

RAD-R script

Ver20201203

Manual (Japanese)

Raw sequence reads
to
linkage map construction

1. Input and Output files list

1. 生シーケンスリード (.fastq.gz) が保存されているフォルダーを指定する。
外付けHDDのフォルダーでも問題ない。
最後に「/」をつけない！

2. 解析結果を保存するsaveフォルダーを指定する。
外付けHDDより内蔵HDDで行った方が解析が速くなる。
最後に「/」をつける！

Raw data folder (.fastq.gz files)	exp) D:/20151218_NGS1	←No "/"
C:/NGS/Raw_sequence_reads		
Save folder (fasta,tagcount files)	exp) D:/20151218_NGS1/save/	←With "/"
C:/NGS/save/		

R_package install script

```
install.packages("data.table")
install.packages("ABHgenotypeR")
install.packages("qtl")
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("Biostrings")
biocLite("ShortRead")
biocLite("QuasR")
```

Full_path script

```
fullpath <- list.files("C:/NGS/Raw_sequence_reads", fullnames=T)
fullpath
write.csv(fullpath, "C:/NGS/save/full_path_list.csv")
```

3. 必要なpackageをRにインストールする。
1行ずつRのコンソールにコピーする。

4. 解析したいファイルのpathを調べるため、
Full_path scriptをRのコンソールにコピーする。

1. Input and Output files list

5. saveフォルダーにできた「full_path_list.csv」を開いて、
集団の親とF₂世代の各個体のフルパスを緑セルにコピーする。

Parent samples				
input file names		Output file		
From (full_path_list.csv)		Name	exp) × 98-830 → ○ A98_830	Base Trimming length 5' (bp) Base Trimming length 3' (bp)
C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R1_001.fastq.gz		ShinanoGreen		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R2_001.fastq.gz		ShinanoGreen		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCGATAG-GTACTGAC_L005_R1_001.fastq.gz		VI185_4		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCGATAG-GTACTGAC_L005_R2_001.fastq.gz		VI185_4		6 1

F ₂ population samples				
input file names		Output file		
From (full_path_list.csv)		Name	exp) × F2-1 → ○ F2_1	Base Trimming length 5' (bp) Base Trimming length 3' (bp)
C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_01		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_01		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_02		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_02		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/03_ATTACTCG-CCTATCCT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_03		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/03_ATTACTCG-CCTATCCT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_03		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/04_ATTACTCG-GGCTCTGA_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_04		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/04_ATTACTCG-GGCTCTGA_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_04		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/05_ATTACTCG-AGGCGAAG_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_05		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/05_ATTACTCG-AGGCGAAG_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_05		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/06_ATTACTCG-TAATCTTA_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_06		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/06_ATTACTCG-TAATCTTA_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_06		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/07_ATTACTCG-CAGGACGT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_07		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/07_ATTACTCG-CAGGACGT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_07		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/08_ATTACTCG-GTACTGAC_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_08		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/08_ATTACTCG-GTACTGAC_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_08		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/09_TCCGGAGA-TATAGCCT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_09		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/09_TCCGGAGA-TATAGCCT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_09		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/10_TCCGGAGA-ATAGAGGC_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_10		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/10_TCCGGAGA-ATAGAGGC_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_10		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/11_TCCGGAGA-CCTATCCT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_11		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/11_TCCGGAGA-CCTATCCT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_11		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/12_TCCGGAGA-GGCTCTGA_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_12		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/12_TCCGGAGA-GGCTCTGA_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_12		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/13_TCCGGAGA-AGGCGAAG_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_13		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/13_TCCGGAGA-AGGCGAAG_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_13		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/14_TCCGGAGA-TAATCTTA_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_14		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/14_TCCGGAGA-TAATCTTA_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_14		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/15_TCCGGAGA-CAGGACGT_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_15		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/15_TCCGGAGA-CAGGACGT_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_15		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/16_TCCGGAGA-GTACTGAC_L005_R1_001.fastq.gz		NGS0_16		6 1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/16_TCCGGAGA-GTACTGAC_L005_R2_001.fastq.gz		NGS0_16		6 1

6. 集団の親とF₂世代の各個体の名前を入れる。“- (ハイフン)”はエラーが出るので“_ (アンダーバー)”を使う。名前の先頭は文字にする。

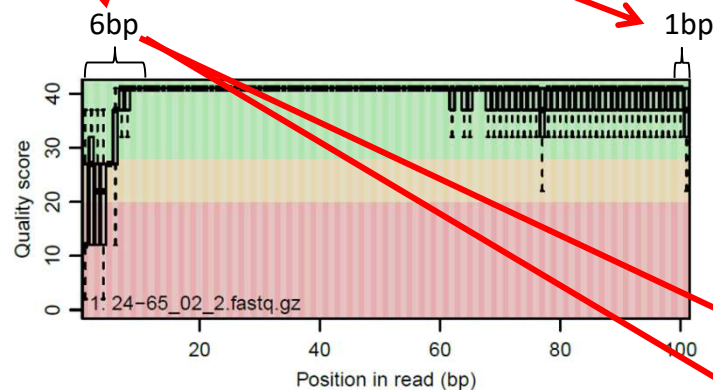
1. Input and Output files list

7. 集団の親とF₂世代の数個体のシーケンスクオリティを調べるため
qQCReport_scriptをRのコンソールにコピーする。

qQCReport script

```
library(QuasR)
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R1_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/ShinanoGreen_1.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R2_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/ShinanoGreen_2.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCATAG-GTACTGAC_L005_R1_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/V1185_4_1.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCATAG-GTACTGAC_L005_R2_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/V1185_4_2.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R1_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/NGS0_01_1.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R2_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/NGS0_01_2.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R1_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/NGS0_02_1.pdf")
qQCReport("C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R2_001.fastq.gz", pdfFilename="C:/NGS/save/NGS0_02_2.pdf")
```

8. saveフォルダーに出来たPDFを開いてシーケンスクオリティをチェックする。
読み始めと終わりが低クオリティになりがちなのでトリミングする塩基数を指定する。
この数値は全個体で統一しないとマッピングの位置がずれてしまうので注意。
低クオリティなリードがなければ0(ゼロ)とする。



Parent samples				
input file names		Output file		
From (full_path_list.csv)	Name	exp	Base Trimming length (bp)	Base Trimming length (bp)
C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R1_001.fastq.gz	ShinanoGreen	exp × 98-938 → ○A98_938	6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/97_ATTACTCG-TATAGCCT_L006_R2_001.fastq.gz	ShinanoGreen		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCATAG-GTACTGAC_L005_R1_001.fastq.gz	V1185_4		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/98_AGCATAG-GTACTGAC_L005_R2_001.fastq.gz	V1185_4		6	1
F ₂ population samples				
input file names		Output file		
From (full_path_list.csv)	Name	exp	Base Trimming length (bp)	Base Trimming length (bp)
C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R1_001.fastq.gz	NGS0_01	exp × F2-1 → ○F2_1	6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/01_ATTACTCG-TATAGCCT_L005_R2_001.fastq.gz	NGS0_01		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R1_001.fastq.gz	NGS0_02		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/02_ATTACTCG-ATAGAGGC_L005_R2_001.fastq.gz	NGS0_02		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/03_ATTACTCG-CGTATCCT_L005_R1_001.fastq.gz	NGS0_03		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/03_ATTACTCG-CGTATCCT_L005_R2_001.fastq.gz	NGS0_03		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/04_ATTACTCG-GGCTCTGA_L005_R1_001.fastq.gz	NGS0_04		6	1
C:/NGS/Raw_sequence_reads/04_ATTACTCG-GGCTCTGA_L005_R2_001.fastq.gz	NGS0_04		6	1

1. Input and Output files list

9. シーケンスクオリティ(PHRED score)が低い生リードデータを除外する。
デフォルトではPHRED scoreが35以下の塩基を10%以上含むリードを除外する設定。
基本的にはこの設定のままで問題ない。

Quality Trimming (minimum PHRED score)	35
Quality Trimming (acceptable ratio of low PHRED score)	0.1
Error corrections of genotype data by Chi-square test (minimum p.value)	0.001

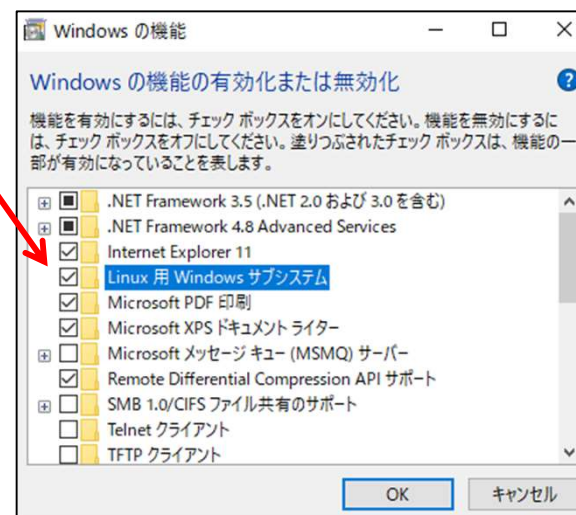
10. カイ二乗検定で分離比が(3:1)からかけ離れているデータ($P < 0.001$)を除外する。
基本的にはこの設定のままで問題ない。

Windows system for Linuxの導入

11. 「スタート」→「設定」で開いたウインドウに
「Windowsの機能の有効化または無効化」と書き込む



12. ボックスが開いたら「Linux用Windowsサブシステム」に☑を入れて再起動

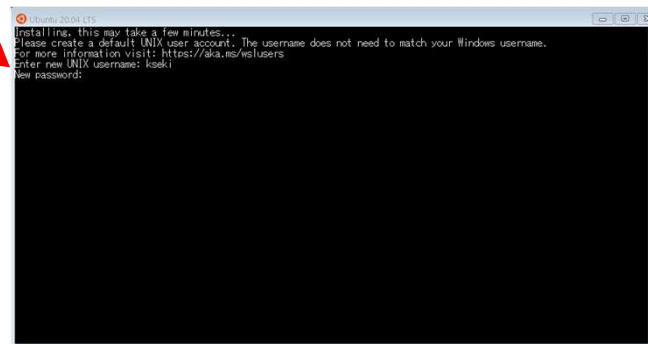


Windows system for Linuxの導入

13. 「スタート」→「Microsoft Store」で開いたウインドウの右上「検索」に「ubuntu」と書き込む。最新版を選んで「入手」をクリック。複数のデバイスで使うかどうか聞かれるが、使う必要性はない。



14. ダウンロード完了後に起動するかどうか聞かれるので「起動」をクリック。しばらくするとuser nameとpasswordを聞かれるので書き込む。passwordは文字を打ち込んでも見えない。再度passwordを聞かれるので書き込めば導入完了。



1. Input and Output files list

15. リファレンスゲノムファイルをsaveフォルダーに入れてそのファイル名を書き入れる。

Reference genome **fasta** file name (Move to Save folder << C:/NGS/save/ >> and make BWA index)
Lsat_1_v8_lg_1-9.fasta

BWA install script

```
system("ubuntu run git clone https://github.com/lh3/bwa.git")  
system("ubuntu run cd bwa; make")
```

make BWA index script

```
setwd("C:/NGS/save/")  
system("ubuntu run bwa index Lsat_1_v8_lg_1-9.fasta")
```

16. Rのコンソールに「BWA_install script」と「make_BWA_index script」をコピーする。

17. Linkage mapの補正に関わる設定、基本的にはそのまま。

Error correction approach of each genotype data about parent by ABHgenotypeR (maxHapLength = 3, 6, 9) The parameter value for Genotype_select_ABHR

3

Drop markers of Genetic Map (Correctness rate compared to both neighboring markers)

0.5

0.5

0.4

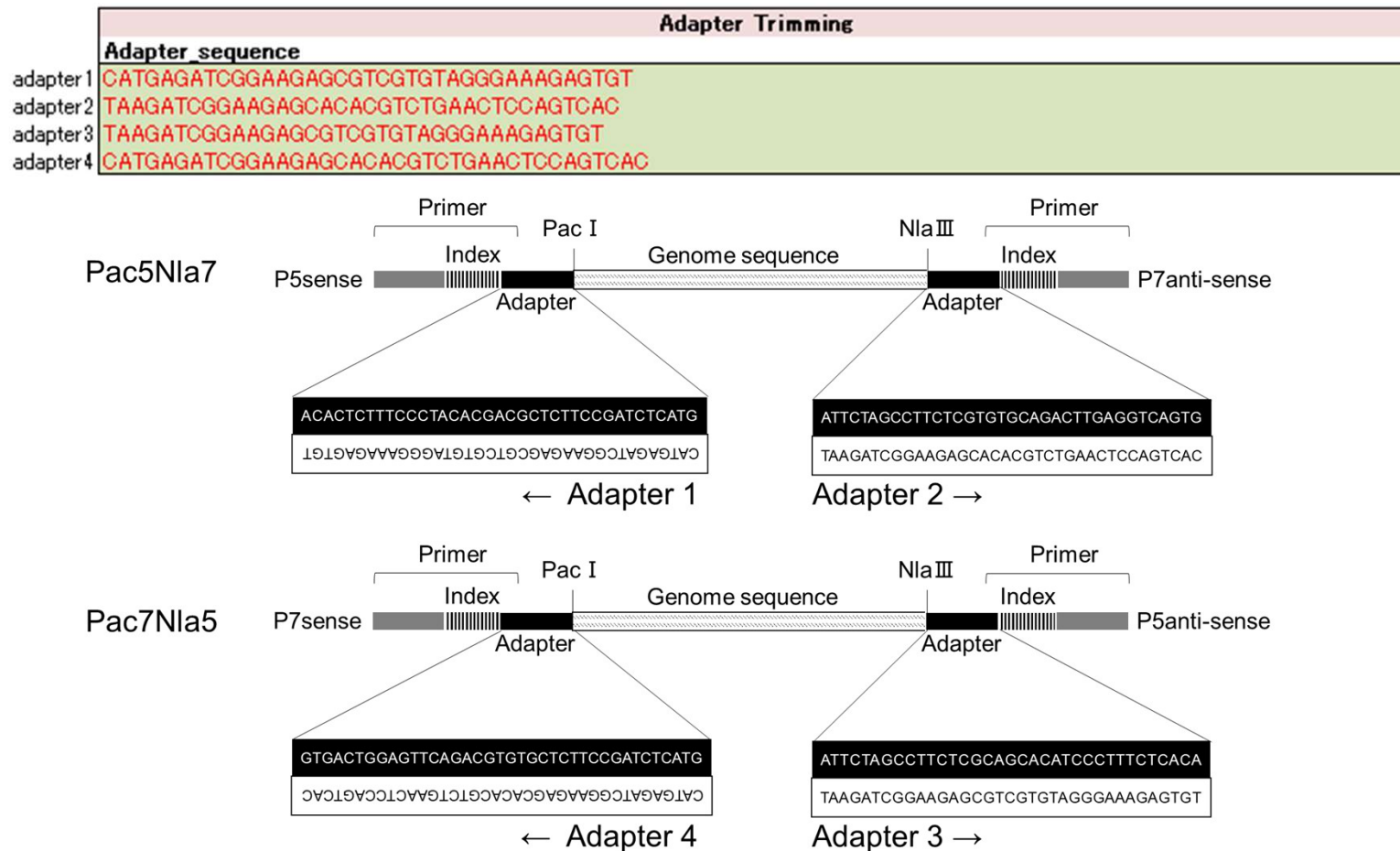
0.5

0.5

0.4

1. Input and Output files list

18. ゲノムシーケンスを挟んでいるアダプター配列を生リードシーケンスから除外するため、ライブラリ作成に用いたアダプター配列を下図を参考にして設定する。
RAD-R scriptでは2パターンのアダプター配列を設定できるようになっているが、1パターンだけでライブラリを作成した場合や、すでにアダプター配列が除外されているデータの場合は「A」「T」「C」「G」などを各40塩基ほど連ねて記入しておく。



2. Input Phenotype data

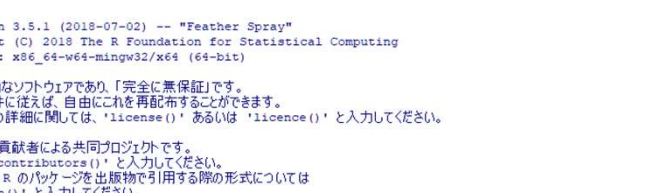
19. 「1. Input and Output files list」と「2. Input Phenotype data」は連携しているので、
 個体名は自動的に書き込まれる。
 「id」の欄には形質名を入れて、全個体の表現型データを書き入れる。
 データがない箇所には“- (ハイフン)”を入れておく。

Parent sam		Trait id			
Output file		1	2	3	
Name	exp) × 98-830 → ○A98_830	B.			
ShinanoGreen					
ShinanoGreen					
V185_4					
V185_4					
F ₂ population					
Output file					
Name	exp) × F2-1 → ○F2_1	B.			
NGS0_01					
NGS0_01					
NGS0_02					
NGS0_02					
NGS0_03					
NGS0_03					
NGS0_04					
NGS0_04					
NGS0_05					
NGS0_05					
NGS0_06					
NGS0_06					
NGS0_07					
NGS0_07					
NGS0_08					
NGS0_08					
NGS0_09					
NGS0_09					
NGS0_10					
NGS0_10					
NGS0_11					
NGS0_11					
NGS0_12					
NGS0_12					
NGS0_13					
NGS0_13					
NGS0_14					
NGS0_14					

id	1	2	3
ShinanoGreen	R1shoot	R1root	leafwaveF3
V185_4	91.22807	100	0
NGS0_01	1.6666667	41.666667	100
NGS0_02	79.62963	100	100
NGS0_03	56.666667	90	29.166667
NGS0_04	50	81.666667	100
NGS0_05	3.3333333	53.333333	100
NGS0_06	38.333333	88.333333	17.708333
NGS0_07	59.649123	89.473684	25
NGS0_08	21.666667	80	20.833333
NGS0_09	100	100	22.105263
NGS0_10	42.105263	92.982456	22.580645
NGS0_11	45	93.333333	100
NGS0_12	87.719298	98.245614	0
NGS0_13	52.631579	96.296296	100
NGS0_14	33.333333	85.964912	100
NGS0_15	26.666667	75	27.368421
NGS0_16	11.666667	76.666667	0
NGS0_17	43.859649	80.701754	100
NGS0_18	5	28.333333	0
NGS0_19	53.333333	88.333333	100
NGS0_20	46.666667	78.333333	0
NGS0_21	88.333333	95	25
NGS0_22	56.666667	83.333333	0
NGS0_23	10	56.666667	25
NGS0_24	5.2631579	38.596491	0
NGS0_25	7.0175439	66.666667	100
NGS0_26	20	58.333333	100
NGS0_27	63.157895	89.473684	100
NGS0_28	85	100	25
NGS0_29	63.333333	95	100
NGS0_30	5	43.333333	100
NGS0_31	65	90	25
NGS0_32	30	80	25
NGS0_33	1.6666667	68.333333	20.454545
NGS0_34	75	98.333333	20.731707
NGS0_35	37.037037	85.185185	100
NGS0_36	50	98.333333	25
NGS0_37	25	93.333333	19.791667
NGS0_38	5	73.333333	100
NGS0_39	1.754386	54.385965	25
NGS0_40	53.333333	91.666667	0
NGS0_41	22.222222	96.296296	26.373626
NGS0_42	100	100	100
NGS0_43	98.148148	100	19.791667
NGS0_44	13.333333	85	100
NGS0_45	42.592593	79.62963	100
NGS0_46	26.666667	75.555556	100
NGS0_47	0	62.222222	26.041667
NGS0_48	42.222222	80	25
NGS0_49	51.851852	98.148148	100
NGS0_50	3.5087719	40.350877	27.272727
NGS0_51	51.851852	100	25

3. From FASTQ to linkage map

20. 紫のセルを全て選択してコピーし、そのままRのコンソールにペーストする。
Saveフォルダーに色々なファイルが作られ始める。
解析が終了するまで待つ。

[illegible]

```
R Console (64-bit)
ファイル 編集 その他 パッケージ ウィンドウ ヘルプ

R version 3.5.1 (2018-07-02) -- "Feather Spray"
Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

R は、自由なソフトウェアであり「完全に無保証」です。
一定の条件に従えば、自由にこれを再配布することができます。
配布条件の詳細に関しては、'license()' あるいは 'licence()' と入力してください。

R は多くの貢献者による共同プロジェクトです。
詳しくは 'contributors()' と入力してください。
また、R や R のパッケージを出版物で引用する際には
'citation()' と入力してください。

'demo()' と入力すればデモをみることができます。
'help()' とすればオンラインヘルプが出ます。
'help.start()' で HTML ブラウザによるヘルプがみられます。
'q()' と入力すれば R を終了します。

[以前にセーブされたワークスペースを復旧します]

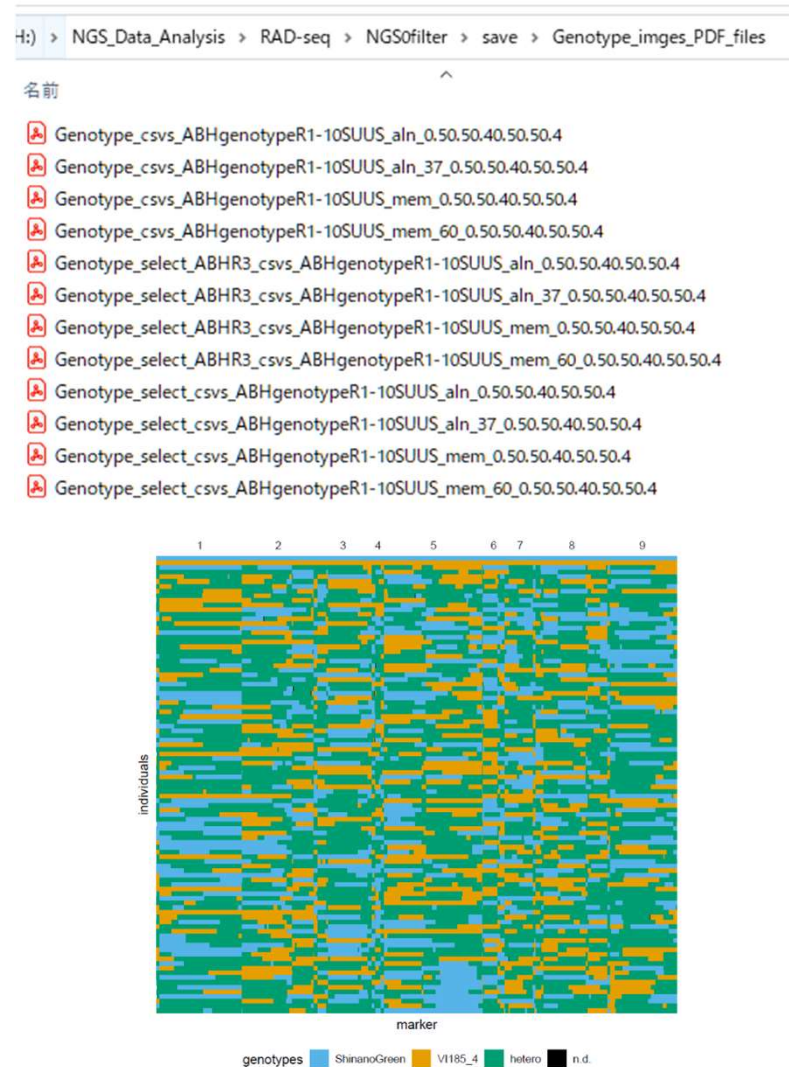
> |
```

QTL analysis

R/qtl

4. QTL

21. saveフォルダー内にできた「Genotype_images_PDF_files」フォルダーを開く。
12個のPDFファイルに収められたgenotype データのイメージを確認して、
適切に補正されていると思われるデータを選ぶ。



4. QTL

22. 4つの緑セルから名前のパーツを選択してGenotype dataファイルの名前を指定する。
選んだGenotype dataファイルは下の黄色セルに表示される。

	Select Genotype data file
①	Correction approach (Genotype_select_ABHR3_csvs, Genotype_select_csvs, Genotype_csvs) Genotype_select_csvs
②	ABHgenotypeR (maxHapLength = 1 ~ 10) The parameter of maxHapLength in ABHgenotypeR 7
③	Error correction approach by ABHgenotypeR (SU, US) The order of S and U S: correctStretches function U: correctUndercalledHets function US
④	BWA mode (mem, mem_60, aln, aln_37) mem
	Genotype file for R/QTL
	Select file C:/NGS/save/Genotype_select_csvs_ABHgenotypeR7US_mem.csv
	Phenotype file for R/QTL
	C:/NGS/save/ShinanoGreen_V1185_4_phe.csv

① ② ③ ④

23. Phenotype data fileはsaveフォルダーに自動で生成される。

24. 「Genotype_Freq_and Density script」をRのコンソールにコピーして、saveフォルダーに生成されたPDFファイルを開いてマップの状況を確認する。

```
Genotype_Freq_and_Density script
library(ABHgenotypeR)
pdf("C:/NGS/save/Genotype_select_csvs_ABHgenotypeR7US_mem_AlleleFreqMarkerDensitypdf")
select_genotype <- readABHgenotypes("C:/NGS/save/Genotype_select_csvs_ABHgenotypeR7US_mem.csv", "ShinanoGreen", "V1185_4", readPos=TRUE)
plotAlleleFreq(genos = select_genotype)
plotMarkerDensity(genos = select_genotype)
dev.off()
```


4. QTL

25. 6つの緑セルの数値はとりあえずそのまま「CIM_plot script」をRのコンソールにコピーする。SaveフォルダーにPDFとテキストのファイルが生成される。

```
sim_geno (n.draws = 10 ~ 10000 ) Number of simulation replicates
1000
cim (n.perm = 10 ~ 10000 ) Number of permutation replicates
1000
interval <-
1
error_prob <-
0.001
n.cover <-
1
window_size <-
10

CIM_plot script
sink("C:/NGS/save/ QTL_map_text/Genotype_select.csv7US_mem.txt")
pdf("C:/NGS/save/ QTL_map_plot/Genotype_select.csv7US_mem.pdf")
library(qtl)
cross <- read.cross(format="csv", genfile="C:/NGS/save/ Genotype_select.csv7US_mem.csv", phefile="C:/NGS/save/ ShinanoGreen_V185_4_phe.csv", n.dupmap <- findDupMarkers(cross, exactonly = F, adjacentonly = T)
totmap(cross)
cross <- drop.markers(cross, unlist(dupmap))
totmap(cross)
write.cross(cross, "csv", file="C:/NGS/save/ Genotype_ABHgenotypeR_dropmarkers_extmapF_mem")
cross <- read.csv("C:/NGS/save/ Genotype_ABHgenotypeR_dropmarkers_extmapF_mem.csv", header=T, na.strings=c("", "NULL"))
cross <- cross[-2,]
write.csv(cross, "C:/NGS/save/ Genotype_ABHgenotypeR_dropmarkers_extmapF_mem.csv", row.names=F, na="")
cross <- read.cross(format="csv", file="C:/NGS/save/", file="Genotype_ABHgenotypeR_dropmarkers_extmapF_mem.csv", na.strings=c("", "NA", "N"), genotypes=c("AA", "A", "a", "aa"))
write.cross(cross, "csv", file="C:/NGS/save/ Genotype_ABHgenotypeR_dropmarkers_extmapT_7US_mem")
cross <- jittermap(cross)
summary(cross)
summaryMap(cross)
genoimage(cross)
plotMap(cross)
plot(cross)
sink()
dev.off()
interval <- 1
error_prob <- 0.001
cross <- calc.genprob(cross, step = interval, errorprob = error_prob, mapfunction = c("kasambi"))
cross <- sim.gen(cross, step = interval, n.draws = 1000, errorprob=error_prob, mapfunction = c("kasambi"))
phe <- read.csv("C:/NGS/save/ ShinanoGreen_V185_4_phe.csv", header=T)
n.cover <- 1
window_size <- 10
for (q in 2:nco(phe)){
  trait.id <- q
  file.name <- paste("C:/NGS/save/", phenames(cross)[trait.id], "Genotype_select.csv7US_mem", ".txt", sep="")
  sink(file.name)
  file.name <- paste("C:/NGS/save/", phenames(cross)[trait.id], "Genotype_select.csv7US_mem", ".pdf", sep="")
  pdf(file.name)
  print(paste(q, phenames(cross)[all])
  autcim.hk <- cim(cross, pheno.col = trait.id, method = "hk", n.mapcover = n.cover, window = window_size)
  summary <- summary(autcim.hk)
  print(summary)
  apermcim.hk <- cim(cross, pheno.col = trait.id, method = "hk", n.mapcover = n.cover, window = window_size, n.perm = 1000)
  summary <- summary(apermcim.hk, alpha=c(0.1, 0.05, 0.01))
  print(summary)
  plot(autcim.hk, main = paste(phenames(cross)[trait.id], "_Composite Interval Mapping", sep=""), bandcol="grey55", ylab="LOD score")
  addcim.cover(autcim.hk, col = "green")
  abline(h = summary(apermcim.hk, alpha = 0.01), col = "red")
  abline(h = summary(apermcim.hk, alpha = 0.05), col = "red", lty=2)
  LG <- read.csv("C:/NGS/save/ Linkage_group_list.csv", col.names=c("Linkage_group", "LGHum"), stringsAsFactors=F)
  for(t in 1:nrow(LG)){
    chr.num <- t
    plot(autcim.hk, main = paste(phenames(cross)[trait.id], "LG", paste(chr.num), "_Composite Interval Mapping", sep=""), chr=c(chr.num), show.marker.names=TRUE, ylab="LOD score")
    addcim.cover(autcim.hk, col = "green")
    abline(h = summary(apermcim.hk, alpha = 0.01), col = "red")
    abline(h = summary(apermcim.hk, alpha = 0.05), col = "red", lty=2)
  }
  sink()
  dev.off()
}
```

4. QTL

26. 生成されたPDFファイルを確認してピークが確認できた形質については「trait (trait.id)」の緑セルにtrait.idの数値を記入し、「n.cover」の緑セルに検出された有意なピークの数を入れる。「Re-CIM_each_Trait script」をRのコンソールにコピーするとSaveフォルダーにPDFとテキストのファイルが生成される。

```
sim.geno (n.drows = 10 ~ 10000 ) Number of simulation replicates
100
cim (n.perm = 10 ~ 10000 ) Number of permutation replicates
100
trait (trait.id=)
12
interval <-
1
error.prob <-
0.001
n.cover <-
2
window.size <-
10

Re-CIM_each_Trait script
library(qtl)
rm(list=c("a"))
crs <- read.cross(format="csv", dir="C:/NGS/save/", file="Genotype_ABHGenotypeR_drapmakers_estmapT_7US.mem.csv", na.strings=c("-", "NA", "H"), genotypes=c("AA", "AB", "BB"))
crs <- jittermap(crs)
trait.id <- 12
file.name <- paste("C:/NGS/save/", phenames[crs][trait.id+1], "Genotype_select.csv7US.mem", "makeqtl.txt", sep="")
sink(file.name)
file.name <- paste("C:/NGS/save/", phenames[crs][trait.id+1], "Genotype_select.csv7US.mem", "plot.pdf", sep="")
pdf(file.name)
print(phenames[crs][trait.id+1])
interval <- 1
error.prob <- 0.001
crs <- calc.genoprob(crs, step = interval, error.prob = error.prob, map.function = c("kosambi"))
crs <- sim.geno(crs, step = interval, n.drows = 100, error.prob = error.prob, map.function = c("kosambi"))
n.cover <- 2
window.size <- 10
autim.hk <- cim(crs, pheno.col = trait.id+1, method = "hk", n.mercov = n.cover, window = window.size)
summary <- summary(autim.hk)
print(summary(autim.hk))
print(summary)
rm(summary)
aperm.hk <- cim(crs, pheno.col = trait.id+1, method = "hk", n.mercov = n.cover, window = window.size, n.perm = 100)
summary <- summary(aperm.hk, alpha=c(0.1, 0.05, 0.01))
print(summary(aperm.hk, alpha=c(0.1, 0.05, 0.01)))
print(summary)
rm(summary)
temp1 <- summary(autim.hk, perms = aperm.hk, alpha = 0.01)
print(summary(autim.hk, perms = aperm.hk, alpha = 0.01))
print(temp1)
qtl <- makeqtl(crs, chr = temp1$chr, pos = temp1$pos, what = "prob")
res1 <- fitqtl(crs, pheno.col = trait.id+1, qtl=qtl, method=c("hk"), mode=c("normal"), drapone=TRUE, run.checks=TRUE, maxit=1000, get.test=TRUE)
summary <- summary(res1)
print(summary(res1))
print(summary)
rm(res1, summary)
res1 <- fitqtl(crs, pheno.col = trait.id+1, qtl=qtl, method=c("hk"), mode=c("normal"), drapone=TRUE, run.checks=TRUE, maxit=1000, get.test=TRUE, formula=y~(Q1+Q2)^2)
summary <- summary(res1)
print(summary(res1), formula=y~(Q1+Q2)^2)
print(summary)
rm(res1, summary)
res1 <- fitqtl(crs, pheno.col = trait.id+1, qtl=qtl, method=c("hk"), mode=c("normal"), drapone=TRUE, run.checks=TRUE, maxit=1000, get.test=TRUE, formula=y~Q1+Q2+Q1:Q2)
summary <- summary(res1)
print(summary(res1), formula=y~Q1+Q2+Q1:Q2)
print(summary)
rm(res1, summary)
temp5 <- summary(autim.hk, perms = aperm.hk, alpha = 0.05)
print(summary(autim.hk, perms = aperm.hk, alpha = 0.05))
print(temp5)
qts <- makeqtl(crs, chr = temp5$chr, pos = temp5$pos, what = "prob")
res5 <- fitqtl(crs, pheno.col = trait.id+1, qtl=qts, method=c("hk"), mode=c("normal"), drapone=TRUE, run.checks=TRUE, maxit=1000, get.test=TRUE)
summary <- summary(res5)
print(summary(res5))
print(summary)
rm(res5, summary)
res5 <- fitqtl(crs, pheno.col = trait.id+1, qtl=qts, method=c("hk"), mode=c("normal"), drapone=TRUE, run.checks=TRUE, maxit=1000, get.test=TRUE, formula=y~(Q1+Q2)^2)
summary <- summary(res5)
print(summary(res5), formula=y~(Q1+Q2)^2)
print(summary)
```

4. QTL

27. ピークごとにplot図を描く。連鎖群名とピーク前後のcMを記入して「Re-plot script」をRのコンソールにコピーする。SaveフォルダーにPDFファイルが生成される。

```
chr.num <-  
3  
xlim=c( A , B )   From A to B (cM)  
175  
205  
  
Re-plot script  
filename <- paste("~/NGS/save/", phenomes(grass)[trait.id+1], "Genotype_select.csv?US_memo", "plot_chrNum.pdf", sep="")  
pdf(filename)  
chr.num <- 3  
plot(autaim.hk, main = "Composite Interval Mapping", chr=c(chr.num), show.marker.names=TRUE, ylab="LOD score", xlim=c(175,205))  
add.cim.cover(autaim.hk, col = "green")  
abline(h = summary(apermaim.hk, alpha = 0.01), col = "red")  
abline(h = summary(apermaim.hk, alpha = 0.05), col = "red", lty=2)  
dev.off()
```