

## ПОЛИМОРФИЗМ ПО ПРИЗНАКАМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ЦМС-*Rf*, У ЗЕРНОВОГО СОРГО ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР\*

И.Н. АНИСИМОВА<sup>1</sup>, Д.Н. РЯБОВА<sup>1</sup>, Е.В. МАЛИНОВСКАЯ<sup>2</sup>,  
Н.В. АЛПАТЬЕВА<sup>1</sup>, Ю.И. КАРАБИЦИНА<sup>1</sup>, Е.Е. РАДЧЕНКО<sup>1</sup>

У зернового сорго (*Sorghum bicolor* L. Moench) известны семь различных типов цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), однако в селекции используется лишь А1 (milo). Генетический контроль восстановления фертильности ЦМС А1 обусловлен действием двух или трех генов *Rf* (*Restoration of Fertility*), а также ряда модификаторов. Молекулярные механизмы ЦМС А1 и восстановления фертильности изучены очень мало. На молекулярном уровне до настоящего времени был идентифицирован только ген-кандидат *Rf1* (R.R. Klein et al., 2005). В представленной работе мы впервые показали нуклеотидный полиморфизм в кодирующих последовательностях рецессивного и доминантного аллелей гена *Rf2*, а также гена-кандидата *RFL-PPR*, характеризующихся гомологией с геном *Rf1* риса. Материалом служили образцы сорго из мировой коллекции ВИР (Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова): восстановители фертильности к-928 и к-929, полувосстановитель к-1362, стерильные линии А-10598 и А-83 (ЦМС А1) и их фертильные аналоги, устойчивые к *Schizaphis graminum* Rond. сестринские линии F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> ВС<sub>1</sub>-ВС<sub>2</sub>, выделенные из гибридов от скрещиваний линии Н-81 (ЦМС А1) с линиями к-929 и к-928, а также гибриды между сестринскими линиями. Для изучения характера изменчивости генов-кандидатов, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*, из биоинформационной базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) отобрали четыре референсные последовательности, сконструировали восемь пар специфичных праймеров и секвенировали фрагменты, амплифицированные на ДНК генотипов, различавшихся по способности к супрессии фенотипа ЦМС. У линий ЦМС и восстановителей фертильности обнаружен значительный нуклеотидный полиморфизм (18 полиморфных сайтов) фрагмента кодирующей последовательности гена *Rf2* длиной 825 п.н. (референсный фрагмент XM\_002459403.1, хромосома SDI02), а также *PPR*-гена, локализованного в 3-й хромосоме (референсный фрагмент XM\_002458104.1). Секвенированные участки структурного ядерного гена *ALDH2b*, кодирующего альдегиддегидрогеназу, — гомолога гена *Rf2* кукурузы и митохондриального гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы F0F1 у линий ЦМС и восстановителей фертильности оказались идентичными. Сравнение изменчивости показателей фертильности пыльцы с использованием окрашенных ацетокармином цитологических препаратов показало, что устойчивые к *S. graminum* линии, а также их гибриды различались по частоте формирования окрашенных (фертильных), аномально крупных (диаметром 54-70 мкм), гигантских (до 84 мкм) и деформированных пыльцевых зерен. Так, у фертильных линий F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> ВС<sub>1</sub>-ВС<sub>2</sub> на основе гибридов с к-929 и к-928 доля окрашенных пыльцевых зерен была относительно высокой, составив в первом случае 72,2-83,8 %, во втором — 57,4 и 63,4 % (у двух линий); крупные пыльцевые зерна с разной частотой встречались у пяти линий, гигантские — у двух. Наблюдавшаяся изменчивость может быть обусловлена различиями в аллельном составе генов *Rf*, полученных от рекуррентного родителя.

Ключевые слова: *Sorghum bicolor* L. Moench, зерновое сорго, ЦМС, восстановление фертильности, *Rf*, фертильность пыльцы, гены-кандидаты, нуклеотидный полиморфизм.

Явление цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), открытое у кукурузы в США в 1931 году М. Rhoadse и в СССР сотрудником Всесоюзного института растениеводства (ВИР) М.И. Хаджиновым и к настоящему времени описанное более чем у 150 видов растений (1, 2), широко используется при производстве гибридных семян многих сельскохозяйственных культур (кукурузы, риса, рапса, хлопчатника, подсолнечника, капусты и др.). Создание гетерозисных гибридов на основе ЦМС рассматривается как приоритетное направление современных селекционных программ по сорго (*Sorghum bicolor* L. Moench) — важной злаковой культуре, возделываемой в засушливых и полузасушливых регионах планеты.

\* Для секвенирования в работе использовано оборудование ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» (ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург).

Первое упоминание о гетерозисных гибридах сорго относится к 1927 году (3, 4), однако создание коммерческих гибридов стало возможным лишь после открытия у кафрского сорго стабильно наследуемой цитоплазматической мужской стерильности A1 (milo) и источников восстановления фертильности пыльцы (5). Впоследствии были идентифицированы альтернативные типы ЦМС — A2-A6, 9E (6), но из-за сложности получения надежных источников генов восстановления фертильности, а также эпигенетической изменчивости признака в зависимости от условий среды (7-9) в селекционных программах пока используется лишь ЦМС A1 (10). Методом гибридологического анализа идентифицированы по меньшей мере два главных гена — *Rf1* (11) и *Rf2* (10), доминантные аллели которых отвечают за восстановление фертильности ЦМС A1-milo. Их проявление зависит от условий среды и действия генов-модификаторов. Полагают также, что в случае ЦМС A1 восстановление фертильности пыльцы контролируется доминантными аллелями главного и двух дублированных комплементарных генов, тогда как при ЦМС A2 и A3 оно детерминировано доминантными аллелями трех генов, взаимодействующих комплементарно (12). Обнаружены ген *Rf5* и ряд модификаторов, восстанавливающие фертильность пыльцы ЦМС A1 и A2 (13). Восстановление фертильности при ЦМС A3 контролируется на гаметофитном уровне доминантными аллелями генов *Rf3* и *Rf4* (14), а на уровне спорофита объясняется парамутациями генов *Rf* (15). Молекулярные механизмы проявления признака ЦМС и восстановления фертильности у сорго изучены мало. Показано, что, как и у других растений, у сорго ЦМС обуславливают аберрантные гены митохондрий (16).

Большинство охарактеризованных к настоящему времени генов *Rf* (у петунии, кукурузы, риса, редиса) кодируют белки, которые содержат повторяющиеся мотивы из 35 аминокислотных остатков (PPR, pentatricopeptide repeats) и регулируют согласованную работу ядра и митохондрий. *PPR* гены с функцией восстановления фертильности выделены в отдельное подсемейство *RFL-PPR* (*Restoration of Fertility Like-PPR*). Структурно-функциональное разнообразие *PPR-RFL* генов поддерживается за счет изменчивости *PPR*-мотивов, а также сложной кластерной организации локусов *Rf* в геноме (17-19).

У сорго на молекулярном уровне охарактеризован только один ген восстановления фертильности пыльцы — *Rf1* (11). Установлено, что локус *Rf1* находится в группе сцепления 08 и включает 4 открытых рамки считывания (ORF), которые кодируют  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу плазматической мембраны, циклин D-1, а также неизвестный митохондриальный белок, содержащий 13 *PPR*-мотивов и относящийся к E-типу подсемейства *PPR* генов. В кодирующей последовательности, а также в 5'- или 3'-концевых фланкирующих районах доминантного и рецессивного аллелей гена-кандидата *PPR13* выявлено 19 полиморфных сайтов. Ген *PPR13* сорго по структуре *PPR*-мотивов существенно отличается от других представителей подсемейства *PPR-RFL* генов (19-21). Другой ген-кандидат (*Rf2*) локализован на участке хромосомы SDI02 протяженностью 236219 п.н. Район включает 31 ORF, в том числе и один *PPR* ген, характеризующийся высокой степенью сходства с геном *Rf1* риса (10). Полиморфизм нуклеотидных последовательностей доминантного и рецессивного аллелей локуса *Rf2* до сих пор не изучен, что ограничивает возможности разработки специфичных молекулярных маркеров для их идентификации. Не идентифицированы и другие последовательности генома сорго, потенциально ассоциированные с признаком восстановления фертильности пыльцы.

Коллекция сорго ВИР насчитывает порядка 9 тыс. образцов. В со-

ставе коллекции — стерильные линии с ЦМС А1 (milo), восстановители фертильности и закрепители стерильности. У сорго, как и у многих других растений, для оценки признака восстановления мужской фертильности наряду с показателями завязываемости семян при самоопылении используют данные цитологического анализа пыльцы гибридов F<sub>1</sub> (8, 13, 22). Однако изменчивость этого признака, а также полиморфизм геномных последовательностей, потенциально ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*, у образцов коллекции ВИР не изучены.

В настоящей работе нами впервые показан значительный нуклеотидный полиморфизм в кодирующих последовательностях рецессивного и доминантного аллелей гена *Rf2* (референсный фрагмент ХМ\_002459403.1, хромосома SDI02), а также гена-кандидата *RFL-PPR* (референсный фрагмент ХМ\_002458104.1), характеризующихся гомологией с геном *Rf1* риса.

Цель выполненного исследования заключалась в выяснении характера изменчивости признаков, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf* у линий сорго, для чего изучили нуклеотидный полиморфизм генов-кандидатов, ассоциированных с генетической системой ЦМС-*Rf*, и сравнили образование пыльцы у фертильных форм и растений со стерильным цитоплазмомом типа А1 (milo).

*Методика.* Материалом служили образцы сорго из коллекции ВИР, различающиеся по способности к восстановлению фертильности пыльцы: полувосстановитель фертильности к-1362; линии-восстановители к-928 и к-929; стерильные линии А-10598 и А-83 на основе ЦМС А1 (milo) и их фертильные аналоги В-10598 и В-83; устойчивые к обыкновенной злаковой тле (*Schizaphis graminum* Rond.) сестринские линии F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> BC<sub>1</sub>-BC<sub>2</sub>, выделенные из гибридов от скрещиваний стерильной линии (ЦМС А1) Низкорослое 81 (Н-81) с восстановителями к-928 и к-929; гибриды F<sub>1</sub> от скрещиваний стерильных и фертильных линий (23). Линии к-928 и к-929, которые выделены из образцов зернового сорго Джугара белая из Западного Китая, защищены различными аллелями генов устойчивости к *S. graminum* (24). Образец к-1362 (Джугара белая, Сирия) — донор устойчивости к *S. graminum* и полувосстановитель фертильности. Стерильные линии зернового кафрского сорго А-10598 и А-83 и их фертильные аналоги В-10598 и В-83 поступили в коллекцию ВИР из Индии в 1980-х годах. Линии и гибриды выращивали на полях Кубанской опытной станции ВИР в 2014–2016 годах.

Для оценки фертильности пыльцы зрелые пыльники собирали рано утром в период массового цветения растений и фиксировали в 70 % этаноле. Долю фертильных пыльцевых зерен подсчитывалась по методике Навашина (цит. по 25) с изменениями на окрашенных ацетокармином глицерин-желатиновых препаратах с использованием микроскопа Zeiss Axioplan 2 imaging («Carl Zeiss», Германия). На основании анализа не менее 30 полей зрения при увеличении ×20 рассчитывали процент полностью окрашенных (фертильных), слабо окрашенных и неокрашенных пыльцевых зерен (ПЗ), а также учитывали их диаметр, выравненность по диаметру и наличие деформированных ПЗ.

Фракции ДНК выделяли по протоколу, основанному на использовании СТАВ-буфера (26). В результате биоинформационного поиска в базе данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnological Information, США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) были выявлены 11 последовательностей, обладающих гомологией с ядерными генами *Rf* и митохондриальными генами, ассоциированными с ЦМС сорго (27) и других видов растений. На основе четырех отобранных референсных последовательностей были сконструированы 8 пар специфичных праймеров, фланкирующих

полноразмерные и внутренние фрагменты (табл. 1). Фрагменты, синтезированные с помощью разработанных праймеров на ДНК генотипов, контрастных по проявлению признака фертильности пыльцы, очищали в 1 % агарозном геле и секвенировали на генетическом анализаторе ABI 3500xl («Applied Biosystems», США) в Выравнивание и анализ последовательностей выполнен в программе Mega 5.1 (<http://www.megasoftware.net/>) (28).

При статистической обработке данных о числе фертильных пыльцевых зерен рассчитывали средние ( $M$ ) и ошибки средних ( $\pm m$ ).

**Результаты.** Для выяснения характера изменчивости нуклеотидных последовательностей гена *Rf2* — одного из главных генов восстановления фертильности ЦМС А1, локализованного в 8-й хромосоме, изучили полиморфизм геномного фрагмента, амплифицированного с помощью праймеров (табл. 1), которые были сконструированы на основе геномной последовательности *S. bicolor* (образец ХМ\_002459403.1), содержащей PPR-мотивы и самой близкой (10) к последовательности гена *Rf1* риса *Oryza sativa* L., восстанавливающего фертильность ЦМС типа ВТII (Воро II). Было выявлено сходство референсного фрагмента с несколькими фрагментами генома сорго (предположительно последовательностями гена *Rf1*) и предсказанными последовательностями генов восстановления фертильности из геномов могара *Setaria italica* (L.) P. Beauv. и кукурузы *Zea mays* L. Референсный фрагмент имел длину 951 п.н., секвенированный — 825 п.н. (позиции с 76-й по 901-ю). Длина транслированной *in silico* последовательности составила 275 а.о.

### 1. Праймеры, разработанные для амплификации гомологов генов восстановления фертильности у зернового сорго *Sorghum bicolor* L. Moench

Референсный фрагмент (длина)	Ген, белковый продукт	Праймер, нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина секвенированного фрагмента, п.н.	Позиции в референсной последовательности
ХМ_002458104.1 (2801 п.н.)	Не идентифицирован, PPR-белок	02458104fw1: CACCCAATTCTCCAGACCAT 02458104rev1: ACATCTGCCGGTACATAGCC 02458104fw2: GGCTATGTACCGGCAGATGT 02458104rev2: GATGGGATCAAATGGAATGG 104_inner_fw: TTGCTTGCATGGAGAAATTG 104_inner_rev: CTGCGAGATCAGCAGTTG	818	301-1119
ХМ_002459403.1 (951 п.н.)	<i>Rf2</i> , PPR-белок	2459403fw: CAGGGGCCAAATGTTGTTAC 2459403rev: CACAGTTTATATTTCCGTGAT-AGTG	825	76-901
AJ278689.1 (1324 п.н.)	<i>atpA</i> , $\alpha$ -субъединица АТФ-синтазы F0F1	AJ278689fw: AACTPTTACACGAATTTCAAGTGG AJ278689rev: TGACAGCAGCATAAATAACAACA AJ_inner_fw: TCCTATAGGCCGTGGTCAAC AJ_inner_rev: CGTCTCCAGCTTGTGTTCA	1183	60-1243
AB084898.1 (2159 п.н.)	<i>ALDH2b</i> , митохондриальная альдегиддегидрогеназа	AB084898fw: TTCTGGTTTTGGCCCTACTG AB084898rev: CTCTTCTAACAAATGTTTTTCAT- AAT AB_inner_fw: AACCATACGAATAAGCCTTGC AB_inner_rev: CTCGCATTTGCCCTCTTAAT	738	858-1596

У линий-восстановителей к-928 и к-929, предположительно несущих доминантные аллели *Rf2*, изученные последовательности различались шестью нуклеотидными заменами, тогда как при сравнении нуклеотидных последовательностей у стерильных линий А-10598 и А-83 (носители рецессивных аллелей) обнаружили 3 нуклеотидные замены. Референсная последовательность, источником которой была линия-закрепитель стерильности ВТ × 623 предполагаемого генотипа *rf2rf2*, оказалась в большей степени схожа с последовательностями стерильных линий А-10598 и А-83 и отличалась от них соответственно двумя и четырьмя полиморфными позициями нуклеотидов. В то же время последовательности образцов к-928 и к-

929 отличалась от последовательностей референсного фрагмента и стерильных линий 18 заменами нуклеотидов и семью заменами аминокислот (рис. 1). Известно, что полиморфизм кодирующих последовательностей генов *Rf* растений, в частности гена *Rf1* сорго, связан с их функциональным состоянием (11, 18). Можно предположить, что полиморфные последовательности, идентифицированные у линий ЦМС и восстановителей

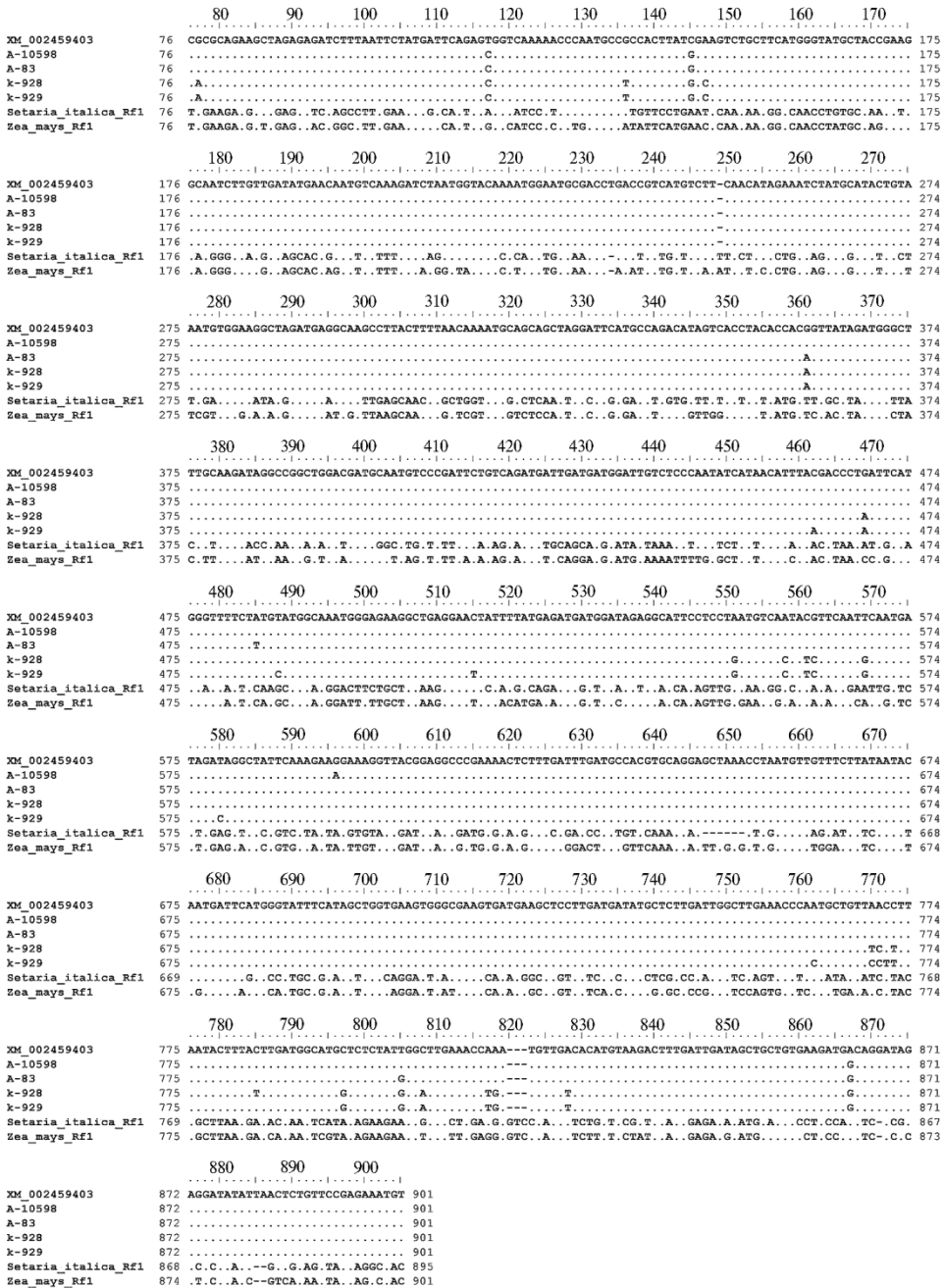


Рис. 1. Элаймент нуклеотидных последовательностей гена-кандидата *Rf2* у линий зернового сорго (*Sorghum bicolor* L. Moench) из мировой коллекции ВИР: к-928 и к-929 — носители доминантного аллеля, А-10598 и А-83 — носители рецессивного аллеля; XM\_002459403 — референсный фрагмент. Для сравнения приведены гомологичные фрагменты генов *Rf* *Setaria italica* и *Zea mays*.

```

          310      320      330      340      350      360      370
XM_002458104.1  301  GGCCTCGCCGATGACCTCGCTTCCTCCCTCCGCGCACTCCTCGGATCCTCGCCCGACGGCCCGCAGCCT 370
A-83            301  .....                               ..... 370
k-929          301  .....ATCG..... 370
Zea mays XM_008677263.2 301  .....C.....AC..T..A..... 370

          380      390      400      410      420      430      440
XM_002458104.1  371  TCCACSTGCTACGTTCCGCTGCGCTGGATACGGCGCTCCCGCCGACGAGCTCGTCGACGCCGCTCTCTC 440
A-83            371  .....                               ..... 440
k-929          371  .....                               ..... 440
Zea mays XM_008677263.2 371  ...T...C..... 440

          450      460      470      480      490      500      510
XM_002458104.1  441  CGTCGCAGAGCTGGCTCGCCGGCCGGCCACGCTCCTCAGTCAGCTCCACCTGCCTCTCCAGCGCC 510
A-83            441  .....                               ..... 510
k-929          441  .....                               ..... 510
Zea mays XM_008677263.2 441  .AC..TG.....TT..T.....C.....C...T 510

          520      530      540      550      560      570      580
XM_002458104.1  511  GCCCGCACTGCCGGCCCGCTGGCCGCACTCTCGCATGGTCACGAGGGCCCTTGTCCCGACGCCA 580
A-83            511  .....                               ..... 580
k-929          511  .....                               ..... 580
Zea mays XM_008677263.2 511  ...A.....C..... 580

          590      600      610      620      630      640      650
XM_002458104.1  581  AATCTCGCACCGACTGCTCGTCGCCACGGCCAGGGGCGCATCGGTCGGGATGCGCTCACGCTGTTCGA 650
A-83            581  .....                               ..... 650
k-929          581  .....                               ..... 650
Zea mays XM_008677263.2 581  .G.....A..A.....G.....G.....A..... 650

          660      670      680      690      700      710      720
XM_002458104.1  651  CGAGATGCCGTGCAAGGGTACTACGGCGATGCTAAGATGTACGACGTCGTGATCGGGCCCTGCCGCTG 720
A-83            651  .....                               ..... 720
k-929          651  .....                               ..... 720
Zea mays XM_008677263.2 651  .....G.....A.G.....G.....A.....AG. 720

          730      740      750      760      770      780      790
XM_002458104.1  721  GGACGGATGCACGGTGACGCCGTCAGGCTGTTGACGAAATGGCCGGTGCCGGAGTCAAGCCTGACGAGC 790
A-83            721  .....                               ..... 790
k-929          721  .....                               ..... 790
Zea mays XM_008677263.2 721  ...G.....T..T.....T..T.....T.....G.....C..... 790

          800      810      820      830      840      850      860
XM_002458104.1  791  GCGTTTATGCCATCACAAATCACAGGTTTGTGCAAGCTACGCGATGCAGACCGGGCAGTCCAGGTGCTGGG 860
A-83            791  .....                               ..... 860
k-929          791  .....                               ..... 860
Zea mays XM_008677263.2 791  .....T.....T.....T.....C.....T..... 860

          870      880      890      900      910      920      930
XM_002458104.1  861  GAAGATGAGGGAGGCGGGTTGAAGCCACGGGATTTTACCTACAATCTGTGTGGATGTGCTTGTGAAG 930
A-83            861  .....                               ..... 930
k-929          861  .....                               ..... 930
Zea mays XM_008677263.2 861  .....CG...GT...G..A..G...G..... 930

          940      950      960      970      980      990      1000
XM_002458104.1  931  GTGGGGAGGATGGATGAGGCATTCGGGCTGAAGGATCAGATGCTGCTGCCACGGGAAGAAGATGGATG 1000
A-83            931  .....                               ..... 1000
k-929          931  .....                               ..... 1000
Zea mays XM_008677263.2 931  .....A.....T...A..... 1000

          1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070
XM_002458104.1  1001 TGTTCCTCGCGACGACGTTGATGCAGGGATATTGCTTGCATGGAGAAATGGGAAGCATTAGATTTGTT 1070
A-83            1001 .....                               ..... 1070
k-929          1001 .....                               ..... 1070
Zea mays XM_008677263.2 1001 .G.....T.....C..G.....G.....G...G..... 1070

          1080     1090     1100     1110
XM_002458104.1  1071 TGAATGAGGCTGTCAAGGATGGTGTGACACCGACCAATGTGACATAT-AC 1118
A-83            1071 .....                               ..... 1118
k-929          1071 ...A.A.G...AA...T...AC.TCT.....A-T 1118
Zea mays XM_008677263.2 1071 .....T...T.....-GG 1118

```

Рис. 2. Элаймент нуклеотидных последовательностей локуса, кодирующего митохондриальный PPR белок, у линий зернового сорго (*Sorghum bicolor* L. Moench) из мировой коллекции ВИР: к-929 — восстановитель фертильности, А-83 — стерильная линия; XM\_002458104.1 — референсный фрагмент. Для сравнения приведена гомологичная последовательность *Zea mays*.

фертильности, представляют разные аллельные варианты гена *Rf2*, продукты которого участвуют в редактировании митохондриальных РНК. У носителей доминантного аллеля *Rf2* в последовательностях выявлено 6 PPR-

повторов, у носителей рецессивного — 5. В целом полиморфизм нуклеотидных последовательностей локуса *Rf2* у носителей доминантного и рецессивного аллелей оказался довольно высоким (2,2 % полиморфных сайтов).

С использованием трех пар праймеров (см. табл. 1, рис. 2) изучили полиморфизм локализованного в 3-й хромосоме геномного фрагмента ХМ\_002458104.1 длиной 2801 п.н., содержащего 17 PPR-повторов и наиболее близкого ядерному гену *Rfo* редиса *Raphanus sativus* (L.) Domin., восстанавливающей фертильность ЦМС Ogura (29), а также гену *Rf1* риса *O. sativa* Japonica Group. Последовательности референсного фрагмента и секвенированного фрагмента ДНК линии А-83, длина которого составляла 818 п.н., оказались идентичными, но значительно отличались от последовательности секвенированного фрагмента ДНК у восстановителя фертильности к-929, при сравнении которых было выявлено 17 полиморфных сайтов и 8 аминокислотных замен (см. рис. 2). Наиболее высокой степенью сходства с идентифицированным фрагментом (90 % идентичных позиций нуклеотидов) характеризовалась последовательность образца ХМ\_008677263.2 из базы данных NCBI (PPR белок *Zea mays*).

Один из генов восстановления фертильности кукурузы (*Rf2*) ЦМС Т-типа кодирует альдегиддегидрогеназу (АлДГ) — фермент, катализирующий окисление альдегидов. Известно, что АлДГ участвует в детоксикации ацетальдегида, продуцируемого во время развития пыльцы, может быть вовлечена в энергетический метаболизм клеток, особенно на стадии развития пыльников и, возможно, взаимодействует с митохондриальным белком URF13, связанным с ЦМС Т-типа у кукурузы (30, 31). Полагают, что механизм действия контролируемой геном *Rf2* АлДГ как восстановителя фертильности обусловлен наличием на поверхности фермента туннельных полостей, посредством которых белок связывается с длинноцепочечными лигандами разной длины и/или с потенциально вредными, токсичными для развития пыльцы молекулами — продуктами экспрессии митохондриальных ЦМС-генов (32).

Чтобы проверить гипотезу о возможном участии гена альдегиддегидрогеназы сорго в контроле восстановления фертильности пыльцы, на основе последовательности мРНК *ALDH2b S. bicolor* (образец АВ084898.1), представленной в базе NCBI, мы сконструировали праймеры для амплификации кодирующей последовательности фермента. Последовательность участка гена *ALDH2b* (позиции 858-1596-я), представляющего один из генов подсемейства 2 обширного суперсемейства АлДГ у высших растений, оказалась гомологичной последовательностям АлДГ других видов злаков, в том числе кукурузы (94 % идентичных аминокислотных остатков). В то же время по нуклеотидным последовательностям этого фрагмента мы не выявили различий между восстановителями фертильности и линиями ЦМС. Необходимо отметить, что для линии А-83 нам удалось определить последовательность протяженного участка гена *ALDH2b* длиной 2055 п.н., однако у секвенированного и референсного фрагментов N-концевые области существенно различались. Это можно объяснить как значительной вариативностью остатков в указанной части молекулы (32), так и тем, что продукт амплификации включал интрон или интроны, информация о которых для генов АлДГ сорго и кукурузы пока отсутствует.

Известно, что во многих митохондриальных локусах, ассоциированных с ЦМС, обнаружены промоторные районы генов АТФ-синтазы либо части этих генов. Так, ассоциированный с ЦМС Т-типа ген *urf13-T* кукурузы содержит 59 нуклеотидов из регуляторной области гена *atp6*. Сцепленный с ним и котранскрибируемый ген *orf221* был идентифициро-

ван как часть гена, кодирующего одну из субъединиц компонента F0 АТФ-синтазы F0F1 (16). В качестве референсной последовательности для анализа участка митохондриального генома *S. bicolor*, потенциально ассоциированного с ЦМС А1, мы использовали последовательность гена *atpA*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу АТФ-синтазы F0F1 линии CS3541 — восстановителя фертильности ЦМС А1 (AJ278689.1 из базы NCBI). Выравненные фрагменты имели длину 1183 п.н. и были идентичны у форм со стерильным (А-83) и фертильным (к-929) типами цитоплазмона. Продукты трансляции этих последовательностей у линии ЦМС и линии-восстановителя, а также референсной последовательности AJ278689.1 и последовательностей, кодирующих  $\alpha$ -субъединицу АТФ-синтазы F0F1 у кукурузы, риса, *Triticum aestivum* L., *T. durum* L., *Secale cereale* L., оказались высокогомологичны.

Таким образом, в настоящей работе впервые выявлен полиморфизм фрагментов нуклеотидной последовательности гена-кандидата *Rf2*, контролирующего признак восстановления фертильности ЦМС А1 у сорго. Наибольшее число полиморфных сайтов обнаружено при сравнении этих последовательностей у стерильных линий и восстановителей. В частности, нуклеотидный полиморфизм обнаружен у восстановителей фертильности к-928 и к-929 — образцов, которые служили родительскими формами при создании устойчивых к *S. graminum* линий F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> ВС<sub>1</sub>-ВС<sub>2</sub>. Эти линии имеют стерильную цитоплазму и, по-видимому, различаются по аллельному составу генов *Rf*, полученных от отцовского родителя. Несмотря на высокую степень гомозиготности, линии F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> ВС<sub>1</sub>-ВС<sub>2</sub> проявляют значительную изменчивость по признаку фертильности пыльцы.

Изученные генотипы значительно различались как по содержанию фертильных (хорошо окрашенных) пыльцевых зерен (ПЗ), так и по их диаметру (табл. 2). Сообщалось (33), что в норме у диплоидного сорго диаметр фертильных ПЗ не зависит от года репродукции и варьирует в пределах 37,5-54,2 мкм. ПЗ с диаметром более 54,2 мкм (крупные пыльцевые зерна) встречается у диплоидного сорго довольно редко и, по-видимому, содержат нередуцированное число хромосом. Высоким качеством пыльцы характеризовались линии В-10598 (фертильный аналог линии ЦМС А-10598), а также образцы к-1362 и к-928 (соответственно 75,5; 100,0 и 83,3 % фертильных ПЗ). Вместе с тем у к-1362 и к-928 отмечалось большое число крупных ПЗ (с диаметром от 55 до 70 мкм). У семи устойчивых к *S. graminum* фертильных линий F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> ВС<sub>1</sub>-ВС<sub>2</sub>, выделенных из гибридов Н-81 × к-928 и Н-81 × к-929, наблюдали сравнительно высокий процент фертильных ПЗ. Этот показатель был несколько выше для пяти линий, у которых донором генов *Rf* служил образец к-929 (72,2-83,8 %), чем для двух линий, выделенных из гибридов с участием к-928 (57,4 и 63,4 %). У пяти линий с разной частотой встречались крупные (диаметр 55-70 мкм), а у двух — гигантские (диаметр до 84 мкм) ПЗ.

## 2. Характеристика пыльцы у линий зернового сорго (*Sorghum bicolor* L. Moench) с разным типом цитоплазмы, сохраняемых в мировой коллекции ВИР

Образец	Тип цитоплазмы	Характеристика генотипа	Характеристика пыльцевых зерен					
			Ф ПЗ, % ( $M \pm m$ )	Д ПЗ, мкм		Г ПЗ, %	К ПЗ, %	Выравненность по Д/деформированные ПЗ
				min	max			
к-1362 Джугара белая	F	Полувосстановитель фертильности	100	51,8	68,9	0	70,0	+/-
к-928 Джугара белая	F	Восстановитель фертильности	83,3±3,73	40,1	60,5	0	60,0	-/-
В-10598	F	Закрепитель стерильности	75,5±9,71	42,2	48,3	0	0	+/-



2146/15	S	Фертильная линия F <sub>9</sub> BC <sub>2</sub> (Н-81 × к-929)	75,3±4,65	19,9	50,3	0	0	-/-
2148/15	S	Фертильная линия F <sub>10</sub> BC <sub>2</sub> (Н-81 × к-929)	76,6±5,56	26,5	58,5	1,8	0	+/+
2149/15	S	Фертильная линия F <sub>10</sub> BC <sub>2</sub> (Н-81 × к-929)	75,6±3,30	27,6	52,2	0	0	+/-
2150/15	S	Фертильная линия F <sub>10</sub> BC <sub>2</sub> (Н-81 × к-929)	83,8±3,66	28,7	84,3	2,7	8,2	-/-
2151/15	S	Фертильная линия, F <sub>12</sub> BC <sub>2</sub> (Н-81 × к-929)	72,2±6,34	16,4	57,2	0	2,1	-/-
2152/15	S	Фертильная линия F <sub>12</sub> BC <sub>1</sub> (Н-81 × к-928)	63,4±3,90	20,8	56,1	0	2,8	-/+
2153/15	S	Фертильная линия F <sub>12</sub> BC <sub>1</sub> (Н-81 × к-928)	57,4±3,20	28,5	56,1	0	3,1	-/-
73/16	S	Гибрид F <sub>1</sub> между стерильной линией и восстановителем фертильности	27,0±5,88	13,4	52,5	0	0	-/-
74/16	S	Гибрид F <sub>1</sub> между стерильной линией и восстановителем фертильности	58,3±8,96	28,5	60,2	0	3,0	-/-

Примечание. Ф ПЗ — фертильные (окрашенные) пыльцевые зерна, Д ПЗ — диаметр пыльцевых зерен, Г ПЗ — гигантские пыльцевые зерна (диаметр > 70-80 мкм), К ПЗ — крупные пыльцевые зерна (диаметр > 55 мкм); «+» или «-» — наличие и отсутствие признака.

Лишь одна из 7 проанализированных сестринских линий (2149/15) характеризовалась выравненными по диаметру ПЗ. Поскольку фертильные линии имеют стерильную цитоплазму, унаследованную от материнской формы Н81, можно полагать, что в их генотипах присутствуют полученные от отцовских форм аллели ядерных генов *Rf*, которые в разной степени влияют на восстановление фертильности пыльцы на фоне стерильного цитоплазмона. У двух линий встречались деформированные ПЗ. Гибриды от скрещиваний устойчивых к *S. graminum* стерильных линий с сестринскими линиями — предполагаемыми восстановителями фертильности тоже значительно различались по доле фертильной пыльцы (от 9 до 58,3 % у разных растений F<sub>1</sub>). Один из гибридов от скрещивания стерильной линии с сестринской линией-закрепителем был полностью стерил и не образовывал пыльцы, а у другого в пыльниках присутствовала пыльца, но она не окрашивалась, то есть была стерильной. Таким образом, изменчивость по показателям фертильности пыльцы, наблюдаемая у устойчивых к *S. graminum* сестринских линий и полученных с их участием межлинейных гибридов, свидетельствует о различиях по аллелям генов, вовлеченных в восстановление фертильности (возможно, минорных генов или генов-модификаторов), что согласуется с гипотезой о сложном генетическом контроле признака (13).

Итак, последовательность *Rf2* — гена-кандидата восстановления фертильности ЦМС А1 у сорго полиморфна у стерильных линий А-10598 и А-83 и восстановителей фертильности пыльцы к-928 и к-929 (Джугара белая). Фрагмент кодирующей последовательности гена длиной 825 п.н. у носителей рецессивного и доминантного аллелей *Rf2* различается 18 полиморфными сайтами, а транслирования последовательность — семью аминокислотными заменами. Геномный фрагмент одного из *PPR* генов, гомологичного гену *Rf1* риса (образец ХМ\_002458104.1) высокополиморфен у линий, различающихся по способности к супрессии фенотипа ЦМС, и со-

держит 17 полиморфных сайтов. Идентифицированный полиморфизм может быть использован при разработке аллель-специфичных молекулярных маркеров локуса *Rf2*. Секвенированные последовательности митохондриального гена *atpA*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу АТФ-синтазы F0F1, и ядерного гена альдегиддегидрогеназы *ALDH2b* (длина фрагментов — соответственно 1183 и 738 п.н.) у изученных линий идентичны. Устойчивые к *Schizaphis graminum* линии зернового сорго F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> BC<sub>1</sub>-BC<sub>2</sub>, выделенные из гибридов от скрещиваний линии ЦМС Низкорослое 81 с восстановителями фертильности к-928 и к-929, а также гибриды между ними различаются по показателям фертильности пыльцы, наличию крупных, гигантских и деформированных пыльцевых зерен. Поскольку линии обладают стерильной цитоплазмой, можно полагать, что они несут различные аллели генов, оказывающих влияние на проявление признака восстановления фертильности пыльцы, которые были получены от рекуррентного родителя. Устойчивые к *S. graminum* линии зернового сорго могут служить модельными объектами для изучения механизмов восстановления фертильности пыльцы.

Авторы признательны А.Г. Пинаеву (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург) за помощь в секвенировании фрагментов ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ivanov M.K., Dymshits G.M. Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants. Russian Journal of Genetics, 2007, 43(4): 354-368 (doi: 10.1134/S1022795407040023).
2. Chen L., Liu Y.G. Male sterility and fertility restoration in crops. Annu. Rev. Plant Biol., 2014, 65: 579-606 (doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040119).
3. Conner A.B., Karper R.E. Hybrid vigour in sorghum. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1927, 359: 21-26 (цит. по B.V.S. Reddy et al., 2006).
4. Reddy B.V.S., Sharma H.C., Thakur R.P., Ramesh S., Rattunde F., Mgonja M. Sorghum hybrid parents research at ICRISAT — strategies, status, and impacts. Journal of SAT Agricultural Research, 2006, 2: 1-24.
5. Stephens J.C., Holland R.F. Cytoplasmic male sterility for hybrid sorghum seed production. Agron. J., 1954, 46: 20-23 (doi: 10.2134/agronj1954.00021962004600010006x).
6. Pring D.R., Tang H.V., Schertz K.F. Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. In: Molecular biology of plant mitochondria /C.S. Levens III, I.K. Vasil (eds.). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands 1995.
7. Elkonin L.A., Tsvetova M.I. Heritable effect of plant water availability conditions on restoration of male fertility in the 9E CMS-inducing cytoplasm of sorghum. Front. Plant Sci., 2012, 3: 91 (doi: 10.3389/fpls.2012.00091).
8. Elkonin L.A., Domanina I.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A. Inheritance of reversions to male fertility in male-sterile sorghum hybrids with 9E male-sterile cytoplasm induced by environmental conditions. Russian Journal of Genetics, 2015, 51(3): 251-261 (doi: 10.7868/S0016675815030030).
9. Kozhemyakin V.V., Elkonin L.A., Dahlberg J.A. Effect of drought stress on male fertility restoration in A3 CMS-inducing cytoplasm of sorghum. The Crop Journal, 2017, 5(4): 282-289 (doi: 10.1016/j.cj.2017.02.003).
10. Jordan D.R., Mace E.S., Henzell R.G., Klein P.E., Klein R.R. Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Theor. Appl. Genet., 2010, 120(7): 1279-1287 (doi: 10.1007/s00122-009-1255-3).
11. Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12. Theor. Appl. Genet., 2005, 111(6): 994-1012 (doi: 10.1007/s00122-005-2011-y).
12. Reddy P.S., Rao D.M., Reddy V.S.B., Kumar A.A. Inheritance of male-fertility restoration in A1, A2, A3 and A4(M) cytoplasmic male-sterility systems of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Indian Journal of Genetics, 2010, 70(3): 240-246.
13. Jordan D.R., Klein R.R., Sakrewski K.G., Henzell R.G., Klein P.E., Mace E.S. Mapping and characterization of *Rf5* a new gene conditioning pollen fertility restoration in A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Theor. Appl. Genet., 2011, 123(3): 383-396 (doi: 10.1007/s00122-011-1591-y).
14. Pring D.R., Tang H.V., Howad W., Kempken F. A unique two-gene gametophytic

- male sterility system in sorghum involving a possible role of RNA editing in fertility restoration. *J. Hered.*, 1999, 90: 386-393 (doi: 10.1093/jhered/90.3.386).
15. Tang H.K., Pederson J.F., Chase C.D., Pring D.R. Fertility restoration of the sorghum A3 male-sterile cytoplasm through a sporophytic mechanism derived from sudangrass. *Crop Science*, 2007, 47: 943-950 (doi: 10.2133/cropsci2006.08.0542).
  16. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, 2004, 16(Suppl. 1): 154-169 (doi: 10.1105/tpc.015966).
  17. O'Toole N., Hattori M., Andres C., Iida K., Lurin C., Schmitz-Linneweber C., Sugita M., Small I. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol. Biol. Evol.*, 2008, 25(6): 1120-1128 (doi: 10.1093/molbev/msn057).
  18. Fujii S., Bond Ch.S., Small I.D. Selection patterns on restorer-like genes reveals a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *PNAS*, 2011, 108(4): 1723-1728 (doi: 10.1073/pnas.1007667108).
  19. Dahan J., Mireau H. The *Rf* and *Rf*-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA Biol.*, 2013, 10(9): 1469-1476 (doi: 10.4161/rna.25568).
  20. Gaborieau L., Brown G.G., Mireau H. The propensity of pentatricopeptide repeat genes to evolve into restorers of cytoplasmic male sterility. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7: 1816 (doi: 10.3389/fpls.2016.01816).
  21. Kaur P., Verma M., Chaduvula P.K., Saxena S., Baliyan N., Junaid A., Mahato A.K., Sing N.K., Gaikwad K. Insights into PPR gene family in *Cajanus cajan* and other legume species. *Journal of Data Mining in Genomics and Proteomics*, 2016, 7: 203 (doi: 10.4172/2153-0602.1000203).
  22. Кибальник О.П. Цитологический анализ фертильности пыльцы у гибридов F<sub>1</sub> сорго на основе А3, А4 и 9Е типов ЦМС. *Мат. Межд. науч.-практ. конф., посвященной 128-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова*. Саратов, 2015: 124-125.
  23. Радченко Е.Е., Малиновская Е.В. Устойчивые к обыкновенной злаковой тле линии зернового сорго. *Защита и карантин растений*, 2012, 10: 24-25.
  24. Radchenko E.E. Inheritance of greenbug resistance in several forms of grain sorghum and sudangrass. *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42(1): 55-59 (doi: 10.1134/S1022795406010078).
  25. Роскин Г.И. *Микроскопическая техника*. М., 1951.
  26. Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Тимофеева Г.И. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле. *Методические указания ВИР /Под ред. Е.Е. Радченко*. СПб, 2010.
  27. Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haber G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A.K., Chapman J., Feltus F.A., Gowik U., Grigoriev I.V., Lyons E., Maher C.A., Martis M., Narechania A., O'tillar R.P., Penning B.W., Salamov A.A., Wang Y., Zhang L., Carpita N.C., Freeling M., Gingle A.R., Hash C.T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M.C., Ming R., Peterson D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K.F., Messing J., Rokhsar D.S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 2009, 457(7229): 551-556 (doi: 10.1038/nature07723).
  28. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, 28: 2731-2739 (doi: 10.1093/molbev/msr121).
  29. Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentini L., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R.M., Bendahmane A. Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.*, 2003; 4(6): 588-594 (doi: 10.1038/sj.embor.embor848).
  30. Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 1996, 272(5266): 1334-1336 (doi: 10.1126/science.272.5266.1334).
  31. Liu F., Cui X., Horner H.T., Weiner H., Schnable P.S. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male sterility in maize. *The Plant Cell*, 2001, 13: 1063-1078 (doi: 10.1105/tpc.13.5.1063).
  32. Jimenez-Lopez J.C., Gachomo E.W., Seufferheld M.J., Kotchoni S.O. The maize ALDH protein superfamily: linking structural features to functional specificities. *BMC Struct. Biol.*, 2010, 10: 43 (doi: 10.1186/1472-6807-10-43).
  33. Tsvetova M.I., Ishin A.G. Large pollen grains as indicators of increased ploidy level due to colchicines treatment. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 1995, 36: 77.

1ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт  
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,  
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44,  
e-mail: irina\_anisimova@inbox.ru;

Поступила в редакцию  
3 июля 2017 года

## POLYMORPHISM OF GRAIN SORGHUM FROM VIR WORLD COLLECTION FOR THE CHARACTERS ASSOCIATED WITH THE CMS-*Rf* GENETIC SYSTEM

I.N. Anisimova<sup>1</sup>, D.N. Ryabova<sup>1</sup>, E.V. Malinovskaya<sup>2</sup>, N.V. Alpatieva<sup>1</sup>, Yu.I. Karabitsina<sup>1</sup>,  
E.E. Radchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Federal Agency of Scientific Organizations, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail irina\_anisimova@inbox.ru (corresponding author);

<sup>2</sup>Kuban Experiment Breeding Station, Branch of Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Federal Agency of Scientific Organizations, 2, ul. Tsentral'naya, pos. Botanika, Gul'kevichskii Region, Krasnodarskii krai, 352183 Russia

ORCID:

Anisimova I.N. orcid.org/0000-0003-0474-8860

Alpatieva N.V. orcid.org/0000-0002-5531-2728

Ryabova D.N. orcid.org/0000-0002-1729-0900

Karabitsina Yu.I. orcid.org/0000-0002-8384-5134

Malinovskaya E.V. orcid.org/0000-0002-0547-0760

Radchenko E.E. orcid.org/0000-0002-3019-0306

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The sequencing was carried out using equipment of the ARRIAM Center of Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology (St. Petersburg).

The authors thank A.G. Pinaev (ARRIAM, St. Petersburg) for assistance in DNA sequencing

Received July 3, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.5.952eng

### Abstract

Seven different types of cytoplasmic male sterility (CMS) are known for the grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench), however, only A1 (milo) is used in heterotic hybrid breeding. The genetic control of pollen fertility restoration of CMS A1 is complex and determined by two or three *Rf* (*Restoration of Fertility*) genes, and also by a number of modifiers. It is very little known about molecular mechanisms of CMS A1 and fertility restoration. Only one gene, *Rf1*, is identified at the molecular level (R.R. Klein et al., 2005). In the present paper we have demonstrated for the first time the nucleotide polymorphism in the coding regions of the recessive and dominant alleles of *Rf2* gene and also of the candidate *RFL-PPR* gene homologous to the rice *Rf1* gene. Here, we studied polymorphism of the CMS-*Rf* genetic system related traits in sorghum accessions from the VIR collection, including the fertility restorers k-928 and k-929; a half-restorer k-1362, the sterile lines A-10598 and A-83 (CMS A1) and their fertile analogs, the F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> BC<sub>1</sub>-BC<sub>2</sub> sister lines resistant to *Schizaphis graminum* Rond. which have been isolated among the hybrids derived from crosses between the sterile (CMS A1) line N-81 and lines k-929 and k-928, and also hybrids between the sister lines. For investigating variability of candidate genes associated with the CMS-*Rf* genetic system the reference sequences were selected from the bioinformatic database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), the eighth specific primers were designed, and the fragments amplified on the DNA of genotypes differing by the ability to suppression of the CMS phenotype were sequenced. In the CMS lines and fertility restorers a significant polymorphism (18 polymorphic sites) was revealed in the 825 bp fragment of the *Rf2* coding region (reference fragment XM\_002459403.1, chromosome SDI02) and also in *RFL-PPR* candidate gene located in the chromosome 3 (reference fragment XM\_002458104.1). The sequenced regions of the structural nuclear gene *ALDH2b* encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase, the maize *Rf2* gene homolog, and also of the mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase alpha subunit were identical in the CMS and fertility restorer lines. Variability of pollen fertility indices was studied using acetocarmine stained cytological preparations. The lines resistant to *S. graminum*, and their hybrids differed in the percentage of stained (fertile) pollen grains, the presence of anomalous large pollen grains (54-70 μm in diameter), giant pollen grains (up to 84 μm in diameter) and deformed pollen grains. In the fertile F<sub>8</sub>-F<sub>12</sub> BC<sub>1</sub>-BC<sub>2</sub> lines which derived from the hybrids produced in crossings with fertility restorers, the frequency of stained pollen grains was relatively high and reached 72.2-83.8 % for k-929, and 57.4 and 63.4 % in two lines, respectively, for k-928; large pollen grains occurred at different frequency in five lines, and the giant ones were observed in two lines. The variability in pollen fertility could be due to the differences in the alleles derived from the recurrent parent.

Keywords: *Sorghum bicolor* L. Moench, grain sorghum, CMS, fertility restoration, *Rf*, pollen fertility, candidate genes, nucleotide polymorphism.