—技術報告—

牧舎由来植物試料の DNA 解析による識別

吉川ひとみ, 杉田律子, 鈴木真一

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1

Discrimination of Grass Hay Samples by DNA Analyses

Hitomi S. Kikkawa, Ritsuko Sugita and Shinichi Suzuki

*National Research Institute of Police Science**6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 15 January 2010; accepted 30 April 2010)*

Grasses are common plant species encountered in botanical evidence because of their wide range of habitats. Presently forensic plant samples are discriminated based on morphological observation, however, some textures occasionally show similar characteristics among different species. In this study, discrimination of grass samples was carried out by comparison of *rbcL* partial region sequence, which is used as markers for phylogenetic and taxonomic studies. Sequence analyses were performed on 5 commercially available grass hay samples and plant fragments collected from 3 different cowsheds. The *rbcL* sequences of commercially available grass hay samples were characteristic to each other. All grass samples collected from the same cowshed had identical sequences, and the sequence was characteristic to each cowshed. Furthermore, different parts of the plant body could be analyzed and showed the identical sequences within the same sample. The results suggest that discrimination among grass hay samples was possible by comparison of *rbcL* sequences and DNA sequences used as phylogenetic and taxonomic markers will be useful for forensic discrimination of plant evidence.

Key words: Plant DNA, grass, *rbcL*

緒 言

植物は身近に広く存在しており, 様々な犯罪現場において証拠資料として, 犯人, 被害者, そして犯罪現場の結びつきを証明する極めて重要な手がかりとなりうる¹⁻³⁾. 草本植物は, 畜産業, 農業などにおいて, 食用のみならず飼料や畑の被覆用など資材

としても広く用いられており, 牧舎や畑が犯罪現場となった場合にはこれらの植物片が鑑定資料となることがある. 畜産業ではアカザ科, マメ科, イネ科に属する草本植物約70種が牧草として用いられており, そのうちイネ科のものが最も多く使われている⁴⁾. また, 牧草として海外より導入された後に野生化し, 雑草として広く生息しているものもある

る⁵⁾.

現在のところ植物片の鑑定は、主として形態的な検査によって行われている^{1,6)}. しかし、微細な証拠物件では種の同定や識別のために必要な情報が失われていることがしばしばあり、さらに植物の種によらずよく似た形態を示す部位もある. これまでの方法では識別や同定が不可能であった微細な植物片の鑑定が植物 DNA の配列解析によって可能となれば、犯罪捜査に多大な貢献が期待できる.

近年、植物種の同定あるいは分類を目的として、種や科のレベルで保存されている領域の DNA 配列を決定する方法が生物学の分野で広く用いられている^{7,8)}. この方法はゲノム上のごく一部の領域を解析の対象としているため、DNA が分解、断片化されている可能性がある劣化した試料にも適用可能と考えられる. 本法の法科学分野に応用した研究としては、*rbcL*, *trnL* intron, *trnL-trnF* IGS, ITS1, ITS2, 508S の領域による種名同定の試み⁹⁻¹¹⁾, および *rbcL*, *trnL-trnF* IGS 領域を用いた鑑定事例が報告されている¹²⁾. 実際の資料を想定したものとして綱の *rbcL* 領域の多様性の解析の報告もある¹³⁾. しかし、植物では、目、科、属を超えて使える種判別マーカー部位は確立途上であり、まだ確定していない. また、鑑定資料は実際に産業で使用され、劣化していることも想定されるが、このような試料についての検討はこれまで報告されていない.

本研究では、系統学および分類学的に種レベルの判別に有効とされている *rbcL* 遺伝子の比較的短い領域の配列¹⁴⁾を用いて、市販の牧草 5 種および牧舎より採取した試料について、*rbcL* 領域の比較により異なる種の牧草の識別を試みた. その結果、DNA 配列の比較が法科学的試料の識別法として有用であると考えられたので報告する.

材料と方法

1. 試料

日本国内で入手した市販の牧草 5 種および異なる 3 牛舎から採取した植物片を試料として用いた. DNA 抽出に供した市販の牧草は、日本国内で乾草あるいはワラとして多用されている Table 1 に示した 5 種である.

近隣に位置する 2 牛舎および数百キロ離れた 1 牛舎より、実際の鑑定を想定して、牧舎内貯蔵庫中の刈り取り後乾燥あるいは発酵のプロセスを経たと思われる、濃茶褐色～淡緑色の約 5～10 数 cm の植物片を無作為に採取した. 採取した植物片には、葉と考えられる部位、茎と考えられる部位、葉、茎、穂を含む部位が混在していた (Fig. 1). 採取した植物試料より、約 3 mm × 3 mm 以下の微細な植物片を切り取り DNA 抽出に供した. A 牛舎からは葉と考えられる部位 3 片、茎と考えられる部位 2 片、複数部位を含む 1 片を採取し DNA 抽出に供した. B 牛舎からは葉と考えられる部位 2 片、茎と考えられる部位 2 片、複数部位を含む 1 片を採取し DNA 抽出に供した. C 牛舎からは葉と考えられる部位 2 片、茎と考えられる部位 2 片、複数部位を含む 1 片を採取し DNA 抽出に供した. 葉、茎、穂など複数部位を含む 1 片は形態による比較が難しい異なる部位毎に DNA 抽出を行った.

2. 測定試料の調製および配列決定

(1) DNA 抽出

試料の植物片 1-10 mg より、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて添付のマニュアルに従い DNA 抽出を行った. 最終的に、100 μ l の Buffer AE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) で溶出し、DNA 溶液とした.

Table 1 Commercially obtained samples and their botanical, English, Japanese, and commodity names^{15,17)}.

Family name	Botanical name	English name	Japanese name	Commodity name
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i> L.	Alfalfa	Murasakiumagoyashi	Alfalfa
Poaceae	<i>Avena sativa</i> L.	Oats	Enbaku	Ohtsuhei
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Barley	Ohmugi	Mugiwara
	<i>Oryza sativa</i> L.	Rice	Ine	Wara
	<i>Phleum pratense</i> L.	Timothy	Oh-awagaeri	Super premium timothy ichibangari

Fig. 1 Plant fragments collected from 3 cowsheds. (a): leaf-like fragments, (b): stem-like fragments, (c): fragments which included different parts of plant body. Black box surrounded sites indicate the parts subjected to DNA extraction.

(2) *rbcL* 遺伝子の塩基配列決定

各試料から抽出した DNA 溶液を鋳型 DNA として, MyCycler (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, U. S. A.) を用い, *rbcL* の翻訳開始点から 105–420 領域を標的とした PCR 増幅を行った¹⁴⁾. *rbcL* 領域の増幅と配列決定にはプライマー *rbcL*-F3 (TAT CTT GGC AGC ATT CCG AGT AAC TCC) および *rbcL*-R3 (GAT TCG CAG ATC CTC CAG ACG TAG AGC)¹⁴⁾ を使用した. PCR 反応液は, KOD plus Buffer, 1 mM の MgSO_4 , 200 μM の 4 種 dNTP, 0.2 U KOD plus polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan), 0.2 μM の *rbcL*-F3, *rbcL*-R3 のプライマーを含み, 全量を 10 μl とした. 98°C 1 分加熱後, 変性 98°C 10 秒, アニール 56°C 30 秒, 伸長 72°C 45 秒のサイクルを 45 回繰り返し, その後 72°C 5 分の伸長反応の条件により PCR 増幅を行った. PCR 産物を鋳型として, 増幅反応に用いたプライマーをシークエンスプライマーとし, Big Dye terminator v1.1 を用いたサイクルシーケンシング法により ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U. S. A.) を用い

て, *rbcL* 遺伝子の翻訳開始点から 132–393 位の塩基配列を決定した.

得られた配列の種名同定は, NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 中の相同性解析ホームページを利用して行った.

結果および考察

1. 市販の牧草の *rbcL* 領域の配列による識別

一般的に用いられている異なる種類の牧草が *rbcL* 領域中の比較的短い DNA 配列により識別可能であるか調べる目的で, 日本国内で一般的に用いられている 5 種の市販の牧草から DNA を抽出し, 種名同定に有用とされている *rbcL* 遺伝子の一部, 262bp の配列を同定した. 得られた配列を比較した結果, 試料間で異なる塩基配列は 262bp 中, 45 箇所であり, 5 種の牧草はいずれも異なる配列を示した (Fig. 2). 異なる科に属する試料だけではなく, イネ科内の植物も識別可能であったことから, この領域の配列比較が牧草の異同識別に有用であると考えられる. イネ科植物は雑草としても多数存在していることから¹⁵⁾, DNA 配列の解析が鑑定資料として

	132	191
Oats	TCAACCTGGGGTTCCGCCGAAGAAGCAGGGGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGG	
Timothy	... G. C.	
Barley	... G. C.	
Rice	... G. G. C.	
Alfalfa	G. A. G. T. T. A. G. C.	
	192	251
Oats	TACATGGACAACTGTTTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATG	
Timothy		
Barley		
Rice	 C.	
Alfalfa	G. G. C. T. C.	
	252	311
Oats	CTATCACATCGAGCCTGTTGCTGGGGAAGACAACCAATGGATCTGTTATGTAGCTTATCC	
Timothy	 G.	
Barley	 G.	
Rice	 C. T. G. T. T. AT. GC.	
Alfalfa	... C. A. A. G. CT. TT. TGC.	
	312	371
Oats	ATTAGACCTATTTGAAGAGGGTTCCGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAACGT	
Timothy	 T. A.	
Barley	 G.	
Rice	 T.	
Alfalfa	C. T. A. T. C. A. T.	
	372	393
Oats	ATTTGGTTTCAAAGCCCTACGT	
Timothy		
Barley	 G.	
Rice	 C	
Alfalfa	 G. G. ... T. G. ...	

Fig. 2 Nucleotide variations in the *rbcL* region of commercially obtained grass hay samples. The numbers of nucleotide residues from translational start site are shown on the upper side. The symbol “.” indicates that the same nucleotide as oats sequence.

しばしば認められる雑草の識別にも適応可能と考えられる。

得られた配列が *rbcL* 領域のものであるのか、また流通している牧草の種名が正しいか確認する目的で、NCBI Blast を用いて配列から推定される植物種名の検索を行った (Table 2)。相同性検索の結

果、全ての試料において解析結果は当該種の *rbcL* 領域の配列と100%一致した。種名検索の結果、アルファルファ (*Medicago sativa* L.)、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.)、イネ (*Oryza sativa* L.) およびチモシー (*Phleum pratense* L.) は、当該種あるいはその原種のみが100%の相同性を示すものと

Table 2 Homology analysis of *rbcL* region of commercially obtained samples.

Botanical name	Sequence matched	Accession number	Homology (%)
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>M. sativa</i> chloroplast <i>rbcL</i> gene	Z70173	100
<i>Avena sativa</i> L.	<i>Avena fatua</i> chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large chain	AJ746257	100
	<i>Avena sativa</i> ribulobisphosphate dehydrogenase (<i>rbcL</i>) gene	L15300	100
	<i>Calamagrostis epigejos</i> chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large chain	AJ784820	100
	<i>Koeleria</i> sp. Forest 780 chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large subunit	AM235063	100
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>Hordeum bulbosum</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>) gene	AY137454	100
	<i>Hordeum chilense</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>) gene	AY137449	100
	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	AY137453	100
	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>)	AY137456	100
	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	AY836173	100
	Barley chloroplast genes <i>rbcL</i> and <i>atpB</i>	X00630	100
	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete genome	EF115541	100
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare from chromosome 10	AC092750	100
	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group chromosome 10 clone OSJNAb0075K12, complete sequence	AC122148	100
	<i>Oryza sativa</i> chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large chain	AJ746297	100
	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone: 001-016-H01, full insert sequence	AK058516	100
	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone: 001-200-A05, full insert sequence	AK105600	100
	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 1	AP003280	100
	<i>Oryza nivara</i> chloroplast DNA	AP006728	100
	<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group) isolate 93-11 chloroplast	AY522329	100
	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare chloroplast	AY522330	100
	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) isolate PA64S chloroplast	AY522331	100
	<i>Oryza sativa</i> chloroplast gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit, complete cds	D00207	100
	<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group) isolate 93-11 mitochondrion	DQ167399	100
	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare mitochondrion	DQ167400	100
	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) isolate PA64S mitochondrion	DQ167807	100
	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group chloroplast genome	X15901	100
<i>Phleum pratense</i> L.	<i>Phleum pratense</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>) gene	AY395554	100
	<i>Phleum pratense</i> chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large chain	AJ784832	100
	<i>Phleum pratense</i> chloroplast partial <i>rbcL</i> gene for ribulose biphosphate carboxylase large chain	AJ746298	100

して検索結果に挙げられた．親子関係を示すような近縁種同士の識別は難しいが、正確に種を判定することが可能であり、今回試料として用いた流通牧草の種名は正しいと考えられた．一方オーツ (*Avena sativa* L.) は、100%の相同性を示すものとして、当該種あるいはその原種以外に、牧草として使用されない近縁種の *Calamagrostis epigejos* (ヤマアワ) および *Koeleria* sp. (イネ科 ミノボロ属) が挙げられた．今回の試料は市販の牧草であり、相同性検索の結果から流通している種名が正しいと考えられた．*rbcL* 領域の配列では識別できなかったこれらの近縁種も、より近縁種まで識別可能なマーカーを併用することで、DNA 配列の比較により識別できる可能性がある．

5種の牧草の以外にも、クローバー、オーチャードグラス、そしてペレニアルライグラスなどの牧草が多用されている．これらの牧草の Genbank 登録配列は全て異なっており、今回得られた配列も含めて比較を行った場合でも全ての種で識別が可能であった．今回、実際に DNA 解析を行った市販の牧草が全て Genbank 上の配列と100%一致したことから、これらの牧草についても *rbcL* 領域の比較による識別が可能であると考えられる．

2. 異なる牛舎より採取した植物片の識別

実際に産業で用いられていた試料でも DNA 配列の比較が有用か検討するために、異なる3牛舎から種名不明の植物片を鑑定資料を想定して無作為に採取し、*rbcL* 遺伝子の一部、262bpの配列を同定した．各牛舎毎に異なる5~6片の試料を解析し、そのうち1片については異なる複数部位から DNA を抽出して、配列を同定した．実際の鑑定を想定し、10 mg 以下の微細な植物片を試料とした．

各牛舎由来植物片の *rbcL* 遺伝子の一部領域の配列の解析結果を Fig. 3 に示す．同一の牛舎から得られた植物片はすべて同一の配列を示し、さらに牛舎毎に得られた植物片の配列は異なっていた．本研究で解析した牛舎では、同一牛舎内で同種または近縁種の植物を使用していると考えられ、また牛舎間では異種の植物の使用が示唆される．この結果から、植物片の配列を比較することによりその植物片がもともと存在した牛舎を識別できる可能性が示さ

れた．さらに、葉、茎、穂など異なる部位を用いて DNA の抽出、解析を行ったが、どの部位を試料として用いた場合も DNA 配列の解析が可能であり、その配列は一致した．よって、形態による識別が難しい、資料と対照が異なる部位の植物片同士であっても、DNA 解析により識別可能であると考えられた．

得られた配列を市販の牧草を用いて解析した配列と比較したところ、A牛舎由来の植物片はチモシー、B牛舎由来の植物片はオーツ、そしてC牛舎由来の植物片はアルファルファとそれぞれ一致した (Table 3)．この結果から、DNA 配列より、未知試料の植物種あるいは近縁種の種名が同定できる可能性が示唆された．

3. DNA 配列の解析による植物試料の識別

本研究で用いた手法を用いた場合には異なる部位から得られた DNA でも同一の配列を示すため、形態による検査が難しい場合であっても識別できる可能性がある．鑑定資料は非常に微細であることがしばしばあるが、本法は10 mg 以下の試料でも解析可能であり、微細な証拠資料の検査に有用であると考えられた．これまでにも *rbcL* を用いた法科学的な検討が行われている^{10,11,13)}が、標品とは異なる個体である市販品であっても適応可能か、また加工され、実際の産業で用いられている状態が良くない試料であっても適応可能かについて十分に検討が行われていなかった．今回、市販品を試料とした場合も牛舎から採取した植物片を試料とした場合も解析可能であり、実際の鑑定業務にこれら DNA 解析の手法を応用しうると考えられた．

本研究では、牛舎由来植物片の識別が可能であったが、同一種、あるいは極めて近縁の種を使用している牛舎同士の比較は困難であると考えられ、今後の技術の発展が期待される．また、配列から種名を同定する場合、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のデータベースを用いて種名を検索することが想定される．しかし、これら公共のデータベースは海外からも登録が行われているために相対的に外国産の植物が多く登録されており、さらに分類群によって偏りがあること、配列が誤登録されている場合あることなどから¹⁶⁾、正確な同定には標品を用いて確認

	132	191
A	TCAGCCTGGGGTTCCCCGGAAGAAGCAGGGGCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGG	
B	... A. G.	
C	G. . A. A. GG. T. T. . A. . G. C.	
	192	251
A	TACATGGACAACCTGTTTGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATG	
B		
C	G. G. C. T. C. .	
	252	311
A	CTATCACATCGAGCCTGTTGCTGGGGAAGACAGCCAATGGATCTGTTATGTAGCTTATCC	
B	 A.	
C	... C. A. A. G. CT. TT. . TGC.	
	312	371
A	ATTAGACTTATTTGAAGAAGGTTCCGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAACGT	
B	 C. G.	
C	C. C. T. T. C. A. T. .	
	372	393
A	ATTGTTTCAAAGCCCTACGT	
B		
C	 G. G. . T. G. .	

Fig. 3 Nucleotide variations in the *rbcL* region of cowshed plant fragments. The numbers of nucleotide residues from translational start site are shown on the upper side. The symbol “.” indicates that the same nucleotide as cowshed A sequence.

することが望ましい。

結 語

市販の牧草 5 種について種名同定に有用とされる *rbcL* 領域の配列の決定を行ったところ、全ての配列が種特異的であり、*rbcL* 領域の比較によって異なる種の牧草が識別できる可能性が示唆された。次に、異なる 3 牛舎より植物片を採取し、*rbcL* 領域の DNA 解析を行った。その結果、同一牛舎由来の植物片はすべて同じ配列を示し、さらに得られた配列は牛舎毎に異なっていた。よって、異なる種の牧

草を用いている牧舎由来の植物片を DNA 解析により識別できる可能性が示唆された。牛舎由来試料から葉、茎、穂など異なる部位を用いて DNA の抽出、解析を行ったところ、どの部位を試料として用いた場合も DNA 解析が可能であり、同一試料由来の配列は一致した。このことから、形態による識別が難しい資料と対照が異なる部位の植物片であっても、DNA 解析により識別可能と考えられた。

以上より、DNA 種名同定に有用といわれている部位の DNA 解析が法科学的に有用であると考えられた。

Table 3 The results of homology search between cowshed plant fragments and commercially obtained grass hay samples.

Cowshed	Sequence matched grass hay
A	Timothy
B	Oats
C	Alfalfa

謝 辞

本研究を行うにあたり，鹿児島県警察本部科学捜査研究所の長濱清英化学科長に丁寧な御助言を頂きました。この場を借りて謝意を表させていただきます。

文 献

- 1) 杉田律子，笹川 薫，鈴木真一：走査型電子顕微鏡を用いたマメ類種皮の断面観察．日本法科学技術学会誌，**10**，77-82 (2005)．
- 2) Craft, K. J., Owens, J. D. and Ashley, M. V.: Application of plant DNA markers in forensic botany: genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Sci. Int.*, **165**, 64-70 (2007)．
- 3) 内山岳人，甲斐彩友美，谷村真一，佐田一浩，川村 修，明石 良：Py-GCによる植物細胞壁構成成分を指標とした植物分類法の検討．日本法科学技術学会誌，**12**，185-196 (2007)．
- 4) 清水矩宏，森田弘彦，宮崎 茂，広田伸七：牧草・毒草・雑草図鑑．pp. 10-94畜産技術協会，東京 (2005)．
- 5) 岩瀬 徹：形とくらしの雑草図鑑一見分ける，身近な280種．pp. 178，全国農村教育協会，東京 (2007)．
- 6) 杉田律子，鈴木真一，丸茂義輝：法科学的土壌鑑定における微小藻類の有効性．日本法科学技術学会誌，**9**，113-122 (2004)．
- 7) Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. and Iwatsuki, K.: *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 5730-5734 (1994)．
- 8) Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. and Janzen, D. H.: Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 8369-8374 (2005)．
- 9) Tsai, L. C., Yu, Y. C., Hsieh, H. M., Wang, J. C., Linacre, A. and Lee, J. C.: Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Sci. Int.*, **164**, 193-200 (2006)．
- 10) 甲斐元士，渡辺直樹，高木卓也，福島久代：塩基配列情報を利用した植物種同定方法の検討．DNA多型，**15**，114-117 (2007)．
- 11) Tsai, L. C., Wang, J. C., Hsieh, H. M., Liu, K. L., Linacre, A. and Lee, J. C.: *Bidens* identification using the noncoding regions of chloroplast genome and nuclear ribosomal DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **2**, 35-40. (2008)．
- 12) Lee, E. J., Kim, S. C., Hwang, I. K., Yang, H. J., Kim, Y. S., Han, M. S., Yang, M. S. and Lee, Y. H.: The identification of ingested dandelion juice in gastric contents of a deceased person by direct sequencing and GC-MS methods. *J. Forensic Sci.*, **54**, 721-727 (2009)．
- 13) Dunbar, M. and Murphy, T. M.: DNA analysis of natural fiber rope. *J. Forensic Sci.*, **54**, 108-113 (2009)．
- 14) 松木吏弓，阿部聖哉，島野光司，矢竹一穂，竹内 亨，白木彩子，石井 孝，梨本 真：イスワシを頂点とする生態系の開発—DNA解析による野生動物の糞内容物からの餌食物同定—．pp. 2，電力中央研究所，東京 (2003)．
- 15) 岩瀬 徹：形とくらしの雑草図鑑一見分ける，身近な280種．pp. 154-185，全国農村教育協会，東京 (2007)．
- 16) 松木吏弓，阿部聖哉，島野光司，竹内 亨，梨本 真：植物 *rbcL* 遺伝子データベースの構築と植食性動物の食性解析への適応．日本生態学雑誌，**58**，105-112 (2008)．
- 17) 長田武正：増補 日本イネ科植物図譜．pp. 76，平凡社，東京 (2002)．