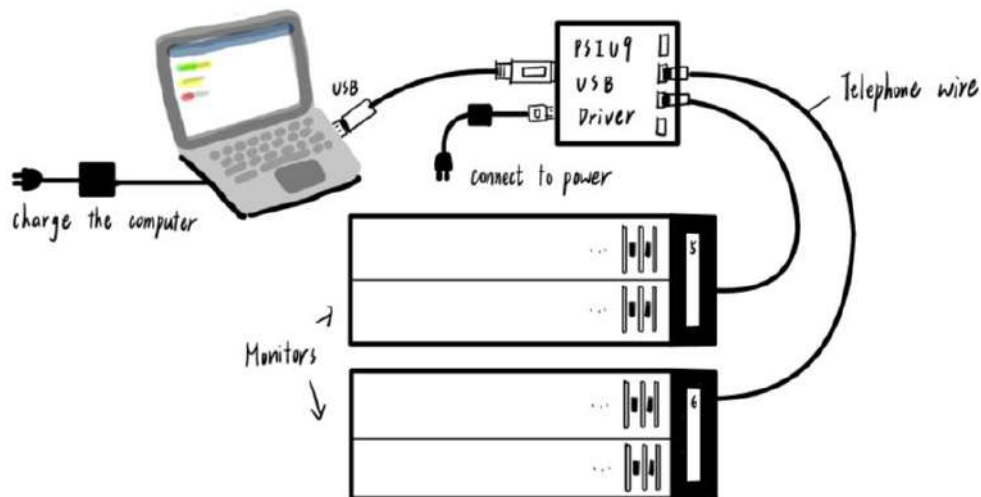
圖四、活動管圖片

（圖片來源：作者自行拍攝）

（四）測定果蠅晝夜節律週期的標準程序

1. LD entrainment 時長 2~5 天
2. 設定開燈 6:00/關燈 18:00 在 12LD 的條件下
3. 恆定溫度 25°C
4. DD 時長 5 天以上
5. 在接近關燈時間的時候去將環境改成 DD
6. 每個品系至少 32 隻果蠅以上以確保資料的穩定性和正確性

（五）DAM system 裝置



圖五、DAM system 裝置示意圖

（圖片來源：作者自行繪製）

五、數據分析

(一) 卡方檢定 (Chi-squared method) :

週期圖 (Periodogram) 使用卡方檢定 (chi-square) 由 Sokolov and Bushnell 在 J. Theoretical Biology 72:139 (1978) 發表。將果蠅的活動資料分割成 tau-low 和 tau-high, 並滿足方程式:

$$Q_P = \frac{KN \sum_{h=1}^P (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

X_i 是 N 個值的資料集中給定時間單位的活動計數, M 是所有 N 個值的平均值, M_h 是 K 值的每個時間單位的平均活動計數。以一個大致 P 週期的範圍計算 Q_p 。節律穩定性以最大 Q_p 值的百分比表示 (完美節律活動時 $Q_p=N$)。

Shiny R DAM 中所使用的 chi-squared method 是 xsp R package (Hitoshi Iuchi and Rikuhiko G. Yamada., 2017)。

(二) 自相關分析 (Autocorrelation method) :

由相關執行活動資料自相關分析以尋找蒼蠅活動的週期性。

Rhythmicity index (RI) 由 Harold B. Dowse 在 (Statistical Analysis of Biological Rhythm Data, Methods in Molecular Biology, vol. 362: Circadian Rhythms: Methods and Protocols) 定義。以第三個自相關峰值的高度, 作為週期穩定性的度量。自相關是針對 0 和最大滯後參數之間的滯後計算的, r_k 代表在 *lag k* 時的自相關係數, x_t 是在時間 t 時的活動量, x_{t+k} 是在時間 $t + k$ 時的活動量, 而 $\bar{x}$ 是果蠅的平均活動量。

$$r_k = \frac{\sum_{t=1}^{N-k} (x_t - \bar{x})(x_{t+k} - \bar{x})}{\sum_{t=1}^N (x_t - \bar{x})^2}$$

六、決定收取數據的標準

自相關分析與卡方檢定兩種方式都可以預測週期 (表一), 因為所使用的演算法不同, 故所得出的預測也不盡相同。而在面對不同類型的波形時, 也會有因演算法而有不同的誤差。這些誤差有時很難預測, 因為基礎理論的演算法設計通常假設沒有趨勢和雜訊。為了更了解這兩種方法及其在不同參數與波形分析的效應, 我使用 CIRCADA, 一個以 R 建立的 Shiny app 來測試不同的採樣間隔、週期、波形對不同分析方法的影響。

表一、兩種預測週期方式比較（圖片來源：作者自行繪製）

method	purpose	reference	note
自相關分析 （Auto-correlation）	得到可以表達 節律程度的 RI 值;預測週期	（Levine et al., 2002）	適用於任何波形，良好的 初始測試適用於檢查可能 有節奏的時間序列；最好 時間序列至少有 4 個週 期
卡方檢定 （Chi-squared method）	做出 periodogram;預 測週期	Sokolov and Bushnell in J. Theoretical Biology 72:139（1978）	常見的預測週期演算法， 但相對其他方法有較高的 錯誤率

其中，我最感興趣的是在不同的 DD 數據天數長和不同的採樣間隔下所產生的誤差，以找到最好的實驗設計。因此，我以 CIRCADA 在 DD 數據天數長 5~9 天之間，採樣間隔 0.125、0.5、0.25（hrs）的不同參數，各產生 100 個隨機波形。以實際週期 24.016（hrs），並使每個合成時間序列的週期是具有標準差的隨機常態分佈值，將 SD 設為 0.1（hrs），波形以 Sin 函數擬合，加入 Gaussian noise 以較能呈現真實的數據。所做成的表如下：

表二、自相關計算在天數與採樣時間的誤差（圖片來源：作者自行繪製）

	5	6	7	8	9
0.125	1.3	0.64	0.47	0.50	0.46
0.25	1.3	0.49	0.43	0.49	0.42
0.5	1.32	0.52	0.43	0.45	0.41

在自相關分析的誤差：縱軸為採樣間隔（單位為 hrs），橫軸為數據天數長（單位為天）表格中數值為實際週期與用自相關分析所預測週期的誤差（單位為%）

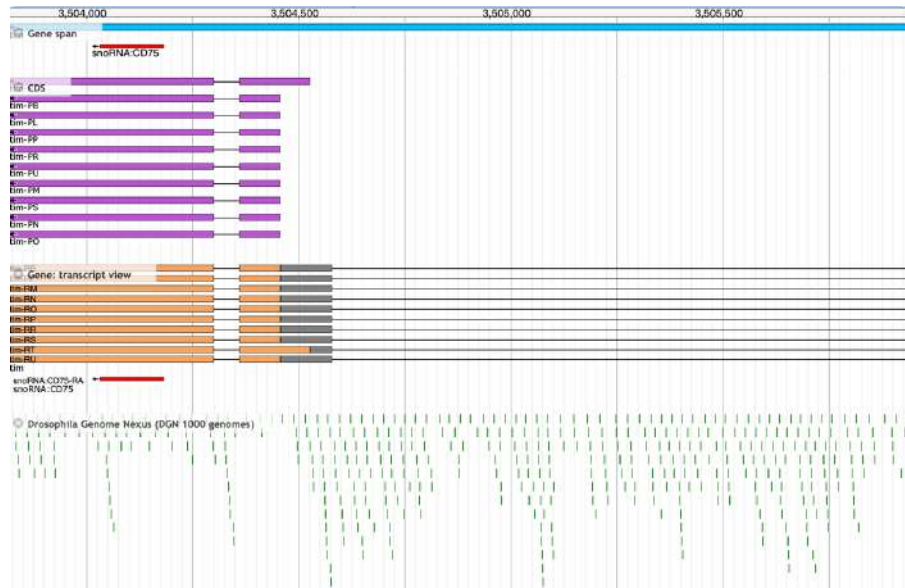
可以看到 5 天到 6 天的時長，誤差有顯著的降低，而後續的 7~9 天誤差就差不多。由其中得知，DD 的數據天數越長可以使預測的週期更接近實際值，採樣間隔的差異則較不明顯。

由上述理論實驗，及配合實驗效率，我設計的實驗以 DD 中環境 6 天，將數據以 0.5（hrs）合併計算。

七、調查時鐘基因在不同品系間的變異

(一) 以可視化的方式觀察 SNP 位點

從 Fly Base 上找到 *per* 和 *tim* 的基因位置與序列，首先先運用 JBrowse 知道這兩個基因大概的位置和 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 位點，如下圖所示：



圖六、JBrowse 在選到 *tim* 時的介面

(圖片來源：截取自 Fly Base 網站 <https://flybase.org>)

上方代表基因的長度與位置，最下方的綠色位點代表 Drosophila Genome Nexus 1000 genomes 出現的 SNP 位點，點開後可以看到個別是哪個品系出現 SNP 變異、變異頻率和對應 reference genome 的差異

Primary Data		Genotypes (1070)		
Type	SNV	non-variant	907	84.77%
Score	99	homozygous for reference	406	37.94%
Description	SNV C -> A	no call	501	46.82%
Position	2L:3494665..3494665	variant	163	15.23%
Length	1 bp	homozygous	163	15.23%
		A variant	163	15.23%
		Total	1070	100%

圖七、SNP 變異位置介面

(圖片來源：截取自 Fly Base 網站 <https://flybase.org>)

此為 2L 染色體上 3494665 位點的變異，可以看到有 C 變為 A 的鹼基變異，且變異在 1000 genome nexus 裡面佔 15.23%

透過 JBrowse 可視化的方式可以使我們以簡單的方式檢查位點，作為後續我在用序列資料調查時檢查 SNP 的一個方法。

肆、研究結果

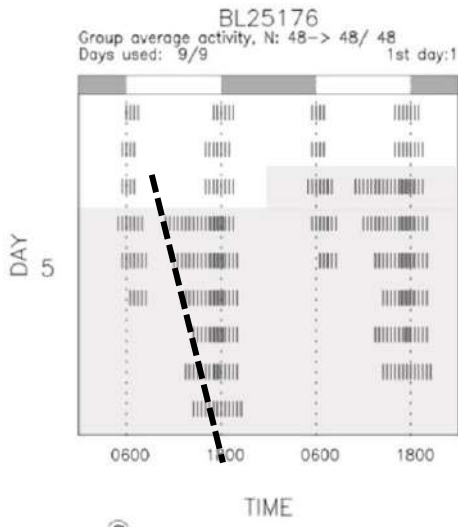
一、果蠅晝夜節律活動量做圖：

透過資料的預處理，先將實驗中途死亡的果蠅數據去除，為了視覺化活動數據的數字形式，我將數據以兩種方式呈現。一種是以 x 軸上繪製整個晝夜節律時間的週期性活動，線段越密集處代表活動量越高，並在 y 軸上繪製一定天數的週期性活動，數據在 x 軸上雙線繪製，以可視化相位變化，通稱為 Actogram（圖九）；而另一種是橫軸為實驗的天數，而縱軸為群體的平均活動量（以同一品系的相加除以果蠅數量），以群體的平均活動量 (group average) 繪製而成的（圖十）。

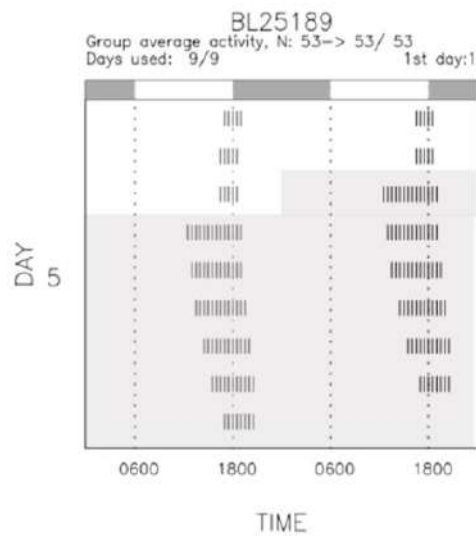
從圖九中的 Actogram 中可以發現，在這五個北緯 35.8 度的品系中，大多數都有活動量向右推移的趨勢（圖中虛線所示），即進入全暗（DD）後的晝夜節律沒有對齊原本在 LD 時所接受到的光線刺激，且週期應有些微較長的現象所造成。

由圖十可以看出在 LD 下，燈亮期間的活動會稍微趨緩。但到了 DD 後，普遍 M（Morning peak）會消失，且因為 DD 期間的中午活動量會增加，沒有明顯的凹陷，這與前人所做的研究相符。另外可發現，各個品系在 DD 下平均活動量都有所增加，M（Morning peak）消失，活動量由下午延伸到黃昏，並在黃昏時達到最大活動量。

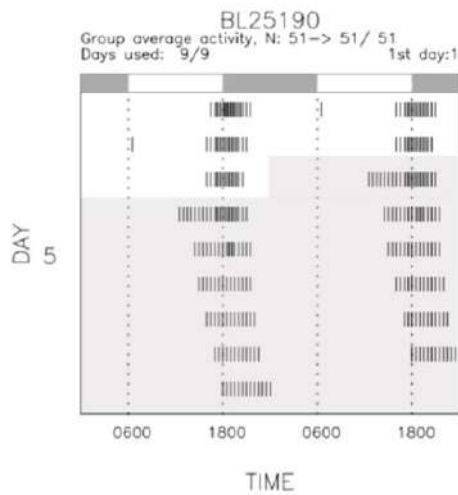
(A) BL25176 / N=48



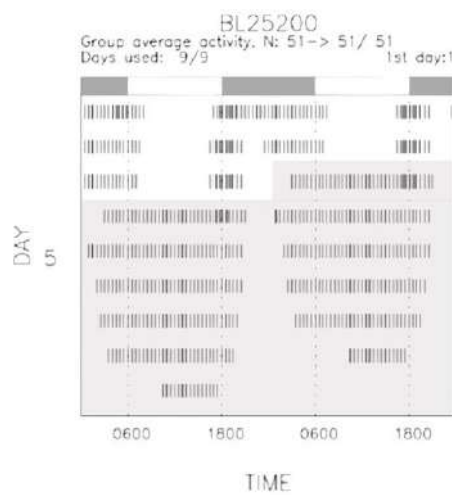
(B) BL25189 / N=53



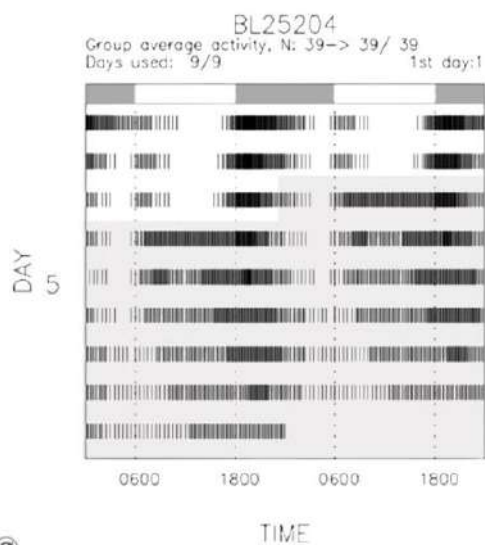
(C) BL25190 / N=51



(D) BL25200 / N=51



(E) BL25204 / N=39

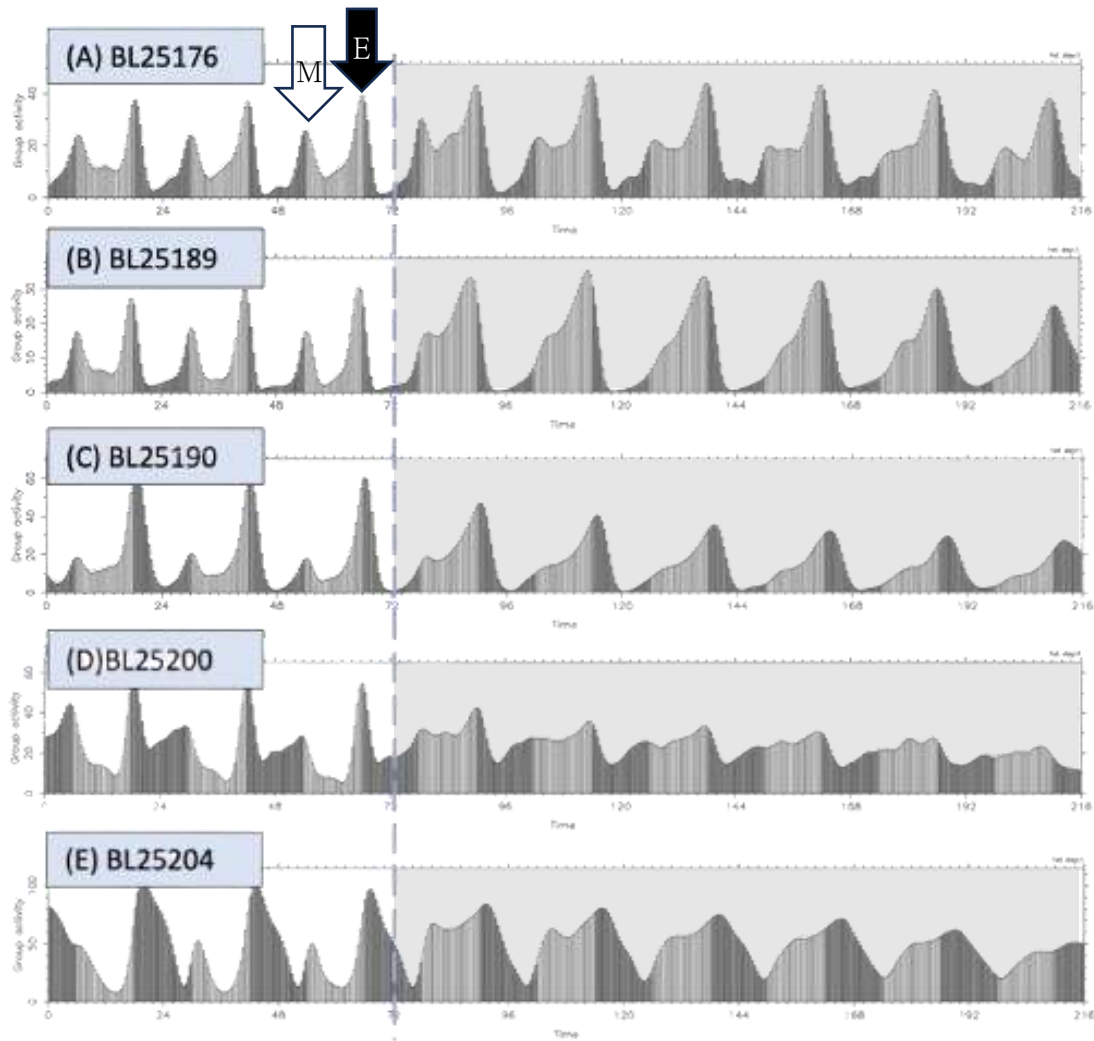


圖九、(A)~(E) 北緯 35.8 度五種不同品系的 Actogram 圖。

(N = 存活果蠅樣本個數)

(圖片來源：作者自行繪製)

圖中最上方黑白相間代表在 LD12 的狀態下環境光線亮和暗的變化。背景轉灰代表切換為 DD 的環境，從五個圖中可以看到在北緯 35.8 度的品系中，在進入 DD 後，果蠅的活動量高峰產生推移(圖(A)虛線)，與原本的環境光線刺激產生時間的落差。



圖十、北緯 35.8 度不同品系的果蠅平均活動量隨時間變化圖

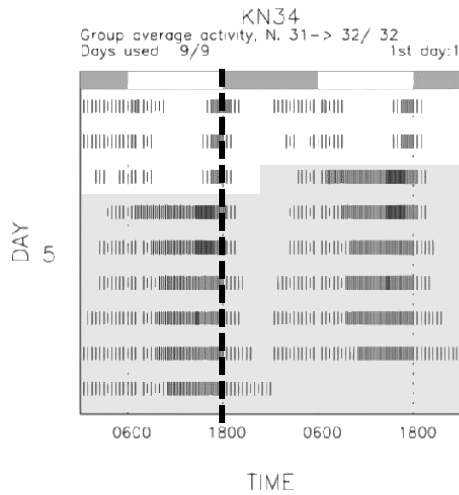
（圖片來源：作者自行繪製）

圖十的虛線分隔前三天的 LD 環境和以灰色背景表示後 6 天的 DD 環境，長方條的淺深灰階顏色代表原本光線刺激的亮暗變化。空心箭頭所指為早晨活動量的高峰 M（Morning peak），實心箭頭為黃昏活動量高峰 E（Evening peak），觀察果蠅活動量在 LD 和 DD 的變化可以看出在進入 DD 後，果蠅原本在中午的活動量低峰（通常被認為午覺的行為），在進入 DD 後被升高的活動量取代，以及進入 DD 後，原本明顯的早晨和黃昏活動量高峰的雙峰結構漸漸消失。

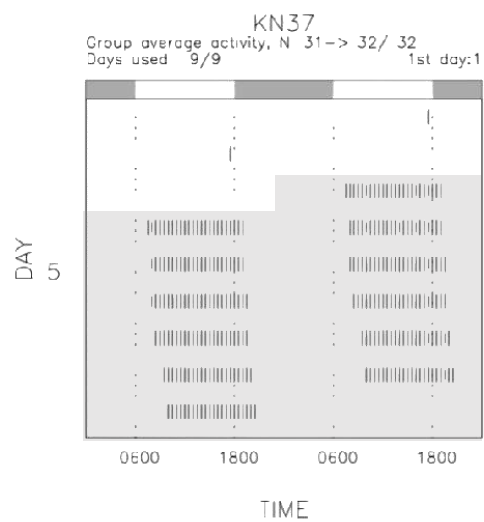
進行完北緯區域調查後，接著進行赤道品系的測定。赤道品系的 Actogram 於圖十一，而活動量隨時間變化圖於圖十二。比對兩地區的 Actogram 可以發現和北緯 35.8 度族群不同的是，赤道品系在進入全暗的環境後，晝夜節律仍對齊原本所接受的光線刺激，如同圖（A）上垂直虛線所示。從赤道品系這項可以對齊原本光線刺激特殊的發現，我推測這可能代表了赤道的品系有更穩定的節律時鐘，讓其在失去光線提示下，內源時鐘能按照原本的指示進行調適。

從活動隨時間的變化圖，比較兩種不同緯度品系果蠅的活動量波形可以發現，相較於北緯 35.8 度品系普遍失去 M（Morning peak）的情況（圖十），赤道品系在 DD 後失去 M 的情況相對較少（圖十二），圖形大致維持雙峰的構造，且 M 和 E 的時間差距有逐漸靠近的趨勢。

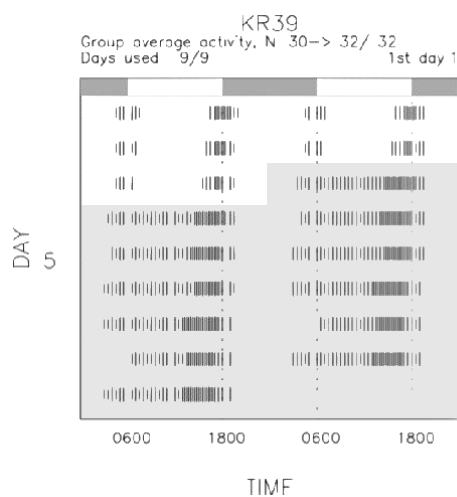
（A） KN34 / N=31



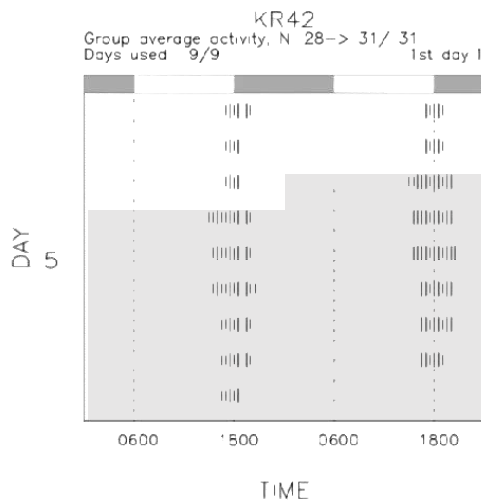
（B） KN37-1-3 / N=31



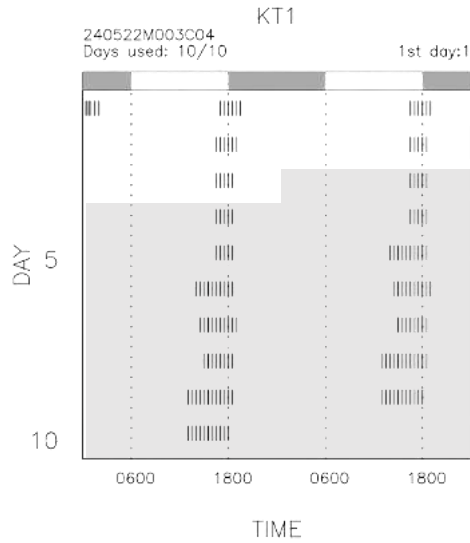
（C） KR39 / N=30



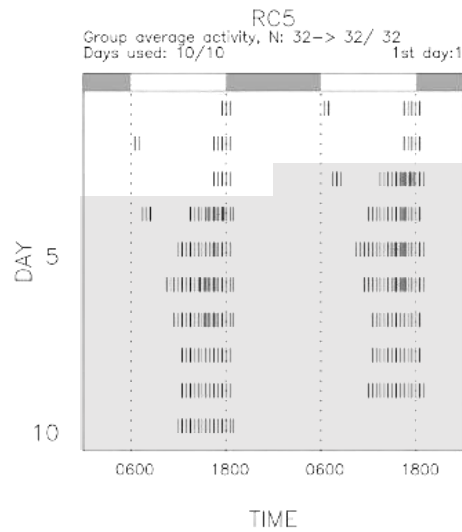
（D） KR42 / N=28



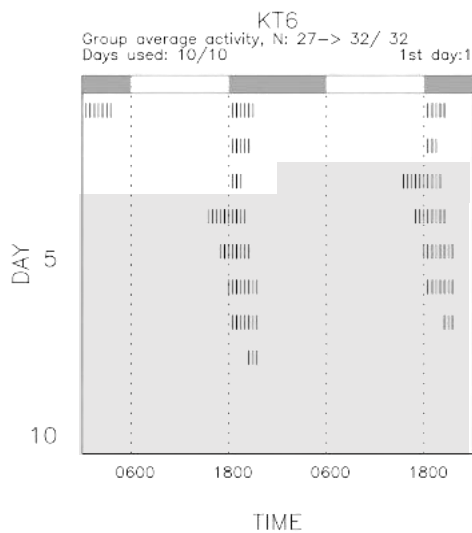
(E) KT1 / single*



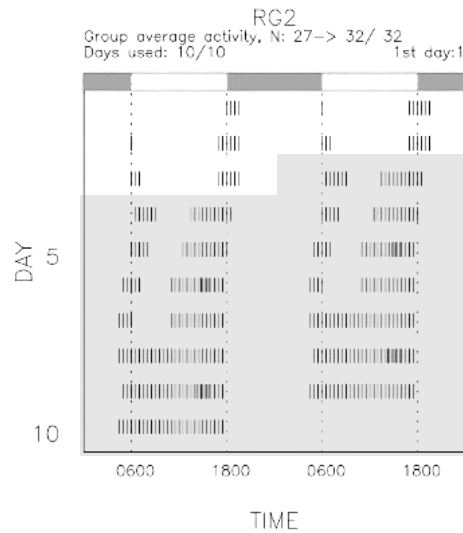
(F) RC5 / N=32



(G) KT6 / N=27



(H) RG2 / N=27

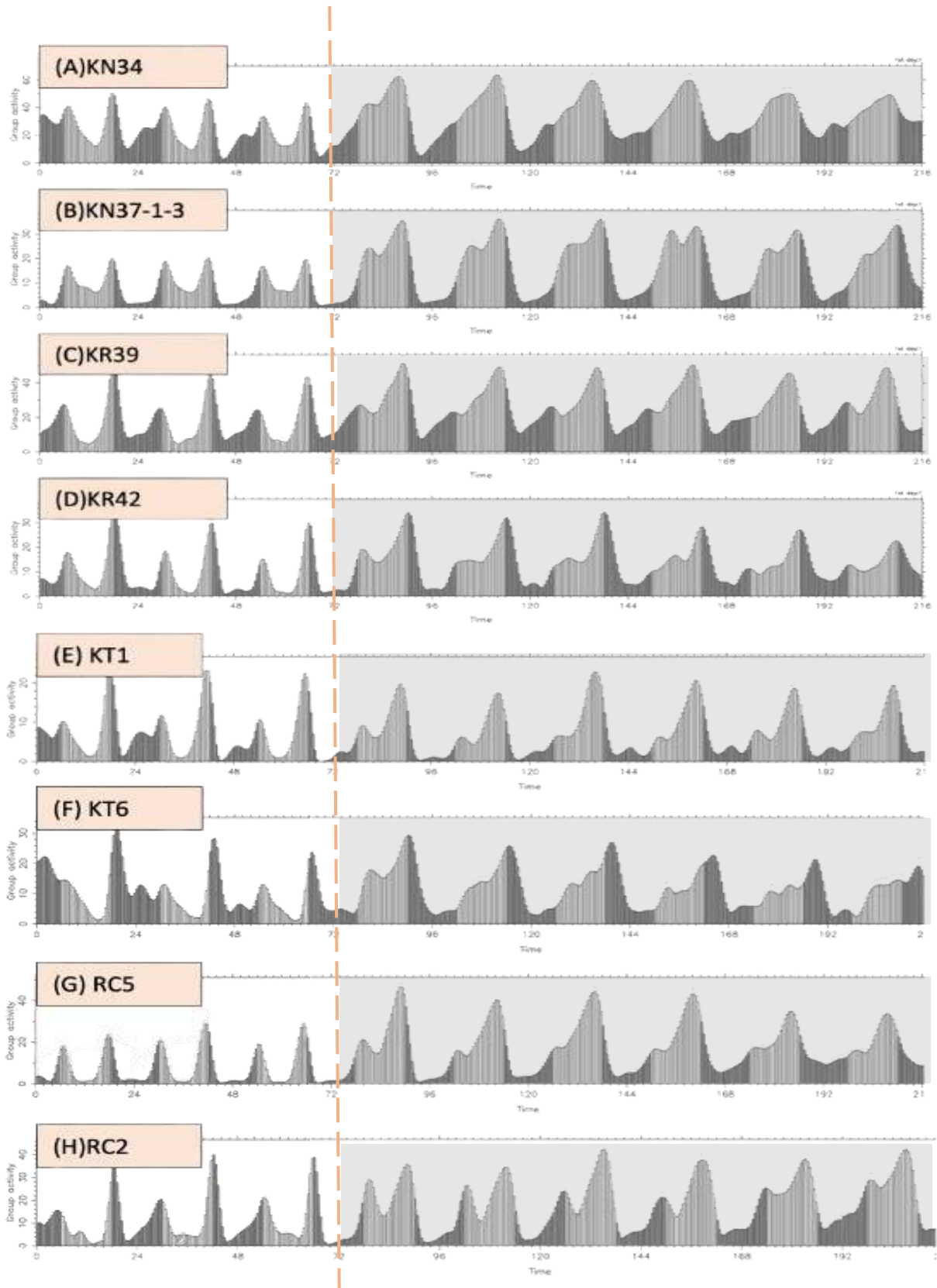


圖十一、赤道八個品系的 Actogram 圖

(圖片來源：作者自行繪製)

可以看出與北緯 35.8 度的品系不同的是，即使進入 DD 後，果蠅的活動量大多還是對齊原本所接受到的光線刺激，活動量高峰與原本在 LD 時維持一致性。這是一個很特別的現象，顯示近赤道的果蠅族群在進入全暗的狀況下可以更好的維持晝夜節律穩定性，內源時鐘的提示可以使其很好的在沒有光線的刺激下保持穩定節律。

(Single*數據代表因這幾個品系整體平均活動量較小，因此數據達不到程式顯示活動量的閾值，因此以隨機挑選的其中一個最具代表性且最完整樣本的單一數據呈現)



圖十二、赤道不同品系的果蠅平均活動量隨時間的作圖

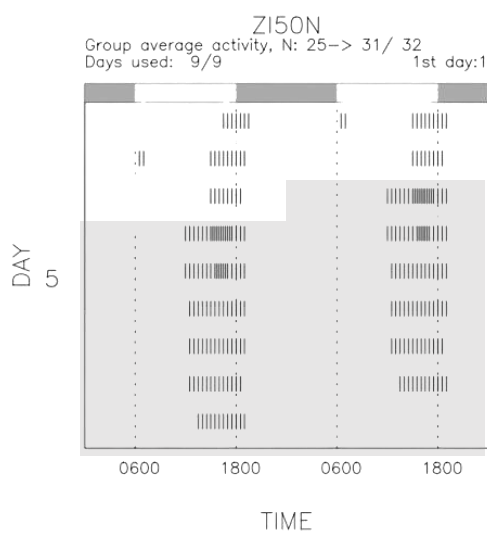
(圖片來源：作者自行繪製)

在前三天的 LD 中可以看到明顯的雙峰結構，而這在進入 DD 後的情況下也是維持的，即使正午活動量升高但還是有呈現些許的早晨和黃昏的活動量高峰特徵。為了驗證此特徵在赤道品系的穩定性和一致性，檢驗更多的品系並都呈現大部分一致的觀察結果。

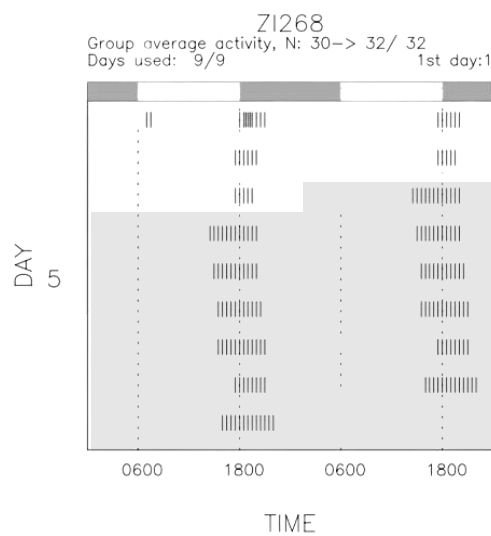
為了驗證在北緯 35.8 度與赤道區域所觀察到的節律特徵，是否在南半球不同緯度間也有相似的特徵。實驗後續加入了尚未被大範圍調查過的赤道以南族群來討論。以下為南緯 16 度族群和南緯 24 度的果蠅族群活動量的作圖，圖十三為 Actogram，圖十四為活動量隨時間變化圖。

圖十三在南半球的品系中顯示，在進入 DD 後也會有活動量不與原光線對齊而偏移的現象，而偏移的程度並沒有因為兩者緯度的差異而有明顯的區別，推測可能是緯度相差不大所造成的。有趣的是，觀察兩區域的品系，各有一個品系所呈現的偏移與在北緯 35.8 度所觀察到的不同，是朝右傾斜（如圖十中 D 和 E 上的虛線所示）。對於這項發現，我推測與些微的週期漸短有關，與後續的計算相符。

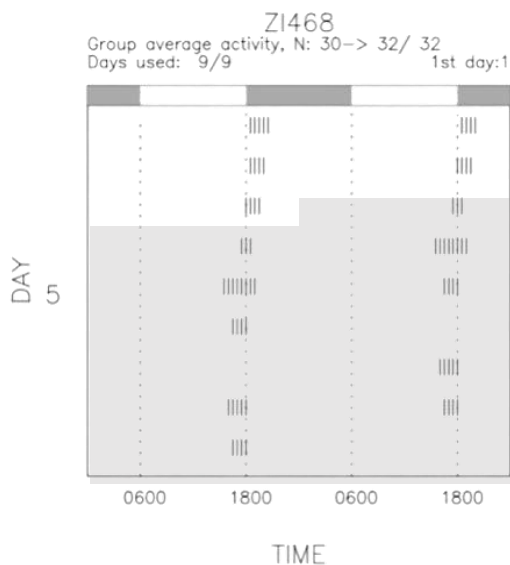
(A) ZI50N / N=25



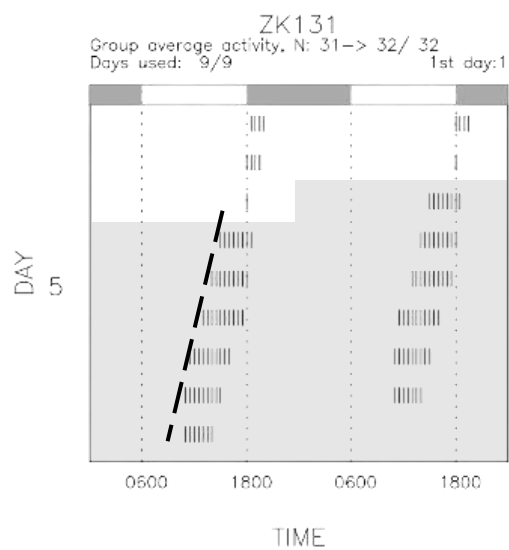
(B) ZI268 / N=30



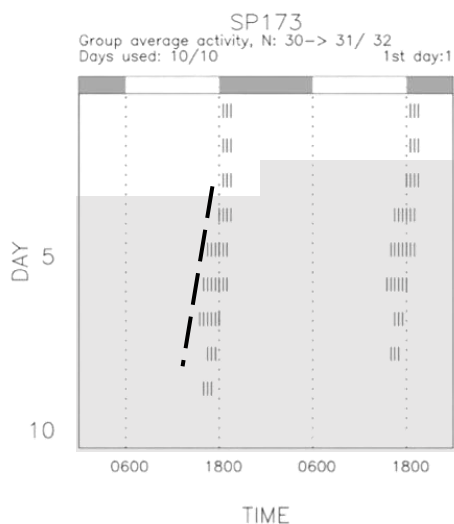
(C) ZI468 / N=30



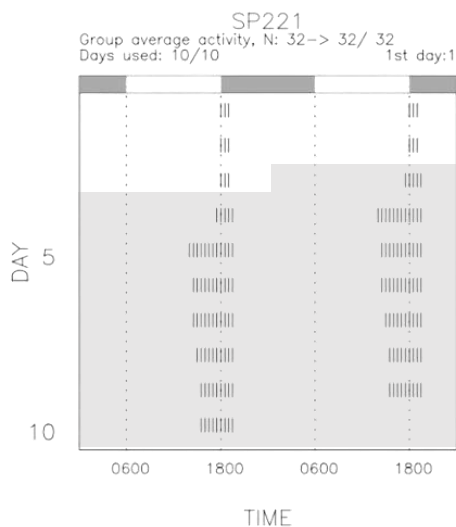
(D) ZK131 / N=31



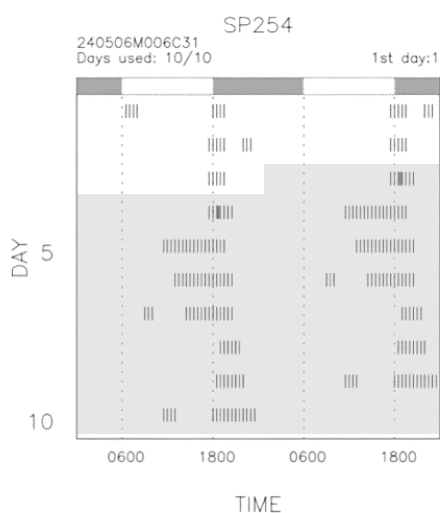
(E) SP173 / N=30



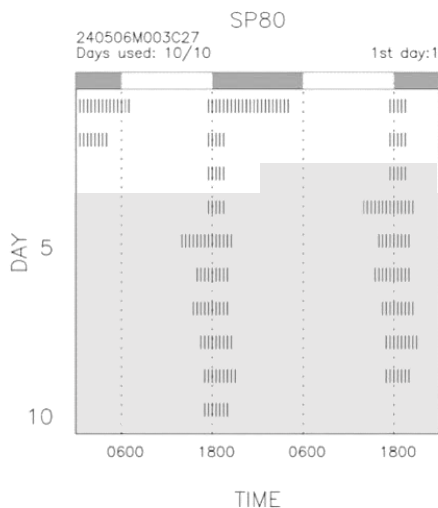
(F) SP221 / N=32



(G) SP254 / single*



(H) SP80 / single*



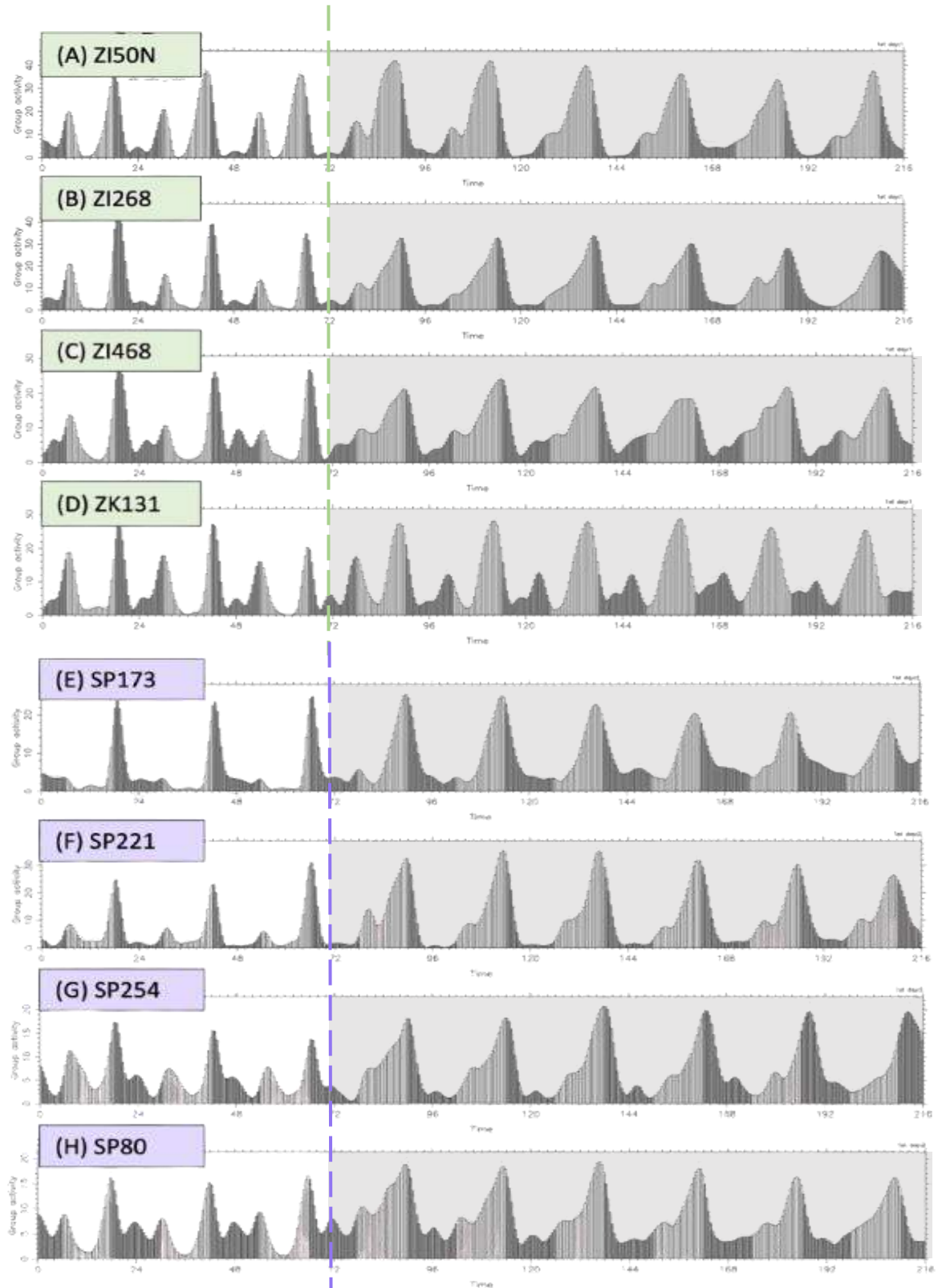
圖十三、南半球各個品系的 Actogram

(A) ~ (D) 為南緯 16 度各個品系的 Actogram

(E) ~ (H) 為南緯 24 度各個品系的 Actogram

(圖片來源：作者自行繪製)

觀察圖十三可以發現南緯 16 度品系的活動圖與赤道品系較接近，沒有明顯的偏移(除 D.ZK131 外)。而在南緯 24 度的品系，可以發現其活動量都有稍微的偏移，雖然與北美族群比起來沒有這麼明顯，但是有此特徵存在。推測可能與緯度不夠南或是活動量較低導致的。有趣的是，在 (D.ZK131 和 E.SP173) 這兩個品系的活動圖數據中，可以發現他們在進入 DD 後的活動量模型是向左偏移，如圖十三 (E) 中黑色虛線，是在北美品系沒有觀察到的，這可能是其週期有非常微小漸短的趨勢(後續在計算時發現)所造成。



圖十四、(A) ~ (D) 為南緯 16 度各個品系的平均活動量隨時間的作圖

(E) ~ (H) 則為南緯 24 度各個品系平均活動量隨時間的作圖

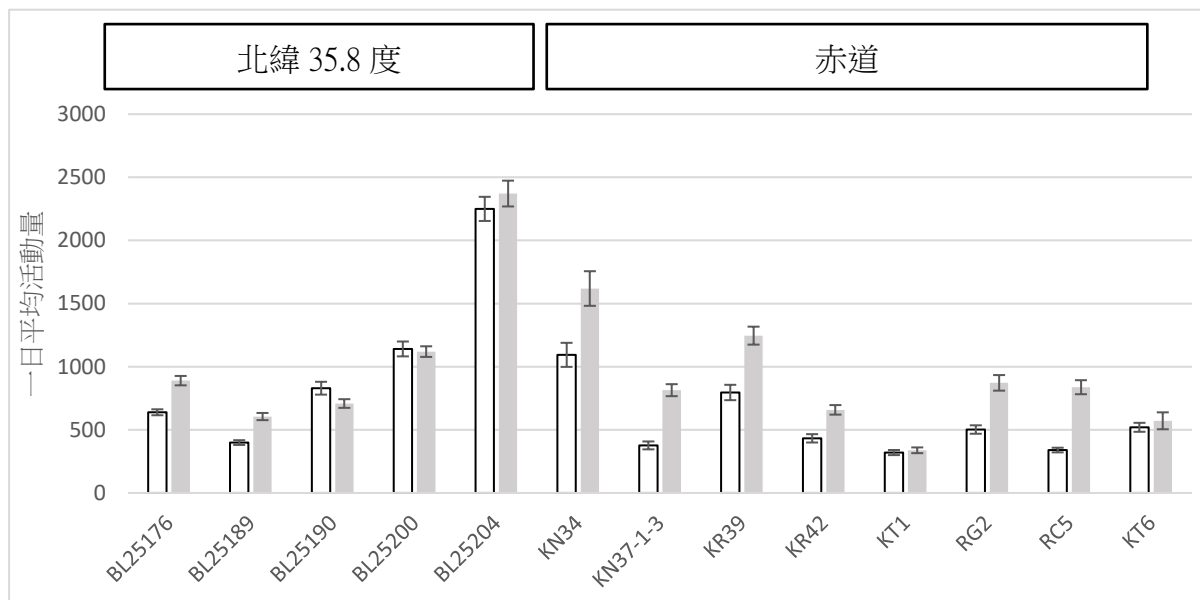
(圖片來源：作者自行繪製)

比較圖十四兩個緯度結果可以發現，在南半球族群的數據與我在北美和赤道族群觀察到的相似，越高緯（南緯 24 度）的活動量分佈在進入 DD 後，其維持活動量雙峰結構的能力沒

有較低緯（南緯 16 度）的好。顯示觀察到的此特徵不論南北半球皆適用，其與緯度高低的關係不受赤道以南或北影響，而是因光週期隨季節變化的程度相似而導致。

二、果蠅晝夜節律活動量的統計

前述所做的圖能得知果蠅各個品系的晝夜節律特徵，接著，將活動量（即 Ct）進行加總，得出一日的平均活動量。

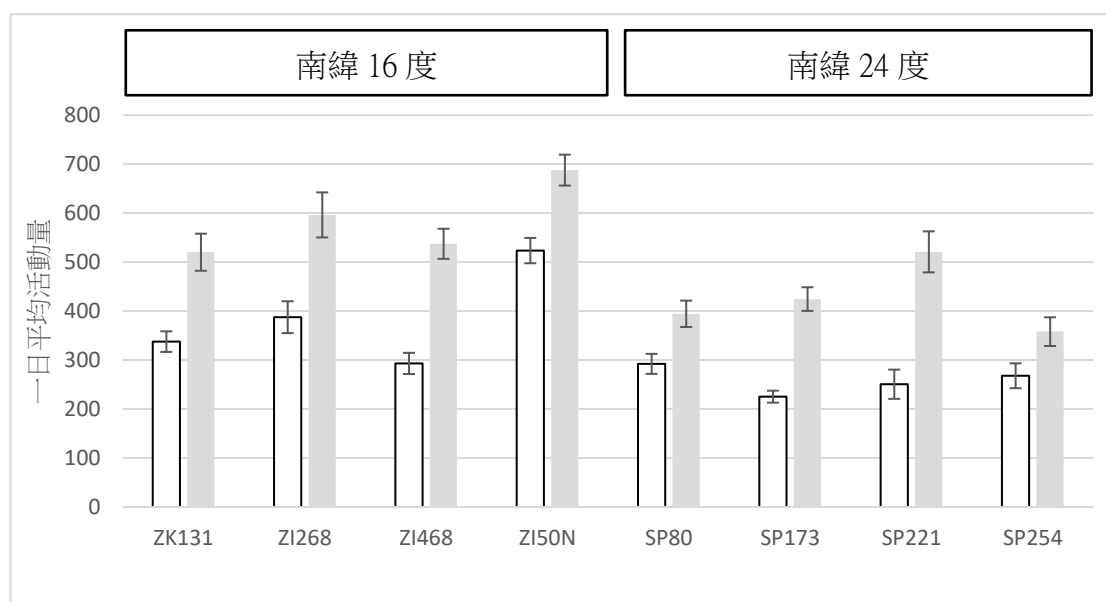


圖十五、北緯 35.8 度和近赤道各個品系在 LD 和 DD 下的一日平均活動量

圖中灰色部分為 DD 下的一日活動量，空白部分為 LD 下的一日活動量。

（圖片來源：作者自行繪製）

由圖十五可以看到北緯 35.8 度的不同品系在 LD 和 DD 下活動量的差異，大部分的品系在 DD 下的活動量相對於 LD 而言會較多，只有 BL25190 例外，LD 的活動量較 DD 多。觀察近赤道的不同品系在 LD 和 DD 下活動量的差異可以發現，各個品系在 DD 下的活動量相對於 LD 而言明顯較多，其在兩種環境下的差異較北美的品系明顯。



圖十六、南半球品系在 LD 和 DD 下的一日平均活動量比較

圖中灰色部分為 DD 下的一日活動量，空白部分為 LD 下的一日活動量。

(圖片來源：作者自行繪製)

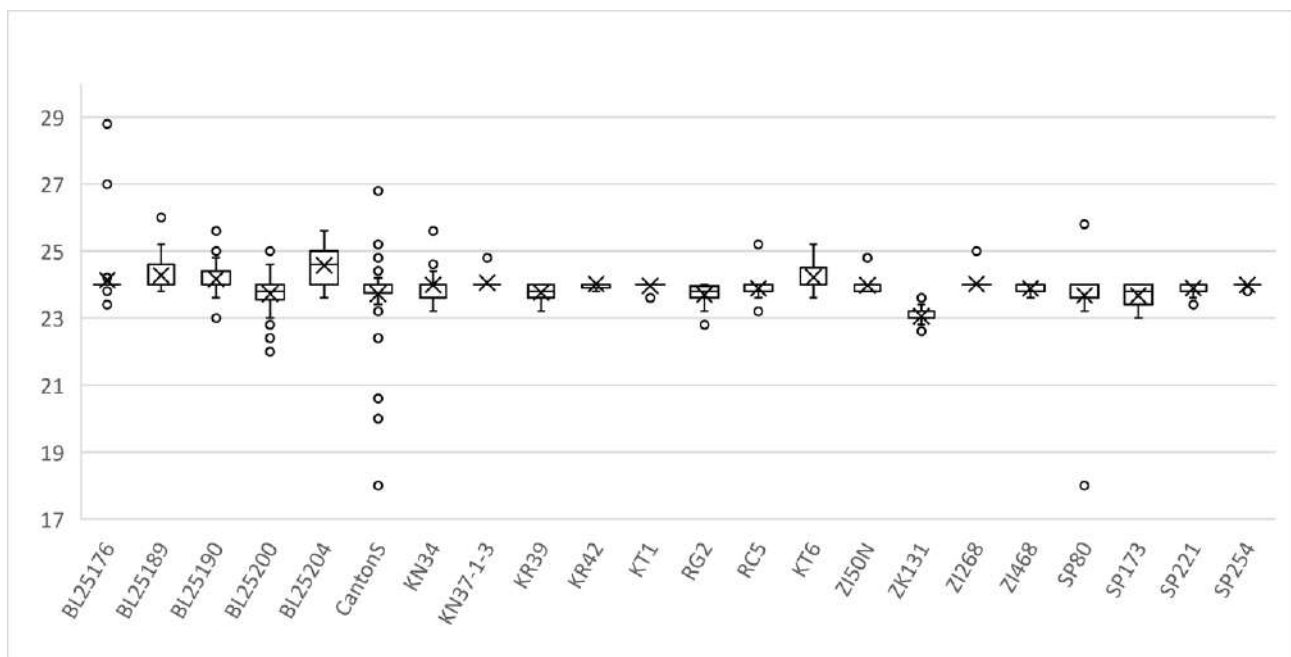
在南半球的數據中，並沒有像北半球那麼明顯有 LD 和 DD 活動量因緯度差異而有比例差異的特色。測到的每一個品系在 DD 下的活動量都與近赤道品系一樣較 LD 明顯更多。此外，整體研究結果可以看到幾乎每個品系在 DD 下的活動量都較 LD 還要多，這是一個非常有趣的結果。從活動量模型來看，可能是因為進入 DD 後，失去在 LD 於中午的活動量低峰（午睡行為 siesta），導致整體活動量在 DD 後提升。此現象不分緯度高低皆有明顯表現。

以上的數據都為合併後的結果，唯有 CantonS 沒有進行合併。在讀取每一個 CantonS 的 Actogram 時，我發現與北緯 35.8 度的五個品系比起來，CantonS 明顯並沒有呈現明顯的一致性，晝夜節律的特徵在不同個體間有較高的差異性。推論這可能與所獲得的 CantonS 的品系有較複雜的遺傳背景，相較 DGRP 較純粹的品系，因而呈現表徵的差異性。因此後續進行計算時會將 CantonS 分開討論。

三、計算晝夜節律的週期、強度

(一) 晝夜節律的週期

利用 Shiny-R DAM 的分析，得到各個品系的週期和晝夜節律強度，兩者都是以 DD 的數據進行計算。

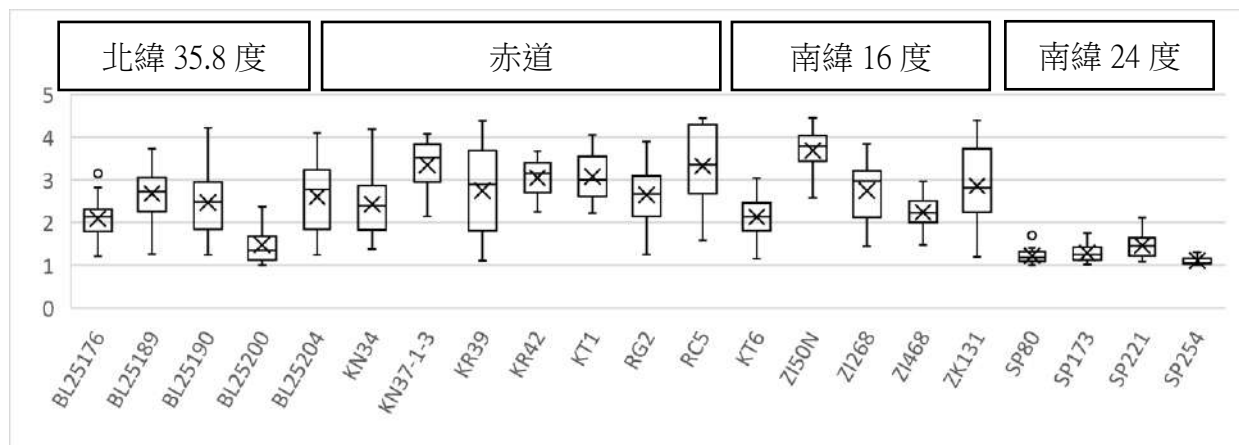


圖十七、週期在各品系間的分佈及其平均

(圖片來源：作者自行繪製)

週期計算值 (Circadian period peaks) 是以選擇 $Qp.act / Qp.sig$ 最大的時間來判斷。可以從圖十七看出週期都在 24 小時附近，差異不大。尤以 CantonS 的週期分佈較散，可能與前文所述的遺傳背景複雜所影響。

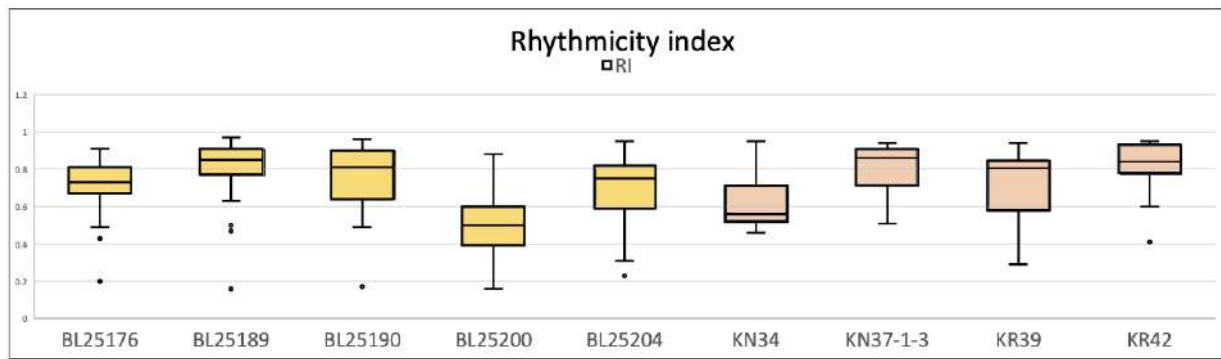
(三) 晝夜節律的強度



圖十八、circadian robustness 在各品系之間的分佈

(圖片來源：作者自行繪製)

圖十八中的 Circadian robustness 是以比較 $Qp.act / Qp.sig$ 來判斷，由 chi-squared method 計算得出，擁有越高的值代表晝夜節律的強度越高。左到右分別是北緯-赤道-南緯的分佈，可以看出在南緯 24 度的品系 Circadian robustness 明顯較少。



圖十九、RI 在各個北緯 35.8 度和赤道品系之間的分佈

(圖片來源：作者自行繪製)

利用 FassX software 中的自相關分析來找出 RI 值，RI 值和 Circadian robustness 所要表示的都是晝夜節律的節律程度，有相似的科學意義。因此可以看出，RI 的分佈趨勢和 Circadian robustness 有相符的趨勢，是合理的結果。

比較北緯 35.8 度品系和近赤道品系，兩者在 Circadian robustness 和 RI 的數值，並沒有顯著的差異，但我進行 t test 的結果發現各個品系間都有顯著差異，表示此晝夜節律的特徵是一種在品系間會有變異的表徵。

四、調查時鐘基因的遺傳變異

為了了解是什麼遺傳變異造成各個緯度的品系不同的晝夜節律特徵，我選擇 *tim* 和 *per* 這兩個最廣為人知的時鐘基因序列來調查。我最想知道的是調控與分子時鐘的路徑如何影響晝夜節律，因此我以 gene region 開始往後找 2000 bp 來了解時鐘基因在轉錄因子這個部分的變異。我總共在各 2000 個 bp 中，在 *period* 發現了 68 個 SNP 變異點，而 *timeless* 則有 94 個。

從數據可以知道各個品系在同個 SNP 變異點的數據，因此我可以用北緯、赤道、南緯分成三個族群來計算變異的頻率。赤道的品系整體變異是較高的，這很合理因為黑腹果蠅的發源地便是赤道地區，因此當地的變異通常會最高，在往外擴散的途中定居在其他緯度因創始者效應而無法重現原本在赤道的較高變異程度，因而變異的頻率較低。觀察整體的趨勢，並沒有發現明顯的赤道和南北緯頻率差別。我接著利用費雪精確性檢定（Fisher's exact test）來計算各個 SNP 位點是否真的沒有因緯度地區而有差異。將數據分成赤道區、非赤道區兩個群，變異鹼基頻率和參考鹼基頻率相同兩個群做成四宮格計算 p value。p value 皆大於 0.05，顯示沒有顯著的差異性。

考慮到在我的實驗中的品系樣本數很少，因此我從我找到的 SNP 位點中，找到我有興趣的數據（如只有北緯有變異、p value 相對較小一點、或是只有南北緯有變異等等）共選了 13 組。如下表所示，並上去 Fly Base 裡面的 JBrowse 看整個 *Drosophila* Genome Nexus 1000 的變異分佈。

表三、所選 SNP 位點在各個品系的鹼基對（圖片來源：作者自行繪製）

Gene	<i>period</i>				<i>timeless</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Number Ref	T	G	T	A	A	C	C	A	T	G	A	T	C
Strains													
RAL-379	T	G	T	A	T	C	C	A	T	G	A	C	A
RAL-380	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	A	C	A
RAL-707	T	G	T	A	A	C	C	A	T	G	A	T	C
RAL-765	T	G	T	G	A	C	C	A	T	G	A	T	C
KN34	T	G	T	G	A	C	C	A	C	C	G	T	C
KT1	A	G	T	A	A	C	C	A	T	G	A	T	C
KN73-1-3	A	G	T	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N
KR39	A	G	T	A	A	T	G	A	C	C	G	T	C
KR42	A	G	T	A	A	T	A	G	C	C	G	T	C
KT6	A	T	A	A	A	T	A	G	C	C	G	T	C
RC5	A	G	T	A	A	C	G	A	C	C	G	T	C
RG2	A	T	A	A	A	C	G	A	T	C	G	T	C
ZK131	A	G	T	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N

ZI50N	A	G	T	A	A	C	G	A	C	C	G	T	C
ZI268	A	G	T	A	A	T	G	G	T	C	G	C	A
ZI468	A	G	T	A	A	C	G	G	C	C	G	T	C
SP80	T	G	T	A	T	C	G	A	C	C	A	C	A
SP173	A	G	T	A	A	C	G	G	C	C	G	T	C
SP221	A	G	T	A	A	C	G	A	C	C	A	T	C
SP254	A	G	T	A	T	C	G	A	T	C	G	T	C
P value	0.16	0.15	0.15	0.46	0.20	0.12	0.37	0.40	0.22	0.27	0.10	0.10	0.10

* N 為 No Call 沒有獲得有效序列資料

* Ref. 代表 Reference 為參考序列

* Strains 為實驗中所用到的品系代稱

* Number 為位於染色體位置上的代稱，對照如下：

SNP1- X: 2685898, SNP2- X: 2686211, SNP3- X: 2686605, SNP4- X: 2686802, SNP5- 2L: 3508107,
SNP6- 2L: 3507795, SNP7- 2L: 3507511, SNP8- 2L: 3507388, SNP9- 2L: 3507340,
SNP10- 2L: 3507121, SNP11- 2L: 3507072, SNP12- 2L: 3506934, SNP13- 2L: 3506840

深入調查我所選取的 SNP 後，我發現大部分的位點並沒有因為緯度不同區域而有特別的 SNP 位點。由此可知從我所選取的數據所看到的 SNP 特性是因為品系數據量不足所導致的片面結論，無法作為遺傳變異的證據討論。

但同時，我的所得到的數據也獲得了一致性的結果。利用 MEGA 內建的計算模組，可以算出各個品系分成不同緯度的區域後，族群序列差異的數值，如下表：

表四、不同緯度區域時鐘基因序列的差異性數值（圖片來源：作者自行繪製）

	period				timeless		
	North	Equator	South		North	Equator	South
North	0.0081 0.0085 0.0089			North	0.0107 0.0120 0.0120		
Equator				Equator			
South				South			

由數值可知所得出的序列差異沒有明顯因為緯度區域而有明顯分化，這與我在 SNP 位點上所看到的結果相符合。儘管數據顯示在 per 和 tim 的序列基因在調控因子 2000 bp 以內的位點沒有 SNP 的明顯差別分佈，但仍有 SNP 的存在和些微的分佈差異，說明遺傳變異在果蠅晝夜節律中的影響。

伍、討論

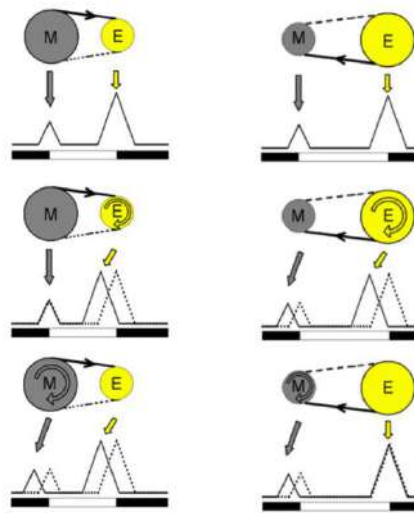
本研究在不同緯度品系的黑腹果蠅間，發現了許多晝夜節律在 DD 下的特徵，發現在更高緯的環境，無論是北半球或是南半球，其晝夜節律特徵中的活動量高峰，皆會與原本所接受到的光源刺激產生偏差因而推移，表示其內源時鐘在進入 DD 後運行的節律與在 LD 下所接收到的光源刺激會錯開。但在赤道區域的品系，其進入 DD 後的晝夜節律特徵維持穩定，早晨和黃昏活動量的高峰是穩定持續且對齊先前所給予的光源刺激的。兩種地區間的差異推測與不同緯度光週期的變化有關，在較高緯的環境下，因為其光週期較多變，因此果蠅的內源時鐘如果可以與所受到的光源刺激錯開的，可以擁有更有彈性的生物時鐘，其可塑性與適應晝短夜長或晝長夜短的多變光刺激可能有關係。反觀赤道果蠅因為長時間暴露在固定 12LD 的情況下，其內源時鐘極其穩定，或許相對可塑性較低但固定。而這在觀察早晨和黃昏活動量高峰的特徵也是類似的結果，在高緯的品系中，在進入 DD 後大部分的品系在早晨的活動量高峰會消失，並使高活動量一直延續到黃昏，導致活動量高峰在早晨和黃昏的雙峰結構漸趨消失。但在赤道品系中，即使在原本 LD 時正中午的活動量低峰被升高的活動量取代，其活動量雙峰的構造還是穩定產生，顯示其對齊原光源刺激且活動量維持相同的結構。兩者證據皆顯示或許赤道品系擁有更穩定的內源時鐘，而推論與其原本所生長環境穩定的光源刺激有關。

在一日的平均活動量的部分，發現在比起北美中緯度的品系，其他區域族群的 DD 的一日活動量明顯較 LD 高。原本在還未進行南半球族群的測定時，以為這是赤道族群的特徵，但進行後續的測定後，發現是北美中緯度的品系與其他族群有差異。在進入 DD 後，大部分品系活動量增加，這可能是與原本在 LD 正中午時的活動量低峰，在 DD 時被升高的活動量取代所導致的。這是一個在大部分品系下都有觀察到的情況，顯示在不同緯度品系的果蠅間，存在相似的特徵，也可以連接到生物時鐘在演化上一定的保守性。

以 chi-squared 計算各個品系在 DD 下的週期，其數值都很接近 24hr，沒有明顯的長短週期差異，由 t test 結果可知各個品系間存在著差異性，這似乎也反映實驗中各個品系的生物時鐘在 DD 下都是持續且正常運作的（Helfrich-Förster et al., 2022）。但在過去一項研究 *D. ananassae* 的自然族群研究中（Joshi, 1999），發現南方近赤道的品系在全暗狀況下的運行週期會較北方的品系短，而這與我所測試到的結果有所差異。

在比較 Circadian robustness 和 RI 值時，計算出的數值，並沒有因為緯度高低而有顯著的差異。但在不同品系間有著不同的數值差異，顯示此晝夜節律表徵是在族群中變異的。

針對上述所觀察到的晝夜節律特徵，我針對活動量的雙峰結構再深入探討，發現過去的文獻曾提出有趣的假設（Stoleru et al., 2007），即果蠅此活動量雙峰的節律特徵是由兩個晝夜節律振盪器互相影響所形成。其中 M（Morning oscillator）負責早晨的活動量高峰且會被光照刺激加速，而 E（Evening oscillator）負責黃昏的活動量高峰且會被光照刺激減速。文獻並推測晝夜節律神經元網路可透過交替 M 和 E 之間的核心時鐘角色來調整行為以適應季節變化，如圖二十：



圖二十、M 和 E 運作以適應季節變化的數學模型預測
（圖片來源：Stoleru et al., 2007）

圖二十左列為晝短夜長的冬天，而右列為晝長夜短的夏天。可以看出模型預測在冬天時，M 會主導核心時鐘網路，而夏季漫長的白天阻止 M 產生強大的主導，此時 E 會取而代之主導核心時鐘。而核心時鐘速度的改變則影響 M 和 E 輸出的相位輸出。雖然這個模型的適用性與真實性在幾年後被質疑（Helfrich-Förster et al., 2009），但也讓我思考，是否高緯度品系的果蠅，其較彈性的晝夜節律活動量的變化，代表擁有較能互相影響的 M 和 E。而在內源時鐘較穩定的赤道品系，其 M 和 E 互相干涉的連結較小，造成其運作的速率較相近，相位差異較小，藉此影響穩定的晝夜節律與活動量的雙峰結構。

以上推論亦引發我的思考，是否有更好的模型或是生物，可以解釋緯度較高的品系進入 DD 後失去雙峰結構的原因，並進而探討以上現象是被晝夜節律時鐘的哪一個分子路徑所驅動，這亦是之後可以研究的課題和延伸的內容。

在分子路徑的部分，我推測能造成緯度差異因而產生晝夜節律特徵特異性的差別，可能在於 TIM，也就是果蠅的分子時鐘中 *timeless* (*tim*) 所產生的蛋白質。推測原因因為 TIM 受 Cryptochrome (CRY)，一種存在於果蠅時鐘神經元和複眼的感藍光隱花色素影

響，兩者結合後，CRY 會使 TIM 降解，因而進入下一個時鐘循環（Young, M.W. et al., 2020）。在 Tim 的多態性上，或許會造成其對光線的不同敏感度，使內源時鐘對齊或錯開原本所受到的光刺激，如我在高緯和赤道族群所觀察到的特徵差異。

在調查 *per* 和 *tim* 這兩個最早被發現且了解調控路徑的時鐘基因蛋白中，根據 SNP 變異的分析，顯示赤道附近的遺傳多樣性確實最高，支持該物種起源於赤道區域。然而，觀察和統計發現各緯度群體間的 SNP 分佈無顯著差異，p 值均大於 0.05，這表明緯度可能對這些基因位點的遺傳變異影響不大。

經過特定 SNP 位點的檢查後僅顯示微小的差異，可以理解為樣本量不足以得出緯度相關的 SNP 模式的結論。此外，這些序列的系統發生分析顯示不同緯度品系間的遺傳分化非常小，與調查 SNP 位點時獲得了一致的結果。但在調控區段有著大量的 SNP 差異和些微的緯度分佈也可以說明遺傳變異在晝夜節律中有著影響。

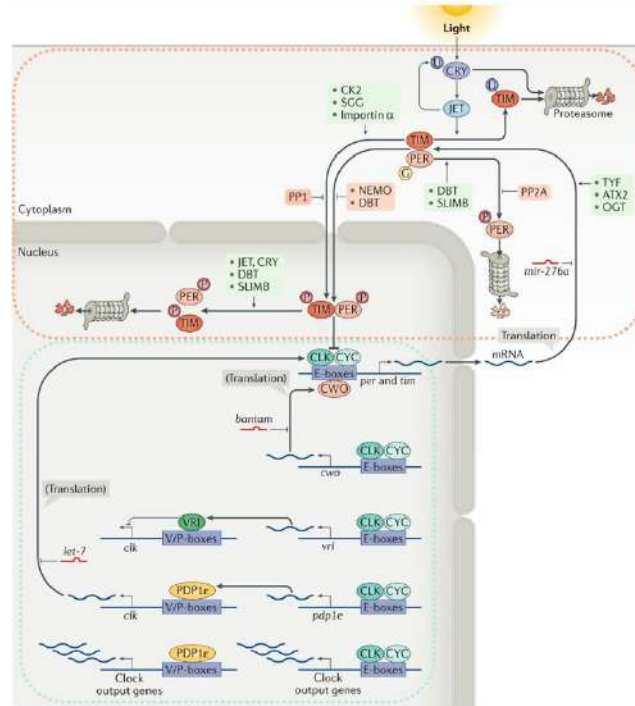
本研究結果的主要貢獻在其對赤道以南族群對不同品系晝夜節律特徵的調查，並發現緯度較高與赤道區域在全暗下的晝夜節律特徵有著差異，這也扣合前人的研究結果：即在不同品系的果蠅間，在全暗下因生存區域差異而有不同節律的行為之觀察結果是一致的。透過黑腹果蠅同種，但不同品系間的調查，更能佐證黑腹果蠅在從赤道區域向更北方大陸和南方擴展其生存範圍時，為適應不同多變的光週期而產生特徵的差異（如對齊光源的能力、活動量的雙峰結構），但同時也保存有相似的特徵（如週期、在全暗下增加的活動量），同種但不同品系的調查，也更能讓我們了解遺傳變異在果蠅生物時鐘演化的角色，有利於未來深入研究造成特徵差異的遺傳變異和基因的多型性。

陸、結論

- 一、在不同品系緯度的黑腹果蠅間，發現低緯度的赤道區域在全暗下內源時鐘的穩定性，在對齊原光線和活動量雙峰結構表現較顯著
- 二、在高緯環境中，北半球和南半球有相似節律特徵，顯示造成變異的因素因與全球性的因素（如光週期變化）有關
- 三、週期與晝夜節律強度並沒有因為緯度高低而有特殊差異，但在不同品系間有著數值差異，顯示晝夜節律的表徵在族群中是有變異的。
- 四、調查時鐘基因 *per* 和 *tim* 的 SNP 結果顯示，沒有因緯度區域而明顯分佈的 SNP 位點

柒、未來展望

目前我利用現成的基因序列資料進行比對 *per* 和 *tim* 兩個時鐘基因蛋白。後續將會從時鐘基因的分子路徑中選取相關的基因序列資料進行更多的比對，並延伸到上游基因以拓展遺傳的更多變異在分子時鐘分子路徑的影響，如何影響到晝夜節律的表徵。



圖二十一、果蠅分子時鐘的調控路徑

（圖片來源：Young, M.W et al., 2020）

圖二十一顯示果蠅的分子時鐘調控路徑參與的各式調控因子和蛋白質，如 CYC、CLC、JET 等，都是未來可以列為調查的對象。

捌、參考資料：

1. Boyan Kostadinov et al. Open-source computational framework for studying *Drosophila* behavioral phase, STAR Protocols, Volume 2, Issue 1, 2021, 100285, ISSN 2666-1667, <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100285>.
2. Charlotte Helfrich-Förster et al., Adaptation of circadian neuronal network to photoperiod in high-latitude European *Drosophilids*, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.036>
3. Charlotte Helfrich-Förster et al., Adaptation of *Drosophila melanogaster* to long photoperiods of high-latitude summers is facilitated by the *ls-Timeless* allele. *Journal of Biological Rhythms*. 2022;37 (2) :185-201. doi:[10.1177/07487304221082448](https://doi.org/10.1177/07487304221082448)
4. Charlotte Helfrich-Förster, Does the Morning and Evening Oscillator Model Fit Better for Flies or Mice?, *Journal of Biological Rhythms*, 2009, 24:4, 259-270,

<https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/0748730409339614>

5. Cichewicz K. & Hirsh J., ShinyR-DAM: A program analyzing *Drosophila* activity, sleep, and circadian rhythms, *Commun. Biol.* 1, 25, 2018 <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0031-9>
6. Dani, C., Kannan, N.N., Sheeba, V. Environmental adaptation and evolution of circadian clocks. In: Numata, H., Tomioka, K. *Insect Chronobiology*. Entomology Monographs. Springer, Singapore, 2023, https://doi.org/10.1007/978-981-99-0726-7_9
7. Dilip S Joshi. Latitudinal variation in locomotor activity rhythm in adult *Drosophila ananassae*. *Canadian Journal of Zoology*. 77 (6) : 865-870, 1999, <https://doi.org/10.1139/z99-051>
8. Dowse, H.B. (2013) 'Maximum entropy spectral analysis for circadian rhythms: theory, history and practice', *Journal of Circadian Rhythms*, 11(0), p. Art. 6. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-11-6>.
9. Fly base 網站 <https://flybase.org>
10. Glen Stecher, Koichiro Tamura, and Sudhir Kumar (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 3
11. Harbison, S.T., Kumar, S., Huang, W. *et al.* Genome-wide association study of circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 49, 60 – 82 , 2019. <https://doi.org/10.1007/s10519-018-9932-0>
12. John E Pool, The *Drosophila* Genome Nexus: A Population Genomic Resource of 623 *Drosophila melanogaster* Genomes, *Genetics*, April 2015, <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174664>
13. Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B. *et al.* Signal analysis of behavioral and molecular cycles. *BMC Neurosci*, 2002. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-3-1>
14. Menegazzi P, Helfrich-Förster C. Closely related fruit fly species living at different latitudes diverge in their circadian clock anatomy and rhythmic behavior. *Journal of Biological Rhythms*. 2018;33 (6) :602-613.
15. Pamela Menegazzi *et al.* Life at high latitudes does not require circadian behavioral rhythmicity under constant darkness, *Current Biology*, Volume 29, Issue 22, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.032>.
16. Patke, A., Young, M.W. & Axelrod, S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 67 – 84 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
17. Stoleru D *et al.*, The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):207-19. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.038. PMID: 17418796.
18. Vitaterna, M., Takahashi, Joseph, & Turek, F. Overview of circadian rhythms, *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707128/>

【評語】 050001

本研究聚焦於不同緯度黑腹果蠅品系在全暗環境下的晝夜節律特徵，並探討核心時鐘基因（per 和 tim）的遺傳變異對節律的潛在影響。研究涵蓋北緯 35.8 度、赤道和南緯地區的品系，發現赤道品系的晝夜節律穩定性顯著，活動高峰與光源刺激高度對齊，而高緯度品系的節律不穩定且具可塑性，能適應多變光週期。赤道品系在遺傳多樣性方面表現最佳，但 SNP 分析未能發現顯著的緯度相關差異。核心時鐘基因變異可能影響節律特徵，但進一步的機制尚未闡明。全暗環境下的活動量高於光暗交替環境，且午睡行為的消失進一步提升了活動量。

缺點與改進建議：

1. 樣本量不足：

材料與方法中規定每品系至少使用 32 隻果蠅，但部分赤道與南半球品系樣本數接近此下限，統計效能受到限制，建議增加樣本數至更高水準以提高分析準確性。

2. SNP 分析能力有限：

SNP 變異分析樣本數過低，導致遺傳變異的顯著性不足。未來應採用更大樣本量，並探索上下游基因的潛在影響。

3. 圖表與數據處理：

結果以 RI 值與 Circadian robustness 比較節律特徵，方法中未驗證兩指標的一致性。數據以 30 分鐘單位整合，但未說明該處理是否影響細微節律的準確捕捉。建議增加方法驗證並提高數據的直觀表現。

4. 缺乏實驗擴展：

研究未包含基因剔除或過表達實驗，無法直接驗證遺傳變異與節律差異的因果關係，建議加入功能性研究。

5. 地理範圍與品系代表性：

高緯度與赤道地區的品系代表性尚未充分，應擴展更多地區的品系進行驗證，以提高結果的普適性。