

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.04.006

# 六倍体小黑麦染色体的荧光原位杂交分析<sup>①</sup>

杨 婷<sup>1</sup>, 陈星灼<sup>1</sup>, 隋建枢<sup>2</sup>, 王 伟<sup>2</sup>, 杨春苗<sup>1</sup>,  
彭 泽<sup>1</sup>, 耿广东<sup>1</sup>, 张庆勤<sup>1</sup>, 张素勤<sup>1</sup>

1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省旱粮研究所, 贵阳 550006

**摘要:** 采用基因组原位杂交(GISH)和荧光原位杂交(FISH)技术对六倍体小黑麦进行了研究, 以鉴定其含有的黑麦染色体的数目和结构特点, 了解小黑麦基因组组成, 为其在小麦遗传育种中的应用提供参考. 分别以黑麦基因组 DNA 及 pSc200 和 pSc250 探针进行顺序 GISH-FISH 分析, 结果显示该小黑麦含有 21 对染色体, 来源于黑麦的 2 对染色体的长臂端部出现 pSc200 和 pSc250 信号, 而另外 5 对染色体的两端部都有该信号. 以 Oligo-pSc119.2-1, pSc200 和 pSc250 探针小黑麦进行了双色 FISH 分析, 发现小黑麦的 Oligo-pSc119.2-1 信号与黑麦基本相似, 而 pSc200 和 pSc250 信号与黑麦的差异较大. 以黑麦基因组 DNA 及 Oligo-pAs1-1 和 Oligo-pSc119.2-1 为探针小黑麦进行顺序 GISH-FISH 分析, 鉴定其基因组组成为 AABBRR; 同时发现小黑麦染色体的一些 FISH 信号发生了变化, 其原因可能是小黑麦形成过程中染色体结构发生了改变, 从而导致小黑麦的 DNA 重复序列呈现多态性.

**关键词:** 小黑麦; 染色体; GISH; FISH; 核型

**中图分类号:** S503

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2019)04-0042-07

在我国, 小麦是仅次于水稻的粮食作物, 对保障粮食安全具有十分重要的作用. 由于小麦育种过程中过分集中地使用一些具有优良性状的亲本, 使得小麦育成品种的遗传基础日益狭窄, 遗传脆弱性增强, 对各种不良环境的抵御能力日益下降<sup>[1]</sup>. 小麦的近缘属是一个巨大的、弥足珍贵的基因资源库, 蕴藏着非常丰富的遗传变异, 具有许多栽培小麦所不具备的优良特性, 如抗病、抗逆、耐贫瘠、高蛋白、高蛋白和大穗多花多粒等<sup>[2]</sup>. 从小麦近缘属中挖掘有益基因可以拓宽小麦遗传基础, 丰富遗传多样性, 因而利用近缘物种育种成为小麦育种的热点方向之一. 黑麦属(*Secale* L.) 是小麦的三级基因源, 黑麦具有高产、广适、抗病性好、抗逆性强、籽粒和茎叶产量高、营养成分丰富等优点<sup>[3]</sup>, 蕴藏着改良栽培小麦抗性、产量、品质、环境适应性等性状的丰富基因资源, 对于丰富小麦的遗传变异、拓展小麦的种质资源具有重要作用. 小麦与黑麦远缘杂交获得的小黑麦是第一个人工创造的新物种, 也是黑麦染色体导入小麦形成的典型双二倍体, 由于小黑麦同时具有小麦和黑麦不同属的染色体, 因而是研究异属染色体配对

① 收稿日期: 2018-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860380, 31660390); 国家“七大农作物育种”重点专项(2017YFD0100900); 贵州省农业成果转化计划(黔科合成果[2016]4022号); 贵州省普通高等学校重点实验室项目(黔教合 KY 字[2015]333); 贵州省作物学省级重点学科建设计划(黔学位合字 ZDXK[2014]8号); 贵州大学自然科学专项(贵大专户合字[2013]01号).

作者简介: 杨 婷(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事作物学的研究.

通信作者: 张素勤, 博士, 教授.

行为及相应遗传性状的理想材料<sup>[4]</sup>。世界上第一个应用在生产上的八倍体小黑麦品种于 1973 年在贵州试种成功,具有穗大、小穗数多、生长旺盛、蛋白质含量高、广泛的适应性和抗逆性等优点,对解决贵州粮食问题做出了特殊贡献<sup>[5]</sup>。李方安等<sup>[6]</sup>用 Kustro 黑麦与绵阳 11 小麦杂交,获得了小麦-黑麦双二倍体材料 MK-25,再用绵阳 11 等小麦和 MK-25 回交,从回交后代中选育出 6R 单体附加系、6RL 端体附加系及来源于 6R 单体附加系的小片段渐渗系,且发现这些附加系和小片段渐渗系材料都表现出了对白粉病免疫的特性,表明 Kustro 黑麦上的白粉病抗性基因渗入到了小麦遗传背景中,因而利用异源单体附加系等诱导外源有利基因的渐渗是可行的。

FISH 技术是以荧光素标记的核酸片段探针与染色体上的特异序列进行杂交,通过荧光检测系统检测杂交信号从而确定探针序列在染色体上的杂交位点的技术。目前,FISH 技术在染色体定位、基因克隆、遗传标记以及染色体畸变等研究中得到了广泛的应用。罗巧玲等<sup>[7]</sup>利用 GISH 和多色荧光原位杂交(mc-FISH)技术,对 8 份农艺性状优良的小麦-黑麦材料进行染色体组成分析,鉴定出 3 份为六倍体小黑麦(AABBRR),2 份为八倍体小黑麦(AABBDDRR),1 份为 1RS·1BL 易位系,其余 2 份不具有可见的黑麦染色体或染色体片段;同时发现其中的 3 份六倍体小黑麦与 2 份八倍体小黑麦所含的黑麦染色体不完全相同。李俊等<sup>[8]</sup>利用四川地方品种蓬安白麦子与秦岭黑麦杂交得到八倍体小黑麦 CD-13(AABBDDRR),并通过顺序 FISH-GISH 技术,发现该八倍体小黑麦 1RS 端部与 7DS 端部发生相互易位,鉴定其携带 1RS-7DS·7DL 小麦-黑麦小片段易位染色体。Tang 等<sup>[9]</sup>使用 Oligo-pSc119.2, Oligo-pAs1 和 Oligo-pTa535 等高度重复序列探针对中国春和绵阳 11 小麦进行双色 FISH 试验,创立了中国春和绵阳 11 小麦的 A、B 和 D 基因组染色体 FISH 核型模式图;并通过对八倍体小黑麦的顺序 FISH-GISH 试验,识别了每一条染色体。杨武娟<sup>[10]</sup>经同步的 GISH 和 FISH 技术鉴定小麦-黑麦衍生系 N9436B,发现 N9436B 包含的两条黑麦染色体是一对 1R 染色体,为小麦-黑麦 1R 附加系;并采用 Oligo-pSc119.2 探针初步建立了奥地利黑麦的 FISH 核型。何道文等<sup>[11]</sup>根据黑麦特异重复序列 pSc20H 设计特异引物,用 PCR 方法从中国春小麦与秦岭黑麦杂交后代( $BC_2F_4$ )共 75 份材料中筛选出 30 份含有黑麦成分的材料。本试验拟对小黑麦染色体进行顺序 GISH-FISH 等分析,明确黑麦(RR)染色体在小麦遗传背景中的存在形式,分析 R 染色体组的 FISH 特点,建立其 FISH 核型,分析小黑麦的染色体组成,为其在小麦遗传育种中的应用提供参考。同时,本试验有利于拓宽小麦遗传基础及创建新种质,为外源染色体的有效转移提供借鉴,加速优良小麦新品种的选育进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验植物材料为小黑麦、黑麦(RR)和野生二粒小麦(AABB);该小黑麦对白粉病、条锈病和叶锈病等小麦主要病害表现出高抗或免疫,同时又具有丰产的优点;这些纯系材料保存于国家小麦改良中心贵州分中心实验室。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 染色体制片

将种子放入盛有蒸馏水的培养皿中浸泡 24 h,待种子发芽露白后,倒掉蒸馏水,将其放在铺有湿润滤纸的培养皿中于 27℃ 恒温箱培养,待根长至 2 cm 左右时,取根尖放入湿润打孔的离心管中用  $N_2O$  处理 2 h,用 90% 冰醋酸固定 10 min,加蒸馏水润洗后切取根尖,水浴酶解滴片,用 OLMPUS BX60 显微镜镜检,选择分裂相好、染色体清晰的玻片进行后续试验。

### 1.2.2 荧光原位杂交分析

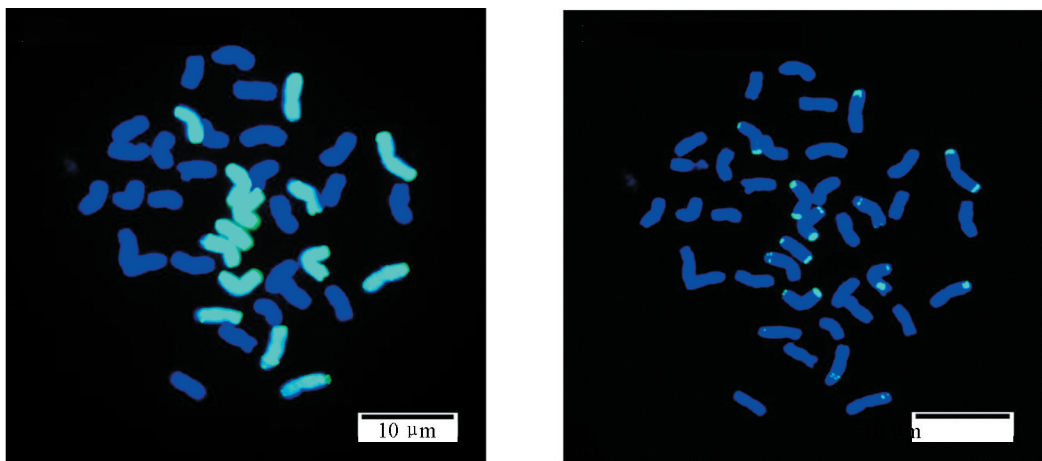
本试验中黑麦和野生二粒小麦的 DNA 提取参照黄娟<sup>[12]</sup>方法, 荧光原位杂交技术参考 Han 等<sup>[13]</sup>方法, Oligo-pAs1-1, Oligo-pSc119.2-1, pSc200 和 pSc250 探针由 Thermo Fisher Scientific(上海)公司合成. 试验中的 pSc200 和 pSc250 探针可以识别小黑麦中的 R 组染色体<sup>[14]</sup>, 而 Oligo-pSc119.2 能够辨别 R 组的每一对染色体<sup>[15]</sup>. 镜检选择 FISH 效果好的细胞用 Cellsens Standard 摄像系统照相, 选取 5 个以上分裂相好且染色清晰的细胞用于 GISH 和 FISH 分析, 以得到准确可靠的数据.

## 2 结果与分析

### 2.1 小黑麦中 R 染色体的鉴定

#### 2.1.1 小黑麦的顺序 GISH-FISH 分析

为了快速准确地区分小黑麦材料中的外源黑麦染色体, 本试验分别以黑麦基因组 DNA(绿)为 GISH 探针, 以切断的野生二粒小麦基因组 DNA 为封阻, 以 pSc200(绿)和 pSc250(绿)为 FISH 探针, 进行了顺序 GISH-FISH 分析(图 1). FISH 结果显示, 小黑麦含有 21 对染色体, 其中包括来源于黑麦的 7 对整条染色体, 没有发现易位染色体; 有 2 对染色体只在染色体长臂端部出现杂交信号, 另外 5 对染色体的两端部都有杂交信号, 但信号的强弱有所差异. 该 FISH 和 GISH 结果一致, 表明 pSc200 和 pSc250 为黑麦染色体端部特异重复序列探针, 可用于小黑麦背景中黑麦染色体的快速检测.



(a) GISH 图, 黑麦染色体为绿色

(b) FISH 图, pSc200 和 pSc250 探针为绿色

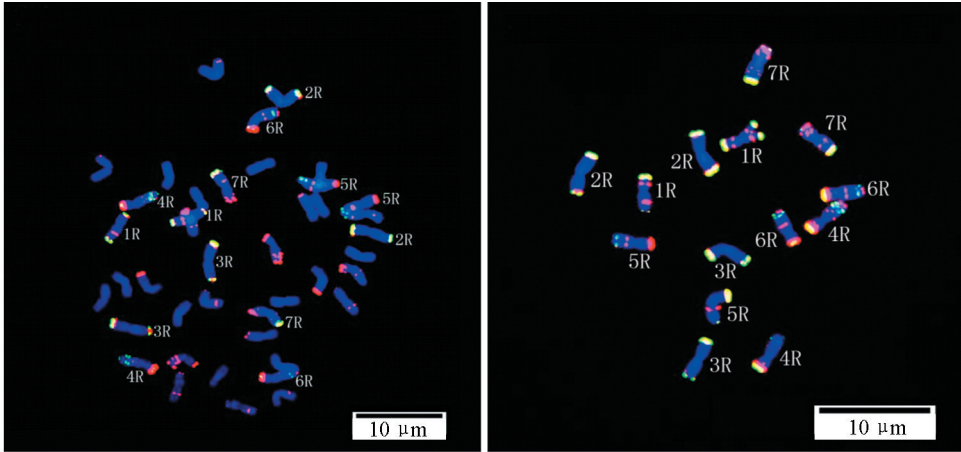
背景染色体由 DAPI 复染为蓝色; 比例尺为 10  $\mu\text{m}$ .

图 1 小黑麦中 R 染色体的顺序 GISH-FISH 分析

#### 2.1.2 小黑麦中 R 染色体的 FISH 核型

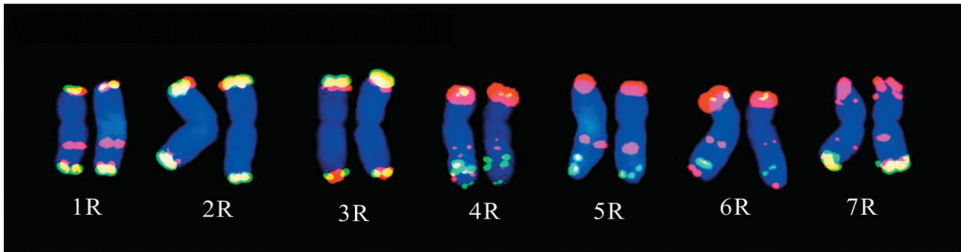
为了进一步识别小黑麦中黑麦的每一条染色体, 以 Oligo-pSc119.2-1(红), pSc200(绿)和 pSc250(绿)为探针分别对小黑麦和黑麦材料进行了双色 FISH 分析, 初步建立了小黑麦中 R 组染色体的 FISH 核型(图 2). 结果显示, 小黑麦的 2R 和 3R 染色体信号很相似, 都只在端部有信号, 但可依据着丝粒位置不同区分出 2R 和 3R 染色体(2R 染色体着丝粒位于染色体亚中部, 而 3R 染色体着丝粒在中部). 通过对比小黑麦和黑麦的杂交信号, 发现 Oligo-pSc119.2-1 探针在两个材料中的信号位点基本相似, 只有小黑麦 1R 染色体短臂丢失了中间的信号. pSc200 和 pSc250 探针在小黑麦和黑麦两个材料中的信号差异较大, 小黑麦的信号相对黑麦有减弱或丢失现象, 如 1R 染色体短臂近端部、4R 染色体短臂端部、6R 染色体两端部的信号都出现减弱; 7R 染色体短臂端部的信号丢失; 而 5R 染色体长臂上的信号却增强了; 并且 pSc200 和

pSc250 探针只在 5R 和 7R 长臂端部出现杂交信号. 由上述可知, 小黑麦中几个 R 组染色体的 FISH 信号发生了一些变化, 其原因可能是在小黑麦形成过程中染色体结构发生了改变, 从而使小黑麦的 DNA 重复序列呈现多态性.

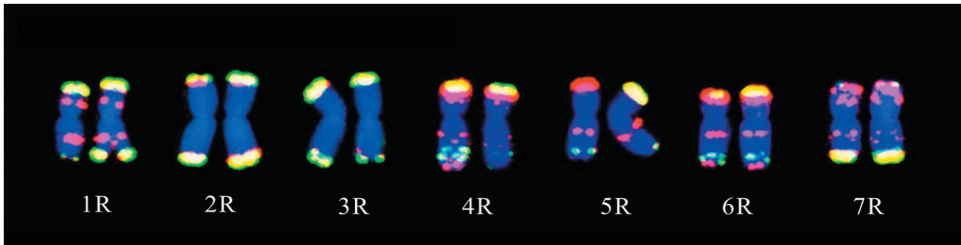


(a) 小黑麦的 FISH 核型

(b) 黑麦的 FISH 核型



(c) 小黑麦中黑麦染色体的 FISH 特点



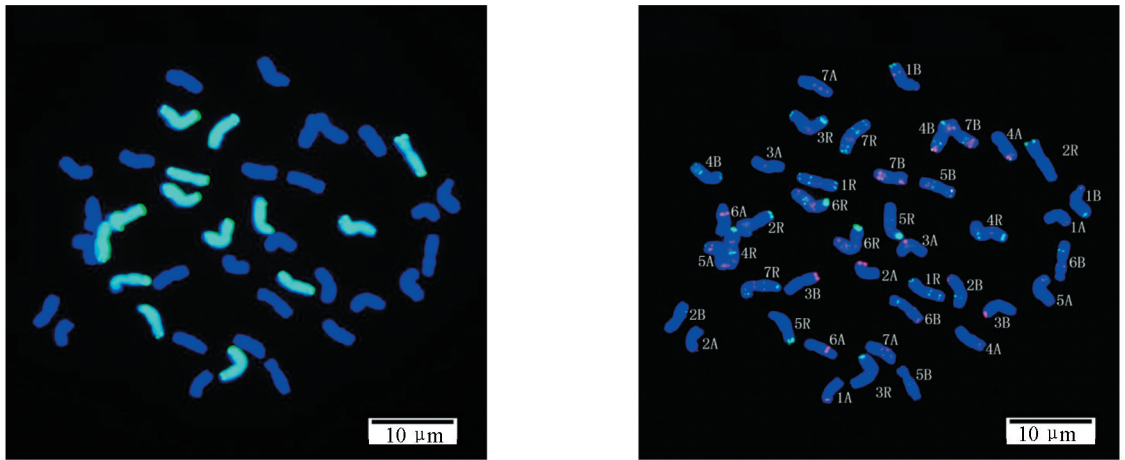
(d) 黑麦的 FISH 特点

Oligo-pSc119. 2-1 探针为红色, pSc200 和 pSc250 探针为绿色; 背景染色体由 DAPI 复染为蓝色, 比例尺为 10  $\mu\text{m}$ .

图 2 小黑麦中 R 染色体组的 FISH 核型

## 2.2 小黑麦的染色体组成

本试验以黑麦基因组 DNA(绿)为 GISH 探针, 以切断的野生二粒小麦基因组 DNA 为封阻, 以 Oligo-pAs1-1(红)和 Oligo-pSc119. 2-1(绿)为 FISH 探针进行顺序 GISH-FISH 分析(图 3), 参照中国春(AABBDD)等小麦<sup>[9]</sup>和黑麦<sup>[10]</sup>的 FISH 核型, 发现该小黑麦的染色体组成为 AABBRR, 即小黑麦的染色体构型为  $2n = 42 = 28(\text{AB 组}) + 14(\text{R 组})$ . 该小黑麦的 A 组和 B 组染色体信号与已报道的硬粒小麦(AABB)<sup>[16]</sup>和中国春小麦<sup>[9]</sup>等都有所差异. 与中国春小麦对比发现, 该小黑麦的 A 组和 B 组染色体 Oligo-pAs1-1 的杂交信号整体增强, 特别是 5A 短臂近端部、6A 长臂中间和 3B 短臂端部出现明显的杂交信号; 而 Oligo-pSc119. 2-1 的信号出现减弱或丢失现象, 例如, 5A, 2B 和 3B 短臂端部都有信号丢失或减弱现象. 与硬粒小麦相比, 发现 Oligo-pSc119. 2-1 杂交信号减弱或丢失明显, 这可能是因为在小黑麦形成过程中, 其染色体结构发生了变异.



(a) GISH 图, 黑麦染色体为绿色

(b) FISH 图, Oligo-pAs1-1 探针为红色, Oligo-pSc119.2-1 探针为绿色

背景染色体由 DAPI 复染为蓝色, 比例尺为 10  $\mu\text{m}$ 。

图 3 小黑麦根尖细胞染色体的顺序 GISH-FISH 分析

### 3 讨 论

通过远缘杂交将小麦亚族植物优异基因渗入到小麦遗传背景中, 能够快速有效地检测和跟踪外源染色体。进行普通细胞学观察和 GISH 技术不仅能快速检测小麦背景中的外源遗传物质, 还能揭示外源染色体在遗传上的不稳定对远缘杂交后代遗传稳定性的影响, 在理论研究和育种实践中都有非常重要的意义<sup>[17]</sup>。杂交技术根据所用探针不同, 可分为 GISH, FISH, 物种专化重复序列原位杂交和单拷贝或寡拷贝序列原位杂交等<sup>[18]</sup>。本试验利用 GISH 技术, 快速区分小黑麦中的外源 R 组染色体。GISH 技术能直观准确地检测出外源染色体及其片段, 但无法快速有效地鉴定出具体的外源染色体, 以及与这些外源染色体发生交换或重组的具体小麦染色体, 尤其是难分辨亲缘关系比较近的染色体组, 而重复序列探针的 FISH 技术就具有一定的互补优势。本试验利用双色 FISH 技术能够在染色体水平上准确辨别来源于黑麦 R 组的每一条染色体。pSc200 和 pSc250 探针为黑麦端部特异重复序列, 只在 R 组染色体端部出现杂交信号, 这有利于快速高效地识别小黑麦中的 R 组染色体; 而 Oligo-pSc119.2-1 杂交信号较强, 其信号在小麦、黑麦染色体上都有分布, 且能识别 R 组每一条染色体。

Alkhimova 等<sup>[19]</sup>利用重复序列 pSc200 为探针, 对一整套中国春-帝国黑麦二体附加系进行研究, 发现黑麦染色体 1R, 2R, 3R, 5R 和 7R 的端部或亚端部都存在变异。符书兰<sup>[20]</sup>分别利用 Kustro 黑麦、AR106BONE 黑麦与绵阳 11 小麦杂交, 获得的两种双二倍体材料进行 FISH 试验, 发现在来自不同组合的小麦-黑麦双二倍体中, pSc200 探针在黑麦染色体上的杂交信号不同; 另外, 其杂交信号的增减在所观察的细胞中都表现一致, 证明探针 pSc200 的变异不是随机的, 其结果还表明外源种质的供体种与受体种之间的确存在相互作用, 且这种相互作用在多倍化早期就开始了。蒋敏<sup>[21]</sup>将绵阳 26 小麦与秦岭黑麦杂交得到 F<sub>1</sub> 种子, 经人工加倍后获得双二倍体材料 MQ, 对 MQ 与绵阳 26 小麦的杂种 F<sub>1</sub> 代进行了分析, 发现黑麦染色体 6R 长臂亚端部的 pSc119.2 信号出现了明显的缺失, 黑麦基因组重复序列发生了变异, 变异区域位于 6R 染色体长臂的亚端部。葛群等<sup>[22]</sup>利用 GISH 和 FISH 相结合的方法, 对绵阳 11 小麦和抗病的威宁黑麦杂交、回交后代进行试验, 分别鉴定出一个 1R 和 5R 单体附加系, 发现黑麦染色体 1R 和 5R 单体附加系可以诱导小麦染色体变异。本试验小黑麦中 1R, 4R, 5R, 6R 和 7R 染色体的 FISH 信号出现减弱、增强或缺失等变异情况, 这与 Alkhimova 等<sup>[19]</sup>、符书兰<sup>[20]</sup>和蒋敏<sup>[21]</sup>的研究存在相似之处; 其原因可能是在小黑

麦多倍体化过程中造成基因组 DNA 含量的显著扩大,引起基因组的不稳定,导致 DNA 重复序列发生了变异,从而拓宽了小麦遗传背景,丰富了小麦种质资源.重复序列在植物基因组中占有很大比例,重复序列的扩增和分化导致了植物基因组进化<sup>[23]</sup>.本试验小黑麦是由一种四倍体小麦(AABB)和黑麦(RR)经远缘杂交以及染色体加倍后获得的六倍体小黑麦(AABBRR)新种质,新形成的多倍体会通过序列的大量丢失,尤其是重复序列的大量丢失等方式控制 DNA 含量,从而更有利于新合成的多倍体在自然界的存活与进化.该种质种植于贵州高海拔生态区,粒大饱满,次生根系发达,顶二叶叶面积较大,根据王志伟等<sup>[24]</sup>对高海拔生态区不同小麦品种叶面积、叶绿素相对质量分数、根系性状及产量的研究结果,该种质具有较大增产潜力,这有待后续深入研究.

## 参考文献:

- [1] 李德炎. 小麦育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 1976.
- [2] 安调过, 许红星, 许云峰. 小麦远缘杂交种质资源创新 [J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(5): 1011-1019.
- [3] 刘成, 杨足君, 冯娟, 等. 黑麦 6R 染色体特异性 PCR 标记的建立 [J]. 麦类作物学报, 2007, 27(1): 35-40.
- [4] 孙元枢. 中国小黑麦遗传育种研究与应用 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2002.
- [5] 吴金华, 吉万全, 李凤珍. 黑麦在小麦改良中的应用研究进展 [J]. 麦类作物学报, 2005, 25(1): 115-119.
- [6] 李方安, 唐宗祥, 符书兰. 新型小麦-黑麦 6R 附加系的创制及其白粉病抗性基因向小麦中的渗进 [J]. 麦类作物学报, 2014, 34(1): 34-38.
- [7] 罗巧玲, 郑琪, 许云峰, 等. 390 份小麦-黑麦种质材料主要农艺性状分析及优异材料的 GISH 与 FISH 鉴定 [J]. 作物学报, 2014, 40(8): 1331-1339.
- [8] 李俊, 朱欣果, 万洪深, 等. 1RS-7DS. 7DL 小麦-黑麦小片段易位系的鉴定 [J]. 遗传, 2015, 37(6): 590-598.
- [9] TANG Z X, YANG Z J, FU S L. Oligonucleotides Replacing the Roles of Repetitive Sequences pAs1, pSc119. 2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC. 1 for FISH Analysis [J]. Journal of Applied Genetics, 2014, 55(3): 313-318.
- [10] 杨武娟. 抗白粉病的多小穗小麦-黑麦 1R 附加系的分子细胞遗传学研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [11] 何道文, 彭正松, 伍碧华. 利用基于重复序列 PCR 的标记和 A-PAGE 鉴定小麦背景中的黑麦染色体片段 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(5): 66-69.
- [12] 黄娟. 普通小麦-华山新麦草-黑麦三属杂种后代衍生系的分子细胞遗传学鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.
- [13] HAN F P, LAMB J C, BIRCHLER J A. High Frequency of Centromere Inactivation Resulting in Stable Dicentric Chromosomes of Maize [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(9): 3238-3243.
- [14] HESLOPHARRISON J S. Molecular Diversification of Tandemly Organized DNA Sequences and Heterochromatic Chromosome Regions in Some Triticeae Species [J]. Chromosome Research, 1996, 4(7): 517-525.
- [15] MCINTYRE C L, PEREIRA S, MORAN L B, et al. New Secale Cereale (rye) DNA Derivatives for the Detection of Rye Chromosome Segments in Wheat [J]. Genome, 1990, 33(5): 635-640.
- [16] 陈星灼, 彭红, 王亚, 等. 硬粒小麦染色体的 FISH 核型分析 [J]. 种子, 2018, 37(3): 12-14, 18.
- [17] 安洪周, 胡梅, 郑会敏, 等. 提莫菲维小麦与光稈野燕麦远缘杂交后代花粉母细胞减数分裂行为分析 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(2): 295-300.
- [18] 杨足君, 冯娟, 周建平, 等. 原位杂交鉴定导入小麦的多年生簇毛麦染色质 [J]. 西南农业学报, 2005, 18(5): 608-611.
- [19] ALKHIMOVA A G, HESLOP-HARRISON J S, SHCHAPOVA A I, et al. Rye Chromosome Variability in Wheat-rye Addition and Substitution Lines [J]. Chromosome Research, 1999, 7(3): 205-212.
- [20] 符书兰. 普通小麦(*Triticum aestivum* L.)与黑麦(*Secale cereale* L.)异源多倍体及异染色体系的分子细胞学研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.

- [21] 蒋敏. 初级八倍体小黑麦中黑麦染色体的变异 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [22] 葛群, 杨漫宇, 晏本菊, 等. 黑麦染色体 1R 和 5R 单体附加诱导的小麦和黑麦染色体的变异和易位 [J]. 麦类作物学报, 2014, 34(5): 603-608.
- [23] FLAVELL R B. Repetitive DNA and Chromosome Evolution in Plants [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1986, 312(1154): 227-242.
- [24] 王志伟, 乔祥梅, 程加省, 等. 不同小麦品种叶面积、叶绿素相对质量分数、根系性状及产量的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(8): 10-15.

## Chromosomal Analysis of Hexaploid *Triticale* by Fluorescence *in situ* Hybridization

YANG Ting<sup>1</sup>, CHEN Xing-zhuo<sup>1</sup>, SUI Jian-shu<sup>2</sup>,  
WANG Wei<sup>2</sup>, YANG Chun-miao<sup>1</sup>, PENG Ze<sup>1</sup>,  
GENG Guang-dong<sup>1</sup>, ZHANG Qing-qin<sup>1</sup>, ZHANG Su-qin<sup>1</sup>

1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Institute of Upland Crops, Guiyang 550006, China

**Abstract:** In the present study, GISH (genomic *in situ* hybridization) and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) techniques were employed to identify the chromosome number and structure of rye in hexaploid *Triticale* and to understand its genomic composition, which would provide reference for wheat genetics and breeding. Sequential GISH-FISH analysis with the rye genomic DNA, pSc200 and pSc250 probes showed that *Triticale* contained 21 pairs of chromosomes, of which 2 pairs derived from rye had pSc200 and pSc250 signals at the ends of the long arms, and other 5 pairs had the same signals at the ends of both arms. The two-color FISH analysis of *Triticale* with Oligo-pSc119.2-1, pSc200 and pSc250 probes showed that Oligo-pSc119.2-1 signals in *Triticale* was basically similar to those of the rye, but some signals of pSc200 and pSc250 probes were different between *Triticale* and the rye. Sequential GISH-FISH analysis of *Triticale* using the rye genomic DNA, Oligo-pAs1-1, and Oligo-pSc119.2-1 probes revealed that the genomic composition of *Triticale* was AABBRR. In addition, some FISH signals on *Triticale* chromosomes changed, which might be due to changes in the chromosome structure during *Triticale* formation. Therefore, DNA repeat sequences of *Triticale* were polymorphic.

**Key words:** *Triticale*; chromosome; GISH; FISH; karyotype

