

На правах рукописи

**ДАРЬЯ ДМИТРИЕВНА НОВИКОВА**

**ПОИСК НОВЫХ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К АУКСИНУ  
РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ  
*ARABIDOPSIS THALIANA* L.**

Генетика

03.02.07

Математическая биология, биоинформатика

03.01.09

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в секторе системной биологии морфогенеза растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

**Научные руководители:**

**Кочетов Алексей Владимирович**

Член-корр. РАН, д.б.н., директор, зав. лаборатории генной инженерии ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Миронова Виктория Владимировна**

к.б.н., зав. сектором системной биологии морфогенеза растений ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Официальные оппоненты:**

**Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**

д.б.н., вед.науч.сотрудник, руководитель группы функциональной геномики ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН», г. Москва

**Витяев Евгений Евгеньевич**

Профессор, д.физ.-мат. наук, вед.науч.сотрудник лаборатории теории вычислимости и прикладной логики Института математики им. С.Л. Соболева, г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:**

ФГБУН «Институт биологии гена РАН», г. Москва

Защита диссертации состоится «   » \_\_\_\_\_ 2019г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,

тел.: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте института [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Фитогормон ауксин играет ключевую роль в регуляции развития и жизнедеятельности растений. Функции ауксина многосторонни и широко используются в разных технологиях, начиная от агротехники, где ауксин применяют и как гербицид для уничтожения сорных растений, и как стимулятор роста, до культуры клеток растений, где он служит индуктором соматического эмбриогенеза. Молекулярные основы реализации таких множественных сценариев клеточного ответа на ауксин, являющийся химически простой молекулой, остаются одним из фундаментальных и центральных вопросов генетики растений.

В основе регулируемых ауксином процессов лежит активация или подавление экспрессии тысяч генов (Weijers and Wagner, 2016). Транскрипционные факторы (ТФ) ARF (Auxin Response Factor) связываются с ауксин-чувствительными элементами (Auxin Responsive Elements; AuxRE) в регуляторных областях генов-мишеней. Геномы растений включают большие семейства ТФ ARF, которые могут регулировать уникальные наборы генов путем связывания с разными AuxRE (Blenau et al., 2011). Несмотря на прилагаемые существенные усилия, из-за функциональной избыточности ТФ ARF, найти мишени конкретных ARF и исследовать пути передачи сигнала ауксина, функционирующие при различных условиях, оказалось технически сложно. В данной работе мы предлагаем решить обратную задачу – найти и описать многообразие и структуру AuxRE и охарактеризовать ТФ, которые с ними связываются. ARF-связывающие AuxRE, выявляемые в регуляторных районах многих ауксин-чувствительных генов, содержат последовательности TGTCGG, TGTCTC или TGTCCC (Zemlyanskaya et al., 2016). Однако эти элементы присутствуют и во многих нечувствительных к ауксину генах, из чего можно предположить существование

дополнительных, еще неизученных особенностей регуляции транскрипционной активности генов ауксином.

Недавние исследования показали, что ТФ ARF связываются с ДНК в виде гомодимеров (Boer et al., 2014) и гетеродимеров (обзор в Cherenkov, Novikova et al., 2018). Биоинформатический анализ районов связывания ТФ ARF5 и ARF2 выявил в них обогащение прямых и инвертированных повторов AuxRE с различной длиной спейсера (Stigliani et al., 2018). Кроме того, в анализе промоторов ауксин-чувствительных генов было выявлено обогащение не ARF-связывающими цис-регуляторными элементами (Berendzen et al., 2012), в том числе в непосредственной близости от последовательностей TGTCNN (Mironova et al., 2014). Ключевым вопросом остается, как много таких цис-регуляторных элементов и какие еще ТФ, помимо ARF, модулируют ответ на ауксин?

Экспериментальный анализ районов связывания ТФ ARF имеет существенные ограничения – на данный момент удалось исследовать взаимодействие с ДНК лишь N-терминального ДНК-связывающего домена ТФ ARF, а не целого белка. Так как формирование гетеродимеров ARF с ТФ-партнерами, как правило, происходит через C-терминальный домен, то выявить такие взаимодействия по данным ChIP(DAP)-seq анализа не представляется возможным. Кроме того, если подразумевается наличие ТФ, которые модулируют ответ на ауксин независимо от ARF, то для решения обратной задачи надо использовать другие данные. В настоящее время в базах данных накоплено большое число транскриптомных данных по ответу на ауксин, что позволяет провести их анализ и выявить новые AuxRE, обогащенные в промоторах дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), и, таким образом, дополнить теоретические знания о механизме регуляции генов ауксином.

## **Цели и задачи работы**

Целью данной работы является идентификация ауксин-чувствительных цис-регуляторных элементов (AuxRE) в промоторах генов *Arabidopsis thaliana*.

*Задачи:*

1. Разработка биоинформатического метода по выявлению потенциальных цис-регуляторных элементов, ассоциированных с дифференциальной экспрессией генов;
2. Апробация биоинформатического метода в поиске потенциальных AuxRE;
3. Анализ функциональности кандидатных AuxRE в ответе на ауксин *in vivo* методом направленного мутагенеза промоторов генов *Arabidopsis thaliana*;
4. Экспериментальная проверка связывания кандидатных AuxRE с транскрипционными факторами *in vitro*.

## **Научная новизна**

Новизна решения заявленной проблемы заключается в применении системно-биологического подхода к поиску молекулярно-генетических механизмов ответа на ауксин через анализ структуры и функциональности одиночных и парных AuxRE. Для решения этой задачи был разработан новый биоинформатический метод ТАА (Транскриптомного Анализа Ассоциаций), который по серии транскриптомных данных описывает разнообразие цис-элементов, систематически обогащенных в промоторах ДЭГ. В экспериментальной части проекта были использованы современные методики, направленные на проверку функциональности предсказанных цис-элементов в ответе на ауксин.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Выявление ауксин-зависимых механизмов регуляции активности генов является актуальным и фундаментальным направлением

исследований в биологии растений. Изучение молекулярных основ генерации множественных ответов на ауксин в развитии растения на транскрипционном уровне, выявление новых ТФ и цис-регуляторных элементов, вовлеченных в регуляцию этих процессов ауксином, открывает новые возможности для биотехнологии и сайт-направленной селекции растений. Предсказанные цис-регуляторные элементы с подтвержденной *in vivo* функциональностью могут быть использованы для создания ауксин-чувствительных репортерных конструкций, аналогов существующего DR5 (DIRECT REPEAT 5), но с более высокой и специфичной чувствительностью.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В данной работе разработан метод транскриптомного анализа ассоциаций (ТАА) для поиска связанных с транскрипционным ответом цис-регуляторных элементов (Cherenkov, Novikova et al., 2018). ТАА основан на анализе данных, полученных из множества транскриптомных экспериментов, что повышает достоверность предсказаний. Использование в анализе одновременно большого количества транскриптомных данных позволяет максимально сократить количество ложно-положительных результатов и найти наиболее полный список цис-элементов, вовлеченных в регуляцию транскрипции генов ауксином.

Для проверки функциональности предсказанных при помощи метода ТАА цис-регуляторных элементов в промоторах ауксин-чувствительных генов *A.thaliana* мы использовали методику мутагенеза с перекрывающимися праймерами. С помощью высокоэффективного безлигазного клонирования (Wendrich et al., 2015) мы получили генетические конструкции на основе плазмидного вектора pPLV104v2 (De Rybel et al., 2011). Трансформация растений *A.thaliana* осуществлялась при помощи *Agrobacterium tumefaciens*. Экспрессия паттернов активности белка GFP изучалась на корнях проростков *A.thaliana* на конфокальных

микроскопах LSM 510 Meta и Leica SP5. Для поиска ТФ, вовлеченных в регуляцию транскрипции исследуемых генов, была использована дрожжевая одногибридная система.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- Разработан метод Транскриптомного Анализа Ассоциаций (ТАА), позволяющий выявить многообразие ассоциированных с изучаемым феноменом регуляторных элементов в промоторах дифференциально экспрессирующихся генов.
- Промоторы генов первичного ответа на ауксин *Arabidopsis thaliana* обладают сложной структурой расположения ауксин-чувствительных регуляторных элементов и обогащены потенциальными сайтами связывания семейств транскрипционных факторов bZIP, bHLH, TCP и A/T-богатыми последовательностями.
- Транскрипционный фактор ARF5 может выполнять функцию активатора и репрессора транскрипции генов в ответ на фитогормон ауксин в зависимости от структуры цис-регуляторных элементов AuxRE.

### **Структура работы**

Работа состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждений работы, заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка литературы (176 наименований). Материал изложен на 138 страницах, содержит 21 рисунок, 10 таблиц и 7 приложений.

### **Личный вклад автора**

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором лично.

### **Апробация результатов**

Материалы настоящей работы вошли в отчеты по грантам Российского научного фонда и Российского фонда фундаментальных исследований. Основные результаты работы были представлены на

научных конференциях и школах молодых ученых в виде устных и стендовых докладов: Международная конференция по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS\SB'2014 и BGRS\SB'2018, г. Новосибирск, Россия), Международная конференция по системной биологии (ICSB'16, г. Барселона, Испания), Всероссийская конференция с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (HGS2017, г. Новосибирск, Россия), Международная конференция по экспериментальной биологии растений (EPS2018 и EPS2019, г. Люнтерен, Нидерланды), Международная конференция "Ауксины и цитокинины в развитии растений" (ACPD2018, г. Прага, Чехия), Международная конференция по ауксинам (Auxin Workshop 2018, г. Лидс, Великобритания), Международная конференция по биологически активным веществам растений (ICPGS2019, г. Париж, Франция).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы**

Гормональная регуляция активности генов играет ключевую роль в росте и развитии растений, реализации защитных механизмов и реакций на изменения окружающей среды, что рассматривается в разделе 1.1.1. Среди фитогормонов растений ключевым является ауксин, хорошо изучены некоторые основные посредники сигнального пути ауксина и описаны в разделе 1.1.2. Помимо ТФ ARF, которые специфично связываются с последовательностью TGTCNN на ДНК, в регуляцию могут быть вовлечены другие ТФ. Участие ТФ, не относящихся к семейству ТФ ARF, в регуляции ответа на ауксин является одним из возможных механизмов, обеспечивающих ткане- и органоспецифичную регуляцию ауксином транскрипционной активности генов, вовлеченных в большое количество процессов. Однако в литературе присутствуют лишь разрозненные данные по участию тех или иных ТФ в транскрипционном

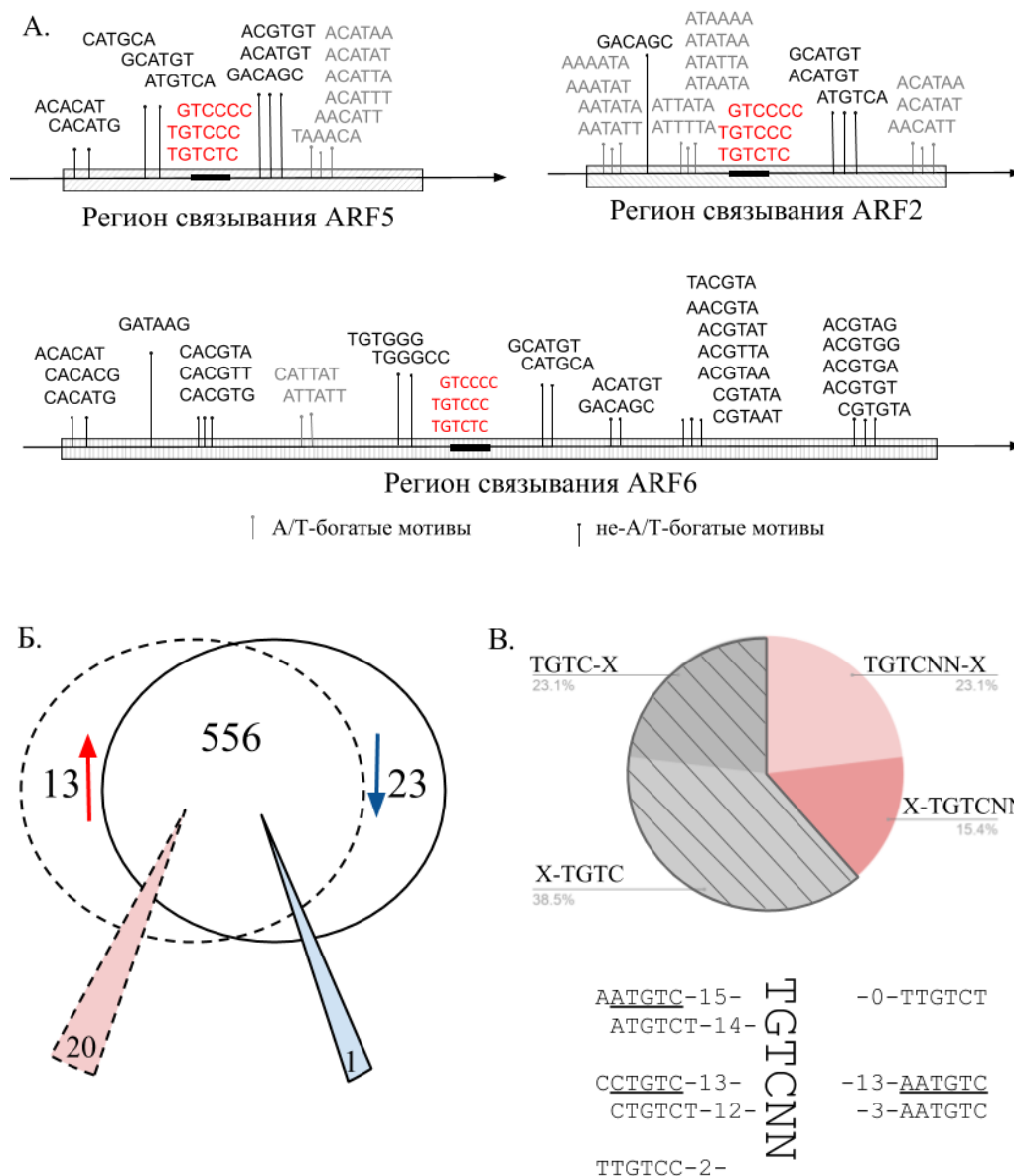


ответе на ауксин (раздел 1.1.3).

К настоящему времени был разработан ряд теоретических и экспериментальных подходов к изучению регуляции транскрипционной активности генов, они описаны в разделе 1.1.4. В базах данных накоплено большое число данных по ауксин-индуцированным транскриптомам (раздел 2.1), что позволяет провести мета-анализ этих данных и выявить максимально полный список ассоциированных с ответом на ауксин цис-регуляторных элементов, следовательно, и ТФ, участвующих в регуляции экспрессии генов ауксином (раздел 2.2). Поэтому целью данной работы стал биоинформатический поиск связанных с ответом на ауксин цис-регуляторных элементов в промоторах чувствительных к ауксину генов *A.thaliana* и их экспериментальная верификация.

## **Глава 2. Предсказание новых цис-регуляторных элементов методом ТАА**

В рамках данной работы был разработан метод транскриптомного анализа ассоциаций (ТАА) для предсказания цис-регуляторных элементов, обогащенных в промоторах ДЭГ (раздел 3.1.1). Метод ТАА позволяет находить цис-регуляторные элементы, которые обогащены в промоторах разных наборов ДЭГ по данным разных транскриптомных экспериментов. Метод ТАА был взят за основу пакета программ metaRE, разработанного моими коллегами (раздел 2.2). В данной работе метод был апробирован для предсказания одиночных и парных AuxRE в геноме *A. thaliana*: были предсказаны и проаннотированы новые одиночные AuxRE, описанные в разделе 3.1.2 (Рисунок 1А), и парные AuxRE, описанные в разделе 3.1.3 (Рисунок 1Б, 1В).

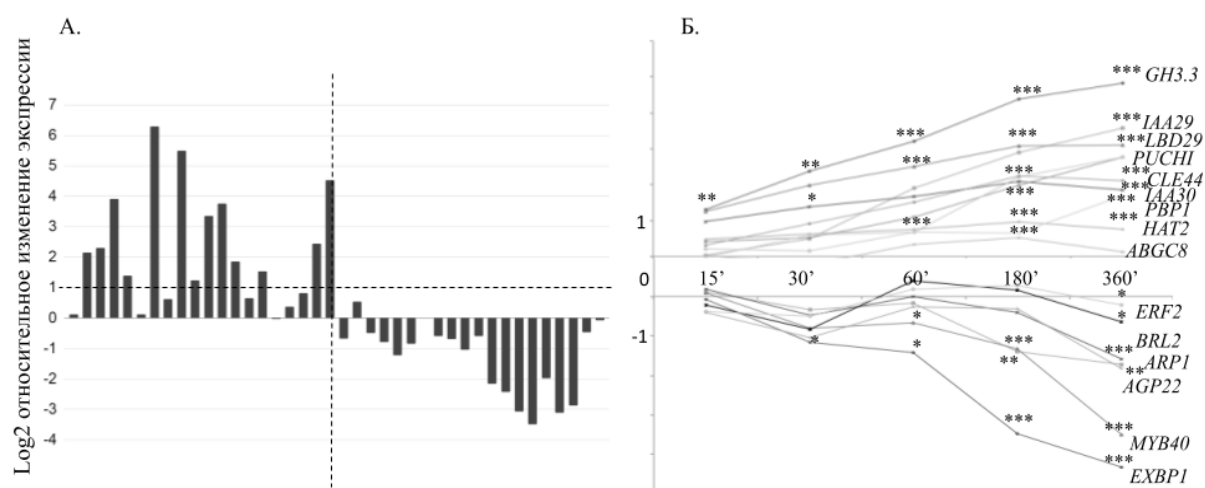


**Рисунок 1.** Предсказанные с помощью метода TAA цис-регуляторные элементы AuxRE. А. Представленность предсказанных одиночных AuxRE в районах связывания ТФ ARF (все указанные мотивы значимо обогащены  $p$ -value adj.<0,05). Красным шрифтом обозначены ARF-связывающие цис-элементы, черным – предсказанные одиночные AuxRE, серым – предсказанные A/T-богатые AuxRE. Б. Количество предсказанных парных AuxRE в промоторах генов *Arabidopsis*, ассоциированных с положительным (красная стрелка) и отрицательным (синяя стрелка) транскрипционным ответом на ауксин. В. Аннотация выявленных парных AuxRE, состоящих из последовательностей TGTC; серым отмечены парные AuxRE с TGTC-содержащим элементом-партнером, розовым – с TGTCNN; ниже схематично представлены TGTC-содержащие элементы-партнеры в составе парных AuxRE.

Также мы провели детальный анализ предсказанных AuxRE путем адаптации пакета программ metaRE к разным задачам, таким как поиск обогащения цис-элементов в районах связывания ТФ, поиск ассоциации цис-регуляторных элементов с положением относительно сайта старта транскрипции (ССТ) и с временем ответа на обработку растений ауксином (Cherenkov, Novikova et al., 2018).

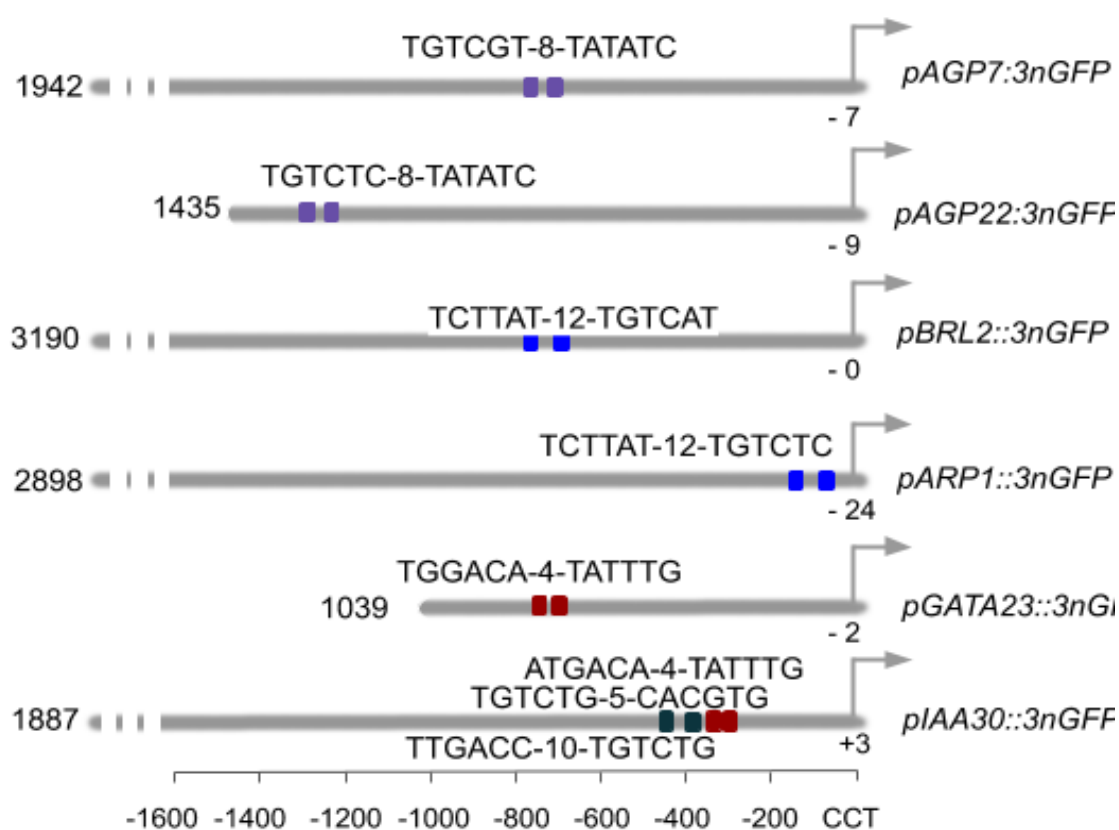
### Глава 3. Верификация функциональности парных AuxRE

Для экспериментальной верификации функциональности предсказанных парных AuxRE было выбрано 40 генов, промоторы которых содержат наиболее значимо ассоциированные с ответом на ауксин парные AuxRE (раздел 3.2.1). Чувствительность этих генов к ауксину была проверена методом ОТ-количественной ПЦР (раздел 3.2.1) (Рисунок 2А). Причем экспрессия двадцати из них была изучена в динамике после разной длительности обработки растений ауксином (Рисунок 2Б).



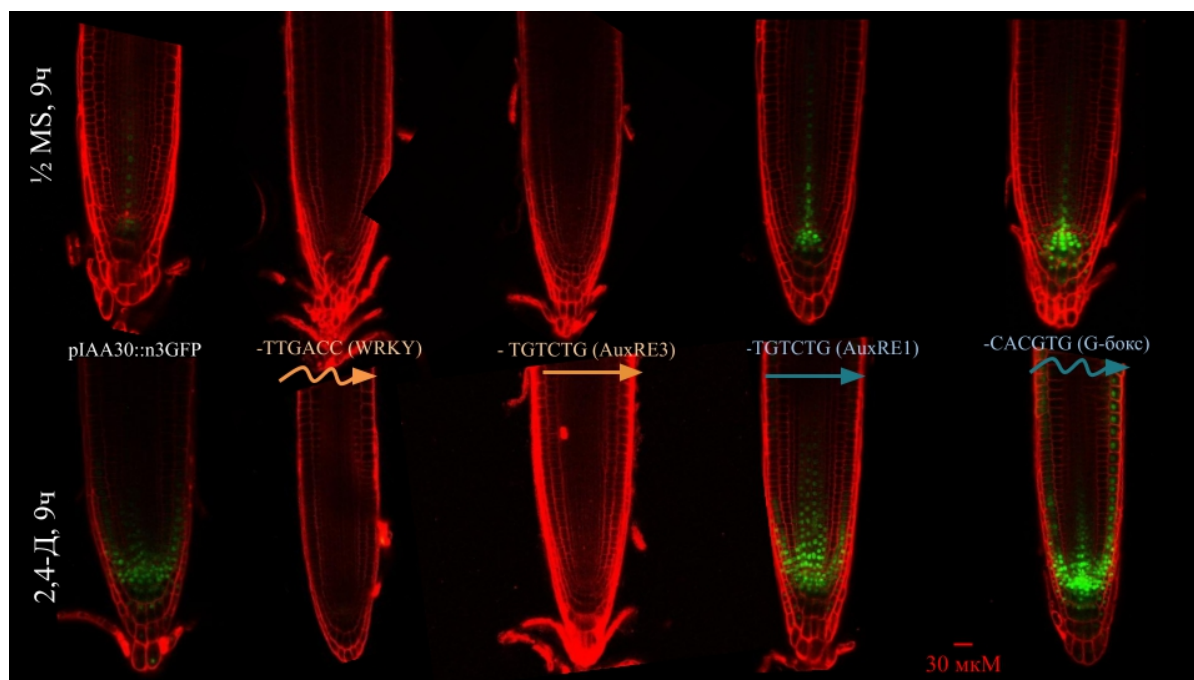
**Рисунок 2.** Изменение экспрессии генов *Arabidopsis thaliana*, в промоторах которых содержатся предсказанные парные AuxRE, в ответ на обработку растений ауксином (1 мкМ 2,4-Д). А. Гистограмма изменения экспрессии генов в ответ на ауксин при обработке целых проростков, корней, семядольных листьев экзогенным ауксином в течение 60 минут. Одна биологическая повторность. Б. График изменения экспрессии генов в корне в ответ на ауксин на разных временных интервалах обработки: 15, 30, 60, 180 и 360 мин. Пороги значимости: \* –  $p$ -value < 0,05; \*\* –  $p$ -value < 0,01; \*\*\* –  $p$ -value < 0,001.

Из генов, изменение экспрессии которых было подтверждено методом ОТ-количественной ПЦР (Рис. 2), были выбраны шесть для верификации парных AuxRE, содержащихся в их промоторах; эти кандидатные элементы описаны в разделе 3.2.2. Для проверки биологической функциональности парных AuxRE мы использовали метод направленного мутагенеза (раздел 2.7), полученные генетические конструкции, в которых под мутированными промоторами генов экспрессируется белок GFP, были трансформированы в растения *Arabidopsis thaliana* (паттерны экспрессии описаны в разделе 3.2.3) (Рис. 3).



**Рисунок 3.** Упрощенная схема промоторов, клонированных в генетические векторы для создания репортерных линий *Arabidopsis thaliana*. Цветными квадратами обозначены предсказанные парные AuxRE, последовательности которых были мутированы.

В результате изучения активности белка-репортера GFP в созданных трансгенных линиях растений с интактными или мутированными промоторами в ответ на обработку растений ауксином была подтверждена функциональность трех парных AuxRE, что описано в разделе 3.2.4. Два из них расположены в регуляторном модуле промотора гена *IAA30* (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Паттерны экспрессии GFP под промотором гена *IAA30* с мутированными последовательностями TGTCTG, CACGTG, TTGACC в контроле ( $\frac{1}{2}$  MS) и после обработки аналогом ауксина (2,4-Д) в течение 9 ч. Клеточные стенки окрашены йодидом пропидия (красный). Последовательности TGTCNN обозначены прямой стрелкой, последовательности элементов-партнеров – волнистой. Разными цветами обозначены стрелки, соответствующие разным парным AuxRE.

Репортерные линии с парными AuxRE, связанными с подавлением экспрессии ауксином, оказались нечувствительны к обработке фитогормоном. Поэтому мы задались вопросом, могут ли ТФ ARF обеспечивать подавление экспрессии в ответ на ауксин, ведь в нашем анализе одиночные ARF-связывающие элементы не были ассоциированы с подавлением транскрипционной активности генов (Cherenkov, Novikova et al., 2018). В связи с этим был проведен более детальный анализ

регуляторного района гена *WOX4*, экспрессия которого значимо подавляется в ответ на ауксин (Suer et al., 2011). В сотрудничестве с группой Томаса Гребба (Германия) мы показали, что подавление экспрессии гена *WOX4* осуществляется путем связывания ТФ ARF5 с одиночным AuxRE в промоторе этого гена (раздел 3.2.6).

По результатам верификации биологической функциональности парных AuxRE возник вопрос, с помощью каких ТФ осуществляется регуляция через подтвержденные парные AuxRE и какой механизм лежит в основе. Чтобы ответить на этот вопрос, было проверено связывание участка промотора гена *IAA30*, содержащего три предсказанных парных AuxRE, с библиотекой ТФ *Arabidopsis* в дрожжевой одногибридной системе (раздел 3.2.5). В скрининге с 1957 ТФ были выявлены взаимодействия 23-х ТФ и А-ацетилтрансферазы с троекратным повтором исследуемого регуляторного района длиной 120 п.н. Механизм функционирования этих белков на промоторе гена *IAA30* остается неизвестным - это тема для дальнейших исследований. Полученные результаты демонстрируют комбинаторную сложность организации регуляторных районов генов. Видимо, в регуляции транскрипции генов в ответ на ауксин присутствует конкуренция и кооперация ТФ, причем в пределах небольшого участка одного промотора.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод Транскриптомного Анализа Ассоциаций (ТАА) для поиска цис-регуляторных элементов, систематически обогащенных в промоторах разных наборов дифференциально экспрессирующихся генов.
2. С помощью метода ТАА предсказаны 147 одиночных и 592 парных ауксин-чувствительных элемента (AuxRE) в промоторах генов *Arabidopsis thaliana*. 27% предсказанных одиночных AuxRE являются известными сайтами связывания транскрипционных факторов, среди неизвестных элементов 66% представлены А/Т-богатыми последовательностями. Среди элементов-партнеров в составе парных AuxRE 7% распознаны как известные сайты связывания транскрипционных факторов.
3. Выявлена композиционная сложность регуляторных районов ауксин-чувствительных генов *Arabidopsis thaliana*, когда в непосредственной близости друг от друга расположены два и более парных AuxRE.
4. В промоторе гена *IAA30* найден и верифицирован *in vivo* AuxRE сложной структуры длиной 35 п.н. С этим AuxRE *in vitro* связываются 23 транскрипционных фактора из семейств bZip, MADS, WOX, LBD, WRKY, bHLH и одна А-ацетилтрансфераза.
5. Активность гена *WOX4 Arabidopsis thaliana* негативно регулируется транскрипционным фактором ARF5 через последовательность TGTCTG в его промоторной области.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано девять научных работ, из них – три статьи в журналах из Перечня ВАК (все индексированы в РИНЦ, Scopus и Web of Science), в том числе три – в зарубежных журналах; а также шесть тезисов конференций.

### Статьи в журналах

1. Pavel Cherenkov#, **Daria Novikova#**, Nadya Omelyanchuk, Victor Levitsky, Ivo Grosse, Dolf Weijers and Victoria Mironova. Diversity of cis-regulatory elements associated with auxin response in *Arabidopsis thaliana* //Journal of experimental botany. – 2017. – Т. 69. – №. 2. – С. 329-339. doi: 10.1093/jxb/erx254, # – equal contribution
2. Omelyanchuk, N. A., Wiebe, D. S., **Novikova D. D.**, Levitsky, V. G., Klimova, N., Gorelova, V., C. Weinholdt, G. V. Vasiliev, E. V. Zemlyanskaya, N. A. Kolchanov, A. V. Kochetov, I. Grosse, V. V. Mironova. 2017. Auxin regulates functional gene groups in a fold-change-specific manner in *Arabidopsis thaliana* roots. /Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 2489. doi:10.1038/s41598-017-02476-8
3. Klaus Brackmann, Jiyan Qi, Michael Gebert, Virginie Jouannet, Theresa Schlamp, Karin Grünwald, Eva-Sophie Wallner, **Daria D. Novikova**, Victor G. Levitsky, Javier Agustí, Pablo Sanchez, Jan U. Lohmann and Thomas Greb. Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation //Nature communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 875. doi: 10.1038/s41467-018-03256-2

### Тезисы конференций

4. **Novikova D.D.**, Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Auxin-responsive transcriptome of *Arabidopsis thaliana* roots, Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, 23-28 of June 2014, Novosibirsk



5. **Novikova D.D.**, Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Cherenkov P.A. Meta-analysis of transcriptome data to investigate auxin response mechanisms in *Arabidopsis thaliana* L., International Conference on Systems Biology, 16 -20 of September 2016, Barcelona, Spain
6. **Novikova D.D.**, Mironova V.V., Cherenkov P.A., Functional annotation of auxin responsive cis-regulatory elements, II Всероссийская конференция с международным участием "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", 18-23 июня 2017, Новосибирск, с. 67
7. **Novikova D.D.**, Weijers D., Mironova V.V., Diversity of auxin responsive cis-regulatory elements, 1–5 of July 2018, Auxins and Cytokinins in Plant Development, Prague, Czech Republic, p. 78
8. **Novikova D.D.**, Cherenkov P.A., Tkachev K.U., Levitsky V.G., Mironova V.V., MetaRE: search for cis-regulatory elements via meta-analysis of transcriptomic data, 20-25 of August 2018, Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology, Novosibirsk, p.179
9. **Novikova D.D.**, Weijers D., Mironova V.V., Diversity of AuxREs in *Arabidopsis thaliana* L, International Conference on Plant Growth Substances, 25 - 29 of June 2019, Paris, France, p.36