

## IDENTIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS ASOCIADOS CON LA ELONGACIÓN DEL TALLO EN EL ARROZ (*Oryza sativa* L.) A TRAVÉS DEL MICROARREGLO DE ADNc

D. Cabezas\*, Sandra Pérez Álvarez\*, D. Haitao\*\*, L. Debao\*\*

\*Departamento de Biología Sanidad. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana. (UNAH). Carretera Tapaste km 3 ½, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: cabezas@isch.edu.cu; \*\*Departamento de Protección de Plantas, Grupo de Biotecnología. Universidad de Zhejiang. Kaixuan Road #268, Hangzhou. República Popular de China

**RESUMEN:** El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos más importantes en el mundo. La giberelina es una hormona que controla diferentes aspectos importantes en el desarrollo de las plantas. De ahí la necesidad de conocer como esta responden a la hormona y las posibles modulaciones de sus concentraciones. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar a través del microarreglo de ADNc la expresión de secuencias etiquetadas expresadas (Expressed sequences tag, ESTs) obtenidas a partir del tejido del tallo de la variedad Hangfeng tratada con aplicaciones de la fitohormona giberelina durante 36 horas. Para profundizar en el conocimiento sobre el genoma de este cultivo se realizó un análisis de la expresión de 2 535 secuencias etiquetadas expresadas mediante la construcción de un microarreglo de Ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Las plantas se trataron con giberelina por 36 horas y las muestras de los tejidos del tallo se tomaron cuando se observaron en las plantas de cinco a seis hojas para proceder a la extracción del Ácido ribonucleico (ARN) total según el método del Trizol. Un total de 1129 ESTs se clasificaron en 18 categorías funcionales de acuerdo a lo establecido por el Centro de Información de Munich para Secuencias de Proteínas (Munich Information Center for Protein Sequences, MIPS). La mayoría de los transcritos tentativos únicos estuvieron relacionados con las categorías de metabolismo (18.5%) y energía (16.19%) para un total de 214 y 181 ESTs respectivamente. Como resultado del microarreglo se obtuvieron 10 ESTs en el tratamiento durante 36 horas con la fitohormona, de las cuales cuatro secuencias: (Tubulina cadena beta-1, Auxinaa-IAA16, Actina factor de despolimerización 5 y Xiloglucan endotransglucosilasa) no se habían informado con anterioridad en *Oryza sativa*. Los resultados del microarreglo se confirmaron mediante la PCR en tiempo real.

(Palabras clave: arroz; Secuencias Etiquetadas Expresadas (ESTs); microarreglo de ADNc; giberelinas)

---

## IDENTIFICATION OF SPECIFIC GENES ASSOCIATED WITH STEM ELONGATION IN RICE (*Oryza sativa* L.) USING cDNA MICROARRAY

**ABSTRACT:** Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops in the world. For this reason it is necessary to know how plants respond to it and the possible modulation of their concentrations. The aim of this research was to evaluate through cDNA microarray the expression of expressed sequence tags obtained from the stem tissue in a variety of rice "Hangfeng" treated with applications of the phytohormone gibberellin for 36 hours. Gibberellin is a hormone that controls several important aspects in the development of plants. Thus, to go deeper in knowledge about this crop genome, an analysis of 2535 expressed sequence tags (ESTs) was done using microarray technology. Plants were previously treated with gibberellin phytohormone at 36 hours and stem tissue samples were taken when plants had from five to six leaves to proceed with total ARN extraction (Trizol method). A total of 1129 ESTs was classified into 18 functional categories according to the requirements established by the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS). Unique transcripts were involved in metabolism

(18.5%) and energy (16. 19%) for a total of 214 and 181 ESTs respectively. As microarray result, 10 ESTs were generated at the 36 hour-treatment with the phytohormone, and four of those ESTs (Tubulin beta-1 chain, Auxin-responsive protein IAA16, Actin-depolymerizing factor 5 and Xyloglucan endotransglucosylase) had never been reported before in *Oryza sativa* L. Array results were confirmed using real time PCR.

(Key words: rice; Expressed Sequence Tags (ESTs); cDNA microarray; gibberellins)

## INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una de las plantas más importante del mundo pues más de la mitad de la población mundial subsiste parcial o totalmente del cultivo (1). En Cuba ocupa el segundo lugar por su importancia (2).

Los conocimientos sobre la biología de las plantas se enfocan en las respuestas fisiológicas y bioquímicas a nivel microscópico; sin embargo, aún es insuficiente lo que se conoce sobre los cambios en los niveles de expresión de los genes. El microarreglo es una de las herramientas utilizada con estos fines pues permite la adquisición de gran conocimiento del genoma mediante la información biológica cuantitativa de múltiples muestras (3).

Las secuencias etiquetadas expresadas (ESTs) constituyen otra herramienta molecular muy utilizada para el estudio de genomas completos, ya que aportan información sobre la parte expresada del genoma permitiendo la identificación de nuevos genes, la construcción de mapas genéticos y el aislamiento de genes homólogos de diferentes especies. Una aplicación interesante de las ESTs es el estudio de la expresión de genes asociados con las respuestas a determinados estímulos hormonales.

La giberelina (GA) es una fitohormona esencial que controla muchos aspectos del desarrollo de la planta como la germinación y el desarrollo de la semilla, la expansión de la hoja, el alargamiento del tallo y la floración (4). Estudios anteriores han sugerido que la acción de las giberelinas en el crecimiento de los tejidos puede estar regulada en parte, por la modulación celular de sus concentraciones, y las alteraciones y habilidades de la célula para responder a esta fitohormona (5). Para entender la función que tiene las giberelinas en el proceso de desarrollo es necesario estudiar cómo se regulan sus concentraciones y cómo las plantas responden a estas.

El arroz es considerado uno de los alimentos más importantes para la seguridad alimentaria a nivel mun-

dial; pero aun existen limitantes en el aumento de su productividad principalmente en variedades de porte bajo con aplicaciones del riego en aniego, donde anteriormente no se reportaron resultados de trabajos encaminados a lograr mayor porte en la variedad Hangfeng con aplicaciones de giberelinas.

El objetivo de este trabajo, fue evaluar a través del microarreglo de ADNc la expresión de secuencias etiquetadas expresadas obtenidas a partir del tejido del tallo en la variedad Hangfeng de *O. sativa* tratada con aplicaciones de la fitohormona giberelina durante 36 horas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las semillas de la variedad Hangfeng de *O. sativa* se sembraron en casas de cultivos perteneciente al laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Zhejiang, en la República Popular de China. Cuando las plantas tuvieron de cinco a seis hojas verdaderas, se estableció dos grupos de plantas: una fue asperjada con agua estéril (control) y el otro grupo se asperjó con una solución de giberelina a razón de 50mg.L<sup>-1</sup>.

### Obtención de las construcciones del microarreglo

#### Aislamiento del ARN total

Las muestras se colectaron a las 36 horas después de los tratamientos con agua estéril (control) y giberelina para cada grupo respectivamente. De cada grupo formado se tomaron 5 g de los tejidos del tallo, los cuales se maceraron con nitrógeno líquido y se homogenizaron en 1,3 mL de Trizol (6) por cada 100 mg de tejido para la extracción del ARN total.

#### Síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificación

La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando el Sistema de Síntesis RiboClone® ADNc (Manual Técnico, Promega, 2005) con la pareja de cebadores oligo(dT)16. En la purificación de la segunda cadena

de ADNc se utilizó el programa GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Digestión con enzimas de restricción NotI y Sall y ligazón de la doble cadena de ADNc

El ADNc se ligó al vector pSPORT II, fue digerido posteriormente con las enzimas de restricción NotI y Sall. El producto de la ligazón se transformó en *Escherichia coli* cepa DH5a mediante el protocolo establecido por Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad).

### Obtención de la genoteca de ADNc

Los clones fueron plaqueados en el medio LB suplementado con agar al 1,5 % (pH 7.0) y 100 mg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina como agente de selección y se incubaron a 37°C durante 12 h. Luego, un clon fue seleccionado a partir de cada una de las colonias en las placas Petri y se transfirió a uno de los 96 pocillos de las placas que contenían un 1 mL del medio de crecimiento 2YT (pH 7.0) suplementado con 100 mg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina.

### Extracción del plásmido

Se utilizó el método alcalino modificado según el juego de reactivos de Purificación del ADN (Millipore, [www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

### Análisis y secuenciación de las muestras

Las muestras se secuenciaron desde ambos extremos de cada ADNc. Los datos obtenidos del secuenciador se procesaron mediante el programa Chromas 1.45® ([www.Technelysium.com/chromas.html](http://www.Technelysium.com/chromas.html)). Las secuencias de los genes provenientes de los ADNc se depositaron en la base de datos del Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST)).

### Construcción del microarreglo

Se usaron dos cebadores obtenidos de tejidos específicos del tallo del arroz tratados con la fitohormona gibelina durante 36h. Se inmovilizaron 2860 ESTs en la membrana de nylon (Immobilon™-Ny (Millipore). Estas expresiones de secuencias etiquetadas fueron analizadas con el programa estadístico Cyber-t disponible en <http://www.iqb.uci.edu>. La información detallada sobre las ESTs seleccionadas y las genotecas, así como sus situaciones en las membranas de la serie están disponibles en [www.estarray.org](http://www.estarray.org).

### Preparación de las muestras de ADN marcadas

Los ARN total procedente de los tejidos del tallo del control y el tratamiento con giberelina fueron extraídos por el método del Trizol. La transcripción

reversa se realizó para obtener el ANDc marcado con dCTP(<sup>32</sup>P).

### Hibridación

La hibridación de las muestras de ADNc y las sondas del microarreglo se realizó durante 12 h a 60°C en un horno de hibridación. La intensidad de la señal de cada mancha de ADNc en el arreglo fue cuantificada mediante el programa ArrayVision 6.0 (Imaging Research INC).

### Confirmación de los resultados mediante la PCR cuantitativa en tiempo real

Para la comprobación o confirmación de los resultados de la hibridación con microarreglo mediante la PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó el colorante de detección básico SYBR® Green (Protocolo Invitrogen, 2005). Los cebadores se diseñaron mediante el programa Primer Express 2.00 (Applied Biosystems Software).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de la genoteca de ADNc

Se generaron un total de 2860 ESTs de las cuales 2535 resultaron ser secuencias de la genoteca de ADNc de *O. sativa* (Tabla 1). Del total de ESTs detectadas (2860), 2535 resultaron ser secuencias únicas, las cuales se agruparon en 1912 secuencias sencillas (para un 85,53%) y 623 secuencias contiguas (el 14,47%), con una redundancia del 48%. En la población de las 623 secuencias contiguas, se encontraron 300 secuencias entre 2-5 ESTs (13,42%), 15 secuencias entre 6-8 ESTs (0,67%), 5 secuencias entre 10-12 ESTs (0,22%) y 3 secuencias con más de 15 ESTs (0,13%), respectivamente.

Un total de 1129 ESTs seleccionadas fueron categorizadas con respecto a anotaciones funcionales de los genes en otros organismos, finalmente se agruparon en 18 categorías acorde con sus funciones biológicas según el Centro de Información para Secuencias de Proteínas (MIPS). La clasificación aparece en la Tabla 2.

Se obtuvieron dos grandes categorías: el metabolismo y la energía con 18,95% y 16,03%, respectivamente. La síntesis de proteína representa el tercer grupo con un 14,26% de ESTs con una gran cantidad de proteínas relacionada con el alargamiento celular. La categoría de localización subcelular consistió en 13,90% de ESTs, seguidos por el transporte celular y su mecanismo de transporte (10,62%).

El metabolismo se considera la mayor categoría que

**TABLA 1.** Análisis de las ESTs de *Oryza sativa*./ *Analysis of the ESTs of Oryza sativa*

Resumen de EST	Número de ESTs
Total de ESTs	2860
Longitud de la EST (nt)	442
Número de Secuencias únicas	2535
Número de secuencias contiguas <sup>1</sup>	623
Redundancia (%) <sup>2</sup>	48
Número de "secuencias sencillas" <sup>3</sup>	1912
Contenido de G + C (%)	48

<sup>1</sup> Un grupo de clones que representan regiones superpuestas del genoma

<sup>2</sup> Redundancia = ESTs agrupadas en secuencias contiguas /total ESTs

<sup>3</sup> Un clon que no tiene nucleótidos superpuestos con otros clones en una estrechez dada

puede estar representado por genes relacionados con la elongación internodal y la elongación celular. Estos genes son Tubulina con 10 ESTs y factor de elongación 1 con 6 ESTs. Otro gen relacionado con el metabolis-

mo es la proteína del grupo 1 (HMG1, del Inglés High Mobility Group). Los microtubos son importantes en la segregación de los cromosomas en mitosis y transporte celular (7). La expresión del factor de elongación 1 alfa responde rápidamente a los cambios en el crecimiento inducidos por los tratamientos hormonales. La elongación internodal en el arroz es un fenotipo específico de desarrollo que acompaña al crecimiento de la panícula. Este proceso involucra la división celular y la diferenciación celular de los tejidos meristemáticos secundarios y el subsecuente alargamiento celular que lleva al alargamiento de los internodos (8).

#### Análisis de los datos del microarreglo ADNc e identificación de las diferentes expresiones de los genes

Como se puede observar en la Tabla 3 aparecieron 10 ESTs inducidos por la aplicación de geberelinas a las 36h relacionadas con diferentes organismos, donde la más importante es la Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolasa proteína 9 precursor, la cual esta fuertemente relacionada con la elongación y la región activa de los entrenudos (8).

**TABLA 2.** Resumen de las EST analizadas en el tallo de *Oryza sativa* de la genoteca de ADNc./ *Summary of the ESTs analyzed in Oryza sativa stem of the cDNA library*

Categoría <sup>1</sup>	Número de		Factor Redundante <sup>2</sup>	Porcentajes en las Anotaciones	
	ESTs	TUT		ESTs	TUT
Metabolismo	214	144	1,48	18,95	18,5
Energía	181	126	1,45	16,03	16,19
Síntesis de proteína	161	86	1,87	14,26	11,05
Localización subcelular	157	107	1,47	13,90	13,75
Transporte celular y mecanismo de transporte	120	78	1,54	10,62	10,02
Proteína (modificación, destilación)	114	95	1,2	10,09	12,21
Ciclo celular y procesamiento del ADN	31	27	1,15	2,74	3,47
Recurso celular, defensa y virulencia	31	14	2,21	2,74	1,8
Componentes biogenéticas celular	24	16	1,5	2,12	2,06
Proteínas funcionales o requerimientos de cofactores	20	18	1,11	1,77	2,31
Comunicación celular/Mecanismo de señal de conducción	18	15	1,27	1,59	1,93
Trascricpción	15	13	1,15	1,32	1,67
Facilidad de trasporte	8	8	1,0	0,70	1,02
Proteína almacenada	4	3	1,33	0,32	0,38
Diferenciación de tipos células	3	3	1,0	0,26	0,38
Interacción con el desarrollo celular	3	3	1,0	0,26	0,38
Proteínas no clasificadas	8	8	1,0	0,70	1,02
Total	1129	778	1,45	100	100

<sup>1</sup> Categorías asignadas por el MIPS según la base de datos funcionales por las anotaciones de Antología.

<sup>2</sup> Factor redundante=número de ESTs/TUTs.

**TABLA 3.** ESTs inducidas por la Giberelina en 36h./ *ESTs induced by Gibberellin at 36 h*

Número de EST	Anotaciones	Organismos	Valor E	Datos del Microarreglo
S114D11	Proteína precursor de la regulación de la luz	<i>Solanum tuberosum</i>	2,00E-40	7,667
S042C12	Guanine deaminasa	-	9,00E-21	1,179
S061A10	Xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase proteína 9 precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-21	1,258
S096B03	Acyl carrier proteína III, cloroplasto precursor (ACP III)	<i>Hordeum vulgare</i>	1,00E-18	0,845
S082D06	Fotosistema II 10 kDa polypeptide, cloroplasto precursor	<i>Spinacia oleracea</i>	5,00E-24	0,906
S119g03	Ribulosa bifosfato carboxilaza pequeña cadena C, cloroplasto precursor	-	0	2,717
S035D10	Actin-depolymerizing factor 5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,00E-09	0,942
S077G12	Ubiquitina-conjugating enzima E2 M	<i>Mus musculus</i>	5,00E-22	0,859
S061C11	Cadena Tubulina beta-1	<i>Eleurine</i>	4,00E-38	0,67
S055B03	Proteína responsable-auxina IAA16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,00E-17	1,343

De estos ESTs inducidos por GA, cuatro están fuertemente relacionados con la elongación del tallo: la cadena de beta-1 tubulina, proteína responsable-auxina IAA16, Actin-depolymerizing factor 5 y Xyloglucan endotransglucosylase.

Los microtubulos son importantes en muchos procesos celulares, por ejemplo en la división celular y elongación celular en plantas. Las  $\beta$ -tubulina, son componentes básicos de microtubulos, los cuales están codificado por familias de multigenes en eucariontes y estas secuencias de nucleótidos son altamente conservados en las regiones que codifican las proteínas (7).

El gen que responde a la proteína responsable-Auxina IAA16 fue inducido mediante aplicaciones de giberelina. Este gen Aux/IAA participa en el control de las expresiones de los genes conjuntamente con las giberelinas para el fotocontrol de los tallos en desarrollo (8). En las plantas el ácido indolacético regula varios aspectos de su crecimiento y desarrollo. Este crecimiento en las plantas es controlado por numerosas hormonas y estímulos ambientales que interactúan o regulan la división celular y el radio de expansión celular (9).

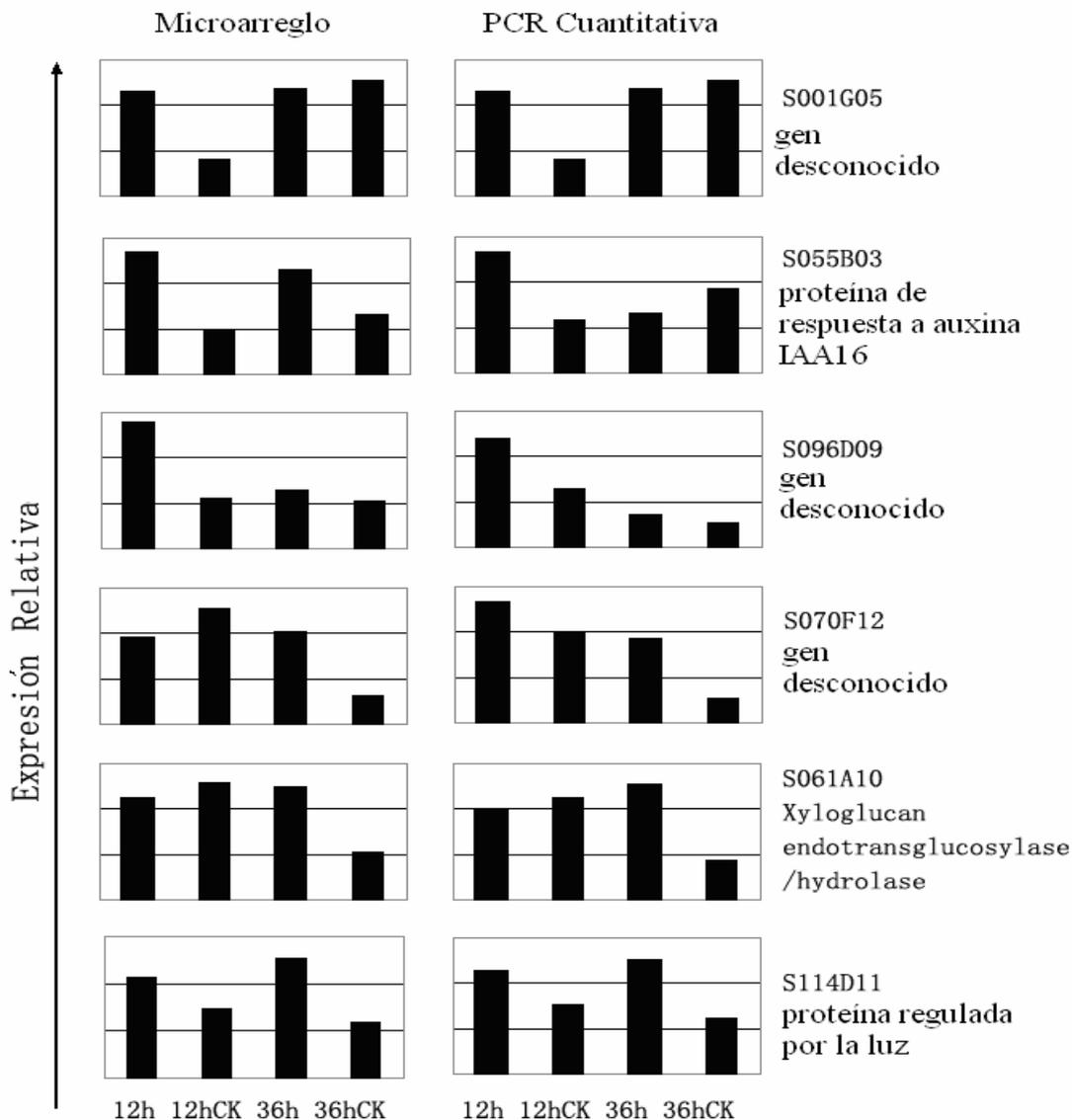
El último gen importante relacionado con la elongación celular es endotransglycosylase (XET). La función fundamental del xyloglucan es mantener la fuerza de composición de la matriz en la pared celular (10). El mecanismo general de la activación del gen XET que actúa en el xyloglucan ha sido explicado en diferentes estudios (11). En arroz genes XET relativos a OsXTR1, OsXTR2, OsXTR3, yOsXTR4 se

han caracterizado en el desarrollo y regulación hormonal. OsXTR2 es contribuyente activo en muchos órganos, sugiriendo que está relacionado con la reconstrucción de la pared celular, elongación celular y división a través del desarrollo de la planta. El gen XTR exhibe diferentes expresiones en órganos específicos donde actúan las GA y los brasinoesteroides en estados específicos durante la elongación internodal. Esos resultados indican que genes XTR pueden ser importantes en la elongación en el arroz y en la región activa de los entrenudos (12).

#### **Análisis de la PCR en tiempo real para la confirmación de los resultados de los microarreglos.**

Se evaluó la expresión de seis genes (Fig. 1) luego de 36 h. B-actin fue utilizado como control negativo en el tratamiento determinado por análisis previos de los microarreglos, los genes seleccionados fueron los siguientes, S001G05, S055B03, S096D09, S070F12, S061A10 y S114D11. A través del análisis por la PCR en tiempo real, se obtuvieron expresiones significativas similares con las expresiones obtenidas en los microarreglos estudiados.

La reproducibilidad, la eficacia y el estrecho margen de error de los resultados que se obtienen producto de las hibridaciones con microarreglo han sido descritos en varias investigaciones realizadas con este objetivo (13,14). Sin embargo, algunos autores recomiendan verificar los resultados de microarreglos mediante otras técnicas como el análisis por Northern o por RT-PCR en tiempo real (15). En este estudio, se ratificaron los resultados de las hibridaciones con microarreglos, mediante el empleo de la RT-PCR en



**FIGURA 1.** Confirmación de los resultados de los microarreglos a través del RT-PCR. Izquierda: Valores de las expresiones normalizadas globales de los experimentos. Derecha: Relativa cuantificación de genes preformados por el uso de la detección de la amplificación del PCR en tiempo real./ *Validation of microarray results by RT-PCR. Left: values of the global normalized expressions from the experiments. Right: Relative quantification of pre-formed genes by the use of real-time PCR amplification detection.*

tiempo real, ya que esta técnica permite examinar los perfiles de expresión de múltiples genes en paralelo, lo cual proporcionó información sobre los modelos de su expresión diferencial.

Todos los genes que se expresaron relacionados con la elongación del tallo fueron inducidos por el tratamiento con la giberelina. También se identificaron genes novedosos, los cuales no habían sido reportados en el arroz. La interpretación de esos datos por la importancia que tienen los genes en la elongación del

tallo del arroz puede ser un punto de partida para estudios futuros encaminados a obtención de variedades de tallos gruesos y porte alto.

## REFERENCIAS

1. Sasaki T, Burr B. International Rice Genome Sequencing Project: The effort to completely sequence the rice genome. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:138-141.

2. Asamizu E, Nakamura Y, Sato Sh, Tabata S. Generation of 7137 Non-redundant Expressed Sequence Tags from a Legume, *Lotus japonicus*. DNA Research, 2000;7:127-130.
3. Rabbani A, Kyonoshin M, Abe H, Ayub MK, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, et al. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Plant Physiol. 2003;133:1755-1767.
4. Alan AH, Baulcombe DC, Harberd NP. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Development. 2005;131:3357-3365.
5. Gonzalez MC, Cejudo FJ. Gibberellin-regulated expression of neutral and vacuolar invertase genes in petioles of sugar beet plants. Plant Science. 2007;172:839-846.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry, Scientia et Técnica. 2005;28:205-209.
7. Achard P, Wim H, Straeten VD, Harberd NP. Ethylene Regulates Arabidopsis Development via the Modulation of DELLA Protein Growth Repressor Function. Plant Cell. 2003;15:2816-2825.
8. Yang G, Jan A, Komatsu S. Functional analysis of *OsTUB8*, another-specific  $\beta$ -tubulin in rice. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/h27330380717/?p=62232b647280427489587930222fc02e&pi=0>. Plant Science. 2006;4:832-838.
9. Kevin MF, Mariela AP, George KN, Ruben B, Edgar. Genomic and physiological studies of early Cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. The Plant Journal. 2003;36:203-214.
10. Vissenberg K, Fry SC, Pauly M, Höfte H, Verbelen JP. XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation. J Exp Botany. 2005;56:673-683.
11. Baran R, Sulová Z, Stratilova E, Farkaš V. Ping-pong character of nasturtium-seed xyloglucan endotransglycosylase (XET) reaction. Gen. Physiol. Biophys. 2000;19:427-440.
12. Uozu S, Ueguchi HK, Hattori K, Matsuoka M. Characterization of XET-Related Genes of Rice. Plant Physiology. 2000;122:853-859.
13. Hennig L, Menges M, Murria J, Gruissem W. Arabidopsis transcript profiling on Affymetrix GeneChip arrays. Plant Molecular Biology. 2004;10:1-9.
14. Redmann J, Haas B, Tanimoto G, Town C. Development and evaluation of Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. The Plant Journal. 2004;38:545-561.
15. Sun Y, Fokar M, Asami A, Yoshida S, Allen R. Characterization of the Brassinosteroid insensitive 1 genes of cotton. Plant Molecular Biology. 2004;54:221-232.

**(Recibido 5-5-2008; Aceptado 20-4-2009)**