

LAMP法によるサトウキビに感染する2種のウイルス (*Fiji disease virus*, *Sugarcane yellow leaf virus*) の検出法の開発

川元 恵子¹⁾・池城 隆明・會澤 雅夫・藤原 加奈子・宮崎 航²⁾

那覇植物防疫事務所

Development of Detection Methods for Two Viruses (*Fiji disease virus*, *Sugarcane yellow leaf virus*) that infect Sugarcane using Loop-mediated Isothermal Amplification. Keiko Kawamoto¹⁾, Takaaki Ikeshiro, Masao Aizawa, Kanako Fujiwara and Wataru Miyazaki²⁾ (Naha Plant Protection Station, 2-11-1, Minato-machi, Naha-shi, Okinawa, 900-0001 Japan. ¹⁾ Naha Airport Branch, Naha Plant Protection, Station. ²⁾ Ishigaki Branch, Naha Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. **51**: 7-13 (2015)

Abstract: *Fiji disease virus* (FDV) and *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) cause serious diseases in Sugarcane plants. In order to specifically and rapidly detect these viruses, we have developed a detection method using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Each LAMP primer set was designed based on the sequences of FDV and ScYLV respectively. These two viruses could be detected with the designed primer sets from nucleic acid extraction of each virus infected sugarcane plant. In the case of nucleic acid extracted from the young leaf by this method, each specific reaction was confirmed to begin at 23 minutes at 60°C in FDV and at 28 minutes at 65°C in ScYLV.

Key words: LAMP, *Fiji disease virus*, *Sugarcane yellow leaf virus*

緒 言

Fiji disease virus (FDV) 及び *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) はサトウキビ (*Saccharum* spp.) に減収等を引き起こす植物ウイルスであり、日本での発生は共に確認されていない。

FDV は *Fijivirus* 属に分類される球状 dsRNA ウイルスで *Saccharum* 属及びその交配種に感染し (Smith, 2000; Frison and Putter, 1993)、クロフツノウンカ *Perkinsiella saccharicida*, *P. vitiensis*, *P. vastatrix* により媒介される (Frison and Putter, 1993)。

本ウイルスは新鞘部の枯死や gall と呼ばれる葉の隆起、矮化等を引き起こし、感染した苗では成長が阻害されて早期に枯死する場合もあり、オーストラリアでは 50% 減収したとの報告がある (Smith, 2000)。インドネシア、タイ、フィリピン及びオーストラリア等での発生報告がある (Smith, 2000)。

ScYLV は、*Polerovirus* 属に分類される球状 ssRNA ウイルスで *Saccharum* 属の商業的交配種 (*Saccharum* spp. hybrids) や *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum* 及び *S. sinense* での感染が確認されており (Smith and Roft,

2003)、ヒエノアブラムシ *Melanaphis sacchari*、トウモロコシアブラムシ *Rhopalosiphum maidis* 等で媒介される (Abu et al., 2006; Schenck and Lehrer, 2000)。本ウイルスは葉や中肋の黄化、末端節間の矮化 (Abu et al., 2006) や糖抽出を妨げる複合多糖類 (gums) の増加を引き起こし (Lockhart and Pieter, 2000)、感受性の高い品種では 20% 減収したとの報告もある (Lapierre and Signoret, 2004)。タイ、台湾、中国、南アフリカ、アメリカ、オーストラリア及びブラジル等での発生報告がある (Abu et al., 2006; Lockhart and Pieter, 2000)。

両ウイルスともに日本既発生の媒介虫が存在すること、サトウキビは種茎を用いた栄養繁殖により栽培されることから、侵入した場合は容易にまん延する可能性がある。サトウキビは日本における亜熱帯地域の基幹作物であることから、海外から輸入される場合、これらのウイルスも含め、検疫有害動植物の有無を隔離栽培検査において確認している。現在、これらウイルスの検査方法は病徴観察、電顕観察及び Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法検定に限られており、ELISA 法よりも検査の精度が高く、効率的に検査が行える手法が求められている。このため、本調査ではサトウキ

¹⁾ 那覇植物防疫事務所那覇空港出張所

²⁾ 那覇植物防疫事務所石垣出張所

ビの隔離栽培検査におけるFDV及びScYLVの遺伝子診断法の導入を目的とし、これらウイルスの既報のプライマーによるPCR法及び新たに設計したプライマーによるLAMP法での検出について調査を行った。また、本調査では両ウイルスの感染株を導入することから、隔離栽培ほ場における病徴診断についても調査を行った。

材料及び方法

1. 各ウイルス感染株の導入

農林水産大臣の許可により、オーストラリア産FDV(農林水産省指令20那植第730号)、モーリシャス産ScYLV(農林水産省指令20那植第731号)の感染サトウキビ生茎を導入した。また、LAMPプライマーの特異性調査にはモーリシャス産*Sugarcane streak virus* (SSV), *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) (農林水産省指令20那植第731号)及び沖縄県産*Sorghum mosaic virus* (SrMV)の感染サトウキビを供試した。

2. 病徴観察

導入したFDV及びScYLVの感染株は、ガラス温室において室温(約12℃～約35℃)で管理し、病徴観察を周年行い、文献で報告された病徴との比較をするなど病徴診断に関する調査を行った。

3. PCR法による検出

(1) 核酸抽出

各供試株の新葉50mgを用いてRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)にて核酸抽出を行った。

試料の磨砕はマルチビーズショッカー (MB601・安井器械)を用いた。サトウキビ葉の組織は繊維質で固いため、細型のメタルコーン(2ml破碎チューブ用・細MC-0218R(S))を用い、キット付属のBufferRLTを450 μ l入れた後、マルチビーズショッカーで2500rpmで2分間磨砕した。

磨砕後はメタルコーンを取り出し、卓上遠心器でチューブの蓋や壁面についた磨砕物を落とした後、56℃で2分間インキュベーションした。以降の手順はキットの付属プロトコルに従い、最終工程の核酸の溶出にはキット付属のRNaseフリー水50 μ lを用いた。

(2) PCR法による検出

両ウイルスの既報のプライマーによるPCR法での検出について、感染株を用いて調査した。

PCR反応液はPCR反応試薬One Step RNA PCR Kit (TaKaRa)を用い、キット付属のマニュアルに従いFDV又はScYLVの特異的プライマー及び抽出核酸を加えて調整した。特異的プライマーは、FDVではFDV7F、FDV7R (Smith *et al.*, 1994)、ScYLVではoFM359、oFM323 (Moonan and Mirkov, 2002)を用いた。

増幅反応はFDVでは50℃30分、94℃2分、(94℃30秒、60℃30秒、72℃1分)を38サイクル行い、その後72℃10分で処理した。ScYLVでは50℃30分、94℃2分、(94℃1分、52℃2分、72℃2分)を

30サイクルで処理した。増幅反応後はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド又はゲルレッドで染色して目的とする増幅バンドの有無を確認した。調査は2反復行った。

4. LAMP法による検出

(1) LAMPプライマーの設計

FDVの検出プライマーはDNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録されているFDVの構造タンパク質遺伝子の塩基配列(Accession number AF050086)を基に6組のプライマーセットを設計した。ScYLVの検出プライマーはDDBJに登録されているScYLVの外皮タンパク質遺伝子の塩基配列(Accession number AF141385)を基に4組のプライマーセットを設計した。

プライマーはLAMPプライマー設計ソフト「PrimerExplorer V4」(栄研化学、富士通)を用い、GC含量、dimer値、末端安定性及びプライマーの領域グループ等を考慮して設計した。

(2) 検出プライマーセットの選定

各設計プライマーセットによる標的ウイルスの検出の可否を確認するため、各ウイルス感染株を用いてLAMP法による検定を行った。

LAMP反応は、RNA増幅試薬キット(RT-LAMP)(栄研化学)を用い、反応液の調整は付属のマニュアルに従った。各反応液には抽出核酸を5 μ l添加して、リアルタイム濁度測定装置(LA-200・テラメックス)にてLAMP反応を63℃90分で行い、濁度を測定した。

陰性対照区としてFDVでは*Saccharum spp. hybrid*及び滅菌蒸留水、ScYLVでは*Saccharum spp. hybrid*、*S. spontaneum*、*S. barberi*及び*S. sinense*を供試した。

試験は2反復行い、標的とするウイルスの検出可否、特異的な濁度上昇(以下、特異的反応)の開始時間、陰性対照区等での非特異的な濁度上昇(以下、非特異反応)の結果から、各ウイルスの検出に有効と考えられるプライマーセットを選定した。

(3) LAMP法条件の調査

4. (2)の調査において、各ウイルスの検出に最も有効と考えられたプライマーセットを用いて、最適な温度条件及び供試サンプル部位について調査した。温度条件は60℃、63℃、65℃とし6反復、供試サンプル部位は新葉と成葉としFDVで3反復、ScYLVで2反復行い、特異的反応が早く、非特異反応が現れない条件を調査した。

陰性対照区には、FDVでは*S. spontaneum*、*S. barberi*、ScYLVでは*Saccharum spp. hybrid*を供試した。

(4) 特異性の調査

選定したプライマーセットの特異性を確認するため、標的とするウイルス以外のサトウキビウイルス4種(SSV, SCBV, SrMV及びFDV又はScYLV)に感染したサトウキビ及び健全な*S. barberi*、*S. sinense*、*S. spontaneum*を供試してLAMP法による非特異反応の有無を調査した。LAMP条件は、4. (3)で選定した条件とし、2反復行った。

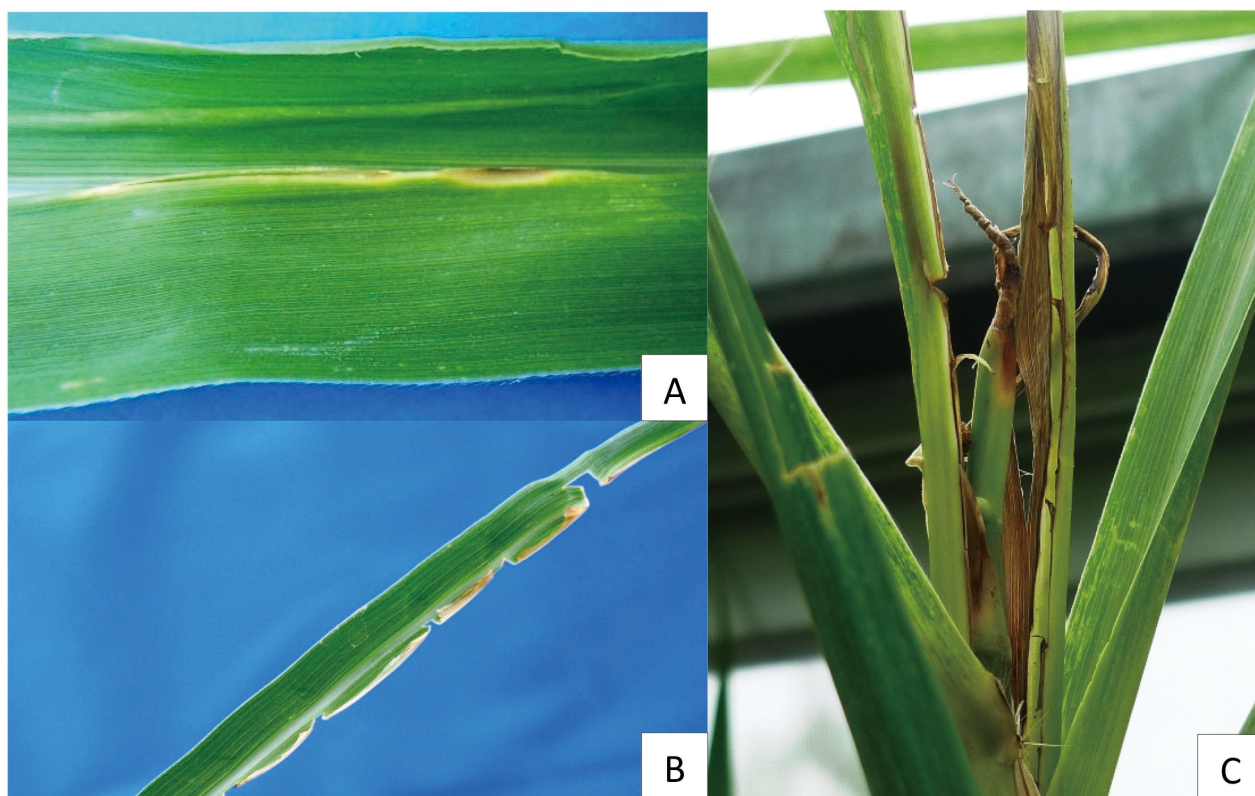


Fig. 1. Symptoms of FDV on Sugarcane

A: Gall along veins of the leaf, B: 'Knife-cut' symptom appearance to the edge of leaves, C: Necrosis of the sugarcane top

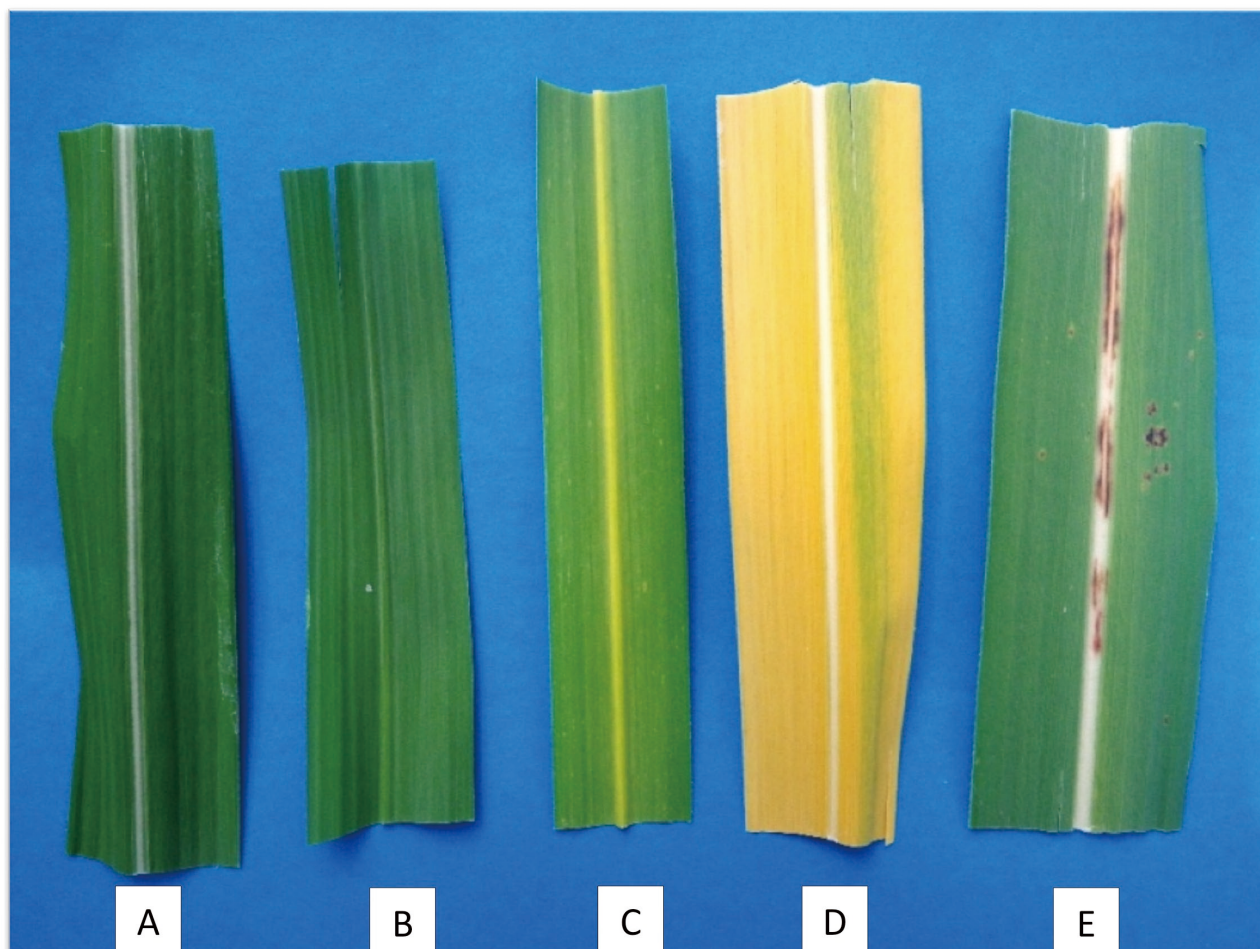


Fig. 2. Symptoms of ScYLV on Sugarcane

A: Healthy leaf, B: Healthy leaf (Back), C: Midrib yellowing (Back), D: Yellow in leaf, E: Red coloration of the midrib

Table 1. The list of LAMP primer sets for detection of FDV

Primer Name	Sequence (5'-3')
TRM40 – F3	TCGATTGATGTTAAGTTGAAGA
– B3	ACCTCGTAACGAATATCCAAC
– FIP	GACAATCGTTTTCAAACGTAAACGCCTATACCCTAGCTACTTTTAGCA
– BIP	GGATCAAATTATTAACGTGACGGCGGACATTGTATTTCCAAGCATAG
S1 – F3	GGTTATGATTACAGTCATTTACCT
– B3	TCATTTTCGTCCGGGTTAC
– FIP	GTTGAGCTTCGCTAAATCCAATTTTTAGAGACAGTGTTCAATACTGC
– BIP	CAAGACGTTTAGCGTAATAATGCCCTGTTCTTCATTCTTGATAAACTCT
ID28 – F3	TCGATTGATGTTAAGTTGAAGA
– B3	ACCTCGTAACGAATATCCAAC
– FIP	GACAATCGTTTTCAAACGTAAACGCAATTAACCTCCGTTATACTATACCCT
– BIP	GGATCAAATTATTAACGTGACGGCACATTGTATTTCCAAGCATAGG

(5) 核酸抽出

PCR法と同一の方法で各ウイルス感染株の新葉及び成葉50mgを用いてRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)により核酸抽出した。

結 果

1. 病徴観察

FDVでは、本病害の特徴であるgallと呼ばれる葉脈に沿った隆起及び進行するにしたがい隆起が白色化する特徴が観察された(Fig. 1A)。また、knife cutと呼ばれる葉縁が虫食いのようにちぎれる症状(Fig. 1B)及び新鞘部が枯死する症状も観察された(Fig. 1C)。しかし、同じく文献で報告があった矮化については、明確な症状を確認できなかった。また、PCR検定の結果、無病徴感染株が確認された。

ScYLVについても、中肋や葉の黄化及び中肋の赤色化といった文献報告と一致する病徴が観察されたが(Fig. 2)、PCR検定の結果、無病徴感染株も確認された。

2. PCR法による検出

両ウイルスの特異的プライマーを用いてPCR法を行った結果、FDVでは450bp、ScYLVでは1200bpの目的とする増幅バンドを確認し、本調査方法による両ウイルスの検出が可能であることを確認した。

3. LAMP法による検出

(1) FDV

1) 検出プライマーセットの選定

設計した6組(ID1, S1, TRM40, ID28, ID52, ID9)のプライマーセットを用いてLAMP法によるFDVの検出を調査した。

その結果、全てのプライマーセットでFDVが検出されたが、

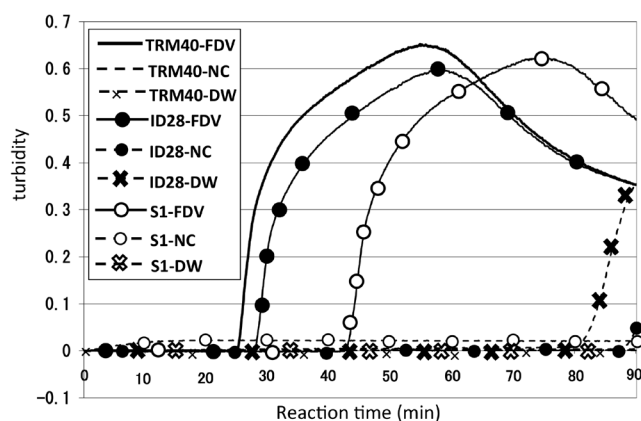


Fig. 3. Detection of FDV with the designed LAMP primer sets (NC: Healthy Sugarcane, DW: Distilled water)

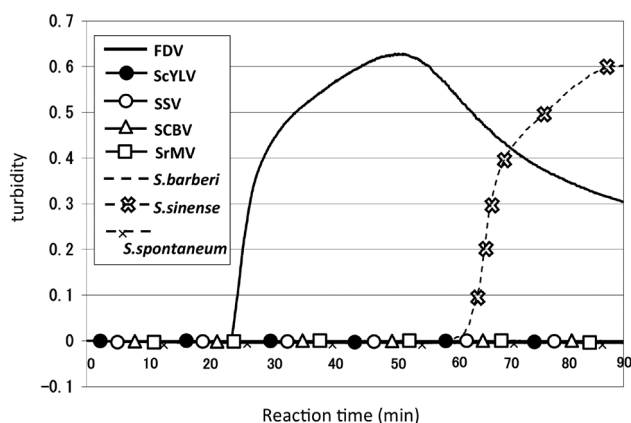


Fig. 4. Specific detection of FDV with the designed LAMP primer set TRM40

Table 2. The list of LAMP primer set for detection of ScYLV

Primer Name	Sequence (5'-3')
BEP15 – F3	TAACATCATGCTCCTCCGACG
– B3	GCTAGGCTCGAGTCTCCATT
– FIP	TGGAGCCTGTTGTTGTTTGGGACAACTCCAGGTGCAATCGC
– BIP	AACGCCAAGAAAGTCTTCCCGGACTGGTCAGCTGACGTAGT

TRM40以外のプライマーセットでは陰性対照区に非特異反応があった。この中でS1及びID28 (Table 1)については非特異反応が約86分及び84分と特異的の約37分及び28分と大きく時間差があったことから、測定時間を60分程度とすれば有効であると考え、検出プライマーセットの候補としてTRM40 (Table 1)と共にさらに2反復の試験を行った。

その結果(Fig. 3)、S1は非特異反応が現れなかったものの、特異的の約43分と遅く、ID28は特異的の約28分であったが、陰性対照区の両試料で80分以降に非特異反応が現れた。TRM40は特異的の約25分と早く、非特異反応も確認されなかった。これらの結果から、特異的の約25分と早く、非特異反応が現れなかったTRM40をFDV検出のプライマーセットとして選定した。

2) LAMP法条件の調査

プライマーセットTRM40を用いて最適なLAMP反応温度と供試サンプル部位について調査した。

その結果、60℃で新葉約23分、成葉約25分、63℃で新葉約26分、成葉約27分、65℃で新葉約32分、成葉約36分と60℃が最も特異的の反応が早く、供試サンプル部位では1～5分程度ではあるが新葉が成葉より早かった。また、全ての調査区において非特異反応はなかった。

3) 特異性の調査

FDVの他、4種のウイルスに感染したサトウキビ及び健全な*Saccharum*属3種を供試してTRM40の特異性を調査した。その結果、*S. sinense*の1検体において約60分から濁度の上昇が見られた(Fig. 4)。このため、LAMP反応の増幅産物を電気泳動したところ、FDVとバンドパターンが異なったことから、非特異反応であると考えられた。非特異反応の再現性を確認するため、非特異反応が現れた抽出核酸、同一株から再抽出した核酸及び*S. sinense*の他株の抽出核酸を用いて再度LAMP反応を行ったが非特異反応は確認されなかった。

(2) ScYLV

1) 検出プライマーセットの選定

設計した4組のプライマーセット(ID2, ID7, ID11, BEP15)を用いてLAMP法によるScYLVの検出について調査した。

その結果、ID7及びID11は共に約23分で特異的の反応が確認されたが、ID7では陰性対照区の全てに、ID11では

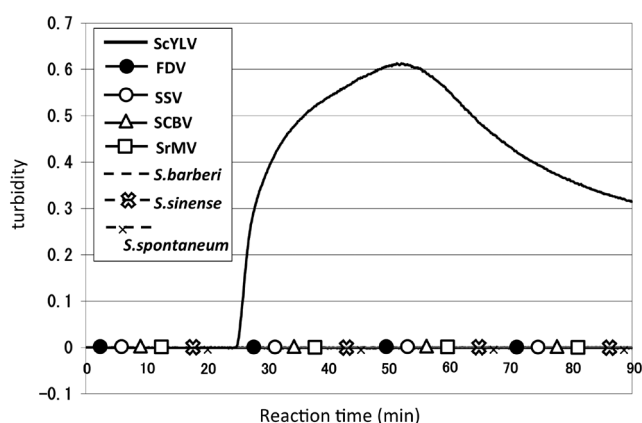


Fig. 5. Specific detection of ScYLV with the designed LAMP primer set BEP15

S. spontaneum, *S. sinense*に非特異反応が現れた。BEP15は約26分で、ID2は約42分で特異的の反応が確認され、共に非特異反応もなかった。以上の結果から検出が早く、非特異反応が現れなかったプライマーセットBEP15 (Table 2)をScYLVの検出プライマーセットとして選定した。

2) LAMP法条件の調査

プライマーセットBEP15を用いて最適なLAMP反応温度と供試サンプル部位を調査した。

調査の結果、60℃で新葉約38分、成葉約40分、63℃で新葉約31分、成葉約32分、65℃で新葉約28分、成葉約30分と65℃が最も特異的の反応が早かった。供試サンプル部位については、わずかに新葉の方が早かった。また、全ての調査区において非特異反応はなかった。

3) 特異性の調査

ScYLVの他、4種のウイルスに感染したサトウキビ及び健全な*Saccharum*属3種を供試してBEP15の特異性を調査した。

その結果、非特異反応は現れず(Fig. 5)、BEP15はScYLVの検出に有効であることが示唆された。

考 察

各ウイルス感染株の病徴観察において、FDVでは特徴的な病徴であるgallが観察された。これまでのサトウキビの隔

離栽培検査において、他の病害や生理障害等でgallと同様の症状は観察されていない。また、gallはFDVの決定的な診断症状であるとの報告(Smith, 2000)もあることから、本病徴が現れた場合はFDVに感染している可能性が高いと考えられた。しかし、knife cutや新鞘部の枯死はFDV以外でも現れること、本調査において無病徴感染株も確認されたことから、病徴による診断は困難であることが明らかとなった。

ScYLVについても、文献報告にある病徴が観察されたが、無病徴の感染株も確認された。ScYLVは品種や環境により病徴が発現しないこと及びphytoplasma等の他の病害や生理障害でも葉の黄化等の症状を引き起こすことが報告(Lockhart and Pieter, 2000; Lapierre and Signoret, 2004)されていることから、今回の調査結果も踏まえ、病徴のみでの診断は困難であり、遺伝子診断法等による検査が必須であると考えられた。

PCR法による検出については、両ウイルスともに既報のPCRプライマーを用いて、本調査方法による検出が可能であることが確認された。

LAMP法については、両ウイルス共に設計したプライマーでの検出が可能であった。

FDVでは、選定したプライマーセットTRM40において*S. sinense*の1検体に非特異反応が現れたが、反復調査の結果、再現性がなかったこと、非特異反応は約60分で現れており、特異的反応と倍以上の時間差があることから、検定上支障はないと考えられた。さらにFDVの抽出核酸を段階希釈し、TRM40を用いてLAMP反応を行ったところ1万倍希釈まで検出が可能であり、1万倍希釈した試料でも約36分で特異的反応が現れたことから、非特異反応が現れたとしても識別可能であると考えられた。また、特異的反応の開始時間及び段階希釈の結果より測定時間は60分が適切であると考えられた。

これらのことから、プライマーセットTRM40は特異性に問題はないと考えられる。また、調査結果より、試料は新葉を用いること、LAMP反応温度は60℃、測定時間は60分が条件として最も適しているものと考えられる。

本条件でFDVに感染した無病徴葉及び無病徴株を供試してLAMP反応を行ったところ、共にFDVが検出され、本プライマーセットの有効性が示唆された。FDVの病徴発現には8ヶ月を要する場合もあること(Frison and Putter, 1993)、本調査でも無病徴の感染株が見られたことから、LAMP法によりこれらを検出できることで、隔離栽培検査の精度向上及び効率化を図ることができる。なお、特異的反応がやや遅かったS1についてもTRM40同様、LAMP条件及び特異性の調査を行ったところ、新葉を用いた60℃の条件において約40分で特異的反応があり、非特異反応もなく安定して検出できたことから、S1を使用することも可能であると考えられた。

ScYLVについては、プライマーセットBEP15が検出に有効であることが示唆され、試料は新葉を用いること、LAMP反応温度は65℃が最も適していた。

ScYLVの抽出核酸を段階希釈してLAMP反応を行ったところ、10万倍希釈まで検出が可能であった。本調査で行ったPCR法では1000倍希釈まで検出できたことから、LAMP法

による検出はPCR法と比較し100倍程度、感度が高いと考えられた。また、10万倍希釈における特異的反応は約46分であったことから、測定時間は60分が適切と考えられた。なお、FDV同様、無病徴葉及び無病徴株であっても検出が可能であることを確認した。

本調査では既報のPCRプライマーを用いたPCR法においても両ウイルスを検出可能であることが確認されたが、PCR法は試薬調整、PCR反応、アガロースゲル電気泳動及び染色と作業工程が多く、反応時間も長いことから検出確認まで半日以上を要し、核酸抽出工程も含めると2日間を必要とする。これに対し、LAMP法は作業工程が少なく、反応時間も短いことから試薬調整も含め、1時間半程度で検出できる。また、一般的にLAMP法はPCR法より検出感度が高く、本調査においてもScYLVではLAMP法がPCR法より100倍検出感度が高かったことから、隔離栽培検査における両ウイルスの検定にはLAMP法が適していると考えられた。

LAMP法は高感度であるため、植物防疫所においても*Potato spindle tuber viroid*やブルーバリーのウイルス等で数百検体を一度に検定する多検体検査及び針刺し法などの簡易核酸抽出法の開発や検査への導入が行われている(神谷ら 2014; 柳澤ら 2012)。本調査において開発した両ウイルスのLAMP法においてもこれらについて調査を進めることで隔離栽培検査のさらなる効率化の可能性があると考えられる。

摘 要

Fiji disease virus (FDV), *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) は、サトウキビに減収等をもたらす重要な病害を引き起こす日本未発生の植物ウイルスである。

本調査ではこれらウイルスの既報のプライマーによるPCR法及び新たに設計したプライマーによるLAMP法での検出について調査を行い、FDV及びScYLVでの隔離栽培検査における遺伝子診断法の導入について検討を行った。

その結果、PCR法により両ウイルスの検出が可能であることを確認した。また、LAMPプライマーの設計及びLAMP条件の検討を行った結果、抽出核酸を用いたLAMP法により、両ウイルスの検出を確認した。LAMP法には新葉を用い、FDVでは約23分(60℃)で、ScYLVでは約28分(65℃)で特異的に両ウイルスが検出された。

引用文献

- Abu Ahmad, Y., M. Royer, J. H. Daugrois, L. Costet, J. M. Lett, J. I. Victoria, J. C. Girard, and P. Rott, (2006) Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Dis.* **90**: 1156-1160.
- Frison, E. A, and C. A. J. Putter, eds., (1993) *Fiji disease. In FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Sugarcane Germplasm.* Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Board of Plant Genetic Resources.

- Rome Italy: 16-18.
- 神谷昌希・柳澤広宣・齋藤範彦 (2014) LAMP法によるブルーベリーに感染する3種のウイルス(*Blueberry red ringspot virus*, *Blueberry scorch virus* 及び *Blueberry shock virus*)の検出法の開発. 植防研報 **50**: 47-52.
- Lapierre, H. and P. A. Signoret (2004) Viruses and virus disease of Poaceae (Gramineae). Editions Quae. Paris France: 719-721.
- Lockhart, B. E, and C. Pieter R. Cronje (2000) Yellow leaf syndrome. In *A guide to sugarcane disease* (Philippe Rott, Roger A. Bailey, Jack C. Comstock, Barry J. Croft, and A. Salem Saumtally eds.). CIRAD/ISSCT. Montpellier France: 291-294.
- Moonan, F., and T. E. Mirkov (2002) Analyses of Genotypic Diversity among North, South, and Central American Isolates of *Sugarcane Yellow Leaf Virus*: Evidence for Colombian Origins and for Intraspecific Spatial Phylogenetic Variation. *Journal of Virology*. **76**(3): 1339-1348.
- Schenck, S., and A. T. Lehrer, (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Dis.* **84**: 1085-1088.
- Smith, G. R. (2000) Fiji disease. In *A guide to sugarcane disease*(Philippe Rott, Roger A. Bailey, Jack C. Comstock, Barry J. Croft, A. Salem Saumtally eds.). CIRAD and ISSCT. Montpellier France: 239-244.
- Smith, G. R., and P. Roff (2003) *Sugarcane yellow leaf virus*. In *Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries* (Gad Loebenstein, George Thottappilly eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht The Netherlands: 555-557.
- Smith, G. R., and R. Vande Velde (1994) Detection of sugarcane mosaic virus and Fijidisease Virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **78**: 557-561.
- 柳澤広宣・堤直也・石井一考・志岐悠介・栗原金光 (2012) RT-LAMP法を用いた*Potato spindle tuber viroid* 検出法の改良. 植防研報 **48**: 7-12.

