コロニーダイレクトのマルチプレックス PCR による植物病原性 *Rhizobium* 属細菌 (旧 *Agrobacterium* 属細菌) の菌種同定

澤田 宏之^{1*}

ABSTRACT

SAWADA, H.^{1*} (2015). Simultaneous identification of phytopathogenic *Rhizobium* species (former *Agrobacterium* species) using multiplex colony-direct PCR. Jpn. J. Phytopathol. 81: 332–340.

The genus *Rhizobium* includes two plant pathogens, crown gall and hairy root bacteria. Among the existing species of the genus, the following six species have at least either of these two pathogens as a member: *R. radiobacter* species complex (including *R. nepotum* and *R. pusense*), *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei*, and *R. skirniwicense*. Of these six species, four species (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, and *R. rubi*) were the focus of this study to develop a method for their simultaneous identification by means of a multiplex colony-direct PCR. Respective species-specific primer sets were designed based on sequences of the *recA* or *pyrG* genes. The universal primer set for 16S rRNA gene (16S rDNA), chosen as an internal control, was also added to the PCR mix to readily judge the success of the reaction and exclude false-negative reactions. Reliability of the method as an identification tool was then validated using the *Rhizobium* species containing pathogens and their relatives of 383 strains in total. As a result, two DNA fragments, one from species-specific amplifications (*R. radiobacter* species complex [245 bp], *R. vitis* [319 bp], *R. rubi* [420 bp], or *R. rhizogenes* [503 bp]) and the other (780–784 bp) from 16S rDNA as the internal control, were stably obtained from all the strains belonging to the targeted four species. When the other strains were used, only the fragment derived from 16S rDNA was amplified. Therefore, this method is useful for the rapid identification of the four *Rhizobium* species (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, and *R. rubi*), which will improve the efficiency in areas such as surveillance and diagnosis of crown gall and hairy root diseases and epidemiological and ecological studies.

(Received April 13, 2015; Accepted August 11, 2015)

Key words: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, colony-direct PCR, multiplex PCR, identification

緒 言

わが国では現時点で、根頭がんしゅ病は 53 種類、毛根病は 4 種類の有用植物で発生が記載されている（日本植物病理学会・農業生物資源研究所, 2012; 日本植物病理学会, 2015; 澤田ら, 2015）。いずれの場合も卓効のある治療薬はなく、特に果樹類の若木や感受性品種、あるいは野菜類の施設栽培などで集団的に発生すると深刻な被害が出ることから、診断や保菌検定が迅速に実施できるような態勢の整備が求められている（澤田, 1994, 2006; 澤田・畔上, 2014; 塩見, 1987）。しかし、これら両病害の病原菌（根頭がんしゅ病菌と毛根病菌）に関しては、以下に述べるように分類体

系の混乱が長く続いてきたこともあり、診断や検定に利用できるような簡便・迅速な菌種同定技術が確立できていない。そこで本研究では、PCR を利用することによって、実用性の高い同定技術の開発を試みることにした。

根頭がんしゅ病菌や毛根病菌は、分類上、*Agrobacterium* 属のメンバーとして長く扱われてきた（Kersters and De Ley, 1984; Young *et al.*, 2005）。しかし、その分類体系には、属・種および変種レベルにまたがって複数の問題が複雑に絡み合って存在しているため、それらを順次解消することを目指して、さまざまな提案が段階的になされてきた（Sawada *et al.*, 1993; Young *et al.*, 2001, など）。そのうち、現時点で命名規約上有効なものは、以下の 3 つ（A～C）に整理する

¹ 農業生物資源研究所（〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2） National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

* Corresponding author (E-mail: sawada@affrc.go.jp)

ことができる(澤田ら, 2014, 2015). A) 病原性に基づいた人為分類: 病原性に基づいて種が記載され, 各菌種内に生理型(biovar)が設けられた. B) 種レベルへの系統分類の導入: 各 biovar が種レベルの分類群へと格上げされた. C) 属レベルへの系統分類の導入: *Agrobacterium* 属と *Rhizobium* 属が統合され, いずれも「*Rhizobium* 属細菌」として扱われることになった.

このうち, 特に細菌分類学分野では, 近年, C の分類体系が利用される傾向が顕著になりつつある(澤田ら, 2014, 2015). そこで本論文でも, C の体系に従って学名表記を行うことにした. この体系のもとでは, 根頭がんしゅ病菌や毛根病菌は, 以下の 6 つの菌種に含まれることになる(Table 1): *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei*, *R. skieniewiczense*. そこで, ここではこれら 6 菌種のことを便宜的に「植物病原性 *Rhizobium* 属細菌」と総称したい. なお, *R. larrymoorei* はアメリカ合衆国, *R. skieniewiczense* はポーランドのみで確認されている菌種であり, 他の 4 菌種に比べるとわが国における防除対策上の重要性は低いと思われる.

ところで, このうちの *R. radiobacter* に属する菌株には遺伝的な多型が多いことから, これらは今のところ 11 個の genomovar (G1–G9, G13 および G14) に細分され, 変種レベルのまとまりとして整理されている(Costechareyre *et al.*, 2010; Portier *et al.*, 2006). しかし, その一方で, 一部の genomovar を種レベルの分類群(*R. nepotum*, *R. pusense*)へと格上げすべきとの提案も出されている(Panday *et al.*, 2011; Pulawska *et al.*, 2012). そこで本論文では, 暫定的に, これらの genomovar や関連菌種(*R. nepotum* と *R. pusense*)を 1 つにまとめて「*R. radiobacter* species complex」として扱うことにした(Table 1).

本研究では, 以上のような病害防除の現場における状況や分類上の問題点を踏まえた上で, C の体系に準拠した信頼性の高い菌種同定技術の構築を試みた. すなわち, 植物病原性の主要な 4 菌種(*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*)を検討対象として選び, コロニーダイレクトのもとで実施するマルチプレックス PCR (マルチプレックス CD-PCR) を利用することによって, これら 4 菌種を簡便・迅速に同定するための手法開発を目指した. そのためにまず, 各菌種に特異的なプライマーの候補を多数設計した上で, 菌種ごとにモノプレックス PCR を行い, 高い特異性が認められるプライマー候補の組合せ(=プライマーセット候補)を 1~数組ずつ選抜した. 次に, 各菌種のプライマーセット候補を組合せてマルチプレックス CD-PCR を行い, 良好な増幅の得られるプライマーセット

を選抜して実験系を完成させた. さらに, この実験系の菌種同定法としての信頼性を検証するために, 多数の菌株を用いて妥当性確認(バリデーション)試験を行った. これらの結果の詳細を以下に報告する.

材料および方法

供試菌株の選定 目的に合った実験系を開発したり, その実験系の信頼性を証明するためには, 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌やその近縁菌種に属する菌株を多数供試し, 妥当性確認試験を行う必要がある. そこで, このような対象菌種に属すると考えられる 383 株を収集し, 各種表現型の検査, 16S rRNA 遺伝子や 3 つの必須遺伝子(*atpD*, *glnA*, *recA*)を用いた分子系統解析(MLSA), PCR 検定, 接種試験等に基づいてその所属を確認した上で, C の分類体系に基づいて学名を整理した(澤田ら, 2014, 2015) (Table 1).

なお, このうちの 368 株は, 「植物病原性 *Rhizobium* 属細菌」とした以下の 6 菌種のうちのいずれかの枠組みに入る(Table 1): *R. radiobacter* species complex (95 株; この中には 5 株の *R. nepotum* と 1 株の *R. pusense* が含まれている. それ以外の 89 株は genomovar G1, G4, G7, G8, G9 に属する.), *R. rhizogenes* (143 株), *R. vitis* (123 株), *R. rubi* (3 株), *R. larrymoorei* (1 株), *R. skieniewiczense* (3 株). また, これら 6 つの既知菌種の枠組みには入らない 7 株の根頭がんしゅ病菌(*Rhizobium* sp.)についても, 対照として試験に加えることにした. 以上の「旧 *Agrobacterium* 属」に相当する 375 株には, 根頭がんしゅ病菌(303 株)や毛根病菌(45 株)だけでなく, 非病原菌(27 株)も含まれている. これらの分離場所はわが国も含めて 14 か国にまたがっている. 国内産菌株については, その分離材料の採集地は 24 道府県にわたっている. また, *Rhizobium* 属やその近縁属に属する根粒菌(8 株)についても, 対照として試験に供することにした. 以上の合計 383 株(Table 1)を用いて, 以後の実験系の構築や妥当性の確認を行った.

供試菌株の培養は, TY 寒天培地(トリプトン 5 g/l, 酵母エキス 3 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.87 g/l, 寒天 15 g/l, pH 6.8), あるいは標準寒天培地(日水製薬)を用いて 27°C のもとで行った. 菌株の保存は凍結保存法(澤田, 2013)によって行った.

プライマー候補の設計 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌由来の必須遺伝子の配列データを DDBJ データベースより収集し, 各菌種内や菌種間で配列を比較した. すなわち, 当該菌種内では配列が保存されているものの, 他の菌種との間では多型が認められるような領域を探索した上で, その配列を標的としてプライマーを設計し, 菌種特異的プライマーの候補とした.

Table 1. Bacterial strains used in this study and results of multiplex colony-direct PCR (multiplex CD-PCR)

Species ^{a)}	Strains ^{b)}		Multiplex CD-PCR results ^{c)}				
	Strains from MAFF (NIAS Genebank) ^{c)}	Strains from other sources ^{d)}	16S rDNA (16SF4/ 16SR3)	<i>R. radiobacter</i> (RRARecF4/ RRARecR3)	<i>R. rhizogenes</i> (RRlpyrF2/ RRlpyrR3)	<i>R. vitis</i> (RVpyrF1/ RVpyrR3)	<i>R. rubi</i> (RRUpyrF1/ RRUpyrR3)
<i>Rhizobium</i> species containing at least crown gall or hairy root bacteria (=former <i>Agrobacterium</i> species)							
<i>Rhizobium radiobacter</i> species complex (Ti)	211863, 211866, 211867, 211872, 301001, 301222, 301223, 301224, 301276, 301277, 301278, 302338, 302339, 302340, 302376, 302377, 302378, 302379, 302380, 302556, 302557, 302558, 302559, 302560, 106578, 106579, 106580, 106581, 106582, 106583, 106585, 106586, 106587, 106588, 106589, 106590, 106591, 106592, 210265, 210266, 210267, 210268, 210269, 210299, 212030, 212031, 212032, 212033, 212034, 212035, 212036, 212037, 212038, 212039, 212040, 301724, 301725, 301726, 301727	NCPPB 2437, ATCC 33970, LMG 26437, 10.9-2, AtC 1, CH 3, CH 5, ST-05-1, ST-05-2, At-M-19, At-M-22	+	+	–	–	–
<i>Rhizobium radiobacter</i> species complex (Ri)	106591, 106592, 210265, 210266, 210267, 210268, 210269, 210299, 212030, 212031, 212032, 212033, 212034, 212035, 212036, 212037, 212038, 212039, 212040, 301724, 301725, 301726, 301727	NCPPB 2659, NCPPB 4042, NCPPB 4062, CSL 5012, ARM-3, melon-1, MR 4, MR 40	+	+	–	–	–
<i>Rhizobium radiobacter</i> species complex (nonpathogenic)	311303, 311304, 520014, 520019, 520020, 520026	IAM 12048 ^T , IAM 1526, IAM 1527, LMG 25623, LMG 26435, LMG 26436, LMG 26438, LMG 26439, Ct-Ag-1, Ar-4, Ar-9	+	+	–	–	–
<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ti)	211704, 211705, 211706, 211707, 211708, 211709, 211710, 211711, 211712, 211728, 211729, 211730, 211731, 211732, 211733, 211734, 211735, 211736, 211864, 211865, 211868, 211869, 211870, 211871, 211873, 301279, 301280, 301539, 301540, 301542, 301543, 301544, 301546, 301547, 301548, 301549, 301550, 301551, 301552, 301553, 301554, 301555, 302306, 302307, 302308, 302309, 302310, 302311, 302312, 302313, 302314, 302315, 302316, 302317, 302318, 302319, 302320, 302321, 302322, 302323, 302324, 302325, 302326, 302327, 302328, 302329, 302330, 302331, 302332, 302333, 302334, 302336, 302337, 302345, 302346, 302347, 302348, 302349, 302350, 302351, 302352, 302353, 302354, 302355, 302356, 302357, 302358, 302359, 302360, 302361, 302362, 302363, 302364, 302365, 302366, 302367, 302368, 302369, 302372, 302373, 302374, 302561, 302563, 302564, 643001, 663002, 663003, 663018	NCPPB 2303, A-Ag-3, A-Ag-4, A-Ag-5, A-Ag-6, At-97-1, At-97-5, At-97-11, At-97-13, At-26, At-45, At-46, At-51, At-56, At-57, 422 ②, JM7-1, JM7-2, Ch-Ag-12, Ch-Ag-13, Ch-Ag-14, P-Ag-7, P-Ag-8, Pch-Ag-7, Pch-Ag-8, Peach CG 8331, AtR 11, R 65, R 80, R 173, R 202, R 294	+	–	+	–	–
<i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ri)		NBRC 13257 ^T , ATCC 15834	+	–	+	–	–
<i>Rhizobium rhizogenes</i> (nonpathogenic)		K84	+	–	+	–	–
<i>Rhizobium vitis</i> (Ti)	211674, 211675, 211676, 211677, 211678, 211861, 211862, 211863, 211884, 211885, 211886, 211887, 211888, 211889, 211890, 211891, 211892, 211908, 211909, 211910, 211911, 211912, 211914, 211915, 211916, 211917, 211918, 211919, 211920, 211942, 211943, 211944, 211945, 211946, 211947, 211948, 211949, 211950, 211951, 302147, 302148, 302150, 302297, 302652, 663001, 663004, 663005, 663006, 663007, 663008, 663009, 663010, 663011, 663012, 663013, 663014, 663015, 663016, 663017	NCPPB 3554 ^T , NCPPB 1771, NCPPB 2562, ATCC BAA-846, Sz-1, G-Ag-5, G-Ag-6, G-Ag-7, G-Ag-8, G-Ag-10, G-Ag-11, G-Ag-12, G-Ag-13, G-Ag-15, G-Ag-16, G-Ag-17, G-Ag-18, G-Ag-22, G-Ag-24, G-Ag-28, G-Ag-30, G-Ag-32, G-Ag-34, G-Ag-36, G-Ag-38, G-Ag-40, G-Ag-44, G-Ag-47, G-Ag-49, G-Ag-51, G-Ag-53, G-Ag-55, G-Ag-69, G-Ag-81, G-Ag-82, G-Ag-83, A-89-4, A-89-5, A-89-8, A-89-9, A-89-10, At-1, YGAt 32-3, YGAt 33-1, YGAt 35-2, VAT03-9, VAT3-2, At-5, A5-1, A5-2, A5-4, A5-8, 9-1-5, 9-3-1, 9-3-5	+	–	–	+	–
<i>Rhizobium vitis</i> (nonpathogenic)		IVIA 339-25, VAR 03-1, VAR 03-3, VAR03-4, VAR03-21, VAR03-28, VAR4-23, VAR7-1, VAR7-4	+	–	–	+	–
<i>Rhizobium rubi</i> (Ti)		NBRC 13261 ^T , NBRC 13260, LMG 294	+	–	–	–	+
<i>Rhizobium larrymoorei</i> (Ti)		ICMP 14256 ^T	+	–	–	–	–
<i>Rhizobium skienewicenses</i> (Ti)		Ch11 ^T , Ch12, AL9.3	+	–	–	–	–
<i>Rhizobium</i> sp. (Ti) (corresponding to novel species of the genus)		NCPPB 1650, K-Ag-3, K-Ag-4, Ch-Ag-4, Ch-Ag-5, Ch-Ag-7, Ch-Ag-8	+	–	–	–	–
<i>Rhizobium</i> species and their relatives including root nodule bacteria							
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		IAM 12609 ^T , NBRC 14784	+	–	–	–	–
<i>Rhizobium phaseoli</i>		NBRC 14785 ^T	+	–	–	–	–
<i>Rhizobium galegae</i>		NBRC 14965 ^T	+	–	–	–	–
<i>Ensifer meliloti</i>		IAM 12611 ^T	+	–	–	–	–
<i>Ensifer fredii</i>		NBRC 14780 ^T	+	–	–	–	–
<i>Mesorhizobium loti</i>		NBRC 14779 ^T	+	–	–	–	–
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		NBRC 14783 ^T	+	–	–	–	–

^{a)} Taxa follow the nomenclature system of Young *et al.* (2001). *R. radiobacter* species complex is known to be very diverse and includes at least 11 genomovars, *R. nepotum* and *R. pusense* (Portier *et al.*, 2006; Costechareyre *et al.*, 2010; Pulawska *et al.*, 2012; Panday *et al.*, 2011). In this study, strains belonging to genomovars G1, G4, G7, G8, G9, *R. nepotum* and *R. pusense* were used; results were compiled into “*R. radiobacter* species complex” in this table. For assigning strains to taxa and their pathogenicity, see reports such as Sawada *et al.*, 1990, 1992a, 1992b, 1993, 2014, 2015; Sawada and Ieki, 1992; Sawada, 1994; Sawada and Azegami, 2014; Kawaguchi *et al.*, 2008.

^{b)} Among the 383 strains used, 368 strains belong to the 6 *Rhizobium* species containing pathogens (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei*, and *R. skienewicenses*) from 14 countries (Australia, France, Greece, Netherlands, Hungary, India, Iran, Israel, Japan, Poland, South Africa, Spain, UK, USA) (see reports in footnote a for details); 232 strains were supplied by MAFF (NIAS Genebank, Tsukuba, Japan).

^{c)} Strain accessions in MAFF (NIAS Genebank) are indicated.

^{d)} Abbreviations of culture collections: ATCC, American Type Culture Collection, USA; IAM, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ICMP, International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; NBRC, NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK.

Strains without above abbreviations were either isolated by the author or supplied by Akihiko Iijima, Kouki Ota, Yasumitsu Kawai, Akira Kawaguchi, Kenichi Kondo, Koichi Suzuki, Yuichi Takikawa, Yasuo Terai, Masayuki Togawa, Takahiro Makino, Tomoo Misawa, Jun Yamamoto, Benito Alarcón Hernández, Erno Szegedi, or Joanna Pulawska.

^T, type strain of the species.

^{e)} +, target band present on agarose gel electrophoresis after PCR; –, no target band present.

Table 2. Sequences of five primer sets used for simultaneous identification of 4 *Rhizobium* species containing pathogens (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, and *R. rubi*)

Primer ^{a)}	Sequence (5'-3')	Gene	Target taxon	Product size (bp)	Reference
RRArecF4 RRArecR3	GAGACCGTTTCGACGGGHTCKCTCAGCCTG GGCTGCGAGATCAGAAGRYCTG CARATCC	<i>recA</i>	<i>R. radiobacter</i> species complex	245	This study
RVpyrF1 RVpyrR3	GATCAAGGACTTCATCGTTGAGGGCAATAG GCAAAACAGCGACAGYTTGCGACGTTCCGG	<i>pyrG</i>	<i>R. vitis</i>	319	This study
RRUpyrF1 RRUpyrR3	GGCACGGTGGGTGACATCGAAGCCATGCCA GTTGCAGACCTCTCCCACTGCTCAAGCCT	<i>pyrG</i>	<i>R. rubi</i>	420	This study
RRlpyrF2 RRlpyrR3	GTCATTCCGCATGTGACCAACGAGATCAAA TTGCAAACCTCTTCCCATTGATCAAGGCGA	<i>pyrG</i>	<i>R. rhizogenes</i>	503	This study
16SF4 16SR3	ACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG GGGGAG CCAGCCGCAGGTTTCYCTACGGCTACCTTG	16S rRNA gene (16S rDNA)	(internal control)	780–784	Sawada <i>et al.</i> (2011)

^{a)} Each primer stock solution was normalized to 100 μ M using Tris-EDTA (TE) buffer to then prepare the 10x primer mix (Table 3).

内部標準の設定 本研究で構築を試みている実験系は、縮重度の高いプライマーセットを4組も用いるマルチプレックスPCRであり、しかも、それをコロニーダイレクトのもとで行うため、きわめて厳しい条件下での反応を強いられることになる。したがって、偽陰性によって誤った判定が導き出されることを避けるために、PCRが正常に進行／完了したか否かが判定できるような仕組みが必要となる。そこで、すべての細菌に普遍的に存在する16S rRNA遺伝子(16S rDNA)を内在性コントロール遺伝子(内部標準遺伝子)として選び、これを標的としたプライマーセットを実験系に組み込むことによって、反応の成否が容易に確認できるようにした。そのためのプライマーセットとしては、筆者らが設計し、安定した結果の得られることが検証済みの16SF4/16SR3(澤田ら, 2011)(Table 2)を採用した。このプライマーセットを用いれば、植物病原性*Rhizobium*属細菌から780～784 bpの増幅産物を安定して得ることができる。

コロニーダイレクトPCR実験系の構築と条件の至適化 以下に示した手順にしたがってCD-PCRを実施した。すなわち、平板培地を用いて被検菌を培養してコロニーを形成させた後、滅菌したイエローチップの先端をコロニーに軽く接触させ、ごく微量の菌体を付着させた。そして、そのチップ先端をPCR反応液に浸漬することによって、鋳型としての菌体を反応液に添加した。PCR試薬としては、予備試験の結果、高い特異性と増幅効率の認められたAmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。そして、最終的な反応液量を10 μ lとした以外は、キット添付のプロトコールに基づいて反応液を調製し、PCRを行った。増幅産物は3%アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離

し、エチジウムブロマイドによる染色後、紫外線照射下でそのサイズを確認した。また、必要に応じて各増幅産物の配列をダイレクトシークエンスによって決定した。

以上のような手順のもとでCD-PCRを行いながらプライマーセットの選抜を行い、さらにPCR条件の至適化を試みた。すなわち、プライマー濃度は0.1～1.0 μ M, GC Enhancerの添加量は0～0.4 μ l, サイクル数は25～45回の間で、また、アニーリング温度は各プライマーのTm値の平均を起点として、条件を変えながらそれぞれの項目の最適条件を探索した。

結 果

プライマー候補の設計

予備試験の結果、*recA*と*pyrG*では、菌種間の配列の違いが比較的大きいことが確認できた(澤田ら, 2014, 未発表)。そこで、これら2つの遺伝子の配列データを対象として菌種特異性の高い領域を探索し、プライマー候補の設計を試みた。その結果、いずれの菌種についても複数個のプライマー候補が設計できた。このうち、*R. radiobacter* species complexに関しては、高い特異性が期待できる領域が*recA*の配列データ内に3か所検出できたので、その配列をもとにフォワードプライマー候補としてRRArecF1～RRArecF4, リバースプライマー候補としてRRArecR1～RRArecR3を設計した。*R. radiobacter* C58株の*recA*(アクセッション番号: AE007869)におけるこれらのプライマー候補の位置関係をFig. 1に示した。また、*R. rhizogenes*, *R. vitis*および*R. rubi*については、*pyrG*の配列データ内に、各菌種に特異性の高い領域をそれぞれ複数か所ずつ見出すことができた(データは示していない)。そこで、これら3菌種については、そ

Fig. 1. Positions (in parentheses) and directions of the seven primers (RRAREcF1–RRAREcF4, RRAREcR1–RRAREcR3 [arrowheads]) used for preliminary monoplex PCR on *recA* gene (open arrow, 1092 bp) of *Rhizobium radiobacter* strain C58 (accession AE007869). After preliminary analysis, primers RRAREcF4 and RRAREcR3 (Table 2) were selected as the species-specific primer set for identification of *R. radiobacter* species complex.

これらの配列をもとにそれぞれ 2～5 個のフォワードプライマー候補とリバースプライマー候補を設計した。

菌種特異性の確認とプライマー候補の選抜

菌種ごとに設計したフォワードプライマー候補／リバースプライマー候補について、組み合わせが可能な位置関係のものを対象として総当たりでモノプレックス PCR を実施し、当該菌種に特異的な増幅が得られるか否かを検討した。そのために、供試菌株 (Table 1) の中から菌種ごとに数菌株を代表として選び、プライマー候補の組合せごとにコロニーダイレクトでモノプレックス PCR を行った。その結果、*R. radiobacter* species complex に関しては、RRAREcF4/RRAREcR3 プライマーセット (Fig. 1) において高い特異性と増幅効率

Table 3. Preparation of 10x primer mix^{a)}

Primer stock ^{b)} (100 μM)	Volume (μl)	Final concentration in 10x primer mix
RRAREcF4	20	4 μM
RRAREcR3	20	4 μM
RVpyrF1	20	4 μM
RVpyrR3	20	4 μM
RRUpyrF1	30	6 μM
RRUpyrR3	30	6 μM
RRlpyrF2	10	2 μM
RRlpyrR3	10	2 μM
16SF4	10	2 μM
16SR3	10	2 μM
TE buffer	320	
Total volume (μl)	500	

^{a)} The 10x primer mix was stored in small aliquots at –20°C until PCR reaction mixture was prepared (Table 4).

^{b)} See Table 2.

が認められた。また、それ以外の菌種についても、良好な結果の得られるプライマー候補の組合せ (=プライマーセット候補) を 1～数組ずつ選定した (データは示していない)。

マルチプレックス CD-PCR 実験系の構築と条件の至適化
菌種ごとに用意したプライマーセット候補の中から、マルチプレックス CD-PCR に最適なものを選抜した。そのためにまず、各菌種からプライマーセット候補を 1 組ずつ取り上げ、それら 4 組のプライマーセット候補と 16SF4/16SR3 とを組み合わせ PCR を行った。そして、プライマーセッ

Table 4. Multiplex PCR components for one reaction

Component	Volume (μl)/reaction	Final concentration
PCR-grade water	3.8	—
AmpliTaQ Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems)	5	1x
360 GC Enhancer (Applied Biosystems)	0.2	N/A
10x primer mix (see Table 3)	1	0.4 μM (RRAREcF4/RRAREcR3) 0.4 μM (RVpyrF1/RVpyrR3) 0.6 μM (RRUpyrF1/RRUpyrR3) 0.2 μM (RRlpyrF2/RRlpyrR3) 0.2 μM (16SF4/16SR3)
Total volume (μl)/reaction ^{a)}	10	

^{a)} After preparation of the volume of reaction mixture 10% greater than required for the total number of reactions to be run, 10 μl was dispensed into each well of the reaction plate, and a small portion of each colony growing on plate medium was added to the appropriate well using a sterilized, yellow micropipet tip. The reaction plate was then loaded into the PCR instrument (Table 5).

Table 5. Thermal cycling conditions

Step	Temperature	Time	Number of cycles
Initial activation step	95°C	10 min	1
3-step cycling:			40
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	66°C	30 sec	
Extension	72°C	60 sec	
Final extension ^{a)}	72°C	7 min	1

^{a)} After final extension, the reaction plate was held at 4°C. The amplified PCR products were separated by gel electrophoresis using 3% agarose in 1x TBE buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized with a UV transilluminator (Fig. 2).

トごとに期待される増幅が得られるか、プライマー同士が干渉して非特異的増幅が発生したり、増幅量が減少することはないか、各増幅産物が電気泳動によって容易に分離できるか、などの視点に基づいてプライマーセットを評価し、菌種ごとに最も成績の良いものを1組ずつ選んだ。その結果、以下のような組合せ (Table 2) において良好な結果が得られた: 内部標準 (16S rDNA) プライマー (16SF4/16SR3); *R. radiobacter* species complex プライマー (RRArcF4/

RRArcR3); *R. rhizogenes* プライマー (RRIPyrF2/RRIPyrR3); *R. vitis* プライマー (RVpyrF1/RVpyrR3); *R. rubi* プライマー (RRUpyrF1/RRUpyrR3)。

さらに、このプライマーセットの組合せのもとで、各種反応条件 (プライマー濃度、GC Enhancer の添加量、サイクル数、アニーリング温度など) を変えながら PCR を反復し、得られた結果を比較しながら条件を調整した。その結果、Table 3 ~ 5 に示した条件下では、供試した代表菌株から期待されるシグナルが安定して得られることが確認できた (Fig. 2)。また、泳動後のゲルから各増幅産物を回収し、その配列を決定したところ、いずれも目的の産物であった。

菌種同定法としての妥当性確認

構築した実験系 (Table 2 ~ 5) の信頼性を証明するために、供試菌株として選んだ 383 株 (Table 1) を用いて妥当性確認試験を行った。すなわち、菌株ごとに PCR を 2 回反復して実施し、菌種特異的なシグナルが当該菌種に属するすべての菌株から安定して得られるか否か、非特異的増幅が発生しないか否かについて、確認・評価を行った。

その結果、本実験系によって、4つの対象菌種のすべての菌株から、内部標準としての 16S rDNA 由来のシグナル (780 ~ 784 bp) とともに、各菌種に特異的な以下のシグナルが安定

Fig. 2. Multiplex PCR reactions using five primer sets (Table 2) to identify *R. radiobacter* species complex, *R. vitis*, *R. rubi*, and *R. rhizogenes* simultaneously. Amplification of the DNA fragments (780–784 bp) from 16S rDNA (internal control) of the respective strains indicated that the respective PCR reactions were completed properly. Amplification was species-specific: *R. radiobacter* species complex (245 bp), *R. vitis* (319 bp), *R. rubi* (420 bp), and *R. rhizogenes* (503 bp). Lanes: M, 100-bp DNA Ladder; 1, *R. radiobacter* (Ti) NCPPB 2437; 2, *R. radiobacter* (Ri) ARM-3; 3, *R. radiobacter* (nonpathogenic) IAM 12048^T; 4, *R. vitis* (Ti) NCPPB 3554^T; 5, *R. vitis* (Ti) MAFF 211950; 6, *R. vitis* (nonpathogenic) VAR 03-1; 7, *R. rubi* (Ti) NBRC 13261^T; 8, *R. rubi* (Ti) NBRC 13260; 9, *R. rhizogenes* (Ti) NCPPB 2303; 10, *R. rhizogenes* (Ri) NBRC 13257^T; 11, *R. rhizogenes* (nonpathogenic) K84; 12, *R. larrymoorei* (Ti) ICMP 14256^T; 13, *Rhizobium* sp. (Ti) K-Ag-3; 14, *Rhizobium* sp. (Ti) Ch-Ag-4; 15, *Rhizobium* sp. (Ti) NCPPB 1650.

して得られた (Table 1, Fig. 2) : *R. radiobacter* species complex からは *recA* 由来の 245 bp のシグナル ; *R. rhizogenes* からは *pyrG* 由来の 503 bp のシグナル ; *R. vitis* からは *pyrG* 由来の 319 bp のシグナル ; *R. rubi* からは *pyrG* 由来の 420 bp のシグナル. なお, *R. radiobacter* species complex に属する菌株として供試した genomovar G1, G4, G7, G8, G9, *R. nepotum* および *R. pusense* の間で, 菌種特異的シグナルのサイズや強度に差異は認められず, いずれの菌株からも同様に 245 bp の産物が得られた. 一方, 検討対象としたこれら 4 菌種以外の供試菌株, すなわち, *R. larrymoorei*, *R. skierniewicense*, 既知菌種の枠組みに入らない根頭がんしゅ病菌 (*Rhizobium* sp.), および根粒菌からは, 16S rDNA 由来のシグナルのみが得られた (Table 1, Fig. 2).

考 察

植物病原性の *Rhizobium* 属細菌を簡便・迅速に同定することを目指して, 「菌種特異的プライマーを利用した PCR 実験系」の開発が盛んに試みられてきた (Eastwell *et al.*, 1995; Pulawska *et al.*, 2006; Szegedi and Bottka, 2002, など). しかし, これまでに報告されてきた PCR 実験系は, いずれの場合も以下に挙げる問題のうちの複数を抱えており, 実用的に十分なレベルに達しているとは言いがたい. 1) いずれか 1 つの菌種のみを対象としている. 2) 解像度・識別能が低いため, 必要な情報を得るためには, 増幅産物をさらに RFLP 分析しなければならない仕様となっている. 3) 抽出・精製した DNA を鋳型として用いることが前提で実験系が構築されており, コロニーダイレクト PCR のもとで信頼できる結果が得られるか否かが検証されていない. 4) PCR の成否が確認できるような仕組み (内部標準) が用意されていない. 5) 十分な数の菌株を用いた妥当性確認試験がなされていない.

本研究では, 以上のような問題を克服し, 実用性の高い PCR 実験系を構築することを試みてきた. その結果, 根頭がんしゅ病菌・毛根病菌をメンバーとして含んでいる主要な 4 菌種 (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*) を対象として, 菌種ごとに特異性の高いプライマーセットを開発することができた (Table 2). さらに, それらと内部標準用プライマーセットとを組み合わせるマルチプレックス CD-PCR を行う実験系を構築した上で, 反応条件を最適化したので (Table 3 ~ 5), 種レベルの所属を一度に判定することが可能となった (Fig. 2).

ここで構築した実験系には, 以下のような特長がある. 1) 菌種ごとに得られる増幅産物のサイズが異なるため, 1 回の実験操作で 4 菌種を対象とした同定ができる. 2) 内部標準

を利用することによって PCR の成否が容易に確認でき, 偽陰性が回避できる. 3) DNA 調製の必要がなく, 被検菌のコロニーさえあればすぐに反応を開始できる. 4) 来歴の異なる多数の菌株を用いた妥当性確認試験が実施済みであり, 高い信頼性が証明されている. 以上のような特長を備えた本実験系を用いれば, 多数の被検サンプルを同時処理することができ, 信頼性の高い結果を効率よく得ることが可能となる. その結果, 本実験系は, 根頭がんしゅ病や毛根病の発生調査・確定診断, 病原菌の疫学・生態学的研究等のさまざまな場面で, その作業効率を大いに高めてくれるであろう.

今後の課題

本研究で開発した菌種同定法では, 被検菌の病原性に関する情報を得ることはできない. 一方, 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の各菌種内には, 病原菌だけでなく非病原菌も存在している. また, *R. radiobacter* species complex と *R. rhizogenes* の菌種内には, 病原菌として, 根頭がんしゅ病菌だけでなく毛根病菌も含まれている. このように各菌種内には病原性に関するさまざまな状態 (pathogenic state) が混在していることから (Table 1) (澤田, 2006; Young *et al.*, 2005), 防除対策や生態学的研究をより効率よく進めるために, pathogenic state が判別できるような技術も求められている. そこで筆者らは, 病原性遺伝子を標的としたプライマーを設計することによって, そのような判別技術の開発を試みているところである (澤田・土屋, 2003; 澤田ら, 未発表).

本研究で開発した菌種特異的プライマーセット (Table 2) を利用すれば, 植物や土壌などのサンプルから, 目的とする菌種を直接検出するための技術開発も可能であろう. ただし, そのためには, 目的とする菌種用のプライマーセットを使った「定性/定量 PCR」と, 被検サンプルからの効率の良い「DNA 抽出法」とを組み合わせる上で, 検出のための実験系として最適化する必要がある. また, 本研究で得られた菌種特異的な配列に関する情報を活用し, LAMP 法のようなより簡便な手法の開発にも取り組んでいきたいと考えている.

ところで, 細菌の分類体系は常に流動的であり, *Rhizobium* 属に関してもその例外ではない. 特に「属レベル」に関しては, 種レベルの場合と違って絶対的な定義が存在しないため, 変化していく可能性はより高いと思われる. *Rhizobium* 属の場合でいえば, 本論文で採用した C の分類体系は, 主に 16S rRNA 分子系統解析の成果に基づいて構築されたものである (Young *et al.*, 2001). しかし, 複数の遺伝子配列を用いた MLSA が一般的になるに従い, その成果をもとに, *Rhizobium* 属をさらに複数の属へと細分した方が良いとの意

見が既に提出されつつある (Mousavi *et al.*, 2014, 2015). 今後、この属レベルの議論がどのような方向へ進み、最終的にいかなる形へ収束するかについては、現時点では予測がつかない。しかし、属レベルの範囲がどのように変化しても、絶対的な定義のある種レベルの枠組みが変わることはないと思われる。したがって、*R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi* の3菌種の場合は、本実験系を利用して種レベルの所属を明らかにした上で、とりあえずCの体系に基づいて学名を記載しておけば、将来、たとえ属レベルの分類が変わったとしても、その時点で適切な学名へと機械的に読み替えることが可能であろう。

ただし、種レベルの整理が十分に進んでいない *R. radiobacter* species complex の場合は注意が必要である。すなわち、本菌種は現時点で11個の genomovar へと細分されているが、今後、これらの genomovar が亜種～種レベルの分類群へと格上げされる可能性のあることが指摘されている (Costechareyre *et al.*, 2010; Panday *et al.*, 2011; Portier *et al.*, 2006; Puławska *et al.*, 2012). したがって、*R. radiobacter* species complex の場合は、本実験系によって種レベルの所属を判定するだけでなく、*recA* 分子系統解析 (澤田・畔上, 2014; 澤田ら, 2014) や genomovar 判別用 PCR (Shams *et al.*, 2013) によって genomovar レベルの所属まで明らかにした上で、その情報を学名とともに記録しておくことが望まれる。このような準備さえしておけば、今後、*R. radiobacter* species complex をめぐる種レベルの分類がどのように変化しても、必要に応じて学名を容易に読み替えることができるであろう。

摘 要

根頭がんしゅ病菌と毛根病菌は、いずれも *Rhizobium* 属に属する植物病原菌である。本属内の既知菌種のうち、これらの植物病原菌をメンバーとして含んでいるのは以下の6菌種である: *R. radiobacter* species complex (*R. nepotum* と *R. pusense* も含む), *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*, *R. larrymoorei*, *R. skierniewicense*. 本研究では、このうちの4菌種 (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*) を対象として、コロニーダイレクトのもとで実施するマルチプレックス PCR を利用した菌種同定法の開発を試みた。各菌種に特異的なプライマーは、*recA* あるいは *pyrG* の配列に基づいて設計した。また、16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) を内在性コントロール遺伝子 (内部標準) として選び、それを標的としたプライマーセットを反応に組み込むことによって、PCR の成否が容易に判定できるようにした。さらに、これらを組み合わせて実験系を構築した上で、その反応条件を至適化した。最後に、この実験系が菌種同定法として

信頼できるか否かを証明するために、合計383株の植物病原性 *Rhizobium* 属細菌や近縁菌を供試し、妥当性確認 (バリデーション) 試験を行った。その結果、菌種同定の対象とした4菌種からは、内部標準としての16S rDNA由来のシグナル (780～784 bp) とともに、各菌種に特異的な以下のシグナルが安定して得られることが確認できた: *R. radiobacter* species complex (245 bp); *R. vitis* (319 bp); *R. rubi* (420 bp); *R. rhizogenes* (503 bp)。一方、4菌種以外の菌株からは、16S rDNA由来のシグナルのみが認められた。以上より、本法は植物病原性の主要4菌種 (*R. radiobacter* species complex, *R. rhizogenes*, *R. vitis*, *R. rubi*) を対象とした簡易・迅速な同定法としてきわめて実用性が高く、根頭がんしゅ病や毛根病の発生調査・確定診断、病原菌の疫学・生態学的研究をはじめとするさまざまな場面において、同定作業の効率化に大きく貢献することが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、瀧川雄一教授 (静岡大学) には有益なご助言を賜った。また、飯島章彦氏 (元長野県果樹試験場), 太田光輝氏 (元静岡県柑橘試験場), 川合康充氏 (長野県佐久農業改良普及センター), 川口章氏 (岡山県庁), 近藤賢一氏 (長野県果樹試験場), 須崎浩一氏 (農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所), 寺井康夫氏 (元山梨県果樹試験場), 外側正之氏 (静岡県農林技術研究所), 牧野孝宏氏 (元光産業創成大学院大学), 三澤知央氏 (北海道立総合研究機構 道南農業試験場), 故山本淳氏 (元島根県農業技術センター), Benito Alarcon Hernandis 氏 (Instituto Valenciano de Investigacions Agrarias, Spain), Erno Szegedi 氏 (Research Institute for Viticulture and Enology, Hungary), Joanna Puławska 氏 (Research Institute of Horticulture, Poland) には、貴重な菌株を分譲していただいた。青柳千佳氏, 中島比呂美氏をはじめとする農業生物資源研究所 遺伝資源センターの皆様にはご支援・ご協力を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

引用文献

- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. and Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microb. Ecol.* 60: 862–872.
- Eastwell, K.C., Willis, L.G. and Cavaleir, T.D. (1995). A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 79: 822–827.
- Kawaguchi, A., Sawada, H. and Ichinose, Y. (2008). Phylogenetic and

- serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathol.* 57: 747–753.
- Kerstens, K. and De Ley, J. (1984). Genus *Agrobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 (Krieg, N.R. and Holt, J.G., eds.). pp. 244–254, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P. and Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 208–215.
- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P. and Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* 38: 84–90.
- 日本植物病理学会・農業生物資源研究所 (2012). 日本植物病名目録 (第 2 版), 日本植物病理学会, 東京.
- 日本植物病理学会 (2015). 日本植物病名目録追録 (更新 2015 年 4 月 6 日). (<http://www.ppsj.org/pdf/mokuroku/supplement150406.pdf>).
- Panday, D., Schumann, P. and Das, S.K. (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2632–2639.
- Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J. and Nesme, X. (2006). Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7123–7131.
- Puławska, J., Willems, A. and Sobiczewski, P. (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 470–479.
- Puławska, J., Willems, A., De Meyer, S.E. and Süle, S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 215–220.
- Sawada, H., Ieki, H. and Takikawa, Y. (1990). Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 199–206.
- Sawada, H. and Ieki, H. (1992). Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 37–45.
- Sawada, H., Imada, J. and Ieki, H. (1992a). Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 52–57.
- Sawada, H., Takikawa, Y. and Ieki, H. (1992b). Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 46–51.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H. and Matsumoto, S. (1993). Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 694–702.
- 澤田宏之 (1994). *Agrobacterium* 属細菌の系統および分類に関する研究. 果樹試特報 5: 1–110.
- 澤田宏之・土屋健一 (2003). *Agrobacterium* 属細菌の分類. 日植病報 69: 349–365.
- 澤田宏之 (2006). いわゆる「アグロバクテリウム」について — (1) プロフィールの紹介 —. 日本微生物資源学会誌 22: 117–121.
- 澤田宏之・功刀幸博・綿打享子・工藤 晟・佐藤豊三 (2011). *Xanthomonas arboricola* によるブドウ斑点細菌病 (新称). 日植病報 77: 7–22.
- 澤田宏之 (2013). 細菌の保存. 土壤微生物実験法 第 3 版 (日本土壤微生物学会編). pp. 27–30, 養賢堂, 東京.
- 澤田宏之・畔上耕児 (2014). ククモビン型 Ri プラスミドを保持した *Rhizobium radiobacter* によるトマト毛根病 (新称). 日植病報 80: 98–114.
- 澤田宏之・山崎福容・竹谷 勝・青木孝之 (2014). 植物病原性 *Rhizobium* 属細菌の分類の変遷とジーンバンクにおける対応. 日本微生物資源学会誌 30: 13–27.
- 澤田宏之・瀧川雄一・牧野孝宏 (2015). 根頭がんしゅ病菌・毛根病菌における最新学名への読み替え. 植物防疫 69: 106–112.
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X. and Lavire, C. (2013). Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 351–358.
- 塩見俊樹 (1987). メロン毛根病の発生とその病原細菌. 植物防疫 41: 4–7.
- Szegedi, E. and Bottka, S. (2002). Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis* 41: 37–42.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 89–103.
- Young, J.M., Kerr, A. and Sawada, H. (2005). Genus *Agrobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 2, part C (Garrrity, G.M., ed.). pp. 340–345, Springer, New York.