



BADANIA NAD OPRACOWANIEM SYSTEMU TRANSFORMACJI GENETYCZNEJ I EDYCJI GENOMU Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMU CRISPR/CAS9 U BORÓWKI WYSOKIEJ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

Borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum* L.) jest ważnym gospodarczo gatunkiem uprawianym komercyjnie w Polsce. Aktualnie roczna produkcja borówek w Polsce wynosi ok. 62 tys. ton, co daje drugie miejsce w Europie i siódme miejsce w świecie. Hodowla twórcza nowych odmian borówki wysokiej (typ uprawny północny) prowadzona jest w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych IO-PIB od 2010 r. i stanowi ważną część programów hodowlanych Instytutu.

Wyzwania stojące przed hodowcami borówki wysokiej to przede wszystkim uzyskanie nowych odmian, łączących w sobie pożądane cechy takie jak odporność na stropy biotyczne i abiotyczne, wysoka jakość owoców (w tym zawartość związków prozdrowotnych) oraz ich długa trwałość pozbiorcza. Rozwój nowych technik genomowych, w tym techniki ukierunkowanej mutagenyzy z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas, umożliwia precyzyjne modyfikacje genów odpowiedzialnych za wyżej wymienione cechy, co daje nowe możliwości w hodowli roślin uprawnych. Edycja genomów roślinnych techniką CRISPR/Cas często wymaga przeprowadzenia transformacji genetycznej rośliny za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*. Wiąże się to z koniecznością optymalizacji procesów transformacji genetycznej i regeneracji pędów przybyszowych z transformowanych komórek w warunkach *in vitro*.

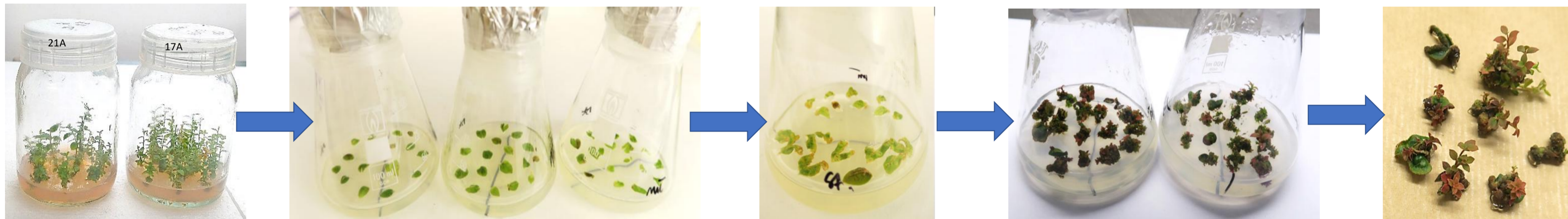
Jako gen docelowy do opracowania systemu edycji u genomu borówki wysokiej wybrano gen kodujący desaturazę fitoenuową (*pds*), enzym zaangażowany w biosyntezę karotenoidów. Gen *pds* jest genem markerowym powszechnie wykorzystywanym podczas opracowywania systemu edycji genomów roślinnych. Nokaut tego genu prowadzi do uzyskania fenotypu albinotycznego związanego z brakiem chlorofilu, co ułatwia identyfikację zmodyfikowanych genetycznie roślin.



Zadanie 1. Optymalizacja metody regeneracji pędów przybyszowych borówki wysokiej z eksplantatów liściowych

Do badań nad opracowaniem systemu transformacji genetycznej i edycji genomu borówki wysokiej wybrano dwa klony hodowlane 17A i 21A, pochodzące z programu hodowlanego Zakładu Hodowli Roślin Ogrodniczych IO-PIB. Dla obu genotypów przeprowadzono optymalizację regeneracji pędów przybyszowych z wykorzystaniem eksplantatów liściowych, pochodzących z ustabilizowanych kultur *in vitro*. W celu określenia optymalnych warunków efektywnej regeneracji pędów borówki wysokiej, zastosowano pożywkę opartą na solach WPM (Woody Plant Medium) zawierającą 50 mg L⁻¹ chelatu FeEDTA, 80 mg siarczanu adeniny oraz różne stężenia cytokiny – zeatyny (1-8 mg L⁻¹) podane pojedynczo lub łącznie z auksyną (NAA) w stężeniu 0,1-0,2 mg L⁻¹. Kultury umieszczono w fitotronie, w temperaturze 23 ± 2°C w różnych warunkach świetlnych: na świetle emitowanym przez świetlówki LED (białe ciepłe, fotoperiod 16/8) lub przez pierwsze 2 tygodnie w ciemności. Zainicjowane pędy przenoszono na pożywkę z 0,75 mg L⁻¹ zeatyny w celu uzyskania dalszego rozwoju pędów.

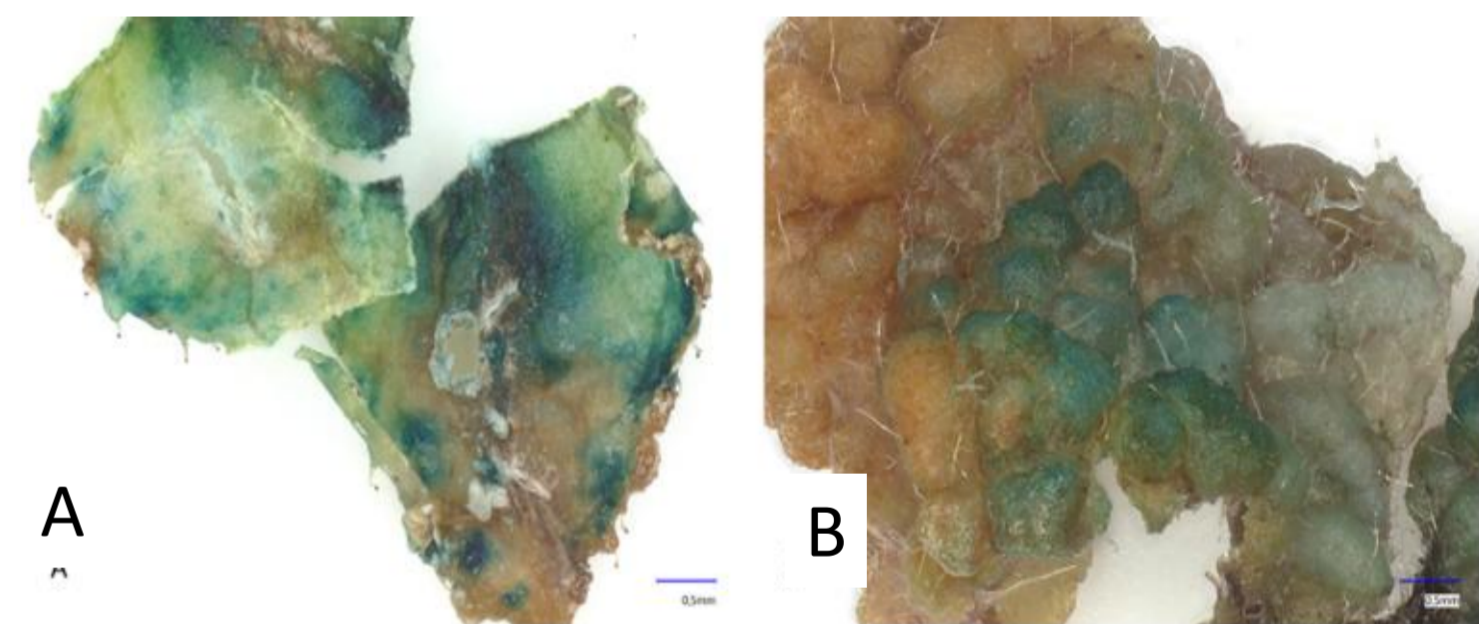
Zdolność do tworzenia pędów przybyszowych wykazywały oba badane genotypy borówki wysokiej, ale intensywność regeneracji zależała od zastosowanych regulatorów wzrostu i obecności światła (Rys. 1). Najwyższą zdolność regeneracyjną, zarówno dla genotypu 17A jak i 21A, obserwowano na pożywce z dodatkiem zeatyny w stężeniu 4 mg L⁻¹ bez obecności auksyny. Dla genotypu 17A zdolność regeneracyjną podwyższało umieszczenie kultur na 2 tygodnie w ciemności (78%), dla genotypu 21A umieszczenie kultur od początku na świetle (87%).



RYS. 1. Przebieg poszczególnych etapów procesu regeneracji pędów przybyszowych borówki wysokiej z eksplantatów liściowych

Zadanie 2. Ocena skuteczności transformacji genetycznej borówki wysokiej za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*

Błaszkę liściową obu badanych genotypów borówki wysokiej poddano próbie transformacji genetycznej za pośrednictwem bakterii *Agrobacterium tumefaciens* noszącej plazmid binarny pCAMBIA1105.1r z genem reporterowym *gus*, kodującym β-glukuronidazę. Eksplantaty (błaszkę liściową) inokulowano w zawiesinie bakteryjnej o gęstości optycznej (OD) równej 1,0 z dodatkiem acetosyringonu w stężeniu 200 μM L⁻¹. Kokultury eksplantatów z bakterią prowadzono przez 6 dni w ciemności, po tym czasie błaszkę liściową płukano w antybiotyku (500 mg L⁻¹ cefotaksymu), a następnie wykładano na pożywkę regeneracyjną zawierającą 250 mg L⁻¹ cefotaksymu. Po 7 dobach eksplantaty przenoszono na pożywkę selekcyjno-regeneracyjną zawierającą 250 mg L⁻¹ cefotaksymu i 2 mg L⁻¹ higromycyny (antybiotyk selekcyjny). Skuteczność transformacji komórek roślinnych borówki wysokiej oceniano na podstawie analizy aktywności enzymu β-glukuronidazy metodą histochemiczną w reakcji z X-Gluc 7 dni po kokulturywacji. Eksplantaty inkubowano w roztworze zawierającym X-Gluc przez noc w temperaturze 37°C, a następnie tkankę płukano kilkakrotnie w etanolu w celu usunięcia chlorofilu. Transformacji genetycznej uległy błaszkę liściowe borówki wysokiej genotypu 17A (Rys. 2). Nie uzyskano pozytywnego wyniku transformacji błaszek liściowych borówki wysokiej genotypu 21A.



RYS. 2. Aktywność β-glukuronidazy w tkankach borówki wysokiej genotypu 17A

Zadanie 3. Wybór sekwencji docelowych do edycji genu *pds* u borówki wysokiej

- Projektowanie starterów do amplifikacji fragmentów cDNA genu *pds* posiłkując się sekwencją tego genu z jagody leśnej (*Vaccinium myrtillus*), dostępną w bazie danych Genome Database for Vaccinium (GDV) – zaprojektowano po 10 par starterów;
- Reakcja PCR z zaprojektowanymi parami starterów na matrycy DNA lub cDNA z wybranych genotypów i sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów;
- Analiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji: analiza BLAST, składanie sekwencji: LaserGene v. 17 (MegAlignPro i SeqManUltra), NCBI (BLAST), EMBOSS (matcher - local alignment, needle - global alignment, merger - alignment consensus);
- Projektowanie cząsteczek sgRNA (single guide RNA), identyfikacja tzw. sekwencji off-target (CRISPR RGEN Tools: Cas-Designer i Cas-OFFinder).

Poznana sekwencja *pds* borówki ma długość 1429 pz i wykazuje podobieństwo do sekwencji genu *pds* jagody leśnej na poziomie 97,1%. Dla uzyskanych sekwencji zaproponowano 4 cząsteczki sgRNA do edycji z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 (Rys. 3, Tab. 1).

Kodon START

```

ATGAAGACGTCGACCTTTGCGAGTGGTTGCGATGGATTCAAGACGAGCTTGAGAGTACTGTCAATTTTGAAGCTGCTACATAT
CTTCATCCTTTGCTTCTCTCTCGTCCAGATAAGCATTGAAGGCGTCAATTGCTGCTGAGGTTTGGCTGGTTTGTCAACTGCAAATTTGG
CAGATGACGAGCCATAAACGATATTGCTGGAAGCAAGAGACGCTTTAGCGCGAAAGGTGGCTGCATGGCAAGATGATGATGAGACTGGTAT
GAGACTGGCTTACATATATTTTTGGCGCTTACCCTCAAAATGTCAGAACTGTTGGAGAACTTGGTATAAATGATCGGTGCAAGTGAAGAACTT
CTATGATTTGCAATGCCAAACAGCCAGGGGATTCAGTCGATTTGACTTCTTGACATTCTACCGGACCCTTAAACGGGATATGGCCATC
TAAAGAATAAGAAATGCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTTTCTCCAGGAAAAGCATGGTTCAAAATGGCATCT
TGGATGGTAACCCCAAGAGAGACTTTGCTGCAAAATGTCATATTCAGTCCCTAGGTGGTGAAGTCCGGCTTAATTCGAATTCAAAAG
ATTGAGCTAAATAAGATGGAACCGTGAAGAACTTCTTACTAAATGGAAGTATTTGAAAGGAGATGTTATGTTTTGGCACTCCAGTCGA
TGCTTTGAAGCTTCTTTTGGCCGAGAAAGATAAATTTGCGATTGGACTACTGCCAGCAATGATCGGTGACAGGCGTATGTTGAAG
CTCAAGATGTTAACTGTGAAGACTGGATGAGGAACAAGGTGACAGATCGAGTAACACTGAGGTGTTTATTGCGATGCAAAAGGCAAT
GAATCTCAAAACCTGATGAATTTCCATGCAAGTATTTGGATTGCCTTAAACCGGTT
```