

УДК 575.12:633.854.78:633.18

**К.В. Азарин<sup>1</sup>**, кандидат биологических наук;

**А.В. Усатов<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, профессор;

**П.И. Костылев<sup>2</sup>**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор;

**М.С. Макаренко<sup>1</sup>**, аспирант;

**А.А. Ковалевич<sup>1</sup>**, студент,

<sup>1</sup> *Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет,*

*(344090, г. Ростов-на-Дону, просп. Стачки 194/1, [azkir@rambler.ru](mailto:azkir@rambler.ru));*

<sup>2</sup> *ФБГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур им. И.Г. Калиненко (347740, г. Зерноград, Научный городок, 3;*

*[p-kostylev@mail.ru](mailto:p-kostylev@mail.ru))*

## **SSR МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ РИСА К ПОЛНОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ**

Настоящая работа посвящена исследованию информативности SSR-маркеров, ассоциированных с локусом устойчивостью к затоплению *Sub1A*, с целью интрогрессии данного локуса в генотипы высокопродуктивных сортов отечественной селекции. В результате SSR-анализа образцов риса по 7 микросателлитным маркерам (RM 219, RM 316, RM 444, RM 464, RM 7481, RM 8303, RM 23877) было показано, что только RM 7481 дает специфические хорошо воспроизводимые спектры и является информативным для идентификации локуса *Sub1A*. Для оценки взаимосвязи наследования маркера RM 7481 и признака устойчивости к затоплению провели гибридизацию между линиями-донорами локуса устойчивости BR-11, Inbara-3, CR-1009, TDK-1 и скороспелым российским сортом Новатор. По результатам ДНК-анализа гибридов F<sub>2</sub> выявлены образцы, несущие различные аллельные варианты локуса *Sub1A*, часть из них была представлена гомозиготами. Оценка устойчивости к водному стрессу исследуемых гибридов риса и их родительских форм через 21 дней после прорастания показала, что повышенный уровень воды достоверно снижал этот показатель у сорта Новатор и гибридов, не унаследовавших локус устойчивости по данным молекулярно-генетического анализа. Наиболее устойчивыми формами по показателю выживаемости были линии-доноры устойчивости и гибридные растения, несущие локус *Sub1A* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии. Таким образом, в результате исследования SSR-маркеров, сцепленных с локусом устойчивости *Sub1A*, была показана высокая информативность кодоминантного маркера RM 7481 для маркер-ассоциированной селекции устойчивых к глубоководному затоплению форм риса.

**Ключевые слова:** *устойчивость, затопление, ДНК-маркеры, SSR- анализ, локус Sub1A, рис.*

**K.V. Azarin<sup>1</sup>**, Candidate of Biological Science;

**A.V. Usatov<sup>1</sup>**, Doctor of Biological Science, professor;

**P.I. Kostylev<sup>2</sup>**, Doctor of Agricultural Science, professor;

**M.S. Makarenko<sup>1</sup>**, post-graduate student;

**A.A. Kovalevich<sup>1</sup>**, student;

<sup>1</sup>*Academy of Biology and biotechnology, Southern Federal University  
(344090, Rostov-on-Don, Stachki Av. 194/1, [azkir@rambler.ru](mailto:azkir@rambler.ru));*

<sup>2</sup>*FSBSI All-Russian research Institute of Grain Crops after I.G. Kalinenko  
(347740, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; [p-kostylev@mail.ru](mailto:p-kostylev@mail.ru))*

## **SSR-MARKERS OF RICE RESISTANCE TO THE TOTAL FLOODING**

The present work deals with the study of the SSR-markers informativeness, associated with the locus of resistance to flooding Sub1A, to introduce this locus into the genotypes of highly productive varieties of domestic breeding. The SSR-analysis of the rice samples according to 7 micro satellite markers (RM 219, RM 316, RM 444, RM 464, RM 7481, RM 8303, RM 23877) showed that the marker RM 7481 gave the special and well-produced ranges, and was informative for the identification of the locus Sub1A. The hybridization among the donors of the locus of resistance to flooding BR-11, Inbara-3, CR-1009, TDK-1 and the early maturing Russian variety 'Novator' has been carried out to estimate the relationship of the inheritance of RM 7481 marker and the trait of resistance to flooding. The DNA-analysis of the hybrid F<sub>2</sub> revealed the samples with the different allele variants of the locus Sub1A, the part of them has been found homozygous. The assessment of the resistance to water stress of rice hybrids and their parental forms in 21-day germination and the data of the molecule-genetic analysis showed that the increased water level significantly reduced this index of the variety 'Novator' and of the hybrids which did not inherit the locus of resistance. The lines-donors of the resistance and hybrid plants, which possess the locus Sub1A in homozygous and heterozygous states turned to be the most resistant forms according to the survival index. Thus, the study of SSR-markers connected with the locus of resistance Sub1A showed the high informativeness of co-dominant marker RM 7481 for the marker-associated breeding of the rice forms resistant to total flooding.

**Keywords:** *resistance, flooding, DNA-markers, SSR-analysis, locus Sub1A, rice.*

**Введение.** Особенностью затопления, как стресс-фактора, является сочетание высокой оводненности и нарушение кислородного режима. При этом происходит снижение поглощения воды, ингибирование процесса экссудации и фотосинтетической активности [1, 2]. В результате в надземных органах обнаруживается недостаток питательных веществ, что в итоге приводит к гибели растений [2]. Даже непродолжительное переувлажнение значительно снижает продуктивность сельскохозяйственных культур [2, 3, 4, 5]. Рис обычно выращивают на затопляемых анаэробных почвах, однако даже эта культура чувствительна к полному затоплению [2, 5, 6]. В мире селекция

сортов риса, устойчивых к данному стресс-фактору, связана как с климатическими особенностями обширных районов возделывания риса, подверженных наводнению, так и с переходом от рассадной культуры к прямому севу семенами [7, 8]. Еще одним вариантом использования устойчивости к затоплению, причем наиболее актуальным для России, является борьба с сорными растениями за счет глубокого слоя воды, который сорняки преодолеть не в состоянии [9].

Важным этапом в истории селекции риса на устойчивость к водному стрессу стала идентификация локуса *Submergence 1* или *Sub1A*, который контролирует данный признак [10]. Одновременно было обнаружено, что локус *Sub1A* отсутствует у сортов, принадлежащих к подвиду *japonica*, культивируемых в России и в ряде других стран [10, 11]. В связи с этим, интрогрессия локуса *Sub1A* в сорта риса отечественной селекции является, несомненно, актуальной задачей.

**Цель работы** – исследование информативности SSR маркеров, ассоциированных с локусом устойчивости к затоплению *Sub1A* для его интрогрессии в генотипы высокопродуктивных российских сортов.

**Материалы и методы.** Исследование SSR-маркеров устойчивости к затоплению проводили на образцах риса ВНИИ зерновых культур им. И.Г. Калининко. В качестве реципиента при интрогрессии локуса *Sub1A* использовали высокопродуктивный раннеспелый сорт Новатор селекции ВНИИ риса. Позднеспелые азиатские линии Inbara-3, BR-11, TDK-1 и CR-1009 использовали в качестве доноров локуса устойчивости *Sub1A*.

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев риса по методу Р. Бума [12] с нашими модификациями [13, 14]. В SSR-анализе использовали следующие 7 микросателлитных маркеров, ассоциированных с локусами солеустойчивости: RM 219, RM316, RM 444, RM 464, RM 7481, RM 8303, RM 23877 (<http://www.gramene.org>). Амплификацию проводили в термоциклере PalmCycler Corbett Research (Австралия). Термальный режим реакций подбирали для каждой пары праймеров с учетом их нуклеотидного состава. Для большинства проведенных реакций оптимальным оказался терморегим с начальной денатурацией при 95°C в течение 2 мин., затем 45 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при 55-60°C в течение 40 с., элонгация – 1 мин. при 70°C, денатурация при 94°C – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Продукты реакции амплификации разделяли электрофоретически в 2 % агарозном геле с бромистым этидием (1 мкг/мл), используя трис-боратный буфер. После электрофореза гели переносили на трансиллюминатор и фотодокументировали с помощью видеосистемы (GelDoc 2000, BioRad, США).

Оценку устойчивости образцов к водному стрессу проводили следующим образом. Семена риса замачивали в воде в течение 12 ч, затем высевали в почву [15]. Глубоководное затопление моделировали в аквариуме при толщине слоя воды 50 см. Контрольные растения выращивали в физиологически нормальных условиях. Через 21 день рассчитывали процент выживших растений. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office.

**Результаты.** В результате SSR-анализа образцов риса по 7 микросателлитным маркерам

было показано, что только RM7481 дает специфические хорошо воспроизводимые спектры и является информативным для идентификации локуса *Sub1A* (рис. 1).

В случае присутствия локуса *Sub1A* в геноме исследуемых растений на электрофореграмме четко визуализируется фрагмент порядка 95 п.н. Результаты ПЦР- анализа продемонстрировали присутствие искомого локуса у исходных линий-доноров – BR-11, Inbara-3, CR-1009, TDK-1, тогда как у растений сорта Новатор данный локус не идентифицирован.

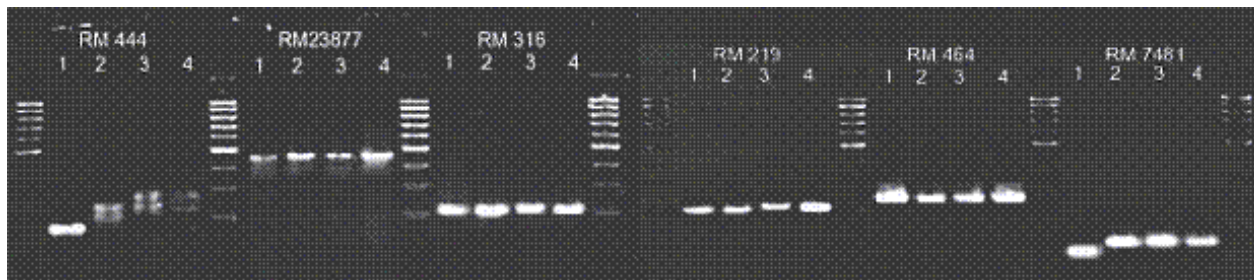


Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК исходных форм риса с маркерами RM 219, RM 464, RM 7481, RM 444, RM 23877, RM 316: 1 - Новатор; 2 - BR-1; 3 - Inbara-3; 4 - TDK-1

С целью проверки информационной ценности маркера RM 7481 была проведена гибридизация между линиями-донорами локуса устойчивости BR-11, Inbara-3, CR-1009, TDK-1 и скороспелым российским сортом Новатор. Первое поколение характеризовалось высокой степенью стерильности (90-95%) и бурой окраской цветковых чешуй при созревании, что свидетельствует о значительных генетических различиях между родительскими формами [9]. Среди гибридов второго поколения по признакам скороспелости, высоты растений, озерненности метелок, неосыпаемости и фертильности колосков отобрали лучшие растения. По 20 растений из каждой комбинации было проанализировано на наличие интродуцируемого локуса.

В качестве примера на рисунке 2 приведены данные электрофоретического анализа ПЦР-продуктов с маркером RM 7481 гибридных растений F<sub>2</sub> из комбинаций CR-1009 × Новатор и Inbara-3 × Новатор. Донорская аллель родительских линий CR-1009 и Inbara-3 выявлена в гомозиготном состоянии у образцов № 29, 30, 32, 36, 40 и 46. Растения под номерами 28, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 44, 47 и 48 несли аллели доноров и рекуррентного родителя, то есть были гетерозиготны по локусу *Sub1A* (рис. 2). У других образцов выявлены только аллели, унаследованные от сорта Новатор. В целом, по результатам скрининга, основанном на ПЦР анализе с маркером RM 7481, выявлены образцы, несущие различные аллельные варианты локуса *Sub1A*, часть из которых была представлена гомозиготами (табл. 1).

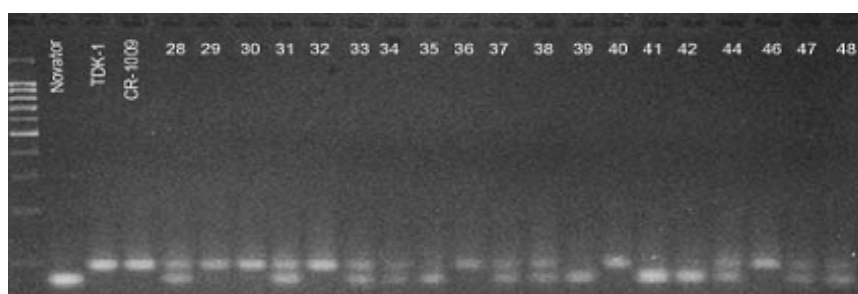


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК родительских форм и гибридов F<sub>2</sub> риса с RM 7481: 1 – Новатор; 2 – CR-1009; 3 – Inpara-3. Цифрами обозначены номера гибридных растений

1. Оценка наличия локуса *Sub1A* у гибридных растений риса F<sub>2</sub>

Гибриды BR-11 × Новатор	ЛокусSub1A	Гибриды CR-1009 × Новатор	ЛокусSub1A	Гибриды Inpara-3 × Новатор	ЛокусSub1A	Гибриды ТДК-1 × Новатор	ЛокусSub1A
5572/1	- -	7802/21	+ +	7810/41	- -	7818/151	- -
5572/2	- -	7802/22	+ -	7810/42	- -	7818/152	- -
5572/3	- -	7802/23	+ +	7810/43	- -	7818/153	+ -
5572/4	+ -	7802/24	+ +	7810/44	+ -	7818/154	+ -
5572/5	- -	7802/25	+ -	7810/45	- -	7818/155	+ -
5572/6	- -	7802/26	+ -	7810/46	+ +	7818/156	- -
5572/7	+ -	7802/27	- -	7810/47	+ -	7818/157	- -
5572/8	+ -	7802/28	+ -	7810/48	+ -	7818/158	+ -
5572/9	+ -	7802/29	+ +	7810/49	+ -	7818/159	+ -
5572/10	- -	7802/30	+ +	7810/50	+ +	7818/160	+ -
5572/11	+ -	7802/31	+ -	7810/51	- -	7818/161	+ -
5572/12	+ -	7802/32	+ +	7810/52	+ -	7818/162	+ -
5572/13	+ -	7802/33	+ -	7810/53	+ -	7818/163	- -
5572/14	- -	7802/34	+ -	7810/54	+ -	7818/164	+ -
5572/15	- -	7802/35	+ -	7810/55	+ -	7818/165	- -
5572/16	- -	7802/36	+ +	7810/56	+ -	7818/166	+ -
5572/17	- -	7802/37	+ -	7810/57	+ +	7818/167	+ +
5572/18	- -	7802/38	+ -	7810/58	+ +	7818/168	+ -
5572/19	+ -	7802/39	- -	7810/59	+ -	7818/169	+ +
5572/20	- -	7802/40	+ +	7810/60	- -	7818/170	+ -

Примечание: + аллель, унаследованная от линии донора *Sub1A*; – аллель от Новатора

Оценка устойчивости к водному стрессу исследуемых гибридов риса и их родительских форм представлена в таблице 2. Анализ выживаемости родительских и гибридных растений через 21 день после прорастания показал, что повышенный уровень воды достоверно снижал этот показатель у сорта Новатор и гибридов, не унаследовавших локус устойчивости по данным молекулярно-генетического анализа. Наиболее устойчивыми формами по показателю выживаемости были линии-

доноры и гибридные растения, несущие локус *Sub1A* в гомозиготном состоянии – отклонение от контроля не более 15%. Также высокую устойчивость проявили гибриды с локусом *Sub1A* в гетерозиготном состоянии (табл. 2).

2. Показатель выживаемости (%) образцов риса через 21 день прорастания в условиях затопления

Образцы	Выживаемость, (%)	
	контроль	опыт
Новатор	98±1,0	52±4,0*
Inbara-3	91±2,0	87±2,5
BR-11	94±2,5	85±1,5*
CR-1009	89±3,5	85±3,0
TDK-1	95±2,1	89±4,7
Inbara-3 × Новатор		
Гомозиготы (по <i>Sub1A</i> )	91±2,0	89±1,5
Гетерозиготы	93±2,0	85±4,5
Гомозиготы (без <i>Sub1A</i> )	91±1,5	57±4,0*
BR 11 x Новатор		
Гетерозиготы	94±1,0	83±1,1*
Гомозиготы (без <i>Sub1A</i> )	94±1,5	57±2,7*
CR-1009 x Новатор		
Гомозиготы (по <i>Sub1A</i> )	90±2,0	87±2,7
Гетерозиготы	90±1,0	87±2,5
Гомозиготы (без <i>Sub1A</i> )	91±1,5	59±3,0*
TDK-1 x Новатор		
Гомозиготы (по <i>Sub1A</i> )	93±2,0	86±3,7
Гетерозиготы	95±1,0	87±4,6
Гомозиготы (без <i>Sub1A</i> )	95±1,5	55±2,2*

Примечание: \* достоверные отличия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

Таким образом, в результате исследования SSR-маркеров, сцепленных с локусом *Sub1A*, была показана высокая информативность кодоминантного маркера RM 7481 для маркер-ассоциированной селекции устойчивых к глубоководному затоплению форм риса.

### Выводы

1. Исследование информационной ценности SSR маркеров, ассоциированных с локусом устойчивости к полному затоплению *Sub1A*, продемонстрировало, что кодоминантный маркер RM 7481 эффективен для контроля передачи *Sub1A* QTL в сорта риса отечественной селекции.
2. ДНК-анализ гибридных комбинаций риса  $F_2$ , полученных на основе отечественного сорта Новатор и азиатских линий-доноров *Sub1A*, позволил идентифицировать 14 устойчивых образцов, гомозиготных по искомому локусу.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-6123.2016.11.

### Литература

1. Kawano, N. Morphological and physiological responses of rice seedlings to complete submergence (flash flooding) / N. Kawano, O. Ito and J.-I. Sakagami // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 161-169.
2. Fukao, T. The submergence tolerance regulator sub1a mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice / T. Fukao, El. Yeung, and J. Bailey-Serres // *The Plant Cell*, 2011. – V. 23. – P. 412-427.
3. Jung, K.-H. The submergence tolerance regulator sub1a mediates stress-responsive expression of ap2/erf transcription factors / K.-H. Jung, Y.-S. Seo, H. Walia, P. Cao, T. Fukao, P. E. Canlas, F. Amonpant, J. Bailey-Serres, and P. C. Ronald // *Plant Physiology*, 2010. – V. 152. – P. 1674-1692.
4. Niroula, R. K. SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species / R. K. Niroula, C. Pucciariello, V. T. Ho, G. Novi, T. Fukao and P. Perata, // *The Plant Journal*, 2012. – V. 72. – P. 282-293.
5. Mickelbart, M. V. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability / M. V. Mickelbart, P. M. Hasegawa and J. Bailey-Serres // *Nature Reviews Genetics*, 2015. – P. 1-15.
6. Fukao, T. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice / T. Fukao and J. Bailey-Serres // *PNAS*, 2008. – V. 105 (43). – P. 16814-16819.
7. Septiningsih, E. M. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond / E. M. Septiningsih, A. M. Pamplona, D. L. Sanchez, C. N. Neeraja, G. V. Vergara, S. Heuer, A. M. Ismail and D. J. Mackill // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 151-160.
8. Linh, T.-H. Improving submergence tolerance of vietnamese rice cultivar by molecular breeding / T.-H. Linh, L.-H. Linh, D.-T. K. Cuc, L.-H. Ham and T.-D. Khanh // *J. Plant Breed. Genet.*, 2013. – V. 01 (03). – P. 157-168.
9. Костылев П.И. Перспективы использования устойчивого к длительному затоплению риса с геном Sub1 в селекции российских сортов / П.И. Костылев, А.А. Редькин, Е.В. Краснова, А.В. Усатов, М.С. Макаренко // *Зерновое хозяйство России*, 2015. – 4 (40). – С.37-42.
10. Xu, K. Sub1A is an ethylene response factor-like gene that confers submergence tolerance to rice / K. Xu, X. Xia, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A.I. Ismail, J. Bailey-Serres, P.C. Ronald, D.J. Mackill // *Nature*, 2006. – V. 442. – P. 705-708.
11. Fukao, T. Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice / T. Fukao, T. Harris and J. Bailey-Serres // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 143-150.
12. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen, J. Van Der Noordaa // *J. Clin. Microb.*, 1990. – V. 28. – №3. – P. 495-503.
13. Маркин, Н. В. Исследование полиморфизма хлоропластной ДНК подсолнечника (*Helianthus L.*) / Н. В. Маркин, А. В. Усатов, М. Д. Логачева, К. В. Азарин, О. Ф. Горбаченко и др. // *Генетика*. – 2015. – Т. 51, № 8. – С. 873-880.
14. Usatov, A.V. DNA-markers of sunflower resistance to the downy mildew (*Plasmopara halstedii*) / Usatov, A.V., A.I. Klimenko, K.V. Azarin, O.F. Gorbachenko and N.V. Markin et al. // *Am. J. Biochem. Biotech.*, 2014. – V.10. – P. 125-129.
15. Azarin, K. V. Effects of salt stress on ion balance at vegetative stage in rice (*Oryza sativa L.*)

/ K.V. Azarin, A.V. Alabushev, A.V. Usatov, P.I.Kostylev, N.S. Kolokolova and O.A. Usatova // OnLine Journal of Biological Sciences, 2016. – V.16 (1). – P. 76-81.

### Literature

1. Kawano, N. Morphological and physiological responses of rice seedlings to complete submergence (flash flooding) / N. Kawano, O. Ito and J.-I. Sakagami // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 161-169.
2. Fukao, T. The submergence tolerance regulator sub1a mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice / T. Fukao, El. Yeung, and J. Bailey-Serres // *The Plant Cell*, 2011. – V. 23. – P. 412-427.
3. Jung, K.-H. The submergence tolerance regulator sub1a mediates stress-responsive expression of ap2/erf transcription factors / K.-H. Jung, Y.-S. Seo, H. Walia, P. Cao, T. Fukao, P. E. Canlas, F. Amonpant, J. Bailey-Serres, and P. C. Ronald // *Plant Physiology*, 2010. – V. 152. – P. 1674-1692.
4. Niroula, R. K. SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species / R. K. Niroula, C. Pucciariello, V. T. Ho, G. Novi, T. Fukao and P. Perata, // *The Plant Journal*, 2012. – V. 72. – P. 282-293.
5. Mickelbart, M. V. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability / M. V. Mickelbart, P. M. Hasegawa and J. Bailey-Serres // *Nature Reviews Genetics*, 2015. – P. 1-15.
6. Fukao, T. Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice / T. Fukao and J. Bailey-Serres // *PNAS*, 2008. – V. 105 (43). – P. 16814-16819.
7. Septiningsih, E. M. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond / E. M. Septiningsih, A. M. Pamplona, D. L. Sanchez, C. N. Neeraja, G. V. Vergara, S. Heuer, A. M. Ismail and D. J. Mackill // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 151-160.
8. Linh, T.-H. Improving submergence tolerance of vietnamese rice cultivar by molecular breeding / T.-H. Linh, L.-H. Linh, D.-T. K. Cuc, L.-H. Ham and T.-D. Khanh // *J. Plant Breed. Genet.* 2013. – V. 01 (03). – P. 157-168.
9. Kostylev P.I. Prospects of use of rice with the gene Sub<sub>1</sub> tolerant to the long-term flooding in the breeding of domestic crop varieties / P.I. Kostylev, A.A. Redkin, E.V. Usatov, M.S. Makarenko // *Grain Economy of Russia*, 2015. – 4 (40). – PP.37-42.
10. Xu, K. Sub1A is an ethylene response factor-like gene that confers submergence tolerance to rice / K. Xu, X. Xia, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A.I. Ismail, J. Bailey-Serres, P.C. Ronald, D.J. Mackill // *Nature*, 2006. – V. 442. – P. 705-708.
11. Fukao, T. Evolutionary analysis of the Sub1 gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice / T. Fukao, T. Harris and J. Bailey-Serres // *Annals of Botany*, 2009. – V. 103. – P. 143-150.
12. Boom, R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen, J. Van Der Noordaa // *J. Clin. Microb.*, 1990. – V. 28. – №3. – P. 495-503.
13. Markin N.V. The research of polymorphology of chloroplast DNA of sunflower (*Helianthus*L.) / N.V.



Markin, A.V. Usatov, M. D. Logacheva, K.V. Azarin, O.F. Gorbachenko and others // *Genetics*, 2015. – V. 51, № 8. – PP. 873-880.

14. Usatov, A.V. DNA-markers of sunflower resistance to the downy mildew (*Plasmopara halstedii*) / A.V. Usatov, A.I. Klimenko, K.V. Azarin, O.F. Gorbachenko and N.V. Markin et al. // *Am. J. Biochem. Biotech.*, 2014. – V.10. – P. 125-129.

15. Azarin, K. V. Effects of salt stress on ion balance at vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.) / K.V. Azarin, A.V. Alabushev, A.V. Usatov, P.I. Kostylev, N.S. Kolokolova and O.A. Usatova // *Online Journal of Biological Sciences*, 2016. – V.16 (1). – P. 76-81.