

## **Análisis genético de granos de polen de Lima Mexicana cultivados *in vitro* con marcadores SSR (Simple SequenceRepeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**

Miguel F. GARAVELLO<sup>(1)</sup>, Pablo ALEZA GIL<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Citricultura y Producción Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias - IVIA Km. 10, CV-315, 7, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

E-mail de contacto: aleza@ivia.es

El estudio de la estructura genética de los granos de polen de genotipos diploides y euploides de cítricos es de gran interés para los programas de mejora genética de híbridos triploides obtenidos mediante hibridación sexual. A partir de hibridaciones sexuales entre parentales diploides se pueden obtener híbridos triploides como consecuencia de la formación de gametos no reducidos (gametos 2n).

En este trabajo se pretende extraer el ADN de los granos de polen individualizados de Lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swing) cultivados *in vitro* y posterior amplificación del genoma completo para realizar análisis genéticos de cada grano de polen con múltiples marcadores SSR y SNP con el objetivo de identificar la presencia de granos de polen originados mediante gametos 2n y el mecanismo implicado en la formación de los mismos. Para ello, se sembraron granos de polen *in vitro* y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se clasificaron los granos de polen en función de su tamaño, y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 200 µL en los que previamente se depositaron 0,5 µL de una solución de SDS al 0,01%. A continuación, los tubos se sometieron a cinco ciclos de 5 minutos cada uno de enfriamiento a -25°C y calentamiento a 50°C. Luego se incorporó a cada tubo una solución tampón compuesta por proteinasa K y se incubaron una hora a 54°C y 10 minutos a 95°C. Finalmente, se amplificó el genoma de cada grano de polen mediante el REPLI-g Single Cell Kit (QiagenInc., Valencia, CA, USA) lo que nos permitió realizar análisis genéticos de un solo grano de polen con varios marcadores.

Los resultados obtenidos nos han permitido identificar la presencia de granos de polen originados a partir de gametos 2n y actualmente se están analizando con más marcadores para determinar el mecanismo implicado en su formación.