



杨军丽,郎旭,张延明,等.越冬小黑麦材料的创制及细胞遗传学研究[J].黑龙江农业科学,2020(10):16-24.

# 越冬小黑麦材料的创制及细胞遗传学研究

杨军丽<sup>1</sup>,郎旭<sup>1</sup>,张延明<sup>1</sup>,张举梅<sup>2</sup>,赵海滨<sup>2</sup>,金慧<sup>2</sup>,吴玉娥<sup>2</sup>,王晓萍<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院,黑龙江 哈尔滨 150025;2. 黑龙江省农业科学院 草业研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为选育能够在黑龙江省等高寒地区顺利越冬的冬性小黑麦中间材料,本研究利用远缘杂交手段,将中饲232、鉴3、4-29、4-30和4-31共5份六倍体小黑麦分别与俄罗斯冬黑麦( $R_0R_0$ ,  $2n=14$ )杂交,对杂交试验结果及杂种后代进行田间农艺性状调查和细胞遗传学分析。结果表明:经2018-2019年连续两年的田间杂交,共杂交406穗,获得 $F_1$ 杂交种1100粒,平均杂交结实率在8.31%~25.51%,籽粒饱满度低。杂种 $F_1 \sim F_3$ 经田间越冬筛选,共获得12份可在哈尔滨地区顺利越冬的小黑麦杂交材料,杂种植株形态与亲本相比类型丰富,表现为植株生长茂盛、抗寒能力强、多分蘖(最多有效分蘖36个)、大穗(最长17.23 cm)且穗底部多花等特点。细胞遗传学鉴定杂种 $F_1$ 体细胞染色体数目在25~42条,其中21份为42条染色体;通过花粉母细胞减数分裂观察表明,普遍存在6~9个二价体,单价体数目在6~16个。杂种 $F_2$ 体细胞染色体数目多数为42条,通过基因组原位杂交(GISH)鉴定结果表明,4份杂种 $F_2$ 中含有14条冬黑麦染色体。

**关键词:**小黑麦;冬黑麦;细胞遗传学;原位杂交

小麦(*Triticum aestivum* L.)是主要的粮食作物之一,其栽培面积和总产量对经济发展有重要作用。通过遗传改良选育小麦优良品种,是目前提高小麦产量的有效方法之一<sup>[1]</sup>。黑麦属(*Secale* L.)为禾本科(Poaceae)植物,隶属小麦族(Triticeae)小麦亚族(Triticinae),其中黑麦(*Secale cereale* L.)为小麦三级基因源<sup>[2]</sup>,含有一个R染色体组( $2n=14$ , RR),是小麦的近缘物种。小黑麦(Triticale)是小麦属(*Triticum*)与黑麦属植物属间杂交及染色体加倍形成的双二倍体新物种,具有抗逆性强、适应性强及蛋白质含量高<sup>[3]</sup>等优良特性,同时具有多分蘖、耐寒、耐瘠薄等特征,因其遗传变异丰富,可作为改良小麦品质、产量和抗逆性等性状的重要基因资源<sup>[4]</sup>。

通过远缘杂交手段将黑麦优异基因性状导入小麦中,是目前小麦育种研究者们获得新种质的重要途径之一。Wilson在1875年首次利用普通小麦和黑麦杂交获得小麦-黑麦杂种,随后研究者利用杂交、自交和回交等方法,选育出许多优良品

种,如小黑麦2号、小黑麦3号、劲松5号和黔中1号等,具有高结实率和高籽粒饱满度等优良特性,可广泛应用到生产实践<sup>[5-7]</sup>。在小麦遗传改良中已培育鉴定出多个小麦-黑麦易位系,常用的有1R/1B代换系及1R附加系,应用最普遍的是1BL/1RS易位系<sup>[8]</sup>。近年来,在黑龙江省等西北冷、凉地区,春旱、高温及降雨量等地方气候因素,对春小麦的产量和品质造成了严重影响,导致小麦种植面积减少<sup>[9]</sup>。因此可对冬小麦进行培育,建立两年三作的种植模式,不仅可以保护因冬季气温低、降雪量不平衡等导致的土地裸露及土地贫瘠化现象,还能提高了单位面积土地的生产力,增加粮食产量<sup>[10]</sup>。佟明耀等<sup>[11]</sup>结合越冬栽培措施,培育出能够在黑龙江省地区安全越冬的“东农冬麦1号”冬小麦新品种(系),但试验推广范围较小。引进其他地区的冬性小麦在黑龙江省地区种植后,由于冬季气候寒冷多变,无法安全过冬。所以对于抗寒性材料的创制,可利用性状良好的小麦、小黑麦品种与强冬性黑麦品种,进行远缘杂交获得粮饲兼用型冬小麦品种<sup>[9]</sup>。

冬黑麦作为俄罗斯地区第二大类农作物,对种植土地的选择和气候环境有很强的适应性,同时具备了黑麦的抗逆性及稳产性,在黑龙江省冬季种植亦可安全越冬<sup>[12]</sup>。本研究以六倍体小黑麦与抗寒性强的俄罗斯冬黑麦进行杂交试验,借助哈尔滨地区冬季寒冷漫长的气候环境,结合田

收稿日期:2020-06-30

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFE0110400);国家科技重大专项和重点研发项目(GX18B009);黑龙江省自然科学基金项目(C2017040);哈尔滨师范大学研究生创新项目(HSDSSCX2019-15)。

第一作者:杨军丽(1995-),女,在读硕士,从事分子遗传学研究。E-mail:1393487184@qq.com。

通信作者:王晓萍(1972-),女,博士,教授,从事分子遗传学研究。E-mail:dr\_wxp@sina.com。



间农艺性状调查和细胞遗传学的研究方法,选育能够在哈尔滨地区顺利过冬及抗寒性强的冬性小黑麦中间材料。本研究将拓宽小黑麦遗传资源,为选育适宜黑龙江省等寒冷地区冬季种植的麦类作物提供材料基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

母本:5份六倍体小黑麦,其中鉴3(AAB-BRR,  $2n=6x=42$ )、中饲232(AABBRR,  $2n=6x=42$ ),引自山西省农业科学院;4-29(AAB-BRR,  $2n=6x=42$ )、4-30(AABBRR,  $2n=6x=42$ )、4-31(AABBRR,  $2n=6x=42$ ),引自黑龙江省农业科学院。父本:俄罗斯冬黑麦( $R_0R_0$ ,  $2n=14$ ),具有抗寒性,能够在黑龙江省哈尔滨地区田间裸露生长情况下顺利越冬,材料引自黑龙江省农业科学院,来源于俄罗斯。

供试杂交组合包括中饲232×冬黑麦、鉴3×冬黑麦、4-29×冬黑麦、4-30×冬黑麦、4-31×冬黑麦。供试材料还有杂种 $F_1$ 和 $F_2$ 材料。

### 1.2 方法

1.2.1 田间播种与杂交 亲本材料分别于2018和2019年3月末播种在哈尔滨师范大学生命科学与技术学院试验田。分批种植,间隔4~7 d,便于花期相遇、田间杂交。田间杂交共配制5组杂交组合:中饲232×冬黑麦、鉴3×冬黑麦、4-29×冬黑麦、4-30×冬黑麦、4-31×冬黑麦。期间正常播种和施肥管理。田间杂交试验自春季5~6月进行,杂交方法采用常规法及捻穗法相结合。

1.2.2 田间农艺性状调查 田间农艺性状描述依据《小麦种质资源描述规范和数据标准》,对研究材料进行观察,统计如下相关性状。每份研究材料选取3~5个单株进行考种(单株杂交材料则选取3~5个单穗考种)。

株高:从地面(分蘖节处)至主茎顶端(不计芒长)的长度,单位 cm;

穗长:麦穗基部到穗顶端(不计芒长)的距离,单位 cm;

小穗数:每株的小穗数,包括有效小穗数(结实)和无效小穗数(无籽粒);

每穗小花数:每小穗中间的小花数;

总分蘖数:从地面上小麦基部处发生的所有分支;

有效分蘖数:所有植株中可结实的分蘖;

结实率:有效结实数/小穗数×每穗小花数;

生育期:播种期、出苗期、分蘖期、抽穗期、开花期、成熟期。

1.2.3 种子萌发及体细胞染色体检测 将种子放入垫有两层滤纸的培养皿中,加水充分浸泡,23.5℃培养箱中吸胀过夜;待种子露白后,保持水分潮湿且不流动即可,腹沟朝下摆放;露白种子转入4℃冰箱内培养48 h;低温处理后,放入23.5℃培养箱中继续培养;待根尖(主根)生长至1.5~2.0 cm时(侧根长至1.0~1.5 cm),剪下放入冰水混合物的离心管中0℃条件处理36~48 h;倒掉冰水,加入1.0~1.5 mL卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1),4℃冰箱中固定48 h;吸取固定液,根尖用蒸馏水冲洗2~3遍,加入70%乙醇,-20℃冰箱中储存(或加入1%醋酸洋红进行染色),备用;将根尖采用常规压片法或酶解法进行染色体制片,镜检,统计结果。

1.2.4 花粉母细胞减数分裂观察 6月中旬,9:00-10:00时和14:00-15:00时取材,选取大小适宜的穗苞(取旗叶与剑叶之间宽度约2~3指的幼穗),取出花药(颜色是淡黄色或黄绿色为宜)后迅速置于装有卡诺固定液的离心管中固定;固定30 min,更换一次固定液,将材料固定24 h左右;吸出固定液,冲洗3次,加入70%乙醇,-20℃条件下长期保存。待观察时取出花药,蒸馏水清洗2~3遍;加入1%醋酸洋红染色;应用常规压片法进行染色体制片;镜检,采集图像照片,进行数据统计。

1.2.5 基因组原位杂交检测 植物总基因组DNA提取采用CTAB法<sup>[13]</sup>,略有改动。原位杂交实验以“冬黑麦”基因组DNA为探针,“普通小麦”DNA为封阻,GISH实验方法参照Liu等<sup>[14]</sup>。

1.2.6 数据分析 试验数据采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析,样本间差异显著性用Duncan's检验,整理数据和作图过程在Excel 2007、Photoshop CS3软件下完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交试验结果

由表1可知,田间杂交总穗数共406株,其中215穗结实,获得杂种 $F_1$ 共1100粒,平均杂交结实率在8.31%~25.51%。杂交后代中“鉴3×冬黑麦”组合平均结实率最高,为25.51%,获得杂种280粒;“4-30×冬黑麦”组合结实粒数最多,为327粒,平均结实率是23.36%;“4-31×冬黑麦”组合平均结实率在所有杂交组合中最低,只有

8.31%。

2.2 田间农艺性状调查结果

2.2.1 亲本材料田间农艺性状调查 对亲本材料生育期调查如表 2 所示,父本冬黑麦出苗期最早,较母本材料提前约 10~14 d,与 4-31 材料抽穗期及开花期相接近,籽粒饱满度好;母本 4-29 与 4-30 开花期平均在 6 月 19-20 日,植株成熟期在 8 月初;中饲 232 与鉴 3 开花期最晚,平均在 6 月 20 日之后,成熟时已 9 月初,抽穗期较冬黑麦相差 17~20 d,生育期长。

表 1 杂交组合的配制

Table 1 The preparation of hybrid combinations

杂交组合	杂交穗数	结实穗数	结实数	杂交结实率
Hybrid combinations	Hybrid spike	Fruiting spike	Seeds number	Hybrid seed-setting rate/%
中饲 232×冬黑麦	74	30	130	13.70
鉴 3×冬黑麦	48	38	280	25.51
4-29×冬黑麦	37	32	163	17.50
4-30×冬黑麦	67	53	327	23.36
4-31×冬黑麦	180	62	200	8.31

表 2 亲本材料田间生育期调查 (月-日)

Table 2 Investigation of parental materials in field growth period (month-day)

品系名	播种期	出苗期	分蘖期	抽穗期	开花期	成熟期
Line	Sowing	Seedling	Tillering	Heading	Flowering	Maturity
冬黑麦	03-30	04-07	05-04	06-02	06.-2	07-22
中饲 232	03-30	04-20	05-04	06-19	06-23	09-05
鉴 3	03-30	04-17	05-04	06-24	06-27	09-10
4-29	03-30	04-16	05-01	06-04	06-20	08-01
4-30	03-30	04-21	05-06	06-15	06-19	07-28
4-31	03-30	04-17	05-03	05-31	06-10	07-20

注:生育期调查时间为平均日期。

Note:Fertility period survey time is the average date.

对亲本材料田间农艺性状调查结果如表 3 所示,亲本材料的株高在 69.93~137.97 cm,其中 4-31 株高为 69.93 cm,株高最低,显著低于其他植株,但分蘖数与穗粒数最多,每穗可收获约 80 粒种子;鉴 3 和中饲 232 的植株长势均等,株高约 120 cm,小穗数在 28~29 个,二者除小花数性状间差异显著外,其他性状差异均不显著;4-29 和 4-30 平均株高约为 90 cm,平均分蘖数相同,约包括 9 个,每穗的穗粒数在 56~65 粒,二者各性状间无显著性差异,整体较父本生长茂盛,结实数高。

表 3 亲本材料田间农艺性状调查

Table 3 Investigation of agronomic traits in parental materials

材料	株高	穗长	小穗数	小花数	穗粒数	分蘖数
Materials	Plant height/cm	Spike length/cm	Number of spikelets	Number of florets	Seeds of spike	Number of tillers
冬黑麦	137.97±9.31 a	13.00±1.13 a	27.33±1.25 ab	2.00±0.00 c	35.67±7.59 b	12.33±2.87 a
中饲 232	124.57±8.27 a	11.40±0.45 ab	29.00±3.74 ab	5.00±0.00 a	50.67±6.34 b	8.67±1.25 a
鉴 3	125.33±5.45 a	10.00±0.57 bc	28.67±3.30 ab	3.33±0.47 b	36.33±4.19 b	7.00±1.63 a
4-29	90.57±2.29 b	11.53±0.54 ab	26.33±0.94 ab	3.33±0.47 b	56.00±9.00 b	9.00±1.63 a
4-30	90.63±3.06 b	12.77±0.39 a	30.00±2.94 a	3.33±0.47 b	65.33±8.18 ab	9.00±0.82 a
4-31	69.93±5.11 c	8.90±1.14 c	23.67±0.94 b	5.00±0.00 a	79.67±2.87 a	12.00±3.74 a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著性(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters after data in the same column indicate the significant difference (P<0.05). The same below.



2.2.2 杂交种田间农艺性状调查 2018 年 9 月末,将 F<sub>1</sub>代 393 粒杂交种分别播种于温室花盆和田间自然条件下。温室播种 220 粒杂种 F<sub>1</sub>,成活 151 株;田间播种 173 粒杂种 F<sub>1</sub>,截止 2018 年

10 月16 日覆膜前,共计出苗 66 株(图 1A-C),低温覆膜后降雪如图 1D 所示,统计出苗率为 38.15%,且 50%小麦苗已进入分蘖期。杂种 F<sub>1</sub>播种后共存活 155 株植株。



A: F<sub>1</sub>18J3-D-2 出苗期;B: F<sub>1</sub>18429-D-5 出苗期;C: F<sub>1</sub>18430-D-6 出苗期;D: 秋播覆雪;E: F<sub>1</sub>18J3-D-2 返青期;F: F<sub>1</sub>18429-D-5 返青期;G: F<sub>1</sub>18430-D-5 返青期;H: F<sub>1</sub>18430-D-6 返青期  
A: F<sub>1</sub>18J3-D-2 emergence stage; B: F<sub>1</sub>18429-D-5 emergence stage; C: F<sub>1</sub>18430-D-6 emergence stage; D: After autumn sowing, it is covered with snow; E: F<sub>1</sub>18J3-D-2 green stage; F: F<sub>1</sub>18429-D-5 green stage; G: F<sub>1</sub>18430-D-5 green stage; H: F<sub>1</sub>18430-D-6 green stage

图 1 秋播杂种 F<sub>1</sub>出苗期与返青期调查

Fig. 1 Investigation on emergence stage and green stage of F<sub>1</sub> hybrids after autumn sowing

2019 年 4 月初,田间 F<sub>1</sub>共 4 份材料 F<sub>1</sub>18J3-D-2、F<sub>1</sub>18429-D-5、F<sub>1</sub>18430-D-5 和 F<sub>1</sub>18430-D-6 顺利越冬(图 1E-H),越冬存活率为 6.1%。对越冬杂种 F<sub>1</sub>生育期进行调查,发现 F<sub>1</sub>代植株生育期较长,2018 年 9 月 21 日播种,成熟期均在 2019

年 7 月中下旬(图 2A-D)。F<sub>1</sub>18430-D-5 分蘖期在 2019 年 5 月 12 日,其余均在越冬前进入分蘖期;5 月中旬,杂种 F<sub>1</sub>植株长势较快,分蘖数增多;4 份材料抽穗期与开花期相似,分别在 5 月底和 6 月 10 日左右。



A: F<sub>1</sub>18J3-D-2; B: F<sub>1</sub>18429-D-5; C: F<sub>1</sub>18430-D-5; D: F<sub>1</sub>18430-D-6

图 2 秋播杂种 F<sub>1</sub>成熟期观察

Fig. 2 Investigation on the mature stages of F<sub>1</sub> hybrids after autumn sowing

对越冬杂种 F<sub>1</sub>农艺性状调查如表 4 所示,获得 F<sub>2</sub>代杂种 821 粒。F<sub>1</sub>18J3-D-2 植株最高,约

134 cm,与其他 3 个材料差异显著,总分蘖数达到 96 个,但未结实。F<sub>1</sub>18430-D-6 株高约 115 cm,



平均穗长最长,为 17.23 cm,穗形稍弯曲,与母本 9 个,同其它越冬材料差异较大,结实率超过 4-30 穗形相似,有效分蘖数 28 个,结实率偏低。50%。杂种 F<sub>1</sub>18429-D-5 小穗数与小花数分别为 32 和 5 个,平均结实率 2.32%。

表 4 杂种 F<sub>1</sub>农艺性状调查结果

Table 4 Survey results of agronomic traits on F<sub>1</sub> hybrids

材料 Materials	株高 Plant height/cm	穗长 Spike length/cm	总分蘖数 Total tillers number	有效分蘖数 Effective tillers number	小穗数 Spikelets number	小花数 Florets number	结实率 Seed-setting rate/%
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	134.08±11.84 a	12.10±0.61 b	96	0	-	-	0
F <sub>1</sub> 18429-D-5	97.73±14.64 c	15.98±0.73 a	58	36	32.33±3.50 a	4.67±0.47 b	2.32±0.01 b
F <sub>1</sub> 18430-D-5	78.02±5.89 d	13.72±1.46 b	10	9	26.00±2.52 b	4.67±0.47 b	59.32±0.13 a
F <sub>1</sub> 18430-D-6	115.25±8.30 b	17.23±0.94 a	46	28	30.00±5.45 ab	5.50±0.76 a	1.80±0.01 b

注:“-”表示性状不存在;同列不同小写字母代表差异显著( $P<0.05$ )。  
Note:“-” indicates that the trait doesn't exist;different lowenase in the same line indicate significant difference( $P<0.05$ ).

将 2019 年 7 月在温室收获的 23 份杂种 F<sub>2</sub> 材料和田间收获的 8 份杂种 F<sub>3</sub> 材料于 2019 年 9 月 18-19 日秋播,进行越冬性检测。2020 年 3 月底统计顺利越冬的杂种材料共 8 份,包括 F<sub>3</sub> 18431-D-24、F<sub>3</sub> 18431-D-40、F<sub>2</sub> 18ZS-D-1、F<sub>2</sub> 18J3-D-4、F<sub>2</sub> 18430-D-8、F<sub>2</sub> 18430-D-22、F<sub>2</sub> 18J3-D-2 和 F<sub>2</sub> 18429-D-5。

2.3 杂交后代材料体细胞染色体数目鉴定

对 49 份杂种 F<sub>1</sub> 进行体细胞染色体制片,确定染色体数目(表 5)。其中杂种 F<sub>1</sub>18J3-D-9 染色体数目为 28 条(图 3A),F<sub>1</sub> 18429-D-5 和 F<sub>1</sub> 18430-D-5 的染色体数目均为 42 条(图 3B 和 3C),而 F<sub>1</sub>18430-D-6 的染色体条数目为 25 条(图 3D)。统计结果表明染色体数目在 25~42 条,其中 21 份材料为 42 条染色体,9 份材料是 28 条染色体,杂交后代材料染色体数目变异范围较大。

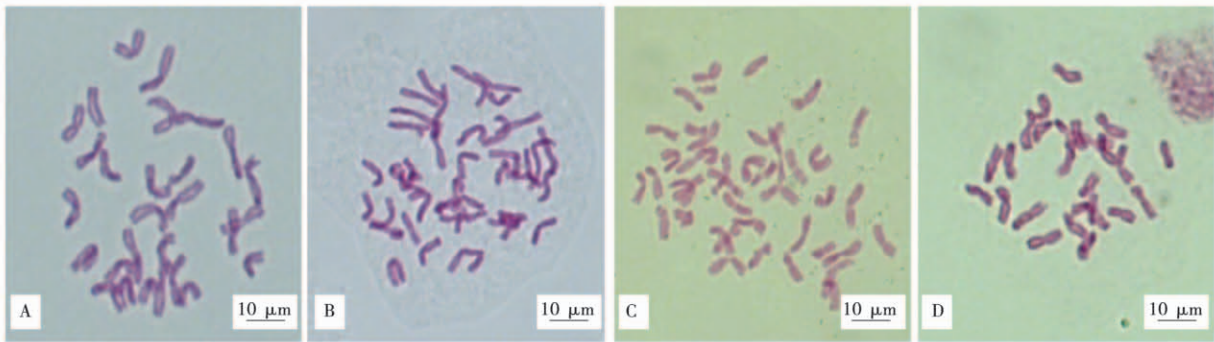
2.4 杂交后代材料花粉母细胞减数分裂观察

对 3 份越冬杂种 F<sub>1</sub> 花粉母细胞减数分裂进行观察,结果表明,材料中普遍存在单价体(黑色箭头)、棒状二价体(红色箭头)和环状二价体(绿色箭头),其中杂种 F<sub>1</sub>18J3-D-2 中有 6~9 个二价体,6~10 个单价体(图 4A);F<sub>1</sub> 18429-D-5 中包括 3 个环状二价体和 3 个棒状二价体,约有 16 个单价体(图 4B 和 4E);杂交种 F<sub>1</sub>18430-D-6 含有 3~4 个环状二价体,5~6 个棒状二价体,单价体数目在 6~10 个(图 4C 和 4F)。

表 5 杂种 F<sub>1</sub>体细胞染色体数目观察结果

Table 5 Observation on the chromosome number of hybrid F<sub>1</sub> cells

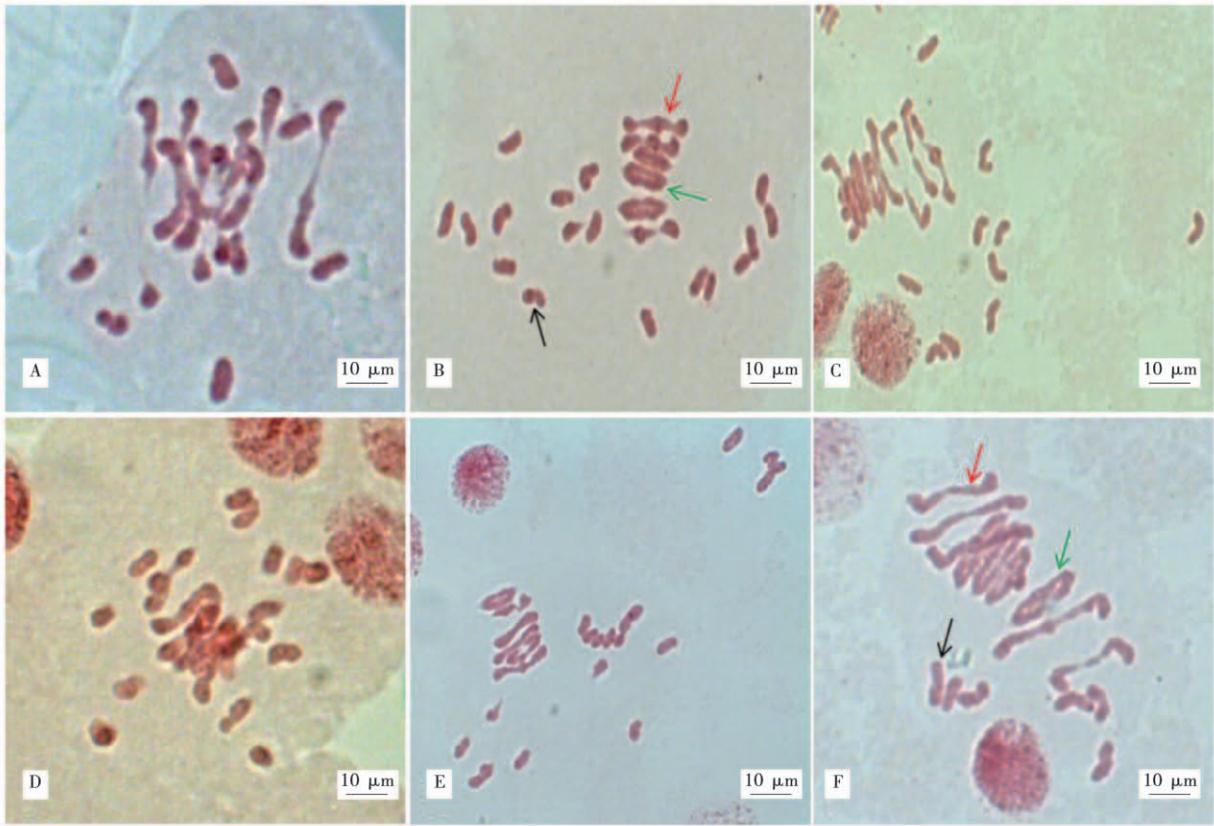
材料 Materials	染色体数目 Chromosome number	材料 Materials	染色体数目 Chromosome number
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=33
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=27	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=40
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18429-D-5	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=38	F <sub>1</sub> 18430-D-4	2n=28
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-5	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=34	F <sub>1</sub> 18430-D-5	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=36	F <sub>1</sub> 18430-D-5	2n=30
F <sub>1</sub> 18J3-D-4	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-11	2n=36
F <sub>1</sub> 18J3-D-4	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-12	2n=33
F <sub>1</sub> 18J3-D-4	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-16	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-5	2n=28	F <sub>1</sub> 18430-D-21	2n=28
F <sub>1</sub> 18J3-D-9	2n=28	F <sub>1</sub> 18430-D-23	2n=40
F <sub>1</sub> 18J3-D-9	2n=28	F <sub>1</sub> 18430-D-24	2n=28
F <sub>1</sub> 18J3-D-13	2n=28	F <sub>1</sub> 18430-D-26	2n=41
F <sub>1</sub> 18ZS-D-1	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-26	2n=28
F <sub>1</sub> 18ZS-D-1	2n=42	F <sub>1</sub> 18431-D-8	2n=40
F <sub>1</sub> 18ZS-D-6	2n=40	F <sub>1</sub> 18431-D-11	2n=36
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=33
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=27	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18ZS-D-10	2n=40
F <sub>1</sub> 18J3-D-2	2n=42	F <sub>1</sub> 18429-D-5	2n=42
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=38	F <sub>1</sub> 18430-D-4	2n=28
F <sub>1</sub> 18J3-D-3	2n=42	F <sub>1</sub> 18430-D-5	2n=42
F <sub>1</sub> 18430-D-6	2n=25		



A:9-1(F<sub>1</sub>18J3-D-9)(2n=28);B:31-3(F<sub>1</sub>18429-D-5)(2n=42);C:36-1(F<sub>1</sub>18430-D-5)(2n=42);D:37-2(F<sub>1</sub>18430-D-6)(2n=25)

图3 杂种F<sub>1</sub>根尖体细胞染色体观察

Fig. 3 Observation on chromosome number in root tips cells of F<sub>1</sub> hybrid material



A:F<sub>1</sub>18J3-D-2;B:F<sub>1</sub>18429-D-5;C:F<sub>1</sub>18430-D-6;D:F<sub>1</sub>18J3-D-2;E:F<sub>1</sub>18429-D-5;F:F<sub>1</sub>18430-D-6

图4 杂种F<sub>1</sub>减数分裂观察

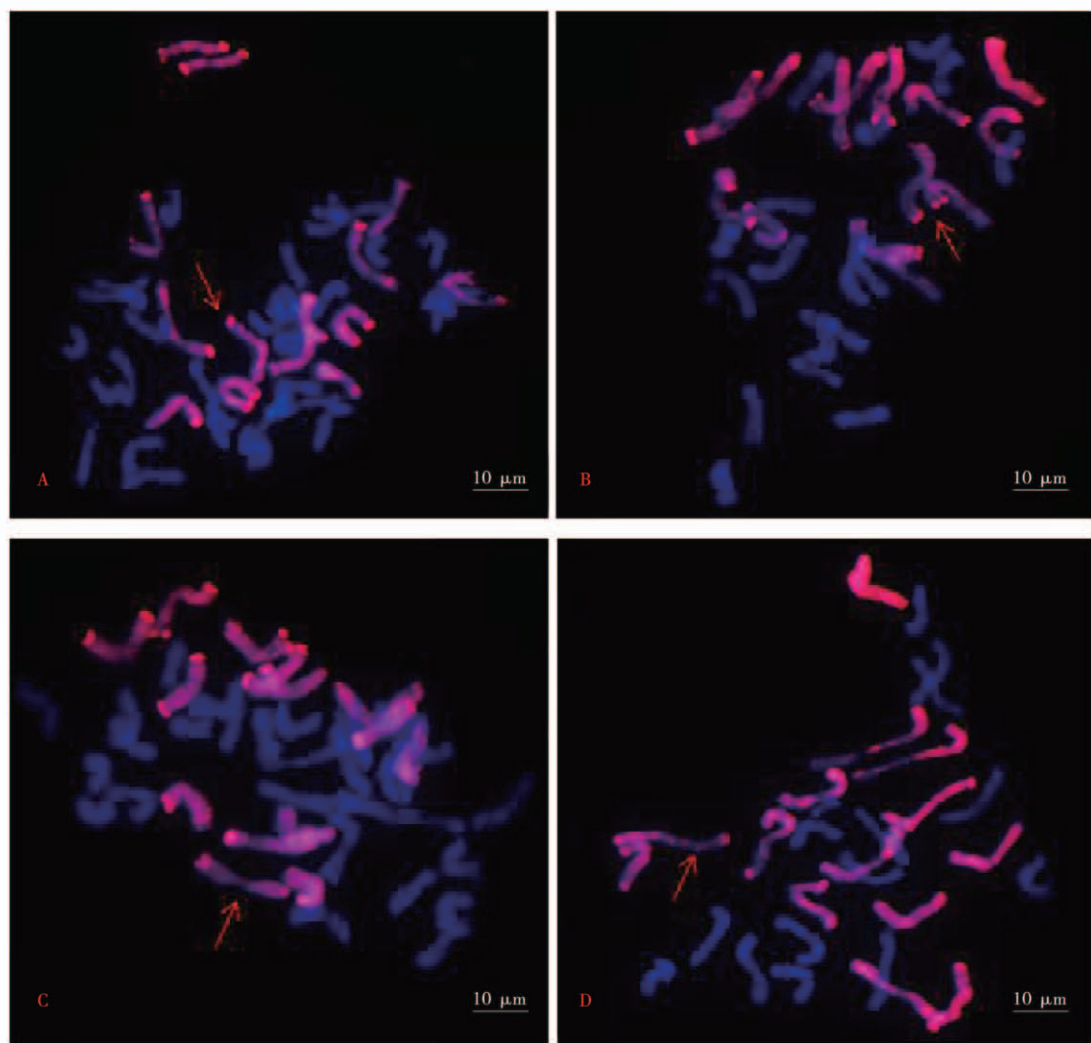
Fig. 4 Observation on meiosis of F<sub>1</sub> hybrids

2.5 杂种F<sub>2</sub>基因组原位杂交检测

对杂种F<sub>2</sub>材料体细胞染色体进行基因组原位杂交(GISH)检测,以冬黑麦(R<sub>0</sub>R<sub>0</sub>,2n=14)全基因组DNA为探针,普通小麦(AABBDD,2n=42)DNA作封阻,进行冬黑麦遗传物质的检测。结果表明,杂种F<sub>2</sub>18J3-D-2染色体数目为42条,含有14条(R组染色体)红色杂交信号(图5A),

杂种F<sub>2</sub>18430-D-5检测有42条染色体,包括14条红色杂交信号(图5C)。杂种F<sub>2</sub>18429-D-5和F<sub>2</sub>18430-D-6的染色体数不足42条,分别为31条和29条,检测结果中有14条红色杂交信号(图5B和5D)。GISH结果可以看出,4份F<sub>2</sub>材料中均含有冬黑麦染色体组遗传物质。





A; F<sub>2</sub> 18J3-D-2 (2n=42); B; F<sub>2</sub> 18429-D-5 (2n=31); C; F<sub>2</sub> 18430-D-5 (2n=42); D; F<sub>2</sub> 18430-D-6 (2n=29)

图 5 杂种 F<sub>2</sub> GISH 鉴定结果

Fig. 5 GISH results of F<sub>2</sub> hybrids

### 3 结论与讨论

目前,作物育种中对于种质资源和基因挖掘的研究仍不断深入,但某些作物产量已达到稳产期,若育种方面不进行创新及改进,将导致全球对植物类产品的需求难以得到满足<sup>[15]</sup>。因此,需扩大培育作物品种的遗传基础,特别是水稻、小麦和玉米等。宝贵的种质资源,是培育作物优质、高产及抗逆性等新品种的物质基础,也是提高农业生产力的重要保证<sup>[16]</sup>。例如通过复合杂交创制的小麦新种质“烟 1933”“烟 1944”<sup>[17]</sup>和“黔中 7 号”<sup>[18]</sup>,杂交后代表现良好的抗逆性,且产量高、综合性状突出,在育种工作中得到广泛应用。本研究通过远缘杂交手段将六倍体小黑麦与冬黑麦进行杂交,借助哈尔滨地区气候特点,杂交后代

越冬共筛选出 12 份小黑麦中间材料,综合田间杂交结实率及越冬存活率结果表明,“4-30×冬黑麦”杂交组合结实率较高且越冬存活株数最多,其中越冬杂种 F<sub>1</sub> 18430-D-6 农艺性状较突出,应扩大杂交后代群体数量,以选育适应当地气候环境特点的新种质材料。由于种质创新研究周期长,不可直接用于作物生产,因此对于新种质创制初期至关重要,可为后续小麦育种发展奠定基础。

通过远缘杂交的方式导入目标性状或基因,对杂交后代群体,进行田间农艺性状如苗相、株高、穗长等调查,有利于了解其生长习性及表型,为分析杂种后代的遗传多样性及性状间配合力提供了参考<sup>[19]</sup>。本研究发现杂种 F<sub>1</sub> 性状表现类型较为丰富,有的倾向于母本性状,为茎秆粗状、抗



倒伏、大穗多花等特点;有的与父本相似,如穗形长且具有抗寒性等特点。此外,越冬杂种  $F_1$  经冬季低温处理后,较其它材料分蘖多、株穗变长、生长茂盛。已有研究表明抗寒性强(冬性强)的品种分蘖后植株会呈匍匐状贴地面生长,且分蘖数增多<sup>[20]</sup>。利用细胞遗传学方法,从染色体水平上对杂交后代的染色体数目、结构等变化进行直观鉴定,观察染色体数目及配对现象;结合原位杂交技术可以快速、准确地鉴定外源染色体。本研究通过对随机统计的 49 份杂种  $F_1$  材料鉴定,体细胞染色体为 25~42 条不等,其中经 GISH 检测有 14 条为冬黑麦染色体。前人研究发现,六倍体小黑麦同二倍体黑麦杂交,因亲本中可能存在未减数配子基因,会促使染色体自然加倍,产生双二倍体<sup>[21]</sup>,并可以遗传到杂种后代材料中<sup>[22]</sup>。在本研究中,发现早期材料染色体数存在较大的变异范围,对于越冬存活的杂种  $F_1$  植株进行花粉母细胞检测,发现染色体大多数以单价体形式存在,有少数的环状二价体和棒状二价体,说明染色体配对情况不稳定。后续仍需进行连续自交或回交进行扩繁选育,以获得稳定性强的高代材料。

大多数作物在育种中多依赖于对该物种主基因库基因的利用,当资源短缺时,便可利用其次生基因库来扩大遗传变异的供应<sup>[23]</sup>。小麦近缘种是改良小麦过程中重要的基因资源库,黑麦作为改良普通小麦性状的外源基因供体,利用种间杂交和连续多次回交,将其优良遗传物质导入小麦,既扩大了小麦育种的遗传多样性,又改善了亲本遗传基础不足的现象<sup>[24-25]</sup>。有时直接将黑麦与普通小麦进行杂交,导入优异基因较困难,可能遇到远缘杂交不亲和、结实率低等问题<sup>[6]</sup>。因此,可利用八倍体小黑麦和六倍体小黑麦作为桥梁亲本,实现将黑麦优良基因导入到小麦育种中<sup>[26]</sup>。目前在黑麦中已鉴定并命名的抗性基因,属抗病性的基因较多<sup>[27-28]</sup>,关于黑麦及小黑麦抗寒性相关基因的探讨较少,因此后续研究可对杂种后代进行连续越冬筛选,以充分挖掘后代材料中的耐霜冻性及抗寒性基因资源,可为丰富和改良黑龙江省麦类种质资源及抗性育种提供材料基础。

本研究利用六倍体小黑麦与二倍体冬黑麦进行杂交试验,获得 12 份可在哈尔滨地区顺利越冬的小黑麦材料,且顺利越冬的杂种后代中均含有 14 条冬黑麦染色体。综合试验结果表明,“4-30×冬黑麦”杂交组合越冬存活率高,可对其杂交组

合加以利用。后续可通过连续自交或回交进行扩繁选育,以期获得稳定性高、抗寒能力强的小黑麦新种质。

### 参考文献:

- [1] 尚海英,郑有良,魏育明,等. 黑麦属基因资源研究进展[J]. 麦类作物学报,2016,23(1): 86-89.
- [2] 董玉琛. 小麦的基因源[J]. 麦类作物学报,2000,20(3): 78-81.
- [3] 李冬梅,田新会,杜文华. 小黑麦新品系的草产量及营养价值研究[J]. 草地学报,2016,24(6): 1164-1169.
- [4] 孙媛媛,杜秉昊,汪慧,等. 小麦改良的可利用资源: 黑麦抗病基因[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(2): 327-332.
- [5] 曾雪,杨足君,李光蓉,等. 非洲黑麦染色体特异性标记的建立与应用[J]. 遗传,2008,30(8): 1056-1062.
- [6] Yang Z J, Li G R, Jiang H R, et al. Intergenomic interaction of nucleolus, gliadin and disease resistance in a *Triticum Aestivum*-*secale africanum* amphiploid[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2001, 19(4): 340-343.
- [7] 张珊珊. 普通小麦×八倍体小黑麦杂种后代的形态学和分子细胞遗传学研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2010.
- [8] 任正隆, Lelley T, Rbbele G. 小麦和黑麦染色体在小黑麦×小麦杂种的不同世代群体中的传递[J]. 遗传学报, 1991, 18(2): 161-167.
- [9] 佟明耀, 郑家兰, 李卓夫, 等. 高寒地区超强抗寒新品种“东农冬麦 1 号”的选育[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(7): 1-4.
- [10] 王晓楠, 付连双, 李卓夫, 等. 低温驯化及封冻后不同抗寒性小麦品种的形态建成及生理基础分析[J]. 作物学报, 2009, 35(7): 1313-1319.
- [11] 于晶. 寒地冬小麦东农冬麦 1 号抗寒机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [12] Vasily A S, Lydija I K, Elena I U, 等. 冬黑麦生产在不同领域的应用前景[J]. 科技成果管理与研究, 2016(6): 31-34.
- [13] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2320-2325.
- [14] Liu W H, Yang L, Wang J C, et al. Production and identification of wheat-*Agropyron cristatum* (L. 4P) alien translocation[J]. Genome, 2010, 53(6): 472-481.
- [15] Tester M, Langridge P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world[J]. Science, 2010, 327(5967): 818-822.
- [16] 刘旭, 黎裕, 曹永生, 等. 中国禾谷类作物种质资源地理分布及其富集中心研究[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 1-8.
- [17] 赵明, 于经川, 孙妮娜, 等. 小麦创新种质烟 1933、烟 1934 的应用[J]. 农业科技通讯, 2020(1): 224-227.
- [18] 董永琴, 程治军, 英敏, 等. 异源八倍体小黑麦黔中 7 号新品种的选育[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(5): 7-9.
- [19] Eric J, Karine A. From diploids to allopolyploids: The



- emergence of efficient pairing control genes in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2004, 23(1): 21-45.
- [20] 于晶, 孟健男, 曾俨, 等. 温度及土壤含水量对冬小麦生长习性 & 返青率的影响[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(5): 9-13.
- [21] Zhang L Q, Yen Y, Zheng Y L, et al. Meiotic restriction in emmer wheat is controlled by one or more nuclear genes that continue to function in derived lines[J]. Sexual Plant Reproduction, 2007, 20(3): 159-166.
- [22] Forster B P, Heberle-Bors E, Kasha K J, et al. The resurgence of haploids in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(8): 368-375.
- [23] Hao M, Zhang L Q, Ning S Z, et al. The resurgence of introgression breeding, as exemplified in wheat improvement[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 252.
- [24] Mason A S. Polyploidy and hybridization for crop improvement[J]. Boca Raton: CRC Press, 2017: 490.
- [25] 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.
- [26] 邹景伟, 张珊珊, 张志雯, 等. 小麦-八倍体小黑麦杂种衍生的抗条锈病品系 HB20121023 选育与鉴定[J]. 种子, 2016, 35(6): 101-104.
- [27] Guo J T, Lei Y H, Zhang H T, et al. Frequent variations in tandem repeats pSc200 and pSc119.2 cause rapid chromosome evolution of open-pollinated rye [J]. Molecular Breeding, 2019, 39(9): 1-13.
- [28] Li F, Li Y H, Cao L R, et al. Simultaneous transfer of leaf rust and powdery mildew resistance genes from hexaploid triticale cultivar sorento into bread wheat[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 85.

## Creation and Cytogenetic Research of Overwintering Triticale Material

YANG Jun-li<sup>1</sup>, LANG Xu<sup>1</sup>, ZHANG Yan-ming<sup>1</sup>, ZHANG Ju-mei<sup>2</sup>, ZHAO Hai-bin<sup>2</sup>, JIN Hui<sup>2</sup>, WU Yu-e<sup>2</sup>, WANG Xiao-ping<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 2. Institute of Pratacultural Science, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** In order to select the middle material of winter rye that can survive the winter successfully in Heilongjiang Province and other alpine areas. In this study, field agronomic traits and cytogenetic analysis were carried out on five small hexaploid rye cultivars of Zhongsi 232, Jian 3, 4-29, 4-30, 4-31 and Russian winter rye ( $R_0$ ,  $2n=14$ ) by remote hybridization. The results showed that for two consecutive years from 2018 to 2019, with a total of 406 ears and 1 100  $F_1$  hybrids were obtained. The average hybridization setting rate ranged from 8.31% to 25.51%, with low seed fullness. The hybrid  $F_1$ - $F_3$  were planted in the field, and a total of 12 materials were obtained for successful living through the winter in Harbin. Compared with the parents, the hybrids had more agronomic traits, which were characterized by lush growth in the field, strong resistance to stress, multiple tillering (the most effective tillering was 36), large panicle (the longest was 17.23 cm) and multiple flowers at the bottom of the panicle. The chromosome number of hybrids  $F_1$  cells ranged from 25 to 42. 21 hybrids  $F_1$  cells contain 42 chromosomes. Meiotic observation of pollen mother cells shows that 6-9 bivalent bodies and 6-16 monovalent bodies were common. The chromosome number of hybrids  $F_2$  cells was mostly 42, Genomic in situ hybridization (GISH) identified 14 winter rye chromosomes in 4 hybrids  $F_2$ .

**Keywords:** triticale; winter rye; cytogenetics; In situ hybridization

### 致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部