

MICORRIZAS ARBUSCULARES Y ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS EN GENTIANACEAE NATIVAS DE LA ARGENTINA

LEONARDO A. SALVARREDI¹, ESTEBAN M. CRESPO², EUGENIA MENOYO¹, EVA M. FILIPPA³,
GLORIA E. BARBOZA³ y MÓNICA A. LUGO¹

Summary: Arbuscular mycorrhizas and dark septates endophytes in native Gentianaceae from Argentina. The roots of five native species of Gentianaceae distributed in different environments of Argentina, four belonging to *Gentianella* and one to *Gentiana*, were studied for fungal symbionts colonization. Arbuscular mycorrhizal structures belonging to *Paris* type (intracellular hyphae and coils) and dark septates endophytes (DS) (hyphae microesclerotia) were observed. Three of the species studied were associated to both arbuscular mycorrhizas (AM) and DS, only one to DS and the other only to AM. Root colonization by DS (hyphae and microesclerotia) and AM hyphal colonization were host dependent. This is the first report of AM and DS colonization for *Gentianella helianthemoides*, *G. magellanica*, *G. parviflora* and *Gentiana prostrata*. Host and environmental influence on AM and DS colonization is discussed.

Key words: root endophytes, host preference, *Gentiana*, *Gentianella*, *Paris* colonization pattern.

Resumen: Se estudió la colonización de raíces por simbiontes fúngicos en cinco especies de Gentianaceae nativas distribuidas en distintos ambientes de la Argentina, cuatro pertenecientes a *Gentianella* y una a *Gentiana*. Se observaron estructuras micorrícicas arbusculares pertenecientes al tipo *Paris* (hifas y circunvoluciones intracelulares) y endófitos septados oscuros (SO) (hifas y microesclerocios). Tres de las especies estudiadas se asociaron a micorrizas arbusculares (MA) y SO, una sólo a SO y otra sólo a MA. La colonización radical por SO (hifas y microesclerocios) y la colonización hifal MA difirieron con el hospedante. Este es el primer reporte de colonización por MA y SO en *Gentianella helianthemoides*, *G. magellanica*, *G. parviflora* y *Gentiana prostrata*. Se discute la influencia del hospedante y del ambiente en la colonización por MA y SO.

Palabras clave: endófitos radicales, preferencia del hospedante, *Gentiana*, *Gentianella*, patrón de colonización *Paris*.

INTRODUCCIÓN

Gentianaceae es una familia con ca. 87 géneros, que incluye 6 tribus y ca. 1700 especies (Struwe *et al.*, 2002). De distribución cosmopolita, habita en regiones templadas y subtropicales, aunque está ausente en la Antártida. Son plantas de hábito gene-

ralmente herbáceo y muy pocas leñosas; presentan distintas estrategias metabólicas, siendo la gran mayoría de las especies autotróficas y solamente 30 son aclorófilas y micoheterotróficas (Smith & Read, 2008). En Argentina se han registrado 10 géneros y 42 especies de Gentianaceae. En particular, *Gentianella* Moench y *Gentiana* L. están representados por 29 y una especie, respectivamente (Filippa & Barboza, 2006, 2008). Las especies incluidas en *Gentianella* están distribuidas a lo largo de la Cordillera de los Andes, sobre suelos pedregosos y en pastizales de "vegas" altas, hasta 4500 m, dentro de las provincias biogeográficas Altoandina, Puneña

¹ IMIBIO-CONICET, FQByF-UNSL

² Diversidad-Vegetal I, FQByF-UNSL

³ IMBIV-CONICET-UNC y FCQ-UNC

E-mail: lugo@unsl.edu.ar

y Prepuneña. En las Yungas se las encuentra bajo la protección de bosques de *Alnus* sp., en las provincias biogeográficas Patagónica, Subantártica e Insular son comunes en vegas y turberas, mientras que en las provincias Chaqueña y del Monte se encuentran en serranías que superan los 1000 m. *Gentianella magellanica* y *G. multicaulis* son las especies de distribución geográfica más extensa, llegando la primera hasta Tierra del Fuego e Islas Malvinas (Filippa & Barboza, 2006, 2008). En el caso de *Gentiana*, la única especie sudamericana es *G. prostrata*, que habita a lo largo de la zona cordillerana en vegas, mallines y turberas, desde Venezuela hasta Tierra del Fuego, entre los 1800 a 4500 m (Fabris, 1983; Filippa & Barboza, 2008).

Cabe destacar que las entidades de Gentianaceae se caracterizan por la presencia mayoritaria de secoiridoides y xantonas, por lo que son empleadas en etnomedicina como antihepatotóxicas y como tónicos digestivos y, además, en la industria alimenticia son utilizadas en la preparación de aperitivos (Jensen & Schripsema, 2002). En nuestro país, se registran distintas especies nativas de *Centaurium* Hill emend. Adans., *Gentiana* y *Gentianella* empleadas con la misma finalidad (Filippa & Barboza, 2006; Barboza *et al.*, 2009), habiéndose comprobado además, actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en *Gentianella multicaulis* (sub nom. *G. achalensis* (Gilg) Ho & Liu) (Nadinic *et al.*, 1997, 2002).

La mayoría de las plantas terrestres presentan asociaciones micorrícicas arbusculares (MA), siendo éste el tipo más común de asociación en ecosistemas naturales (Smith & Read, 2008). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son representantes de Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), en su mayoría biótrofos que colonizan por medio del micelio intrarradical la corteza de la raíz y desarrollan, además, micelio extrarradical que beneficia a la planta en la absorción de nutrientes minerales (principalmente fosfatos) y agua del suelo. El micelio intrarradical puede presentar dos patrones de colonización extremos, caracterizados por la distribución diferencial de estructuras micorrícicas dentro del hospedante: el tipo *Arum*, donde se observa la presencia de hifas intercelulares y arbuscúlos; y el tipo *Paris*, caracterizado por la colonización intracelular de hifas que forman circunvoluciones típicas y arbusculadas y una distribución intercelular escasa o nula de hifas en la corteza (Smith & Read, 2008).

Entre ambos patrones de colonización se observa un continuo de tipos intermedios que varía en función de las especies involucradas (planta-hongo), las características del suelo y las condiciones nutricionales de la especie vegetal (Dickson, 2004).

Por otra parte, las raíces de las plantas pueden ser colonizadas por un grupo diverso de hongos, denominados endófitos septados oscuros (SO), cuyo nivel de asociación puede variar desde patogénico hasta mutualista (Jumpponen, 2001), condición, esta última, que resulta en un incremento en la biomasa del hospedante y una mayor captación de nutrientes como P y N (Jumpponen *et al.*, 1998). La colonización por SO sigue un patrón común en la mayoría de las plantas; inicialmente, las hifas toman contacto con la superficie radical y forman una red micelial, tanto en la superficie como en el interior de la raíz. Las hifas pueden ingresar a la raíz a través de pelos radicales, células epidérmicas, células del meristema apical o por medio de las heridas generadas a partir de las zonas de emergencia de raíces laterales. Una vez en el interior de la raíz, las hifas invaden las células epidérmicas y corticales, en donde pueden observarse grupos de hifas melanizadas, compactas y con paredes engrosadas, llamadas microesclerocios. Estas estructuras han sido consideradas como estructuras de resistencia frente a condiciones adversas (Peterson *et al.*, 2004).

A nivel mundial, es escaso el registro de Gentianaceae asociadas simultáneamente a ambos endófitos de raíz (HMA y SO), así como también la sola asociación con MA (Harley & Harley, 1987; Wang & Qiu, 2006). En todos los casos, la asociación que se establece corresponde morfológicamente al tipo *Paris* (Smith & Read, 2008). Cabe mencionar que en referencia al total de especies representantes de las distintas estrategias nutricionales en Gentianaceae, una mayor proporción de los estudios sobre las asociación con MA se han enfocado en especies micoheterótrofas (Imhof, 1999; Bidartondo *et al.*, 2002; Franke, 2002; Franke *et al.*, 2006; Wang & Qiu, 2006). En contraste, es escaso el estudio de las interacciones MA y Gentianaceae autototróficas, representadas por más de 1000 especies (Jacquelinet-Jeanmougin & Gianinazzi-Pearson, 1983; McGee, 1985; Jacquelinet-Jeanmougin *et al.*, 1987; Wang & Qiu, 2006; Sýkorová *et al.*, 2007). En nuestro país, sólo se ha registrado la presencia de asociación MA y SO en una especie nativa (Menoyo *et al.*, 2007).

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) estudiar la colonización radical por HMA y SO en representantes nativos de interés medicinal de *Gentiana* y *Gentianella*, que habitan distintos ambientes de la Argentina; b) aportar datos básicos sobre las interacciones micorrícicas potencialmente útiles en la generación de cultivos para el aprovechamiento industrial de estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio y especies estudiadas

Se recolectaron seis individuos de *Gentianella multicaulis* (Gillies ex Griseb.) Fabris y cinco de *G. parviflora* (Griseb.) T. N. Ho en Córdoba, Dpto. San Alberto, Pampa de Achala, ca. 2100 m (Filippa *et al.* 72 y Filippa *et al.* 73, respectivamente); nueve individuos de *G. magellanica* (Gaudich.) Fabris ex D. M. Moore en Neuquén, Dpto. Picunches, ca. 1870 m (Barboza *et al.* 1222); seis individuos de *G. helianthemoides* (Gilg) Fabris en Salta, Dpto. Chicoana, Quebrada de La Sirena (Barboza *et al.* 709); y dos individuos de *Gentiana prostrata* Haenke en Jujuy, Dpto. Humahuaca, Mina Aguilar, ca. 3650 m (Negritto *et al.* 195). Los sitios de recolección para cada especie se eligieron de acuerdo a la abundancia de individuos, los que se recolectaron al azar en el período de floración-fructificación (entre febrero y abril). Los materiales de referencia fueron depositados en el herbario CORD.

Detección y cuantificación de endófitos (HMA y SO) de raíz

Las raíces de cada uno de los individuos recolectados fueron separadas y lavadas con agua corriente, eligiéndose luego las más delgadas (no lignificadas), las que se clarificaron y tiñeron siguiendo la metodología de Phillips y Hayman (1970). Finalmente, se montaron en alcohol polivinílico de acuerdo a Omar *et al.* (1979); por cada individuo se realizó un preparado microscópico.

Las raíces fueron observadas a 400x en un microscopio Olympus BH-2, cuantificándose al menos 100 intersecciones por preparado. Las micrográficas se obtuvieron con una cámara digital Sony DSC-H9.

El porcentaje de colonización MA se determinó usando el método de las intersecciones de McGonigle *et al.* (1990) cuantificándose arbuscúlos, vesículas e hifas de HMA; además, para la cuantificación de SO se siguió a Lugo *et al.* (2009), registrándose el porcentaje de hifas (%SO) y microesclerocios (%MESO).

Tipo de colonización MA y SO

Para la caracterización morfo-anatómica de la colonización radical MA se consideró la localización de las hifas (intracelular o intercelular), la presencia de arbuscúlos, vesículas y circunvoluciones típicas y arbusculadas (Smith & Read, 2008).

En cuanto a la colonización por SO, se consideró la distribución del micelio pigmentado y la morfología de los microesclerocios según lo descripto por Barrow (2003), Barrow & Aaltonen (2001) y Jumpponen & Trappe (1998).

Análisis estadístico

Las variables porcentaje de colonización por hifas de HMA y SO se analizó considerando la especie hospedante mediante ANAVA no paramétrico (Kruskal Wallis) y test *a posteriori* de comparaciones múltiples. La variable %MESO fue analizada con el test no paramétrico de Mann Whitney, considerando como factor a la especie hospedante. Además, en cada hospedante se analizó la relación entre las variables porcentaje de colonización por hifas de HMA y SO mediante correlaciones de Spearman, excepto en *G. prostrata* donde se recolectaron solamente dos ejemplares. Todos los análisis se efectuaron con $\alpha = 0.05$, utilizando el programa *Infostat* versión Beta 2001.

RESULTADOS

Cuantificación de la colonización radical

La colonización MA y por SO varió entre las distintas especies de Gentianaceae, observándose una diferencia significativa en relación al hospedante ($H=17,98214$, $p=0,00039$ y $H=17,73941$, $p=0,00095$, respectivamente) (Fig. 1). *Gentianella multicaulis* presentó los mayores niveles de colonización por ambos endófitos, determinándose la pre-

sencia de vesículas y arbusculos (Tabla 1), mientras que en *G. magellanica* se observaron vesículas y circunvoluciones (Fig. 2 B). *Gentianella multicaulis*, *G. magellanica* y *Gentiana prostrata* estuvieron simultáneamente colonizadas por hifas de HMA y de SO (Tabla 1), sin observarse una correlación significativa en la colonización por ambos endófitos (*G. magellanica* $r=-0,1167$ y $p=0,74$ y en *G. multicaulis* $r=-0,3143$ $p=0,48$). *Gentianella parviflora* presentó exclusivamente colonización por SO, mientras que en *G. helianthemoides* se detectaron los niveles más bajos de colonización por HMA, sin observarse colonización por SO (Tabla 1). Por otro lado, en *G. multicaulis* y *Gentiana prostrata*, se determinó la presencia de microesclerocios sin detectarse diferencias significativas entre los hospedantes ($W=3$; $p=0,07$).

Tipo de colonización por HMA y SO

En todos los casos donde se determinó la presencia de HMA la colonización fue exclusivamente intracelular, observándose hifas y circunvoluciones típicas y arbusculadas (Fig. 2 A).

La colonización por SO presentó hifas intercelulares pigmentadas en los tejidos corticales de la raíz y se cuantificó en *G. multicaulis*, *G. magellanica*, *G. parviflora* y *Gentiana prostrata* (Tabla 1); también se observaron microesclerocios en *G. magellanica*, *G. multicaulis* y *Gentiana prostrata*, cuantificándose en estos dos últimos taxones. Cabe mencionar que la morfología de los microesclerocios difirió entre *G. magellanica* (Fig. 2 C) y *G. multicaulis* (Fig. 2 D).

DISCUSIÓN

En este trabajo se cita por primera vez la co-ocurrencia de MA y SO en *Gentianella magellanica* y *Gentiana prostrata*, así como la presencia de MA en *G. helianthemoides* y de SO en *G. parviflora*. Además, se cuantificó la colonización de ambos endófitos de raíz en todas las especies estudiadas.

La presencia de hifas intracelulares y circunvoluciones típicas y arbusculadas, permitieron determinar el tipo de colonización Paris (Smith & Read, 2008) en todas las especies analizadas, coincidiendo con lo registrado para otras Gentianaceae exóticas (Jacquelinet-Jeanmougin & Gianinazzi-Pearson, 1983; McGee, 1985; Jacquelinet-Jeanmougin *et al.*,

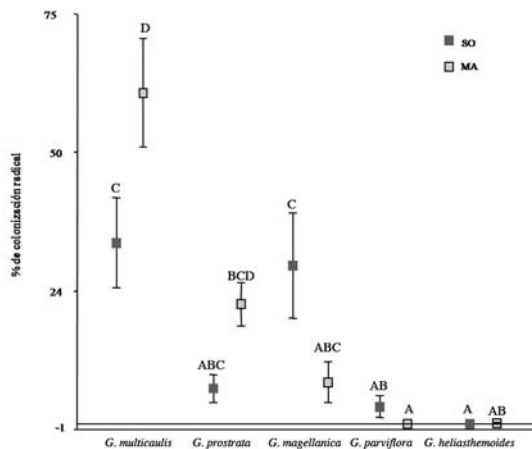


Fig. 1. Porcentaje de colonización por hifas de HMA y SO para las Gentianaceae estudiadas. Los datos son medias y errores estándares; se usaron letras diferentes para indicar diferencias significativas ($p<0,05$).

1987; Smith & Read, 2008) y en la especie nativa *G. multicaulis* (Menoyo *et al.*, 2007)

En distintas familias de hospedantes, no existe especificidad hospedante-HMA en sentido estricto (Helgason *et al.* 2002; Vandenkoornhuys *et al.*, 2002; Scheublin *et al.*, 2004). En Gentianaceae autotróficas, mediante herramientas moleculares se ha registrado una preferencia diferencial hospedante-HMA (Sýkorová *et al.*, 2007), mientras que en especies micoheterótrofas se ha observado especificidad por el simbionte fúngico (Bidartondo *et al.*, 2002). En este trabajo, las variaciones observadas en el porcentaje de colonización MA y SO podrían asociarse a la influencia de la especie hospedante sobre la colonización por HMA y SO. Sin embargo, se debe considerar que la mayoría de las especies estudiadas fueron recolectadas en distintos hábitat, por lo que la colonización MA podría estar influenciada por factores ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, luz y temperatura (Sanders & Fitter, 1992; Smith & Read, 2008). Cabe mencionar que *G. multicaulis* y *G. parviflora* fueron recolectadas simultáneamente en el mismo sitio, observándose, respectivamente, presencia y ausencia de colonización micorrícica y una diferencia significativa en la colonización por SO. Por lo tanto, en este caso, la influencia del hospedante sobre la colonización por HMA y SO sería mayor que la de los factores ambientales. Asimismo, el elevado nivel de colonización MA determinado en *G. multicaulis* coincide con lo reportado por Menoyo *et al.* (2007). Estas observaciones permitirían reforzar

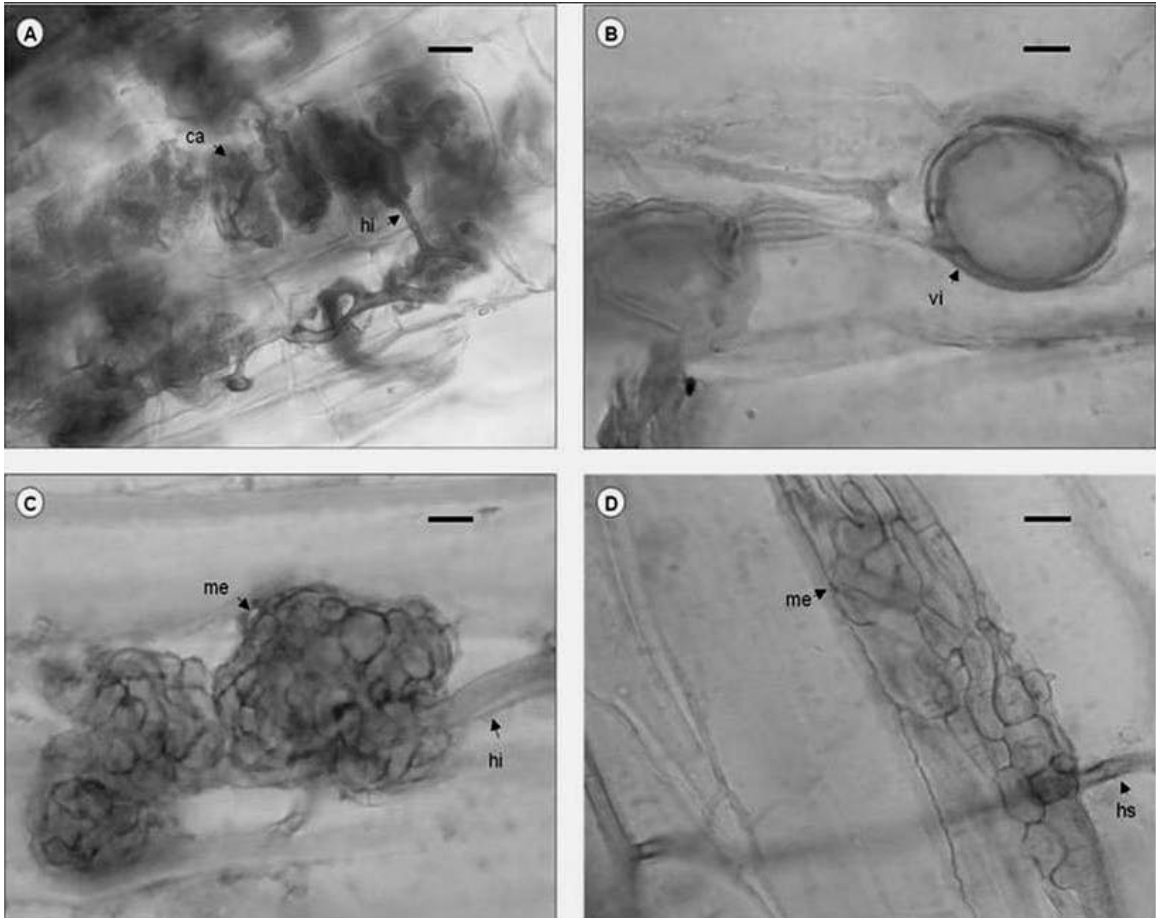


Fig. 2. Patrones de colonización de HMA y SO. **A-B-C:** *Gentianella magellanica*. A, colonización tipo *Paris* con circunvoluciones arbusculadas en células radicales contiguas; B, vesícula intercelular; C, co-ocurrencia de hifas de HMA y microesclerocios de SO. **D.** *G. multicaulis*, hifas intercelulares y microesclerocio laxo de SO; Abreviaturas: (ca) circunvoluciones arbusculadas, (hi) hifa intracelular, (hs) hifa de SO, (me) microesclerocio, (vi) vesícula intercelular. Barras: A=12mm, B=6,5mm, C y D= 5mm.

Tabla 1. Porcentaje de colonización MA (hifas, vesículas y arbusculos) y SO (hifas y microesclerocios –MESO–), en los distintos hospedantes. Los datos representan la media \pm error estándar.

Hospedante	n	% Hifas MA	% Vesículas	% Arbúsculos	% Hifas SO	% MESO
<i>G. multicaulis</i>	6	60,57 \pm 9,99	4,86 \pm 1,80	0,84 \pm 0,40	33,17 \pm 8,20	23,60 \pm 8,28
<i>G. parviflora</i>	5	-	-	-	3,20 \pm 1,96	-
<i>G. magellanica</i>	9	7,62 \pm 3,75	-	-	-	28,93 \pm 9,51
<i>G. helianthemoides</i>	6	0,17 \pm 0,17	-	-	-	-
<i>G. prostrata</i>	2	22,00 \pm 4	-	-	6,5 \pm 2,5	3,00 \pm 1,00

la hipótesis de un efecto del hospedante sobre la colonización MA y por SO, la que podría ser confirmada en futuros estudios con condiciones controladas para los distintos hospedantes.

Por otra parte, en contraste con la ubicuidad de los SO, el conocimiento de su interacción con MA es escaso; sin embargo, el estudio de estas interacciones ha adquirido en la actualidad una renovada atención (Urcelay *et al.*, 2005; Li & Guan, 2007). En el presente trabajo, si bien la correlación negativa entre la colonización por HMA y SO no fue significativa, la co-ocurrencia de ambos endófitos en tres especies analizadas plantea interrogantes para futuros estudios acerca del significado ecológico de esta doble asociación en Gentianaceae. Asimismo, estos conocimientos podrían considerarse en el desarrollo de prácticas agronómicas efectivas en el aumento de la productividad de estos hospedantes con miras a su cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se realizó en el marco del proyecto PROIPRO 2-0302, financiado por la FQByF (UNSL) y contó también con aportes de la Secretaría de Ciencia y Tecnología (UNC), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba y CONICET. Los autores agradecen a la Lic. en Cs. Biológicas M. Polanco por la tinción de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- BARBOZA, G., J. J. CANTERO, C. O. NUÑEZ, A. PACCARONI & L. ARIZA ESPINAR. 2009. Medicinal Plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentinean Flora. *Kurtziana* 34: 7-365.
- BARROW, J. R. & R. E. AALTONEN. 2001. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza* 11: 199-205.
- BARROW, J. R. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239-247.
- BIDARTONDO M. I., D. REDECKER, I. HIJRI, A. WIEMKEN, T. D. BRUNS, L., DOMINGUEZ, A. SERSIC, J. R. LEAKE & D. J. READ. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389-392.
- DICKSON, S. 2004. The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 163: 187-200.
- FABRIS, H. A. 1983. Gentianaceae. En: A. L. Cabrera (dir.). *Fl. Prov Jujuy* 8: 55-84. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires.
- FILIPPA, E. M. & G. E. BARBOZA. 2006. Gentianaceae *Flora Fanerogámica Argentina* 102: 1-46. PROFLORA-CONICET.
- FILIPPA, E. M. & G. E. BARBOZA. 2008. Gentianaceae. En: F. O. Zuloaga, O. Morrone & M. J. Belgrano (eds.), Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Monogr. Missouri Bot. Garden* 107: 2322-2333.
- FRANKE, T. 2002. The myco-heterotrophic *Voyria flavescens* (Gentianaceae) and its associated fungus. *Mycol. Progr.* 1: 367-376.
- FRANKE T., L. BEEKEN, M. DORING, A. KOCYAN & R. AGERER. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus* group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycol. Progr.* 5: 24-31.
- HARLEY, J. L. & E. L. HARLEY. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 105: 1-102.
- HELGASON, T., J. W. MEARRYWEATHER, J. DENISON, P. WILSON, J. P.W. YOUNG & A. H. FITTER. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *J. Ecol.* 90: 371-384.
- IMHOF, S. 1999. Root morphology, anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria aphylla* (Jacq.) Pers. (Gentianaceae). *Mycorrhiza* 9:33-39.
- JACQUELINET-JEANMOUGIN, S. & V. GIANINAZZI-PEARSON 1983. Endomycorrhizas in the Gentianaceae. I. The Fungi associated with *Gentiana lutea* L. *New Phytol.* 95: 663-666.
- JACQUELINET-JEANMOUGIN, S., V. GIANINAZZI-PEARSON & S. GIANINAZZI. 1987. Endomycorrhizas in the Gentianaceae. II. Ultrastructural aspects of symbiotic relationships in *Gentiana lutea* L. *Symbiosis* 3: 269-286.
- JENSEN, S. R. & J. SCHRIPEMA. 2002. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: L. Struwe & V. A. Albert (eds.). *Gentianaceae - Systematics and Natural History*, pp. 573-631. Cambridge University Press, Cambridge.
- JUMPPONEN, A. & J.M. TRAPPE. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140: 295-310.
- JUMPPONEN, A., K.G. MATTSON & J. M. TRAPPE. 1998. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* 7: 261-265
- JUMPPONEN, A. 2001. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza* 11: 207-211.
- LI, A.R. & K.Y. GUAN. 2007. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from northwest of Yunnan Province, China. *Mycorrhiza* 17:103-109.
- LUGO, M. A, M. G. MOLINA & E. M. CRESPO. 2009. Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in bromeliads from South American arid environment. *Symbiosis* 47: 17-21.
- McGEE, P. A. 1985. Lack of spread of endomycorrhizas of *Centaurium* (Gentianaceae). *New Phytol.* 101: 451-458.
- MCGONIGLE, T. P., M. H. MILLER, D. G. EVANS, D. L. FAIRCHILD & J. A. SWAM. 1990. A new methods which

L.A. Salvarredi *et al.* - Endófitos radicales en Gentianaceae

- gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- MENOYO, E., A. G. BECERRA & D. RENISON. 2007. Mycorrhizal associations in *Polylepis* woodlands of Central Argentina. *Canad. J. Bot.* 85: 526-531.
- NADINIC, E., C. P. LÓPEZ, C. SAAVEDRA, M. T. NÁJERA, A. L. BANDONI, E. SPEGAZZINI, M. T. CASTRO & S. L. DEBENEDETTI. 1997. Analytical assays of Argentine herbal drugs known as "nencia". *Acta Hort. (ISHS)* 503: 155-159.
- NADINIC, E., C. PENNA, C. L. SAAVEDRA, J. D. COUSSIO, G. GUTKIND & S. L. DEBENEDETTI. 2002. Aislamiento de los Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). *Acta Farm. Bonaerense.* 21: 123-130.
- OMAR, M. B., BOLLAND, L. & W. A. HEATHER. 1979. P. V. A. (polivinil alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bull. Brit. Mycol. Soc.* 13: 31-32.
- PETERSON, L. R., H. B. MASSICOTTE & L. H. LEWIS. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press. Ottawa.
- PHILLIPS, J. M. & D. S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- SANDERS, I. R. & A. H. FITTER. 1992. The ecology and functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. I. Seasonal patterns of mycorrhizal occurrence and morphology. *New Phytol.* 120: 517-524.
- SCHEUBLIN, T. R., K. P. RIDGWAY, J. P. W. YOUNG & M. G. A. VAN DER HEIJDEN. 2004. Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6240-6246.
- SCHÜBLER, A., D. SCHWARZOTT & C. WALKER. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- SMITH, S. E. & D. J. READ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokio, Toronto.
- STRUWE, L., J. W. KADEREIT, J. KLACKENBERG, S. NILSSON, M. THIV, VON HAGEN & V. A. ALBERT. 2002. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: L. Struwe & V. A. Albert (eds.). *Gentianaceae - Systematics and Natural History*, pp. 21-309. Cambridge University Press, Cambridge.
- SÝKOROVÁ, Z., A. WIEMKEM & D. REDECKER. 2007. Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5426-5434.
- URCELAY, C., P. A. TECCO & F. CHIARINI. 2005. Micorrizas arbusculares del tipo *Arum* y *Paris* y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40: 151-155.
- VANDENKOORNHUYSE, P., R. HUSBAND, T. J. DANIELL, I. J. WATSON, J. M. DUCK, A. H. FITTER & J. P. W. YOUNG. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol. Ecol.* 11:1555-1564.
- WANG, B. & Y. L. QIU. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-316.

Recibido el 26 de marzo de 2010, aceptado el 28 de mayo de 2010