

MICHAŁ NOWAKInstytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Identyfikacja genów *Vrn* w odmianach jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) zarejestrowanych w Polsce

Identification of the *Vrn* genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars from the Polish register

Długość okresu wernalizacji jęczmienia zwyczajnego warunkowana jest przez 3 loci: *VRN-H1*, *VRN-H2* oraz *VRN-H3*. Dominujące allele *Vrn-H1* i *Vrn-H3* są charakterystyczne dla odmian jarych. W odmianach ozimych występuje dominujący allel *Vrn-H2* oraz recesywne allele *vrn-H1* i *vrn-H3*. W pracy zidentyfikowano za pomocą markerów STS-PCR geny *Vrn-H1* oraz *Vrn-H2* w 41 jarych oraz 11 ozimych odmianach jęczmienia zwyczajnego zarejestrowanych w Polsce. Do identyfikacji genu *Vrn-H1* zastosowano parę starterów: HvBM5A-intron1-F3 i Intr1/H/R3, natomiast dla genu *Vrn-H2*: VRN-Ha-F i VRN-Ha-R. Obecność recesywnego allelu *vrn-H1* stwierdzono we wszystkich badanych odmianach ozimych, a jego brak — we wszystkich analizowanych odmianach jarych jęczmienia. Obecność dominującego allelu *Vrn-H2* stwierdzono we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych oraz w 10 odmianach jarych: Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos oraz Scarlett. W jarych odmianach Scarlett i Stratus obserwowano ponadto produkty amplifikacji, których obecność wynikać może z występowania nowej formy allelicznej genu *Vrn-H2* lub rearanżacji w genomach tych odmian.

Słowa kluczowe: geny *Vrn*, jęczmień zwyczajny, STS-PCR, wernalizacja

Length of the barley vernalization period is determined by 3 loci: *VRN-H1*, *VRN-H2* and *VRN-H3*. The dominant *Vrn-H1* and *Vrn-H3* alleles are characteristic for spring growth habit. In winter cultivars the dominant *Vrn-H2* and recessive *vrn-H1* and *vrn-H3* alleles are present. In this paper the *Vrn-H1* and *Vrn-H2* genes were identified by means of STS-PCR markers in 41 spring and 11 winter barley cultivars from the Polish register. The primer pair: HvBM5A-intron1-F3 and Intr1/H/R3 was used for identification of the *Vrn-H1* gene, and the pair: VRN-Ha-F and VRN-Ha-R for the *Vrn-H2* gene. The recessive *vrn-H1* allele was observed in all examined winter barley cultivars and in none of examined spring cultivars. The presence of dominant *Vrn-H2* allele was stated in all examined winter cultivars and in 10 spring cultivars: Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos and Scarlett. In the spring cultivars Scarlett and Stratus non-specific amplification products were observed. Their presence could be attributed to occurrence of new allelic forms of the *Vrn-H2* gene or from a rearrangement in genomes of these cultivars.

Key words: barley, STS-PCR, vernalization, *Vrn* genes

WSTĘP

Działanie niskiej temperatury na określonych etapach rozwoju roślin zbożowych jest niezbędne, aby doszło do ich kwitnienia i zawiązania ziarniaków. Zjawisko wernalizacji polega na nabywaniu lub przyspieszaniu zdolności roślin do kwitnienia poprzez traktowanie ich chłodem (Chouard, 1960). Proces wernalizacji zachodzi gdy temperatura powietrza wynosi od 0°C do 10°C i trwa przez kilka tygodni (Flood i Halloran, 1984). Badania fizjologiczne polegające na traktowaniu poszczególnych części roślin chłodem wykazały, że ośrodek odpowiadający za wernalizację znajduje się w szczytowym fragmencie pędu (Amasino, 2004).

Długość okresu wernalizacji w jęczmieniu zwyczajnym determinowana jest przez trzy *loci*. *Locus VRN-H1* znajduje się na chromosomie 5H, *VRN-H2* na chromosomie 4H (Yasuda i in., 1993), a *VRN-H3* na chromosomie 7H (Yan i in., 2006). Von Zitzewitz i wsp. (2005) dokonali dokładnej identyfikacji i charakterystyki *locus VRN-H1*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzili oni, że kluczową rolę w tym *locus* odgrywa gen *HvBM5A*. Delecja w obrębie pierwszego intronu tego genu jest podstawowym czynnikiem determinującym jary charakter wzrostu rośliny (von Zitzewitz i in., 2005; Fu i in., 2005). Podobne badania przeprowadzone zostały również dla *locus VRN-H2*. W ich wyniku zidentyfikowano rodzinę genów *ZCCT-H* kodujących czynnik transkrypcyjny, zbudowany z białka zawierającego palec cynkowy i domenę CCT (Dubcovsky i in., 2005). W jęczmieniu rodzina ta zawiera trzy geny, które obecne są w genotypach ozimych, natomiast w genotypach jarych ulegają delecji (Dubcovsky i in., 2005; von Zitzewitz i in., 2005). W przypadku *locus VRN-H3*, o dominującym lub recesywnym jego charakterze decyduje mutacja w obrębie pierwszego intronu genu *HvFT* (Yan i in., 2006). Podstawowym systemem regulującym długość okresu wernalizacji u jęczmienia jest dwugenowy epistatyczny model *Vrn-H2/Vrn-H1*, gdzie produkt ekspresji genów *Vrn-H2* jest represorem dla *Vrn-H1* (Karsai i in., 2005; Kóti i in., 2006; Cockram i in., 2007; Szűcs i in., 2007). Ponadto wykazano, że działanie genów *Vrn-H1* i *Vrn-H2* regulowane jest przez intensywność światła oraz temperaturę (Karsai, 2008; Karsai i in., 2008).

W przypadku jęczmienia zwyczajnego genotyp w loci *VRN-H1* i *VRN-H2* jest silnie związany z tolerancją na działanie niskiej temperatury oraz wrażliwością na fotoperiod (von Zitzewitz i in., 2005). Z tego względu celem pracy było określenie za pomocą metody STS-PCR genotypów *Vrn* w odmianach jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) zrejonizowanych w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były zrejonizowane w Polsce odmiany jęczmienia zwyczajnego ozime: Bartosz, Bażant, Bombay, Bursztyn, Corbie, Gil, Gregor, Horus, Lomerit, Sigra, Tiffany i jare: Annabell, Antek, Atol, Barke, Basza, Binal, Blask, Boss, Brenda, Bryl, Edgar, Frontier, Granal, Hanka, Jersey, Johan, Lailla, Lot, Madonna, Mauritia, Nadek, Nagrad, Nagradowicki, Orthega, Philadelphia, Poldek, Prosa, Rabel, Rasbet, Rastik, Rataj, Refren, Rodion, Rodos, Ryton, Scarlett, Sebastian, Start, Stratus, Tolar, Widawa.

Całkowity DNA wyizolowano z pięciodniowych siewek badanych odmian metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Identyfikację genów *Vrn* w jęczmieniu zwyczajnym wykonano metodą STS-PCR. Do analizy *locus VRN-H1* zastosowano metodę opartą o analizę rearanżacji w obrębie sekwencji intronowej (Cockram i in., 2007). Do reakcji PCR włączono parę starterów: HvBM5A-intron1-F3 (5'-TTTGTCGGAACCTACAACCTTCA-3') i Intr1/H/R3 (5'-AAAGCTCCTGCCAACTACGA-3'), pozwalające na identyfikację recesywnego allelu *vrn-H1*. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja — 94°C przez 5 minut, 38 cykli: denaturacja — 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów — 60°C przez 30 sekund, elongacja — 72°C przez 1,5 minuty oraz po zakończeniu wszystkich cykli, końcowa elongacja — 72°C przez 10 minut.

Zmienność alleliczną w *locus VRN-H2* analizowano stosując markery STS-PCR opracowane przez Dubcovsky i in. (2005). Zastosowano tutaj parę starterów:

— VRN-Ha-F (5'-GCCTCTTCTTCTTCCTCGAC-3'),

— VRN-Ha-R (5'-ACTGGTACTCGTGTCAGTGGG-3'),

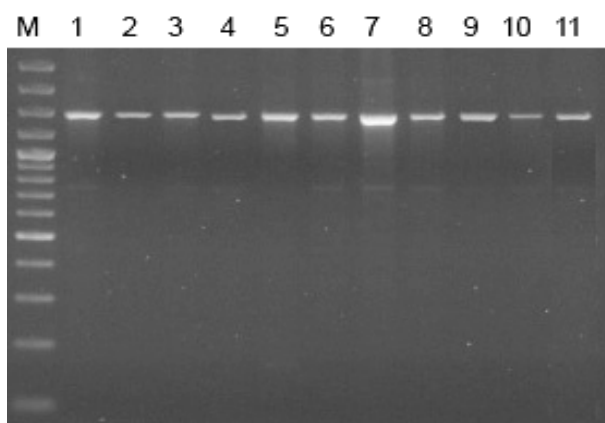
które amplifikują fragment DNA o długości 208 bp w odmianach zawierających dominujący allel *Vrn-H2*. Zastosowany został następujący profil termiczny reakcji: wstępna denaturacja — 94°C przez 5 minut, 38 cykli: denaturacja — 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów — 55°C przez 30 sekund, elongacja — 72°C przez 30 sekund oraz po zakończeniu wszystkich cykli, końcowa elongacja — 72°C przez 7 minut. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze TProfessional Basic (Biometra).

Produkty PCR rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym. Zastosowano marker długości GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1× TBE przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Produkty rozdzielone na żelu agarozowym wizualizowano w świetle UV i dokumentowano przy użyciu zestawu PolyDoc (Vilber Lourmat).

WYNIKI I DYSKUSJA

Po rozdziale na żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych z wykorzystaniem pary starterów HvBM5A-intron1-F3 oraz Intr1/H/R3, stwierdzono obecność prążka o wielkości 1500 bp we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych jęczmienia zwyczajnego. Fragmentu DNA o tej wielkości nie obserwowano natomiast w żadnej z 41 analizowanych odmian jarych (rys. 1, tab. 1). Uzyskane wyniki wskazują na obecność recesywnego allelu *vrn-H1* we wszystkich badanych odmianach ozimych oraz brak tego allelu we wszystkich analizowanych odmianach jarych jęczmienia (rys. 1).

Wykorzystanie do PCR pary starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R umożliwia identyfikację dominującego allelu *Vrn-H2* jęczmienia zwyczajnego. Po rozdziale produktów amplifikacji na żelu agarozowym, fragment DNA o wielkości 208 bp występował we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych oraz w 10 spośród 41 odmian jarych (Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos, Scarlett).



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Bartosz, 2 — Bażant, 3 — Bombay, 4 — Bursztyn, 5 — Corbie, 6 — Gil, 7 — Gregor, 8 — Horus, 9 — Lomerit, 10 — Sigra, 11 — Tiffany

Rys. 1. Obraz elektroforetyczny otrzymany dla ozimych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdzielenia produktów reakcji PCR, do której włączono startery HvBM5A-intron1-F3 oraz Intr1/H/R3
Fig. 1. Electrophoretic image of amplified products obtained for winter barley cultivars in PCR reaction with the HvBM5A-intron1-F₃ and Intr1/H/R3 primers

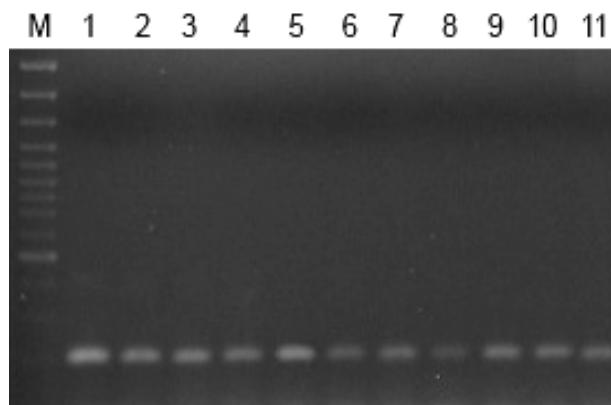
Tabela 1

Genotypy *Vrn* analizowanych odmian jęczmienia zwyczajnego
***Vrn* genotypes of analysed barley cultivars**

L.p. No.	Odmiana Cultivar	<i>Locus VRN — VRN locus</i>		L.p. No.	Odmiana Cultivar	<i>Locus VRN — VRN locus</i>	
		<i>VRN-H1</i>	<i>VRN-H2</i>			<i>VRN-H1</i>	<i>VRN-H2</i>
1	Annabell	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	27	Lot	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
2	Antek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	28	Madonna	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
3	Atol	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	29	Mauritia	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
4	Barke	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	30	Nadek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
5	Bartosz	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	31	Nagrad	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
6	Basza	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	32	Nagradowicki	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
7	Bażant	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	33	Orthega	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
8	Binal	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	34	Philadelphia	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
9	Blask	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	35	Poldek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
10	Bombay	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	36	Prosa	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
11	Boss	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	37	Rabel	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
12	Brenda	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	38	Rasbet	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
13	Bryl	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	39	Rastik	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
14	Bursztyn	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	40	Rataj	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
15	Corbie	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	41	Refren	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
16	Edgar	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	42	Rodion	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
17	Frontier	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	43	Rodos	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
18	Gil	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	44	Ryton	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
19	Granal	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	45	Scarlett	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i> *
20	Gregor	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	46	Sebastian	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
21	Hanka	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	47	Sigra	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
22	Horus	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	48	Start	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
23	Jersey	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	49	Stratus	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i> *
24	Johan	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	50	Tiffany	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
25	Laila	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	51	Tolar	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
26	Lomerit	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	52	Widawa	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>

*Obecność niespecyficznego produktu reakcji PCR; Presence of non-specific PCR product

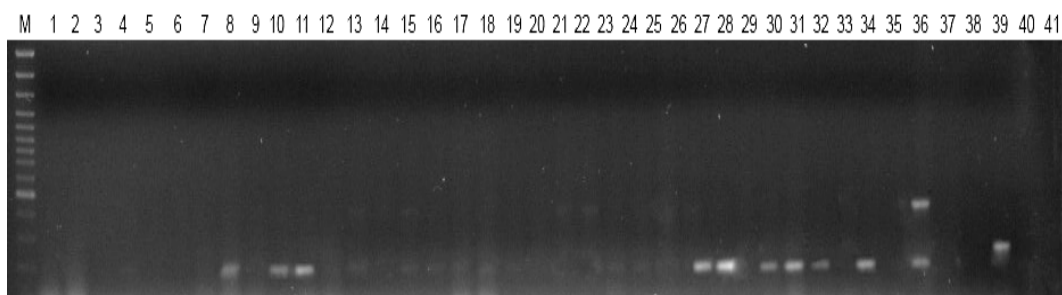
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono występowanie w tych odmianach dominującego allelu *Vrn-H2*. Pozostałe badane odmiany, w których nie stwierdzono amplifikacji w wyniku reakcji PCR, charakteryzowały się obecnością recesywnego allelu *vrn-H2* (rys. 2 i 3, tab. 1).



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Bartosz, 2 — Bazant, 3 — Bombay, 4 — Bursztyn, 5 — Corbie, 6 — Gil, 7 — Gregor, 8 — Horus, 9 — Lomerit, 10 — Sigra, 11 — Tiffany

Rys. 2. Obraz elektroforetyczny otrzymany dla ozimych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdzielania produktów reakcji PCR, do której włączono startery VRN-Ha-F i VRN-Ha-R

Fig. 2. Electrophoretic image of amplified products obtained for winter barley cultivars in PCR reaction with the VRN-Ha-F and VRN-Ha-R primers



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Annabell, 2 — Antek, 3 — Atol, 4 — Barke, 5 — Basza, 6 — Binal, 7 — Blask, 8 — Boss, 9 — Brenda, 10 — Bryl, 11 — Edgar, 12 — Frontier, 13 — Granal, 14 — Hanka, 15 — Jersey, 16 — Johan, 17 — Laila, 18 — Lot, 19 — Madonna, 20 — Mauritia, 21 — Nadek, 22 — Nagrad, 23 — Nagradowicki, 24 — Orthegea, 25 — Philadelphia, 26 — Poldek, 27 — Prosa, 28 — Rabel, 29 — Rasbet, 30 — Rastik, 31 — Rataj, 32 — Refren, 33 — Rodion, 34 — Rodos, 35 — Ryton, 36 — Scarlett, 37 — Sebastian, 38 — Start, 39 — Stratus, 40 — Tolar, 41 — Widawa

Rys. 3 Obraz elektroforetyczny otrzymany dla jarych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdzielania na 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR, do której włączono startery VRN-Ha-F i VRN-Ha-R

Fig. 3. Electrophoretic image of amplified products obtained for spring barley cultivars in PCR reaction with the VRN-Ha-F and VRN-Ha-R primers

W przypadku odmiany Scarlett po rozdzieleniu produktów reakcji PCR, do której włączono parę starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R, na żelu agarozowym stwierdzono występowanie drugiego, niespecyficznego produktu o wielkości około 450 bp. Obecność tego fragmentu wynikać może z występowania nowej formy allelicznej badanego genu lub rearanżacji w genomie tej odmiany. W odmianie Stratus po reakcji z tą samą parą starterów nastąpiła amplifikacja pojedynczego fragmentu DNA o wielkości około 250 bp, który świadczyć może o modyfikacji w obrębie amplifikowanego fragmentu DNA lub występowaniu niezidentyfikowanej formy allelicznej w *locus VRN-H2* (rys. 3).

W dostępnej literaturze niewiele jest prac dotyczących analizy *loci* genów wernalizacji w roślinach jęczmienia. Cockram i wsp. (2007) analizowali 429 jarych, ozimych i przewódkowych odmian jęczmienia zwyczajnego. Spośród badanych odmian 417 miało genotyp *Vrn-H1* zgodny z wymaganą długością okresu wernalizacji. Spośród pozostałych 12 odmian, w 7 przypadkach zweryfikowano na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych i analizy czasu kwitnienia podawane wcześniej wymagania dotyczące procesu wernalizacji. Cztery odmiany jęczmienia: Almunia, Athene, Birgit oraz Express, zawierały allele charakterystyczne dla form jarych, podczas gdy analizy fenotypowe potwierdziły, że są to formy ozime. Rozbieżność ta wynikała przypuszczalnie z obecności nowego, niezidentyfikowanego allelu genu *Vrn-H1*. Cytowani autorzy stwierdzili także, że odmiana Xenia zawierająca allele charakterystyczne dla form ozimych, nie wymagała okresu działania niskiej temperatury do przejścia z fazy wegetatywnej w generatywną. Jej kwitnienie było jednak znacznie opóźnione w porównaniu z badanymi odmianami jarymi. Wyniki uzyskane w badaniach własnych wykazały, że badane odmiany ozime jęczmienia zwyczajnego posiadały recesywny allel *vrn-H1*, który nie występował w żadnej z badanych odmian jarych.

Dubcovsky i wsp. (2005) analizowali *locus VRN-H2* w 23 ozimych i 61 jarych odmianach jęczmienia zwyczajnego. Autorzy na podstawie badań wykazali obecność dominującego allelu *Vrn-H2* we wszystkich analizowanych odmianach ozimych oraz zidentyfikowali recesywny allel *vrn-H2* we wszystkich 61 odmianach jarych. W badaniach własnych wykazano, że wszystkie analizowane ozime odmiany jęczmienia posiadały dominujący allel *Vrn-H2*, jednakże występował on również w 10 spośród 41 badanych odmian jarych jęczmienia zrejonych w Polsce.

WNIOSKI

1. W 11 badanych odmianach ozimych jęczmienia zwyczajnego zidentyfikowano obecność recesywnego allelu *vrn-H1*. Allel ten nie występował w żadnej z 41 badanych odmianach jarych. Dominujące allele *Vrn-H2* zidentyfikowano w 11 ozimych oraz w 10 jarych badanych odmianach jęczmienia zwyczajnego, a recesywne *vrn-H2* w 31 odmianach jarych.
2. Potwierdzono, że decydujący wpływ na determinację jarego charakteru rozwoju jęczmienia zwyczajnego ma obecność dominującego allelu *Vrn-H1*.

3. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie niespecyficznych produktów PCR w jarych odmianach jęczmienia Scarlett i Stratus po zastosowaniu pary starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R.

LITERATURA

- Amasino R. 2004. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* 16: 2553 — 2559.
- Chouard P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11: 191 — 238.
- Cockram J., Chiapparino E., Taylor S. A., Stamati K., Donini P., Laurie D. A., OSullivan D. M. 2007. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet.* 115: 993 — 1001.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 — 15.
- Dubcovsky J., Chen Ch., Yan L. 2005. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. *Mol. Breed.* 15: 395 — 407.
- Flood R. G., Halloran G. M. 1984. The nature and duration of gene action for vernalization response in wheat. *Ann. Bot.* 53: 363 — 368.
- Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., von Zitzewitz J., Hayes P. M., Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics* 273: 54 — 65.
- Karsai I., Szűcs P., Mészáros K., Filichkina T., Hayes P. M., Skinner J. S., Láng L., Bedő Z. 2005. The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative × winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1458 — 1466.
- Karsai I. 2008. Effect of low light intensity on the *VRN-H1* and *VRN-H2* vernalization response loci in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agronomica Hungarica* 56(1): 1 — 10.
- Karsai I., Szűcs P., Kőszegi B., Hayes P. M., Casas A., Bedő Z., Veisz O. 2008. Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *J. Exp. Bot.* 59 (10): 2707 — 2715.
- Kóti K., Karsai I., Szűcs P., Horváth Cs., Mészáros K., Kiss G. B., Bedő Z., Hayes P. M. 2006. Validation of the two — gene epistatic model for vernalization response in a winter × spring barley cross. *Euphytica* 152: 17 — 24.
- Szűcs P., Skinner J. S., Karsai I., Cuesta-Marcos A., Haggard K. G., Corey A. E., Chen T. H. H., Hayes P. M. 2007. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol. Genet. Genomics* 277:249 — 261.
- von Zitzewitz J., Szűcs P., Dubcovsky J., Yan L., Francia E., Pecchioni N., Casas A., Chen T. H. H., Hayes P. M., Skinner J. S. 2005. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.* 59: 449 — 467.
- Yan L., Fu D., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (51): 19581 — 19586.
- Yasuda S., Hayashi J., Moriya I. 1993. Genetic constitution for spring growth habit and some other characters in barley cultivars in the Mediterranean coastal region. *Euphytica* 70: 77 — 83.