



Agrocienza

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

Serrato Cruz, Miguel Ángel; Hernández Rodríguez, Martha; Savidan, Yves; Bárcenas Ortega, Nina M.
Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp. Utilizando citómetro de flujo
Agrocienza, vol. 34, núm. 6, noviembre-diciembre, 2000, pp. 729-734
Colegio de Postgraduados
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30234607>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CONTENIDO DE ADN Y NIVEL DE PLOIDÍA EN *Tagetes* spp. UTILIZANDO CITÓMETRO DE FLUJO

DNA CONTENT AND PLOIDY LEVEL IN *Tagetes* spp. USING FLOW CYTOMETRY

Miguel Ángel Serrato-Cruz¹, Martha Hernández-Rodríguez², Yves Savidan² y Nina M. Bárcenas-Ortega³

¹Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230, Chapingo, Estado de México. (serrato@taurus1.chapingo.mx). ²Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 06600, México, D.F. ³Especialidad de Postgrado en Genética. IREGEP. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

Se determinó la asociación entre el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía de siete poblaciones de *Tagetes* spp. El contenido de ADN se estimó mediante citómetro de flujo utilizando a *Zea mays* L. como estándar interno. El recuento de cromosomas se hizo en preparaciones citológicas teñidas con acetocarmín. *T. erecta*, *T. foetidissima*, *T. tenuifolia* (dos ecotipos) y dos poblaciones silvestres no identificadas mostraron un contenido promedio de ADN de 2.61 ± 0.23 pg correspondiendo a la ploidía $2x=24$. En estos diploides la variación en el contenido de ADN fue 20 % entre poblaciones y de 4 a 13 % dentro de poblaciones. En *T. patula* el contenido promedio de ADN fue de 5.35 ± 0.13 pg con ploidía $4x=48$. Los resultados confirman que el contenido promedio de ADN se puede utilizar para determinar niveles de ploidía en *Tagetes*.

Palabras clave: *Tagetes*, *T. erecta*, *T. foetidissima*, *T. patula*, *T. tenuifolia*, Asteraceae, cempoalxóchitl, citología, cromosomas.

INTRODUCCIÓN

El género *Tagetes* (Tageteae; Asteraceae) se compone de alrededor de 55 especies distribuidas principalmente en el continente americano, la mayoría de las cuales se localizan en México (Turner y Nesom, 1993). En la actualidad algunas especies de *Tagetes*, conocidas como cempoalxóchitl, son un importante recurso genético potencial para la agroindustria, horticultura ornamental y medicina en México (Serrato y Quijano, 1994).

La mayoría de especies que conforman al género *Tagetes* son diploides con $2n=2x=24$ cromosomas. Las especies *T. erecta* L. y *T. tenuifolia* Cav. tienen números cromosómicos $2n=2x=24$, y $2n=4x=48$ en *T. patula* (Towner, 1961). El conocimiento de sus relaciones filogenéticas aún es limitado (Towner, 1961, 1962; Strother, 1977) y la gran diversidad de variantes morfológicas en materiales silvestres y domesticados, dificulta su identificación taxonómica.

ABSTRACT

The association between nuclear DNA content and ploidy level in seven populations of *Tagetes* spp. was determined. DNA content was estimated by flow cytometry using *Zea mays* L. as internal standard. Chromosome counting was performed in cytological preparations stained with acetocarmine. *T. erecta*, *T. foetidissima*, two ecotypes of *T. tenuifolia* and two unidentified wild populations showed a DNA average content of 2.61 ± 0.23 pg, which corresponds to ploidy level $2x=24$. DNA content variation in these diploids was 20 % among populations and 4 to 13 % within populations. DNA average content in *T. patula* was 5.35 ± 0.13 pg with a ploidy level $4x=48$. These results confirm that DNA average content can be used to determine ploidy levels in *Tagetes*.

Key words: *Tagetes*, *T. erecta*, *T. foetidissima*, *T. patula*, *T. tenuifolia*, Asteraceae, cempoalxóchitl, cytology, chromosomes.

INTRODUCTION

Genus *Tagetes* (Tageteae; Asteraceae) is made up of nearly 55 species distributed in the American Continent, most of them located in México (Turner and Nesom, 1993). Some species of *Tagetes*, known as cempoalxóchitl (marigolds) are an important potential genetic resource to industry, ornamental horticulture, and medicine in México (Serrato and Quijano, 1994).

Most *Tagetes* species are diploid with $2n=2x=24$ chromosomes. *T. erecta* L. and *T. tenuifolia* Cav. have the same chromosome number $2n=2x=24$, and *T. patula* $2n=4x=48$ (Towner, 1961). Knowledge about phylogenetic relationships among these species is still scarce (Towner, 1961, 1962; Strother, 1977), and the great diversity of morphological variants in wild and domesticated materials makes taxonomic identification difficult.

Ploidy level is an important taxonomic character in the Tageteae tribe (Strother, 1977). But, the large number, and specifically the small size of Tageteae chromosomes (from 0.88 to 2.2 μm in *T. erecta*) make chromosome counting difficult and time consuming (Towner, 1961; Strother, 1977).

Se considera que el nivel de ploidía es un importante carácter taxonómico en la tribu Tageteae (Strother, 1977). No obstante, el número y especialmente el tamaño reducido de los cromosomas (*i.e.*, 0.88 a 2.2 μm en *T. erecta*) hacen que las técnicas de recuento cromosómico sean poco prácticas (Towner, 1961; Strother, 1977).

En algunos taxa vegetales el contenido de ADN nuclear se ha utilizado para medir el nivel de ploidía (Cavalier-Smith, 1985). El tamaño del genoma o contenido de ADN se ha determinado en una amplia diversidad de especies (Arumuganathan y Earle, 1991). En la familia Compositae (Asteraceae) tal parámetro es de 1.8 a 2.8 picogramos (pg) de ADN en la tribu Microseridineae (Price y Bachmann, 1975), de 4 hasta 14 pg en la tribu y género Cichorieae-*Crepis* (Jones y Brown, 1976), de 2 a 21 pg en Senecioneae-*Senecio* (Lawrence, 1985) y de 7 a 11 pg en Heliantheae-*Heliathus* (Cavallini y Natali, 1991). En estos trabajos las determinaciones del contenido de ADN nuclear se han hecho por microdensitometría; sin embargo, este método implica elaborar preparaciones citológicas y localizar núcleos en división, lo que lo hace lento en su aplicación. El empleo del citómetro de flujo es una alternativa rápida y permite estudios poblacionales más amplios y detallados respecto a la variación existente de varias ploidías (Galbraith *et al.*, 1983; De Laat *et al.*, 1987).

Con base en la asociación entre el contenido de ADN y los niveles de ploidía (a mayor cantidad de ADN nuclear, mayor número de cromosomas) que se ha detectado en algunas especies vegetales (Bennett, 1987), y la necesidad de determinar la ploidía en estudios de sistemática y ecología evolutiva, el presente trabajo pretende conocer la relación entre el contenido de ADN y el nivel de ploidía en el grupo de especies de *Tagetes*, que hasta ahora no han sido objeto de investigación en este aspecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la porción centro occidental de México, la región de mayor diversidad de especies del género, se recolectaron seis capítulos secos por planta, en veinte plantas por población, en siete poblaciones de *Tagetes* (Cuadro 1).

Recuento de cromosomas

Por disponer de suficiente número, entre 150 y 200 semillas de las siete poblaciones de *Tagetes* fueron germinadas, sin escarificar, en cajas Petri con discos húmedos de papel filtro Whatman Núm. 2. Cuando las raíces tuvieron cerca de 1 cm fueron cortadas y pretratadas con solución acuosa de 8-hidroxiquinolina 0.001 M a 18-24 °C por 4.5 horas; no fue necesario fijar las raíces porque diariamente se disponía de suficientes raíces nuevas. La hidrólisis se hizo con HCl 1N a 60 °C por 8.5 minutos. Posteriormente, las raíces fueron lavadas con agua y transferidas a la solución de Schiff por 40 minutos, después de lo cual se procedió al aplastado en acetocarmín 2 % (García, 1990).

Nuclear DNA content determined by densitometry has been used to determine ploidy levels in some plant taxa (Cavalier-Smith, 1985). Genome size has been determined in a wide diversity of plant species (Arumuganathan and Earle, 1991). In Compositae (Asteraceae) DNA content varied from 1.8 to 2.8 DNA picograms (pg) in the Microseridineae tribe (Price and Bachmann, 1975), from 4 to 14 pg in the Cichorieae-*Crepis* tribe-genus (Jones and Brown, 1976), from 2 to 21 pg in Senecioneae-*Senecio* (Lawrence, 1985) and from 7 to 11 pg in Heliantheae-*Heliathus* (Cavallini and Natali, 1991). Densitometry involves preparations of cytologic specimens and localization of dividing nuclei, making it slow in its application. Flow cytometry is a faster alternative, and it allows for wider and detailed population studies (Galbraith *et al.*, 1983; De Laat *et al.*, 1987).

The association between DNA content and ploidy level (a high amount of nuclear DNA corresponds to a high number of chromosomes) has been documented for some plant species (Bennett, 1987). Ploidy level information is important in plant systematics and evolutionary ecology studies. Therefore, the objective of this study was to determine the relationship between DNA content and ploidy level in *Tagetes* species using flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS

Central western México is the zone of most species diversity for *Tagetes*. Six dry heads per plant were collected from twenty plants in each of seven *Tagetes* populations (Table 1).

Chromosome counting

Seeds (150 to 200) from seven populations of *Tagetes* were germinated, without scarifying, in Petri dishes in moist Whatman No. 2 filter paper disks. When root length was about 1 cm length, roots were excised and then pre-treated with 8-hydroxiquinolin 0.001 M aqueous solution at 18-24 °C for 4.5 hours. It was not necessary to fix root specimens because plenty of fresh roots were available every day. Hydrolysis was done with HCl 1N at 60 °C for 8.5 minutes. Later, roots were washed with water and transferred to Schiff's solution for 40 minutes, and then squashed in 2 % acetocarmine (García, 1990).

Cytological information from five plants per population was obtained and three cells per plant were observed.

Flow cytometry

Plant material. In order to increase germination, seeds from the seven populations were scarified using sharp point tweezers, and were later germinated in Petri dishes at 22 °C in the dark. Seedlings were established in the greenhouse. From these plants, young leaf tissue was used for cell isolation.

Cuadro 1. Características de los sitios de recolección de las poblaciones de *Tagetes* estudiadas.
Table 1. Characteristics of collection sites for *Tagetes* populations.

Población	Condición	Localidad	Altitud (m)	Clima [†]	Temperatura media anual (°C)
<i>T. foetidissima</i>	Silvestre	Ixayoc, Texcoco, Méx. 19° 28' N 98° 48' O	2550	Templado subhúmedo C(w1)	14.5
<i>T. patula</i> L.	Cultivada	Coatlinchán, Texcoco, Méx. 19° 52' N 98° 52' O	2270	Templado subhúmedo C(w0) (w) b(i')	16
<i>T. erecta</i> L.	Cultivada	Coatlinchán, Texcoco, Méx. 19° 27' N 98° 52' O	2270	Templado subhúmedo C(w0) (w) b(i')	16
<i>T. tenuifolia</i> Cav.	Silvestre	Acozac, Ixtapaluca, Méx. 19° 20.5' N 98° 53.1' O	2300	Templado subhúmedo C(w0) (w) b(i')	16
<i>T. tenuifolia</i> Cav.	Silvestre	Tepozteco, Tepoztlán, Mor. 18° 59' N 99° 05' O	1800	Semicálido subhúmedo (A) C (w2) (w) i g	18 a 22
<i>Tagetes</i> sp1	Silvestre	Tlalámac, Ozumba, Méx. 18° 58' N 98° 48.4' O	1700	Templado subhúmedo (C) w1 (w)	16 a 18
<i>Tagetes</i> sp2	Silvestre	Quenchendio, Huetamo, Mich. 18° 35' N 100° 53' O	400	Semiseco lluvias en verano Bs (h') w (w)	26 a 28

[†] Fuente: García (1981).

La información citológica se obtuvo de cinco plantas por población y se observaron tres células por planta.

Citometría de flujo

Material vegetal. Ante el fenómeno de latencia que algunas poblaciones presentan y para asegurar la germinación, se escarificó semillas de las siete poblaciones mediante la eliminación de parte de la testa con pinzas de disección. Estas semillas se germinaron en cajas Petri a 22 °C en oscuridad; las plántulas resultantes se establecieron en invernadero. De estas plantas se utilizó el tejido foliar joven para aislar las células.

Como estándar interno para determinar el contenido relativo de ADN de las muestras, se utilizaron tejidos foliares jóvenes de plantas de maíz (*Zea mays* L.) CIMMYT-“Población 21”.

Aislamiento de núcleos. En cajas Petri de plástico de 6 cm de diámetro se colocaron, sobrepuestos, fragmentos de limbo de hoja de maíz y secciones de hoja de *Tagetes* embebidas en 0.5 mL del buffer descrito por Galbraith *et al.* (1983) y utilizado por Leblanc *et al.* (1995) para maíz. Mediante una navaja de afeitar se fraccionó finamente el combinado de tejidos hasta obtener núcleos en suspensión; se adicionó 1.5 mL más del buffer mencionado y enseguida fueron filtrados a través de un filtro de nilón con poros de 40 µm de diámetro procediéndose a su análisis por medio del citómetro de flujo.

Determinación del contenido de ADN. Para determinar el contenido de ADN nuclear se empleó el citómetro de flujo Partec CA II. El citómetro cuenta con una combinación de filtros para determinar la tinción con el fluorocromo bis-Benzimide (2'-[4-etoxifenil 1]-5-[4-

Young leaf tissue from maize plants (*Zea mays* L.) CIMMYT-“Population 21” was used as an internal standard to determine relative DNA content of *Tagetes* samples.

Nuclei isolation. Maize sheath leaf fragments and pieces of *Tagetes* leaf tissue were placed one on top of the other in 6-cm diameter plastic Petri dishes containing 5 mL of the buffer solution described by Galbraith *et al.* (1983) and utilized by Leblanc *et al.* (1995) for maize. Combined tissues were finely chopped with a razor blade until nuclei in suspension were obtained; 1.5 mL of the same buffer solution were added, and the resulting suspension was filtered using a 40 µm pore diameter nylon filter, and later analyzed by flow cytometry.

DNA determination. Nuclear DNA content was estimated with a Partec CA II flow cytometer. This cytometer has a combination of filters to determine staining using phytochrome bis-Benzimide (2'-[4-etoxifenil 1]-5-[4-metil-1-piperazinil]- 2,5'-bi-1H-benzimidazol) with the aid of DPAC software (Partec GmbH, Münster, Germany) for data computer analysis. Cytometer calibration was done according to Leblanc *et al.* (1995).

Determination of relative DNA content was automatically computed as an index equal to the samples' average fluorescence intensity divided by the internal standard (Leblanc *et al.*, 1995). Ten plants were used per population, and each plant was measured three times, watching out that variation coefficients remained under 5 %, which indicated that samples had no impurities. Therefore, nuclei isolation was repeated until cytometer variation coefficient values were under that specified for this study.

Index values were transformed to absolute values (picograms of nuclear DNA). To do so, maize DNA absolute value was defined

metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) y con el Software DPAC (Partec GmbH, Münster, Alemania) para análisis computarizado de datos. El citómetro se calibró de acuerdo con Leblanc *et al.* (1995).

La determinación del contenido relativo de ADN se computa automáticamente como un índice, que representa el cociente del valor medio de la intensidad de fluorescencia de los núcleos de la muestra y el estándar interno (Leblanc *et al.*, 1995). Se consideraron diez plantas por población y se hicieron tres lecturas por planta cuidando que el CV no fuera mayor de 5 %, que es un indicador de que la muestra no tuvo impurezas. Para ello el proceso de aislamiento de núcleos se repitió hasta que la lectura del citómetro cumplió con el CV requerido.

Los valores del índice se transformaron a valores absolutos (picogramas de ADN nuclear). Para ello se consideró el valor absoluto de ADN de maíz de 4.75 a 5.63 pg referido por Arumuganathan y Earle (1991) para una amplia gama de variación de tipos de maíz. Para el manejo práctico de las transformaciones se consideró el valor promedio de 5 pg de ADN de maíz.

Análisis estadístico. El contenido absoluto de ADN entre y dentro de las siete poblaciones de *Tagetes*, así como entre las lecturas (intraplanta), se analizó mediante el procedimiento PROC GLM del paquete SAS (1993). La comparación de medias se hizo con base en la prueba de Tukey.

RESULTADOS

En células mitóticas de ápices de raíz se cuantificaron 24 cromosomas (2x) en las poblaciones *T. erecta*, *T. foetidissima*, *Tagetes* sp1 y sp2, *T. tenuifolia* Acozac y Tepoztlán, y 48 cromosomas (4x) en la población *T. patula*.

El recuento cromosómico en las plantas estudiadas de las especies y poblaciones consideradas (35 plantas) tardó aproximadamente 630 horas (90 horas por población), mientras que para la determinación del contenido de ADN en esos mismos materiales (70 plantas) se dedicó 21 horas (tres horas por población).

El contenido promedio de ADN de las poblaciones *T. erecta*, *T. foetidissima*, *Tagetes* sp1 y sp2, *T. tenuifolia* Acozac y Tepoztlán fue de 2.38 a 2.97 pg, promedio 2.61 ± 0.23 pg, mientras que la población *T. patula* tuvo 5.35 pg (Cuadro 2). Así, la variación total del contenido de ADN en las poblaciones de *Tagetes* fue de 2.38 a 5.35 pg. Hubo variación significativa en el contenido de ADN entre poblaciones; dentro de poblaciones la variación fue significativa solamente en *T. tenuifolia* Acozac y Tepoztlán, *T. erecta* y *Tagetes* sp2, y, como era de esperarse, no se registró variación en las lecturas dentro de plantas por población.

El contenido de ADN del tetraploide (5.35 pg) fue 2.05 veces mayor que la cantidad promedio de 2.61 pg de las poblaciones diploides. Las poblaciones diploides mostraron más variación entre (20 %) que dentro de poblaciones (4 a 13 %) (Cuadro 2).

between 4.75 to 5.63 pg as reported by Arumuganathan and Earle (1991) for a wide range of variation of maize forms. In the end, a 5-pg average of maize DNA was used to facilitate data transformation.

Statistical analysis. Absolute DNA content within and among seven populations of *Tagetes*, and intraplant DNA readings, were analyzed using PROC GLM from SAS (1993). Mean comparisons were made using Tukey's test.

RESULTS

Counts from root apex mitotic cells indicated chromosome numbers of 24 (2x) for *T. erecta*, *T. foetidissima*, *Tagetes* sp1 and sp2, and *T. tenuifolia* Acozac and Tepoztlán; and of 48 (4x) for *T. patula* population.

Chromosome counting of species and populations included in this study (35 plants) took approximately 630 hours (90 hours per population), while DNA content determination of the same materials (70 plants) took 21 hours (three hours per population).

Average DNA content from populations *T. erecta*, *T. foetidissima*, *Tagetes* sp1 and sp2, *T. tenuifolia* Acozac and Tepoztlán ranged from 2.38 to 2.97 pg, with an average of 2.61 pg; *T. patula* had 5.35 pg (Table 2). Thus, total variation of DNA content in *Tagetes* populations ranged from 2.38 to 5.35 pg. There was significant variation in DNA content among populations; within populations variation was only significant in *T. tenuifolia* Acozac and Tepoztlán, *T. erecta*, and *Tagetes* sp2, and, as expected, there was no variation in readings within plants per population.

Tetraploid DNA content (5.35 pg) was 2.05 times higher than the 2.61-pg average for diploid populations. Diploids showed more variation among (20 %) than within (4 to 13 %) populations (Table 2).

DISCUSSION

Diploid levels of *T. erecta*, *T. foetidissima*, *T. tenuifolia*, *Tagetes* sp1 and sp2, and the tetraploid level for *T. patula*, determined by flow cytometry, agreed with root tip mitotic cell chromosome counting made in the present investigation, and with results obtained by Towner (1961) for *T. erecta*, *T. tenuifolia* and *T. patula*. Ploidy $2x=24$, determined for *Tagetes* sp1 and sp2, is a good starting point to further increase taxonomic knowledge of these wild populations.

Flow cytometry is a quick method for determining genome size, and it would allow increases in collection number and sample size, and in the number of locations, environments, and regions to be sampled. This kind of information would be important in evolution and plant systematics studies of the tribe Tageteae.

Average nuclear DNA content of diploid ($2.60 \text{ pg} \pm 0.23$) and tetraploid ($5.35 \text{ pg} \pm 0.13$) populations were

DISCUSIÓN

Los niveles diploide de *T. erecta*, *T. foetidissima*, *T. tenuifolia* y de las poblaciones *Tagetes* sp1 y sp2, y tetraploide de *T. patula* determinados por citómetro de flujo, coincidieron con el recuento cromosómico hecho en el presente trabajo y con los resultados obtenidos por varios autores para *T. erecta*, *T. tenuifolia* y *T. patula* (Towner, 1961). La ploidía $2x=24$, determinada para las poblaciones *Tagetes* sp1 y sp2, es un buen punto de partida para el conocimiento taxonómico de estas plantas silvestres considerando la insuficiente información que existe al respecto.

La rapidez con la que se midió el nivel de ploidía en *Tagetes* mediante citómetro de flujo permitiría ampliar el tamaño de muestra por colección y el número de ellas, e incluir mayor número de localidades, ambientes y regiones en estudios sobre evolución y taxonomía en *Tagetes* y la tribu Tageteae.

El contenido promedio de ADN nuclear de las poblaciones diploides ($2.61 \text{ pg} \pm 0.23$) y del tetraploide ($5.35 \text{ pg} \pm 0.13$), son estimaciones que sugieren posibles tamaños de genoma que se podrían esperar para otras especies del género, y por otra parte, estimulan el estudio del significado biológico de la variación del contenido de ADN en *Tagetes*. En general, el tamaño del genoma observado para *Tagetes* corresponde a la amplitud estimada para algunos taxa de la familia Asteraceae, de 2 a 21 pg (Price y Bachmann, 1975; Jones y Brown, 1976; Lawrence, 1985; Cavallini y Natali, 1991).

La variación del contenido absoluto de ADN entre y dentro de poblaciones diploides (de 20 % y de 4 a 13 %, respectivamente), es indicador de lo variable que es el tamaño del genoma en *Tagetes*, respuesta que también se ha notificado para *Crepis* (Jones y Brown, 1976), *Helianthus annuus* (Cavallini y Natali, 1991), Microseridinae (Price y Bachmann, 1975) y *Senecio* (Lawrence, 1985) de la familia Asteraceae. Se considera que los cambios en el contenido de ADN involucran pérdida o ganancia de secuencias de ADN repetitivo (Price, 1988) y estos cambios modifican al nucleotipo, que Bennett (1987) lo refiere como el efecto de la cantidad de ADN nuclear (sea funcional o no) sobre el fenotipo (tamaño de cromosomas, ciclo mitótico, duración de la meiosis, duración del ciclo de vida, etc.). Cavallini y Natali (1991) consideran que las pérdidas o incrementos en secuencias de ADN repetitivo se asocian con la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Posiblemente la mayor variación en el contenido de ADN entre las poblaciones diploides de *Tagetes*, comparada con la mostrada dentro de poblaciones, puede relacionarse con las características ambientales de las áreas ecológicas en las que crecen y se reproducen (Cuadro 1).

Cuadro 2. Contenido de ADN nuclear y nivel de ploidía en las poblaciones de *Tagetes* estudiadas (n=10 plantas por población).

Table 2. DNA content and ploidy level in *Tagetes* populations included in this study (n=10 plants per population).

Población	Contenido de ADN (pg)			Ploidía
	Mín-Máx	Media [†]	Desviación estándar	
<i>T. erecta</i>	2.30-2.50	2.38 e	0.05	2x
<i>T. tenuifolia</i>				
Acozac	2.25-2.65	2.42 e	0.11	2x
<i>Tagetes</i> sp1	2.40-2.60	2.49 d	0.05	2x
<i>Tagetes</i> sp2	2.45-2.60	2.51 d	0.04	2x
<i>T. foetidissima</i>	2.80-2.95	2.87 c	0.03	2x
<i>T. tenuifolia</i>				
Tepoztlán	2.80-3.15	2.97 b	0.09	2x
<i>T. patula</i>	5.10-5.70	5.35 a	0.13	4x

[†]Medias con igual letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

estimations suggesting possible genome sizes that could be expected for other *Tagetes* species and, on the other hand, promote research on the biological significance of DNA content variation in *Tagetes*. In general, genome sizes observed for *Tagetes* corresponded to estimated ranges (from 2 to 21 pg) for some Asteraceae taxa (Price and Bachmann, 1975; Jones and Brown, 1976; Lawrence, 1985; Cavallini and Natali, 1991).

Variation of absolute DNA content among and within diploid populations (20 % and 4 to 13 %, respectively) was an indicator of genome size variability in *Tagetes*, a result also observed in *Crepis* (Jones and Brown, 1976), *Helianthus annuus* (Cavallini and Natali, 1991), Microseridinae (Price and Bachmann, 1975) and *Senecio* (Lawrence, 1985) from family Asteraceae. One should consider that changes in DNA content include losses or gains of repetitive DNA sequences (Price, 1988), and these changes modify the "nucleotype" or, as defined by Bennett (1987), the effect of nuclear DNA quantity (functional or not) on the phenotype (chromosome size, mitotic cycle, meiosis duration, life cycle length, etc.). Cavallini and Natali (1991) reported that a decrease or increase in repetitive DNA sequences are associated with adaptation to changing environmental conditions. Possibly most DNA content variation among diploid populations of *Tagetes*, compared to variation within populations, could be related to specific environmental conditions of the ecological zone where populations grew and reproduced (Table 1).

The proportion of average DNA content with 2x and 4x ploidies found in the seven populations of *Tagetes* studied, were also observed in levels 2x to 4x in *Tradescantia*-Comelinaceae species (Martinez and Ginzo, 1985); levels 2x to 6x in *Fraxinus*-Oleaceae (Black and

La proporción del contenido de ADN promedio con las ploidías 2x y 4x, encontrada con las siete poblaciones de *Tagetes* estudiadas, también se ha observado en los niveles 2x a 4x en algunas especies de *Tradescantia*-familia Comelinaceae (Martinez y Ginzo, 1985); en los niveles 2x a 6x en *Fraxinus*-familia Oleaceae (Black y Beckmann, 1983) y en varias especies de *Actinidia* (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994). Tal asociación, determinada mediante el empleo del citómetro de flujo, facilitaría analizar rápidamente la ploidía en estudios citológicos y en programas de hibridación que requieren poblaciones variables.

CONCLUSIONES

La asociación entre el contenido de ADN promedio y el nivel de ploidía diploide y tetraploide en las siete poblaciones de *Tagetes* exploradas, puede facilitar, con rapidez, el análisis de la ploidía de numerosas poblaciones de *Tagetes* mediante citómetro de flujo.

LITERATURA CITADA

- Arumuganathan, K., and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9(3): 208-218.
- Bennett, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implication. *New Phytol.* 106: 177-200.
- Black, C. L., and R. L. Beckmann. 1983. The variability of nuclear DNA and its implication for polyploidy in white ash (*Fraxinus americana* L.: Oleaceae). *Am. J. Bot.* 70: 1420-1423.
- Cavalier-Smith, T. 1985. *The Evolution of Genome Size*. John Wiley and Sons. New York. USA. 345 p.
- Cavallini L., and L. Natali. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44: 93-107.
- De Laat, A. M. A., W. Göhde, and M. J. D. C. Vogelzang. 1987. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed.* 99: 303-307.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkis, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. México, D. F. 252 p.
- García V., A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 144 p.
- Jones, R. N., and L. M. Brown. 1976. Chromosome evolution and DNA variation in *Crepis*. *Heredity* 36(1): 91-104.
- Lawrence, M. E. 1985. *Senecio* L. (Asteraceae) in Australia: Nuclear DNA amounts. *Aust. J. Bot.* 33: 221-232.

Beckmann, 1983), and several species of *Actinidia* (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994). The association between average DNA content and ploidy, determined by flow cytometry, would speed ploidy analysis in cytological studies and hybridization programs that require the screening of large populations.

CONCLUSIONS

The association between average DNA content to diploid and tetraploid ploidy levels found in seven populations of *Tagetes* can facilitate and speed up ploidy analysis in large populations of *Tagetes* using flow cytometry.

—End of the English version—



- Leblanc, O., M. Dueñas, M. Hernandez, S. Bello, V. Garcia, J. Berthaud, and Y. Savidan. 1995. Chromosome doubling in *Tripsacum*. The production of artificial sexual tetraploid plants. *Plant Breed.* 114: 224-230.
- Martinez, M., and H. D. Ginzo. 1985. DNA content in *Tradescantia*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 766-775.
- Ollitrault-Sammarcelli, F., J. M. Legave, N. Michaux-Ferriere, and A. M. Hirsch. 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Sci. Hortic.* 57: 303-313.
- Price, H. J. 1988. Nuclear DNA variation among higher plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1248-1257.
- Price, H. J., and K. Bachmann. 1975. DNA content and evolution in the Microseridinae. *Am. J. Bot.* 62: 262-267.
- SAS Institute. 1993. *SAS/STAT Users Guide*. Ver. 6. 4th ed. SAS Institute Inc. NC, USA. 1686 p.
- Serrato, C., M. A. y L. Quijano A. 1994. Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión Bibliográfica (1984-1992). *Memorias I Simposium Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible Tradicional*. CEICADAR. Colegio de Postgraduados. Puebla, México. pp: 228-238.
- Strother, J. L. 1977. *Tagetes*-systematic review. *In: The Biology and Chemistry of the Compositae*. Heywood, V. H., J. B. Harborne, and B. O. Turner (eds.). Academic Press. New York. USA. pp: 769-783.
- Towner, J. W. 1961. Cytogenetic studies on the origin of *Tagetes patula* I. Meiosis and morphology of diploid and allotetraploid *T. erecta* X *T. tenuifolia*. *Am. J. Bot.* 48: 743-751.
- Towner, J. W. 1962. Cytogenetic of *Tagetes jaliscensis* X *T. erecta*. *Am. J. Bot.* 49: 1064-1067.
- Turner, B. L., and G. L. Nesom. 1993. Biogeography, diversity, and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae. *In: Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). Oxford Univ. Press. New York, USA. pp: 290-299.