

НОВОЖИЛОВ Д. О.[✉], ГОРДИНСЬКИЙ С. О., РАБОКОНЬ А. М., ДЕМКОВИЧ А. Є., ПРИВАЛІХІН С. М., БЛЮМ Р. Я., БУЗІАШВІЛІ А. Ю., ЄМЕЦЬ А. І., ПІРКО Я. В.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0009-0008-1491-7166, 0009-0005-7369-3359, 0000-0002-6249-1824, 0000-0002-7433-1203, 0009-0006-2462-2105, 0000-0003-4936-1803, 0000-0002-8283-5401, 0000-0001-6887-0705, 0000-0003-1887-5406

✉ novozhylovd@gmail.com, yarvp1@gmail.com

СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ІЛР-МАРКЕРІВ ДЛЯ ГЕНІВ *ATG2, ATG7, ATG8* У *HORDEUM VULGARE* І *H. MARINUM*

Мета. Створення потенційних маркерів поліморфізму довжини інтронів для генів *ATG2, ATG7* і *ATG8*. **Методи.** Методи класичної біоінформатики для пошуку локусів, що кодують білки *ATG2, ATG7, ATG8* у геномі *Hordeum marinum* на основі гомології з генами культурного ячменю, аналіз екзон-інтронної структури генів, створення ІЛР-маркерів. **Результати.** Визначено послідовності генів *ATG2, ATG7, ATG8* у *H. marinum*. Проаналізовані відмінності екзон-інтронної структури локусів *ATG2, ATG7, ATG8* у культурного (*H. vulgare*) і солестійкого дикого ячменю (*H. marinum*). Створено 25 потенційні ІЛР-маркери, що демонструють суттєвий міжвидовий поліморфізм довжини: 13 для *ATG2*, 6 для *ATG7*, 3 для *ATG8A*, 2 для *ATG8B* та 1 для *ATG8D*. **Висновки.** На основі порівняльного аналізу структури генів білків *ATG2, ATG7, ATG8* у *H. vulgare* і *H. marinum* визначено ряд інтронів, рекомендованих для подальшого їх використання як потенційного джерела ІЛР-маркерів, для вивчення міжвидової генетичної диференціації злаків.

Ключові слова: сольовий стрес, *Hordeum marinum*, *Hordeum vulgare*, ІЛР-маркери, ATG, аутофагія.

У порівнянні з пшеницею та іншими сільськогосподарськими злаковими культурами, ячмінь (*Hordeum vulgare*) вважається солестійким видом, здатним рости при концентраціях солі до 150 мМ NaCl [1]. Серед видів дикого ячменю є такі, що демонструють вищу солестійкість порівняно з культурним ячменем [2–4]. Такі види розглядаються як потенційне джерело генів стійкості до сольового стресу. Серед диких родичів *H. vulgare* заслуговує на увагу морський ячмінь *H. marinum*, який здатний рости навіть в умовах солоних боліт і морського узбе-

режжя Середземноморського регіону і Близького Сходу та може виживати навіть при концентраціях NaCl 450 мМ [5, 6].

Відмінності у формуванні відповіді на сольовий стрес на фізіологічному рівні між *H. vulgare* і *H. marinum* включають більше накопичення проліну, гліцинбетаїну та дегідринів, білків, залучених у процеси енергетичного метаболізму, зміну активності антиоксидантних ферментів. Стратегія стійкості до солі *H. marinum* також включає низьке споживання енергії, використання неорганічних іонів як дешевих осмотичних агентів і зміни в активності іонних транспортерів, підвищення рівня експресії генів, пов'язаних з детоксикацією, таких як глутатіон S-трансферази [7, 8]. Ще одним потенційно важливим, але невивченим аспектом відповіді *H. marinum* на сольовий стрес можуть бути відмінності у протіканні аутофагічних процесів.

Розвиток аутофагії є важливою частиною рослинної відповіді на сольовий стрес, оскільки високі концентрації NaCl швидко запускають аутофагію, щоб полегшити масовий обіг білка і, таким чином, забезпечити рослини енергією, необхідною для виживання. Також можливою стратегією підтримання K^+ / Na^+ гомеостазу при сольовому стресі є секвестрація Na^+ у центральній вакуолі за допомогою механізмів аутофагії [9]. Окрім того, аутофагія обмежує масштаб програмованої клітинної загибелі, щоб уникнути руйнування тканин при сольовому стресі [10]. Ключовою подією аутофагії є формування аутофагосом, що відбувається за участі таких специфічних для аутофагії білків, як, зокрема, *ATG2, ATG7, ATG8*, гени яких стали предметом цього дослідження.

Вивчення відмінностей у структурі генів *ATG* і створення специфічних та інформативних

© НОВОЖИЛОВ Д. О., ГОРДИНСЬКИЙ С. О., РАБОКОНЬ А. М., ДЕМКОВИЧ А. Є., ПРИВАЛІХІН С. М., БЛЮМ Р. Я., БУЗІАШВІЛІ А. Ю., ЄМЕЦЬ А. І., ПІРКО Я. В.

генетичних маркерів для генотипування різних ліній культурного ячменю й *H. marinum* є важливими кроками для вивчення молекулярних механізмів, які лежать в основі фізіологічної відповіді на сольовий стрес. У ході роботи проведений аналіз екзон-інтронної структури генів білків ATG2, ATG7 і ATG8 та створені потенційні маркери для оцінки поліморфізму довжини інтронів (ILP, Intron Length Polymorphism) генів, які можуть бути використані у подальших молекулярно-генетичних дослідженнях.

Матеріали і методи

Усі послідовності були взяті з бази даних GenBank [11]. Вирівнювання послідовностей локусів, що кодують ATG2, ATG7, ATG8 *H. vulgare*, проти геному *H. marinum* проведене за допомогою програмного пакета NCBI Genome Workbench [12]. Була використана геномна збірка *H. marinum* ASM2249601v1 [13]. При створенні потенційних ILP маркерів підбір праймерів відбувався за допомогою Primer3Plus [14], їх перевірка здійснювалась шляхом проведення *in silico* ПЛР за допомогою сервісу PrimerBlast [15] та програмного пакета FastPCR [16].

Результати та обговорення

Блок ATG2 ячменю кодується генами, розташованими у двох локусах – LOC123410864 (на хромосомі 6H) та LOC123402294 (на хромосомі 7H). Для *H. marinum* бракує даних щодо кодуючих послідовностей та розташування ортологів ATG2 у геномі. Була знайдена гомологі-

чна послідовність на хромосомі 7 (геномна збірка ASM2249601v1), позиція: 151314774-151326370, що потенційно кодує ATG2 у *H. marinum*. Загальний розмір локусів ATG2 *H. vulgare*: для LOC123410864 – 11609 п. о., з яких на екзони припадає 6413 п. о.; для LOC123402294 – 13499 п. о., з яких на екзони припадає 6559 п. о.; потенційний локус ATG2 *H. marinum* – 13499 п. о., з яких імовірні екзони загалом включають 6439 п. о. Враховуючи значення подібності (91,8 % проти 59,5 %) та розташування, визначена ділянка *H. marinum*, яка імовірно є ортологом LOC123410864 *H. vulgare*. Обидві послідовності мають аналогічну екзонно-інтронну структуру, кожна включає 13 екзонів і 12 інтронів. Результати порівняння довжин інтронів ATG2 різних видів ячменю подані у таблиці 1.

Для екзонів ATG2 характерний високий рівень консервативності. Поліморфізм довжини проявляється у першому і останньому екзонах, показники ідентичності варіюють від 89,3 % до 100 %. Дві третини інтронів демонструють певний поліморфізм довжини, а показники ідентичності знаходяться у межах від 74,1 % до 97 %. Для інтронів з помітним міжвидовим поліморфізмом довжини було розроблено потенційні ILP маркери. Маркери створені у двох варіантах: універсальні для LOC123410864, LOC123402294 *H. vulgare* та ортолога з *H. marinum* і більш специфічні для LOC123410864 й *H. marinum* (табл. 2).

Таблиця 1. Порівняння інтронів ATG2 (LOC123410864) *H. vulgare* і його потенційного ортологу у *H. marinum*

N інтрону	Розмір інтрону <i>H. vulgare</i> , п. о.	Розмір інтрону <i>H. marinum</i> , п. о.	Ідентичність
1	936	899	82,5%
2	651	652	94,2%
3	800	892	84,6%
4	91	91	96,7%
5	87	87	96,6%
6	817	656	74,1%
7	231	241	90,9%
8	101	101	97%
9	199	210	81,9%
10	161	161	90,7%
11	234	240	94,2%
12	888	911	90,7%

Таблиця 2. Потенційні ILP маркери для ряду інтронів *ATG2* *H. vulgare* і *H. marinum*

Інтрон	Праймери	Очікувана довжина ампліконів, п. о.
1	ATG2-intr1F: CGCTCAACGCCGACTACA; ATG2-intr1R: AGAGGAAATTTAACCAGCAGAGATTT	LOC123410864: 1030 LOC123402294: 1198 <i>H. marinum</i> : 993
3	ATG2-intr3F: GCATATGGGACTGGACGTGT; ATG2-intr3R: CTCAGCAATGGAAGCCCGTA	LOC123410864: 925 LOC123402294: 1018 <i>H. marinum</i> : 1017
6	ATG2-intr6F: CTTGCTCGACTGCATTCAAGT; ATG2-intr6R: AGAGGCAAAATCTCGAGGCA	LOC123410864: 914 LOC123402294: 950 <i>H. marinum</i> : 753
7	ATG2-intr7F: TGTGCCTTGCGAAAATGAGA; ATG2-intr7R: TGTTGAGAAGCTCTGCATAATTTCC	LOC123410864: 422 LOC123402294: 483 <i>H. marinum</i> : 432
9	ATG2-intr9F: TAAGAATGTTTCTGCAATGGGTGT; ATG2-intr9R: TCTTGAGCTTTTGATTGGTAAGGA	LOC123410864: 390 LOC123402294: 445 <i>H. marinum</i> : 401
11	ATG2-intr11F: CCTTTAACCTCACGTGAAGCAAAA; ATG2-intr11R: GCTGTCCTTCCAAACCCATCA	LOC123410864: 356 LOC123402294: 384 <i>H. marinum</i> : 362
12	ATG2-intr12F: TGCAGTAGCTCCAGTATCAGC; ATG2-intr12R: TGAGAAGGCCCGGAATATTTGT	LOC123410864: 1008 LOC123402294: 2125 <i>H. marinum</i> : 1031
1	ATG2-intr1Fspec: TCAACGCCGACTACATCAACA, ATG2-intr1Rspec: TCTCACAACCTTTAACTGTAGAGGA	LOC123410864: 1047 <i>H. marinum</i> : 1010
3	ATG2-intr3Fspec: AGGAAATAGCGGCATATGGGA, ATG2-intr3Rspec: CAGGAACACTGGAATCGCCA	LOC123410864: 994 <i>H. marinum</i> : 1086
6	ATG2-intr6Fspec: ACAGCTCAAAGGATTACCCAAGA, ATG2-intr6Rspec: AGGGTTGTTGTTAATTGAGTCATTCT	LOC123410864: 1017 <i>H. marinum</i> : 856
9	ATG2-intr9Fspec: AGCTTAAGAATGTTTCTGCAATGGG, ATG2-intr9Rspec: GTAGCTTTTGATTGGTAAGGAGACC	LOC123410864: 390 <i>H. marinum</i> : 401
11	ATG2-intr11Fspec: GGTGCACATCAAGGGTTGAA, ATG2-intr11Rspec: CAGTGCTACCCACGATTA	LOC123410864: 349 <i>H. marinum</i> : 355
12	ATG2-intr12Fspec: TGGCTACTGCAATCTGTGGA, ATG2-intr12Rspec: CGATTGAGAAGGCCCGGAAT	LOC123410864: 1043 <i>H. marinum</i> : 1066

ATG7 у *H. vulgare* кодується геном, розташованим у локусі LOC123443875 на хромосомі 3. Як і у випадку з *ATG2*, була визначена ділянка геному *H. marinum* (хромосома 3, позиція: 286039133-286041257), гомологічна LOC123443875 *H. vulgare*. Обидві послідовності мають аналогічну екзонно-інтронну структуру, кожна включає 20 екзонів і 19 інтронів. Результати порівняння інтронів *ATG7* різних видів ячменю подані у таблиці 3.

Для екзонів гена *ATG7* характерний високий рівень консервативності. Поліморфізм довжини незначно проявляється у першому і останньому екзонах, показники ідентичності в цілому варіюють від 89,6 % до 100 %. Більшість інтронів демонструють поліморфізм довжини, показники ідентичності знаходяться в межах від 72,5 % до 95 %. Для інтронів, що демонструють

помітний міжвидовий поліморфізм довжини, було здійснено дизайн потенційних ILP маркерів (табл. 4).

ATG8 *H. vulgare* кодується генами, розташованими у локусах LOC123425915 (*ATG8 A*), LOC123427782 (*ATG8 B*) на хромосомі 2 та LOC123452130 (*ATG8 D*) на хромосомі 5. Були визначені гомологічні ділянки геному *H. marinum* – 184790483-184792959, 494207734-494210222 на хромосомі 2 та 226371867-226375548 на хромосомі 5. LOC123425915 (*ATG8A*) *H. vulgare* має розмір 2409 п. о., з яких на екзони припадає 751 п. о. Його гомолог *H. marinum* має розмір 2484 п. о., з яких екзони складають 829 п. о. Обидві послідовності мають аналогічну екзонно-інтронну структуру, кожна включає 6 екзонів і 5 інтронів. Результати порівняння кожного окремого з інтронів *ATG8* різ-

них видів ячменю подані у таблиці 5. Для екзонів *ATG8A* характерний доволі високий рівень консервативності. Поліморфізм довжини проявляється у першому, третьому й останньому екзонах, показники ідентичності варіюють від 81,6 % до 100 %. Найбільші відмінності виявлені у шостому екзоні. Всі інтрони, окрім третього, демонструють поліморфізм довжини, а показники їх ідентичності коливаються в межах від 73,4 % до 93,2 %.

LOC123427782 (*ATG8B*) *H. vulgare* має розмір 2525 п. о., з яких на екзони припадає

691 п. о. Його гомолог *H. marinum* має розмір 2489 п. о., з яких екзони складають 690 п. о. Обидві послідовності мають аналогічну екзонно-інтронну структуру, кожна включає 6 екзонів і 5 інтронів. Для екзонів *ATG8B* також характерний високий рівень консервативності. Поліморфізм довжини проявляється у першому, другому й останньому екзонах, показники ідентичності коливаються від 92,4 % до 100 %. Всім інтронам властивий поліморфізм довжини, а показники ідентичності варіюють від 78,1 % до 91,1 %.

Таблиця 3. Порівняння інтронів *ATG7* (LOC123443875) *H. vulgare* і його потенційного ортолога у *H. marinum*

№ інтрону	Розмір інтрону <i>H. vulgare</i> , п. о.	Розмір інтрону <i>H. marinum</i> , п. о.	Ідентичність
1	525	562	80,1 %
2	90	91	91,2 %
3	87	85	94,3 %
4	118	118	94,9 %
5	140	137	95 %
6	115	116	94 %
7	81	81	96,3 %
8	384	370	96,3 %
9	77	76	93,5 %
10	211	164	72,5 %
11	120	116	92,5 %
12	163	155	90,2 %
13	80	82	90,2 %
14	91	93	93,5 %
15	86	81	82,8 %
16	75	75	94,7 %
17	101	122	81,1 %
18	90	91	93,4 %
19	86	82	90,7 %

Таблиця 4. Потенційні ILP маркери для ряду інтронів *ATG7* *H. vulgare* і *H. marinum*

Інтрон	Праймери	Очікувана довжина продуктів, п. о.
1	ATG7-intr1F: CATCACTAGCTGCGTCGAGA, ATG7-intr1R: TGGCACTAACGATTCTGGGG	LOC123443875: 691 <i>H. marinum</i> : 728
8	ATG7-intr8F: CGGCAGTTCCTGTTGATTTG, ATG7-intr8R: GGACACCACAATCCTTATCTACGT	LOC123443875: 580 <i>H. marinum</i> : 566
10	ATG7-intr10F: TGGTCTTCTTGTGACTGACACA, ATG7-intr10R: TAATGCTGCAGTGATGGCCA	LOC123443875: 303 <i>H. marinum</i> : 256
12	ATG7-intr12F: TCAGTCTCTGATGAAACAGTAGCA, ATG7-intr12R: TGATAAAACACACCGCGGGA	LOC123443875: 361 <i>H. marinum</i> : 353
15	ATG7-intr15F: GTCAAATTTGGCAAGACAATCACT, ATG7-intr15R: GACGCTCGCAAGCTTTAAGC	LOC123443875: 277 <i>H. marinum</i> : 272
17	ATG7-intr17F: GGGTGCTATTTCTGCAATGACG, ATG7-intr17R: ATGGCCAGATGCTATGGAGG	LOC123443875: 215 <i>H. marinum</i> : 236

LOC123452130 (*ATG8D*) *H. vulgare* має розмір 5139 п. о., з яких на екзони припадає 750 п. о. Його гомолог у *H. marinum* має розмір 3688 п. о., з яких екзони складають 810 п. о. Обидві послідовності мають аналогічну екзонно-інтронну структуру, кожна включає 5 екзонів і 4 інтронів. Для екзонів *ATG8D* характерний менший, ніж в інших генів *ATG8*, проте все ще високий рівень подібності ортологів. Поліморфізм довжини проявляється у першому й останньому екзонах, а показники їх ідентичності варіюють в межах від 75,5 % до 98,1 %. Перший і останній екзони мають нижчі показники ідентичності

(75,5 %–80,3 %), ніж екзони 2–4 (понад 96,4 %) Всі інтрони демонструють поліморфізм довжини, а показники ідентичності для інтронів 1, 3, 4 складають від 82 % до 85,5 %. Найбільш значима різниця спостерігається в інтроні 2. Його розмір складає 4152 п. о. у *H. vulgare* проти 2634 п. о. у *H. marinum*, показник ідентичності лише 46,1 %.

Були створені потенційні маркери поліморфізму довжини інтронів для інтронів генів *ATG8A*, *ATG8B*, *ATG8D* *H. vulgare* і *H. marinum*, які демонструють помітний міжвидовий поліморфізм довжини (табл. 6).

Таблиця 5. Порівняння інтронів *ATG8A* (LOC123425915), *ATG8B* (LOC123427782), *ATG8D* (LOC123452130) *H. vulgare* і їх потенційних ортологів у *H. marinum*

N інтрону	Розмір інтрону <i>H. vulgare</i> , п. о.	Розмір інтрону <i>H. marinum</i> , п. о.	Ідентичність
<i>ATG8A</i>			
1	127	129	92,2 %
2	1047	1066	73,4 %
3	87	87	93,2 %
4	280	288	86,2 %
5	90	85	82,8 %
<i>ATG8B</i>			
1	207	205	85,6 %
2	953	924	78,1 %
3	90	89	91,1 %
4	466	469	87,3 %
5	118	108	78,3 %
<i>ATG8D</i>			
1	82	86	82,0 %
2	4152	2634	46,1 %
3	80	82	85,4 %
4	75	76	85,5 %

Таблиця 6. Потенційні ІІР маркери для ряду інтронів *ATG8* *H. vulgare* і *H. marinum*

Інтрон	Праймери	Очікувана довжина продуктів, п.о.
<i>ATG8A</i>		
2	ATG8A-intr2F: GATGGCCAAGACTTGCTTCAAGA, ATG8A-intr2R: GGAATTCTNTCAGCGTACTTCTCACGG	LOC123425915: 1140 <i>H. marinum</i> : 1157
4	ATG8A-intr4F: TGTCCCGGAAATTGATAAGAAGA, ATG8A-intr4R: CCACGTAGACAAACTGGCCA	LOC123425915: 378 <i>H. marinum</i> : 386
5	ATG8A-intr5F: GAATAGCACCTTGCCACCGA, ATG8A-intr5R: GGCAGACCCGAAAGTGTCT	LOC123425915: 205 <i>H. marinum</i> : 200, 236
<i>ATG8B</i>		
2	ATG8B-intr2F: TGGCNAAGAGCTCGTTCAAGC, ATG8B-intr2R: AGGAATTCTGTACAGAGTACTTCTC	LOC123427782: 1045 <i>H. marinum</i> : 1016
5	ATG8B-intr5F: TGGACAGTTTGTGTACGTGGT, ATG8B-intr5R: AGCGATTCGAGCGATCCAAA	LOC123427782: 310 <i>H. marinum</i> : 300
<i>ATG8D</i>		
2	ATG8B-intr5F: AGGAGAGGGCGAATGAGTC, ATG8B-intr5R: CCATNTCTGGAAGGTTACTCCTCGA	LOC123452130: 4251 <i>H. marinum</i> : 2733

Висновки

Для генів *ATG2*, *ATG7* і *ATG8* характерний високий міжвидовий рівень консервативності послідовностей екзонів. Рівень ідентичності екзонів генів *ATG2* й *ATG7* від 89,3 % до 100 %, *ATG8* – від 75,5 % до 100 %. Характерний поліморфізм довжини першого та останнього екзонів. Інтрони ортологів демонструють загалом дещо нижчий рівень ідентичності, для більшості характерний міжвидовий поліморфізм довжини. Рівень ідентичності інтронів загалом варіює від 46 % до 97 %. Найнижчі показники ідентичності й значні відмінності у довжині спостерігаються у 2 інтрони *ATG8* (LOC123452130). Інтрони, для

яких встановлений значний міжвидовий поліморфізм, рекомендуються для подальших досліджень у контексті їх потенційного застосування для молекулярно-генетичного маркування солестійких генотипів дикого і різних сортів культивованого ячменю. Для інтронів генів, що представляють інтерес, створено 25 потенційних ІПР-маркерів, що можуть бути використані у подальших дослідженнях.

Робота виконана в рамках проекту «Клітинно-біологічні та молекулярно-генетичні механізми соле- та посухостійкості ячменю та перспективи їх регуляції для поліпшення злакових культур» (ДР № 0123U103005).

References

1. Greenway H. Plant response to saline substrates. I. Growth and ion uptake of several varieties of *Hordeum* during and after sodium chloride treatment. *Austral. J. Biol. Sci.* 1962. Vol. 15. P. 16–38 doi: 10.1071/bi9650763.
2. Garthwaite A. J., Bothmer R., Colmer T. D. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56. P. 2365–2378. doi: 10.1093/jxb/eri229.
3. Mano Y., Takeda K. Genetic resources of salt tolerance in wild *Hordeum* species. *Euphytica*. 1998. Vol. 103. P. 137–141. doi: 10.1023/A:1018302910661.
4. Isayenkov S. V., Maathuis F. J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 80. doi: 10.3389/fpls.2019.00080.
5. Carmona A., Friero E., de Bustos A., Jouve N., Cuadrado A. The evolutionary history of sea barley (*Hordeum marinum*) revealed by comparative physical mapping of repetitive DNA. *Annals Bot.* 2013. Vol. 112 (9). P. 1845–1855. doi: 10.1093/aob/mct245.
6. Maršálová L., Vítámvás P., Hýnek R., Prášil I. T., Kosová K. Proteomic response of *Hordeum vulgare* cv. Tadmor and *Hordeum marinum* to salinity stress: similarities and differences between a glycophyte and a halophyte. *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 7. P. 1154. doi: 10.3389/fpls.2016.01154.
7. Isayenkov S. V., Hilo A., Rizzo P., Tandron Moya Y. A., Rolletschek H. et al. Adaptation strategies of halophytic barley *Hordeum marinum* ssp. *marinum* to high salinity and osmotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 9019. doi: 10.3390/ijms21239019.
8. Huang L., Kuang L., Li X., Wu L., Wu D., Zhang G. Metabolomic and transcriptomic analyses reveal the reasons why *Hordeum marinum* has higher salt tolerance than *Hordeum vulgare*. *Environ. Exp. Bot.* 2018. Vol. 156. P. 48–61. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.08.019.
9. Luo L., Zhang P., Zhu R., Fu J., Su J., Zheng J., Wang Z., Wang D., Gong Q. Autophagy is rapidly induced by salt stress and is required for salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2017. Vol. 8. P. 1459. doi: 10.3389/fpls.2017.01459.
10. Yue J. Y., Wang Y. J., Jiao J. L., Wang, H. Z. Silencing of *ATG2* and *ATG7* promotes programmed cell death in wheat via inhibition of autophagy under salt stress. *Ecotox. Environm. Safety.* 2021. Vol. 225. P. 112761. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112761.
11. Sayers E. W., Cavanaugh M., Clark K., Pruitt K. D., Schoch C. L., Sherry S. T., Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucl. Acids Res.* 2021. Vol. 49 (D1). P. D92–D96. doi: 10.1093/nar/gkaa1023.
12. Kuznetsov A., Bollin C. J. NCBI Genome Workbench: Desktop Software for Comparative Genomics, Visualization, and GenBank Data Submission. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*. 2021. Vol. 2231. P. 261–295. doi: 10.1007/978-1-0716-1036-7_16.
13. Kuang L., Shen Q., Chen L., Ye L., Yan T., Chen Z. H., Waugh R., Li Q., Huang L., Cai S., Fu L., Xing P., Wang K., Shao J., Wu F., Jiang L., Wu D., Zhang G. The genome and gene editing system of sea barleygrass provide a novel platform for cereal domestication and stress tolerance studies. *Plant Commun.* 2022. Vol. 3 (5). 100333. doi: 10.1016/j.xplc.2022.100333.
14. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucl. Acids Res.* 2012. Vol. 40 (15). e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
15. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012. Vol. 13. P. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
16. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K. I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics.* 2017. Vol. 109 (3–4). P. 312–319. doi: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.

NOVOZHYLOV D. O., HORDYNSKYI S. O., RABOKON A. M., DEMKOVYCH A. Ye., PRYVALIKHIN S. M., BLUME R. Ya., BUZIASHVILI A. Yu., YEMETS A. I., PIRKO Ya. V.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2A*

DESIGN OF POTENTIAL ILP MARKERS FOR *HORDEUM VULGARE* AND *H. MARINUM* ATG2, ATG7, ATG8 GENES

Aim. Design of potential intron length polymorphism markers for *ATG2*, *ATG7*, *ATG8* genes. **Methods.** Use of classical bioinformatics methods to search for loci encoding *ATG2*, *ATG7*, *ATG8* in the *Hordeum marinum* genome based on homology with cultivated barley genes; analysis of exon-intron structure of genes, design of ILP markers. **Results.** The sequences of *ATG2*, *ATG7*, *ATG8* genes in *H. marinum* were determined. Analyzed differences in the exon-intron structure of the *ATG2*, *ATG7*, *ATG8* loci in cultivated (*H. vulgare*) and salt-resistant wild barley (*H. marinum*). 25 potential ILP markers were designed for introns that showed significant interspecies length polymorphism: 13 for *ATG2*, 6 for *ATG7*, 3 for *ATG8A*, 2 for *ATG8B* and 1 for *ATG8D*. **Conclusions.** Based on gene structure comparative analysis of the autophagosome formation proteins *ATG2*, *ATG7*, *ATG8* of cultivated *H. vulgare* and salt-tolerant *H. marinum*, a number of introns are recommended for further use as a potential source of ILP markers for the study of interspecies genetic differentiation of cereals.

Keywords: salt stress, *Hordeum marinum*, *Hordeum vulgare*, ILP markers, ATG, autophagy.