

IDENTIFICACIÓN DE UN DERIVADO DE LANOSTEROL PROCEDENTE DEL HONGO CULTIVADO *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert

IDENTIFICATION OF LANOSTEROL DERIVATES FROM THE CULTIVATED FUNGUS *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert

Olivia Márquez-Fernández¹; Eloy Herrera²; Olaya Castellanos-Onorio¹; Arturo Estrada-Torres³; Ángel Trigos^{1*}.

¹Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Universidad Veracruzana. Calle Médicos 5, Col. Unidad del Bosque. C. P. 91010. Xalapa, Veracruz. Correo-e: atrigos@uv.mx (* Autor para correspondencia).

²Escuela de Biología-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 76, Cd. Universitaria, Av. San Claudio s/n. C. P. 72579. San Manuel, Puebla, Puebla.

³Laboratorio de Biodiversidad, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas-Universidad Autónoma de Tlaxcala. km 10.5 Autopista San Martín Texmelucan-Tlaxcala. C. P. 90122. Ixtacuixtla, Tlax.

RESUMEN

Los hongos micorrizógenos se encuentran en asociación con las raíces de muchas plantas, incluyendo casi todas las especies de árboles como la familia Pinaceae. Algunos derivados triterpénicos de lanosterol se han aislado tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus arhizus*. En el presente trabajo, se cultivó una cepa de la especie *P. arhizus*, aislada de bosques de pino en Oaxaca en condiciones de laboratorio, con el fin de determinar qué tipo de compuestos se pueden encontrar en una cepa mexicana cultivada bajo condiciones asimbióticas y sus posibles implicaciones ecológicas. Los resultados confirman que, en la fermentación líquida *in vitro* del micelio, la cepa aislada de los bosques de México presenta el mismo tipo de triterpenos sin funcionalidad con el carbono-23 como otras cepas procedentes de bosques de Europa y Brasil, a pesar de que se utilizó un medio de cultivo PDA en lugar del medio de cultivo Melin-Norkrans.

PALABRAS CLAVE:

22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3b-22-diol; 22-R-lanostan-28-metil-8, 24(28)-dien-3b-22-diol; pisolactona; 25-metil pisolactona; micelio.

ABSTRACT

Mycorrhizal fungi can be found in association with the roots of many plants, including almost all tree species such as the Pinaceae family. Some triterpene derivatives of lanosterol have been isolated both in the mycelium as well as in the fruiting bodies of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. In order to determine, what type of compounds can be found as well as any possible ecological implications involved in the case of a Mexican strain cultivated under asymbiotic conditions in the present research work, a strain isolated from *P. arhizus* from pine woods from Oaxaca was grown under laboratory conditions. These results confirm that the strain isolated from the forests of Mexico presents the same type of triterpenes unfunctionalized at carbon-23 in the *in vitro* liquid fermentation of mycelium, like other strains from forests in Europe and Brazil, despite the fact that they we used a PDA medium culture instead of a half Melin-Norkrans medium culture.

KEYWORDS:

22-R-lanostan-8,24(28)-dien-3β-22-diol; 22-R-lanostan-28-methyl-8,24(28)-dien-3β-22-diol; pisolactone; 25-methyl pisolactone; mycelium.



Recibido: 03 de octubre de 2012
Aceptado: 27 de junio de 2013
doi: 10.5154/r.rchscfa.2012.10.056
<http://www.chapingo.mx/revistas>

INTRODUCCIÓN

La simbiosis micorrizógena se produce con un gran número de plantas y aproximadamente 5,000 especies de hongos, en su mayoría ascomicetos y basidiomicetos. Este tipo de simbiosis se considera casi obligada tanto para el árbol como para el hongo en algunas especies, y desempeña un papel esencial en el ciclo de nutrientes y el funcionamiento de los ecosistemas (Brundett, 1991; Estrada-Torres & Santiago-Martínez, 2003; Santiago-Martínez, Varela, & Estrada-Torres, 1993; Smith & Read, 1997). El basidiomiceto *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert es un hongo ectomicorrizógeno que ha sido inoculado con éxito en plantas forestales en países de los cinco continentes. Este hongo puede establecer la simbiosis con más de 20 géneros de gimnospermas y angiospermas distribuidas en todo el mundo (Cairney & Chambers, 1997), incluyendo especies forestales de las familias Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Pinaceae y Myrtaceae (García-Rodríguez, Pérez-Moreno, Aldrete, Cetina-Alcalá, & Vaquera-Huerta, 2006; Pérez-Moreno & Read, 2004). Se sabe que los procesos fisiológicos que se requieren para establecer las ectomicorrizas, dependen en gran medida de la elaboración de las hormonas o metabolitos secundarios por ambos simbioses, del mismo modo la comunicación química entre las asociaciones, raíz-hongo y la raíz-raíz, están mediados por estos compuestos (Dahm & Golińska, 2011). Los compuestos de las raíces y los hongos juegan un papel importante en la fase presimbiótica principalmente mediante la modificación del tropismo de hifas de las raíces, lo que facilita la fijación y la invasión de los tejidos del huésped por hifas, la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces y el micelio y en el mantenimiento de la asociación micorrizal (Dahm & Golińska, 2011).

Sin embargo, estos mecanismos químicos aún no están totalmente entendidos. Se ha indicado que hay incluso una transferencia de componentes entre diferentes especies de hongos y plantas (Pérez-Moreno & Read, 2004). Por otra parte, se ha reportado la existencia de diferencias en el patrón de metabolitos, dependiendo del medio de cultivo y la tasa de crecimiento, ya sea *in vitro* o como micorrizas (Baumert, Schumann, Porzel, Schmidt, & Strack, 1997). Con respecto a esta especie, algunos derivados triterpénicos de lanosterol se han aislado tanto en el micelio, como en los cuerpos fructíferos. Sin embargo, se han encontrado diferencias cuantitativas y cualitativas en estos compuestos, ya que se cree que están involucrados en los mecanismos de colonización de las raíces de la planta (Baumert et al., 1997). Con el objetivo de identificar el tipo de compuestos que se pueden encontrar en una cepa mexicana cultivada en condiciones asimbiótica, y su posible implicación en el proceso de colonización de las raíces en el caso de esta micorriza, se aisló una cepa *Pisolithus arhizus* de bosques de pino en Oaxaca, se cultivó en condiciones de laboratorio. Los resultados confirmaron la presencia en el micelio de cuatro triterpenos menos oxidados, como se reportó anteriormente por De Abreu, Lobo, y Prabhakar (1991) and Baumert et al. (1997).

INTRODUCTION

Mycorrhizal symbiosis occurs with a large number of plants and about 5,000 species of fungi, mostly ascomycetes and basidiomycetes. This type of symbiosis is considered almost obligatory for both the tree and the fungus in some species and plays an essential role in nutrient cycling and the functioning of ecosystems (Brundett, 1991; Estrada-Torres & Santiago-Martínez, 2003; Santiago-Martínez, Varela, & Estrada-Torres, 1993; Smith & Read, 1997). The basidiomycete *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert is an ectomycorrhizal fungus which has been inoculated successfully in forest plants in countries in five continents. This fungus can establish symbiosis with more than 20 genera of gymnosperms and angiosperms distributed worldwide (Cairney & Chambers, 1997), including forest species of the families Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Pinaceae and Myrtaceae (García-Rodríguez, Pérez-Moreno, Aldrete, Cetina-Alcalá, & Vaquera-Huerta, 2006; Pérez-Moreno & Read, 2004). It is known that the physiological processes which are required for establishing the ectomycorrhizae, depend largely on the elaboration of hormones or secondary metabolites by both symbionts; likewise the chemical communication between associations, root-fungus and root-root, are mediated by these compounds (Dahm & Golińska, 2011). Compounds from roots and fungi play a significant role in the presymbiotic phase mainly by modifying the tropism of hyphae from the roots, facilitating the attachment and invasion of host tissues by hyphae, inducing morphological and physiological changes in roots and mycelium and in the maintenance of mycorrhizal association (Dahm & Golińska, 2011).

However, these chemical mechanisms are not yet fully understood. It has been indicated that there is even a transfer of components between different species of fungi and plants (Pérez-Moreno & Read, 2004). On the other hand, the existence of differences in the pattern of metabolites has been reported, depending on the culture medium and growth rate, whether *in vitro* or as mycorrhiza (Baumert, Schumann, Porzel, Schmidt, & Strack, 1997). Regarding this species, some triterpene derivatives of lanosterol have been isolated both in the mycelium as well as in the fruiting bodies. However, quantitative and qualitative differences have been found in these compounds, as it is believed they are involved in the mechanisms of plant root colonization (Baumert et al., 1997). With the objective of identifying the type of compounds that can be found in a Mexican strain cultivated under asymbiotic conditions, and its possible involvement in the colonization process of roots in the case of this mycorrhiza, we isolated a *Pisolithus arhizus* strain from pine woods in Oaxaca, grown under laboratory conditions. Results confirmed the presence in the mycelium of four triterpenes less oxidized, as previously reported by De Abreu, Lobo, y Prabhakar (1991) and Baumert et al. (1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

La cepa fue aislada de los bosques de pinos de las regiones de Oaxaca y se depositó en la colección de cepas de hongos micorrizógenos en la Universidad de Tlaxcala. Se mantuvo en agar de dextrosa de patata a 25 °C. Se inocularon discos de agar colonizados con *P. arhizus* micelio en matraces que contenían 300 mL de medio líquido de patata-dextrosa y se incubaron durante 15 días a 25 °C.

Extracción y separación

El proceso para la obtención de los compuestos se realizó de acuerdo a Trigos, Reyna, y Matamoros (1995). El medio de cultivo de micelio se eliminó por filtración y se sometió a un baño de ultrasonido, posteriormente, el micelio se eliminó y se extrajo con acetato de etilo (5X), las extracciones se llevaron a sequedad bajo presión reducida. Del extracto total a través de una simple cristalización y posterior recristalización con hexano y acetona, se separó un sólido cristalino de color blanco que fue nombrado compuesto 1. El resto del extracto se separó por cromatografía en columna (Sistemas y Equipos de Vidrio, Puebla, México) utilizando gel de sílice Merck 60 (malla de 230-400) como la fase estacionaria y hexano-acetato de etilo con un gradiente ascendente de polaridad como eluyente. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (gel de sílice 60 F₂₅₄) y eluidas con acetato de etilo-hexano 9:1 y reveladas con luz ultravioleta y vapores de yodo. A partir de las fracciones eluidas con 09:01 y 08:02 acetato de etilo-hexano, se obtuvo una mezcla de compuestos que se separaron por cromatografía de columna, obteniéndose en orden de polaridad ascendente los compuestos 2, 3 y 4.

Caracterización estructural

Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Johns (Cole Parmer [12-144], EE.UU.) y no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN ¹H) se obtuvieron con la ayuda de un instrumento Gemini Varian 200 (EE. UU.)

- 1) **22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3β, 22-diol.** Agujas blancas, mp. 170-178 °C, Rf 0.4 (acetato de etilo-hexano 8:2). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 4.85 (d, 2H, H-28), δ 3.81 (m, 1H, H-22), δ 3.23 (dd, 1H, H-3), δ 1.07 (d, 3H, H-27), δ 1.04 (d, 3H, H-26), δ 1.01 (s, 3H, H-31), δ 0.99 (s, 3H, H-19), δ 0.92 (d, 3H, H-21), δ 0.91 (s, 3H, H-29), δ 0.82 (s, 3H, H-30), 0.71 (s, 3H, H-18).
- 2) **22-R-lanostan-28-metil-8, 24(28)-dien-3β, 22-diol.** Agujas blancas, mp 172-180 °C, Rf 0.81 (acetato de etilo-hexano 8:2). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 5.25 (q, 1H, H-28), δ 3.78 (t, 1H, H-22), δ 3.24 (dd, 1H, H-3), 2.85 (m, 1H, H-25), 1.65 (s, 3H, H-32), δ 1.01 (d, 3H, H-26), δ 1.01 (d, 3H, H-27), δ 0.99 (s, 3H, H-19), δ 0.92 (d, 3H, H-31), δ 0.91 (s, 3H, H-21), δ 0.82 (s, 3H, H-30), 0.71 (s, 3H, H-18).

MATERIALS AND METHODS

Fungal material

The strain was isolated from pine forests of the regions of Oaxaca and was deposited at the ectomycorrhizal fungus strain collection at the University of Tlaxcala. It was maintained in potato dextrose agar at 25 °C. Colonized agar disks with *P. arhizus* mycelium were inoculated in flasks containing 300 mL potato-dextrose liquid medium and were incubated for 15 days at 25 °C.

Extraction and separation

The process for obtaining the compounds was performed according to Trigos, Reyna, y Matamoros (1995). The mycelia suspension culture medium was removed by filtration and subjected to an ultrasonic bath and thereafter the mycelium was removed by soaking with ethyl acetate (5X) and extractions were taken to dryness under reduced pressure. Of the total extract through crystallization and subsequent recrystallization from hexane and acetone, a white crystalline solid was separated which was named compound 1. The rest of the extract was separated by column chromatography (Sistemas y Equipos de Vidrio, Puebla, México) using Merck silica gel 60 (230-400 mesh) as the stationary phase and hexane-ethyl acetate in order of ascending polarity as the eluent. The fractions obtained were observed by thin layer chromatography (silica gel 60 F₂₅₄) eluted with hexane-ethyl acetate 9:1 and developed with ultraviolet light and iodine vapors. From the fractions eluted with 9:1 and 8:2 hexane-ethyl acetate, a mixture of compounds were obtained which were separated by column chromatography to yield in order of ascending polarity, compounds 2, 3 and 4.

Structural characterization

The melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus (Cole Parmer [12-144], USA) and were not corrected. The nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were obtained on a Varian Gemini 200 (USA) instrument.

- 1) **22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3β, 22-diol.** White needles, mp. 170-178 °C, Rf 0.4 (hexane-ethyl acetate 8:2). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 4.85 (d, 2H, H-28), δ 3.81 (m, 1H, H-22), δ 3.23 (dd, 1H, H-3), δ 1.07 (d, 3H, H-27), δ 1.04 (d, 3H, H-26), δ 1.01 (s, 3H, H-31), δ 0.99 (s, 3H, H-19), δ 0.92 (d, 3H, H-21), δ 0.91 (s, 3H, H-29), δ 0.82 (s, 3H, H-30), 0.71 (s, 3H, H-18).
- 2) **22-R-lanostan-28-methyl-8, 24(28)-dien-3β, 22-diol.** White needles, mp 172-180 °C, Rf 0.81 (hexane-ethyl acetate 8:2). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 5.25 (q, 1H, H-28), δ 3.78 (t, 1H, H-22), δ 3.24 (dd, 1H, H-3), 2.85 (m, 1H, H-25), 1.65 (s, 3H, H-32), δ 1.01 (d, 3H, H-26), δ 1.01 (d, 3H, H-27), δ 0.99 (s, 3H, H-19), δ 0.92 (d, 3H, H-31), δ 0.91 (s, 3H, H-21), δ 0.82 (s, 3H, H-30), 0.71 (s, 3H, H-18).

- 3H, H-27), δ 0.99 (s, 3H, H-19), δ 0.92 (d, 3H, H-31), d 0.91 (s, 3H, H-21), d 0.82 (s, 3H, H-30), 0.71 (s, 3H, H-18).
- 3) **22-S-24 metil-lanostan-8-en-22, 24'-epoxi-3 β -ol-24'one (pisolactona)**. Agujas blancas, mp 268-273 °C, Rf 0.78 (acetato de etilo-hexano 8:2). RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 4.48 (m, 1H, H-22), 3.24 (dd, 3H, H-3), 2.60 (m, 1H, H-24), 2.20 (m, 1H, H-25), 1.05 (s, 3H, H-26), 1.00 (d, 3H, H-28), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.96 (d, 3H, H-21), 0.91 (d, 3H, H-27), 0.90 (s, 3H, H-30), 0.81 (s, 3H, H-29), 0.71 (s, 3H, H-18).
- 4) **22-S-24, 25-dimetil-lanostan-8-en-22, 24'-epoxi-3 β -ol-24-one (25-metil-pisolactona)**. Agujas blancas, mp. 311-317 °C, Rf 0.75 (acetato de etilo-hexano 8:2). RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 4.45 (m, 1H, H-22), 3.24 (dd, 3H, H-3), 2.45 (m, 1H, H-24), 1.07 (s, 3H, H-26), 1.07 (s, 3H, H-27), 1.07 (s, 3H, H-31), 1.01 (d, 3H, H-28), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.95 (d, 3H, H-21), 0.95 (d, 3H, H-19), 0.86 (s, 3H, H-29), 0.72 (s, 3H, H-18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de acetato de etilo del micelio de *P. arhizus* (11.3 g), seguido por la cromatografía del residuo orgánico, permitió el aislamiento de cuatro derivados triterpénicos de lanosterol (1-4), que estaban presentes en pequeñas cantidades. Los compuestos mostraron ser: 1) 22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 2) 22-R-lanostan-28 metil-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 3) pisolactona y 4) 25-metil-pisolactona (Figura 1), en comparación con muestras auténticas y sus datos espectrales (Baumert et al., 1997; De Abreu et al., 1991; Lobo, De Abreu, Prabhakar, Godinho, & Williams, 1983; Lobo et al., 1988).

Los espectros RMN ^1H de los compuestos 1 y 2 difieren principalmente en el grupo metileno exocíclico H-28. Estos protones se observan como una doble señal (δ 4.85, $J = 2.4$ Hz) en el 1, y como una señal cuádruple (δ 5.26, $J = 6.6$ Hz) en el 2. Mientras, en los espectros de ambos compuestos,

RESULTS AND DISCUSSION

The ethyl acetate extraction of the mycelium of *P. arhizus* (11.3 g), followed by chromatography of the organic residue, allowed the isolation of four triterpene lanosterol derivatives (1-4), which were present in small amounts. Compounds were shown to be: 1) 22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 2) 22-R-lanostan-28 methyl-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 3) pisolactone and 4) 25-methyl-pisolactone (Figure 1), by comparison with authentic samples and spectral data (Baumert et al., 1997; De Abreu et al., 1991; Lobo, De Abreu, Prabhakar, Godinho, & Williams, 1983; Lobo et al., 1988).

The ^1H NMR spectra of compounds 1 and 2 differ primarily in the exocyclic methylene group H-28. These protons are observed as a double signal (δ 4.85, $J = 2.4$ Hz) in 1, and as a quadruple signal (δ 5.26, $J = 6.6$ Hz) in 2. While, in the spectra of both compounds, there are five simple signals, which are integrated for three protons each, correspond-

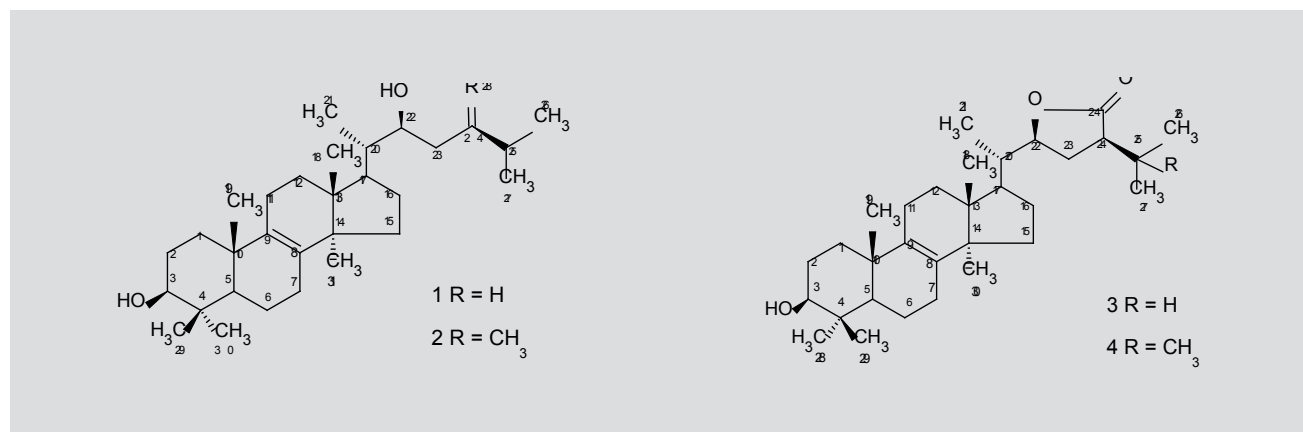


FIGURA 1. Estructuras de los cuatro metabolitos secundarios encontrados en el cultivo micelio de *Pisolithus arhizus*: 1) 22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 2) 22-R-lanostan-28 metil-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 3) pisolactona and 4) 25-metil-pisolactona.

FIGURE 1. Structures of the four secondary metabolites found in the culture mycelia of *Pisolithus arhizus*: 1) 22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 2) 22-R-lanostan-28-methyl-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, 3) pisolactone and 4) 25-methyl-pisolactone.

hay cinco señales simples, que integran para tres protones cada una, que corresponden a H-18, H-19, H-29, H-30 y H-31 (δ 0,71, 0,99, 1,01, 0,81 y 0,91, respectivamente). Además, dos señales dobles en δ 3,23 (3,22) y 3,82 (3,79) corresponden a los dos grupos hidroxilo germinales H-3 y H-22. Una señal doble a δ 0,92 (0,91), $J = 6,6$ Hz, se asignó a los protones del metilo H-21 y dos señales dobles a δ 1,04 (1,01) y 1,07 (1,02), $J = 6,8$ Hz, que integraron para tres protones cada una, se asignaron a H-26 y H-27. Con estos datos y de acuerdo con la literatura, los compuestos 1 y 2 fueron identificados como 22-R-lanostan-8, 24 (28)-dien-3 β , 22-diol y 22-R-lanostan-28-metil-8,24(28)-dien-3 β , 22-diol, respectivamente (Baumert et al., 1997; Zamuner, Cortez, Dias-Filho, Lima, & Rodrigues-Filho, 2005).

En los espectros de RMN ^1H de los compuestos 3 y 4, destacan una señal múltiple a δ 4.48 (4.45) debido a H-22, una señal doble en δ 3.24, $J = 11.4, 4.5$ Hz que corresponde a H-3 y cinco señales simples integradas en tres protones cada una, fijadas a H-18, H-19, H-28, H-29, H-30 (δ 0.71, 0.98, 1.0, 0.81 y 0.9, respectivamente). Sin embargo, el espectro ^1H NMR del compuesto 4 muestra una señal adicional a 1,08 (3H, s) que corresponde a metilo H-31 y la señal doble asignada a H-21 (δ 0.95, 3H, s) aparece ligeramente desplazada. Estos compuestos fueron asignados como 22-S-24-metil-lanostan-8-en-22, 24'-epoxi-3-ol-24'ona (pisolactona) y 22-S-24, 25-dimetil-8-lanostan-en-22, 24'-epoxi-3-ol-24'ona (25-metil-pisolactona) de acuerdo con sus datos espectrales con respecto a las referencias consultadas (Baumert et al., 1997; Lobo et al., 1983). Baumert et al. (1997) reportaron la presencia de triterpenos sin funcionalidad en el carbono-23, igual a los reportados en este trabajo, a partir del cultivo superficial del micelio, cultivo en suspensión y micorriza, difiriendo sólo en su concentración, obteniendo una mayor proporción de los triterpenos 2 y 4, cuando precedieron de la asociación micorrízica que en cultivo *in vitro* (Zamuner et al., 2005).

Por otro lado, los derivados de lanosterol aislados en los cuerpos fructíferos de esta especie muestran pequeñas diferencias sutiles de las que se encuentran en el micelio (Tabla 1), tal como 24-metil y 24-etil-lanostan-8, 24 (28)-dien-3, 22, 23-triol-22-acetat (Lobo, De Abreu, Prabhakar, & Godinho, 1985; Zamuner et al., 2005), pisosterol, pisosterol acetato (Gill, Kiefe, Skelton, & White, 1989; Zamuner et al., 2005), 3-oxo-pisolactona (De Abreu et al., 1991; Lobo et al., 1988), epi-pisosterol y pisosterol (Zamuner et al., 2005). Algunos autores distinguen estas diferencias en el carbono-23 y proponen que los derivados de lanosterol menos oxidados participan en los procesos de fijación y la formación de micorrizas (Baumert et al., 1997; Zamuner et al., 2005). También se sabe que, incluso en la misma especie, los aislados de micorrizas de diferentes fuentes muestran variaciones morfológicas y causan efectos diferenciales en el crecimiento de las planta cuando se utiliza como inoculantes (Castellano y Molina, 1989), lo cual podría estar mediado por metabolitos secundarios, no obstante, es necesario confirmar esto con más estudios sobre las micorrizas de *P. arhizus in vivo*, debido a las limitaciones de las condiciones

ing to H-18, H-19, H-29, H-30 y H-31 (δ 0.71, 0.99, 1.01, 0.81 y 0.91, respectively). Further, two double signals in δ 3.23 (3.22) and 3.82 (3.79) correspond to the two germinal hydroxyl groups H-3 and H-22. One double signal at δ 0.92 (0.91), $J = 6.6$ Hz, was assigned to the methyl protons H-21 and two double-swap signals at δ 1.04 (1.01) and 1.07 (1.02), $J = 6.8$ Hz, which integrated into three protons each, were assigned to H-26 and H-27. With this data and according to the literature, compounds 1 and 2 were identified as 22-R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol and 22-R-lanostan-28-methyl-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol, respectively (Baumert et al., 1997; Zamuner, Cortez, Dias-Filho, Lima, & Rodrigues-Filho, 2005).

The ^1H NMR spectra of compounds 3 and 4, highlights a multiple signal at δ 4.48 (4.45) which is due to H-22, one double signal at δ 3.24, $J = 11.4, 4.5$ Hz corresponding to H-3 and five simple signals that integrated into three protons each were assigned to H-18, H-19, H-28, H-29, H-30 (δ 0.71, 0.98, 1.0, 0.81 and 0.9, respectively). However, the ^1H NMR spectrum of compound 4 shows an additional signal at 1.08 (3H, s) corresponding to methyl H-31 and the double signal assigned to H-21 (δ 0.95, 3H, s) appears slightly displaced. These compounds were assigned as 22-S-24-methyl-lanostan-8-en-22, 24'-epoxy-3-ol-24'ona (pisolactone) and 22-S-24, 25 dimethyl-lanostan-8-en-22, 24'-epoxy-3-ol-24'ona (25-methyl-pisolactone) according to their spectral data as compared to with the references consulted (Baumert et al., 1997; Lobo et al., 1983). Baumert et al. (1997) reported the presence of triterpenes unfunctionalized at carbon-23, equal to those found in this paper, from mycelium on surface culture, suspension culture and mycorrhiza, differing only in their concentration, resulting in a greater proportion of the triterpenes 2 and 4, when they preceded from mycorrhizal association than in culture *in vitro* (Zamuner et al., 2005).

On the other hand, lanosterol derivatives isolated in the fruiting bodies of this species showing small subtle differences from those found in the mycelium (Table 1), as 24-methyl and 24-ethyl-lanostan-8, 24 (28)-dien-3, 22, 23-triol-22-acetate (Lobo, De Abreu, Prabhakar, & Godinho, 1985; Zamuner et al., 2005), pisosterol, pisosterol acetate (Gill, Kiefe, Skelton, & White, 1989; Zamuner et al., 2005), 3-oxo-pisolactona (De Abreu et al., 1991; Lobo et al., 1988), epi-pisosterol and pisosterol (Zamuner et al., 2005). Some authors distinguish these differences at carbon-23 and they propose that derivatives of lanosterol less oxidized participate in the processes of fixation and mycorrhizal formation (Baumert et al., 1997; Zamuner et al., 2005). It is also known that even in the same species, mycorrhizal isolates from different sources show morphological variations and cause differential effects on plant growth when used as inoculants (Castellano & Molina, 1989), which could also be mediated by secondary metabolites, but it is necessary to confirm this with further studies on mycorrhizae of *P. arhizus in vivo*, due to the limitations of asymbiotic culture conditions of this piece of research. Additionally, it is interesting to note that some compounds or extracts reported previously from

CUADRO 1. Relación de los compuestos aislados de los cuerpos fructíferos y micelio de *Pisolithus arhizus*.

Compuesto	Material biológico	Referencia	País
3-oxo-pisolactona	Cuerpos fructíferos	Lobo et al. (1988) De Abreu et al. (1991)	Portugal
3-acetil-24-metil-lanostan-8, 24-dien-22-acetato	Cuerpos fructíferos	Lobo et al. (1988) De Abreu (1991)	Portugal
Pisosterol	Cuerpos fructíferos	Lobo et al. (1985) Gill et al. (1989) Zamuner et al. (2005)	Portugal Australia Brasil
Metil-pisosterol	Cuerpos fructíferos	Lobo et al. (1985) Gill et al. (1989) Abreu (1991)	Portugal Australia
3-epi-pisosterol	Cuerpos fructíferos	Zamuner et al. (2005)	Brasil
Pisosterol	Cuerpos fructíferos	Zamuner et al. (2005)	Brasil
Acetato de 3 β , 22, 23-trihidroxi-24-metil-lanostan-8, 24(28)-dien-23-acetato	Cuerpos fructíferos	Zamuner et al. (2005)	Brasil
3 β , 22, 23-trihidroxi-24-etil-lanostan-8, 24(28)-dien-22-acetato	Cuerpos fructíferos	Zamuner et al. (2005)	Brasil
Pisolactona	esporas y micelio	Lobo et al. (1983) Baumert et al. (1997)	Portugal Suiza* Oaxaca, México
25-metil-pisolactona	Micelio	Baumert et al. (1997)	Suiza* Oaxaca, México
22R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol	Micelio	Baumert et al. (1997) Zamuner et al. (2005)	Suiza* Oaxaca, México Brasil
28-metil-22R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol	Micelio	Baumert et al. (1997) Zamuner et al. (2005)	Suiza* Oaxaca, México Brasil
Lanosterol	Micelio	Zamuner et al. (2005)	Brasil
Agnosterol	Micelio	Zamuner et al. (2005)	Brasil

*Cepa comercial

de cultivo asimbiótica de este tipo de investigación. Además, es interesante observar que algunos de los compuestos o extractos mencionados anteriormente a partir de especies de *Pisolithus* exhiben actividad antibiótica y antifúngica (Ameri, Ghadge, Vaidya, & Deokule, 2011; Tsantrizos, Kope, Fortin, & Ogilvie, 1991) y se ha reportado que pisosterol ha mostrado actividad citotóxica (Montenegro et al., 2004).

CONCLUSIONES

Finalmente, los resultados confirman que la cepa aislada de los bosques de México presenta el mismo tipo de triterpenos sin funcionalidad en el carbono-23 en micelio obtenido a través de fermentación líquida *in vitro*, al igual que otras cepas de bosques en Europa y Brasil, a pesar del hecho de que se utilizó un medio de cultivo PDA en lugar de un medio de cultivo Melin-Norkrans. La pruebas indican la hipótesis de que los triterpenos de micelios sin funcionalidad con el carbono-23 están probablemente involucrados en los procesos de fijación y formación de micorrizas.

species of *Pisolithus* exhibit antibiotic and antifungal activity (Ameri, Ghadge, Vaidya, & Deokule, 2011; Tsantrizos, Kope, Fortin, & Ogilvie, 1991) and pisosterol was reported with cytotoxic activity (Montenegro et al., 2004).

CONCLUSIONS

Finally, results confirm that the strain isolated from the forests of Mexico presents the same type of triterpenes unfunctionalized at carbon-23 in the fermentation liquid *in vitro* of mycelium, like other strains from forests in Europe and Brazil, despite the fact that we used a PDA medium culture instead of a half Melin-Norkrans medium culture. Evidence is given to the hypothesis that the triterpenes from mycelia unfunctionalized at carbon-23 are probably involved in the processes of fixation and mycorrhizal formation.

End of English Version

TABLE 1. Relationship of compounds isolated from fruiting bodies and mycelia of *Pisolithus arhizus*.

Compound	Biological material	Reference	Country
3-oxo-pisolactone	Fruiting bodies	Lobo et al. (1988) De Abreu et al. (1991)	Portugal
3-acetyl-24-methyl-lanostan-8, 24-dien-22-acetate	Fruiting bodies	Lobo et al. (1988) De Abreu (1991)	Portugal
Pisosterol	Fruiting bodies	Lobo et al. (1985) Gill et al. (1989) Zamuner et al. (2005)	Portugal Australia Brazil
Methyl-pisosterol	Fruiting bodies	Lobo et al. (1985) Gill et al. (1989) Abreu (1991)	Portugal Australia
3-epi-pisosterol	Fruiting bodies	Zamuner et al. (2005)	Brazil
Pisosterol	Fruiting bodies	Zamuner et al. (2005)	Brazil
3 β , 22, 23-trihidroxi-24-metil-lanostan-8, 24(28)-dien-23-acetate	Fruiting bodies	Zamuner et al. (2005)	Brazil
3 β , 22, 23-trihidroxi-24-etil-lanostan-8, 24(28)-dien-22-acetate	Fruiting bodies	Zamuner et al. (2005)	Brazil
Pisolactone	Spores and mycelium	Lobo et al. (1983) Baumert et al. (1997)	Portugal Switzerland* Oaxaca, México
25-methyl-pisolactone	Mycelium	Baumert et al. (1997)	Switzerland* Oaxaca, México
22R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol	Mycelium	Baumert et al. (1997) Zamuner et al. (2005)	Switzerland* Oaxaca, México Brazil
28-methyl-22R-lanostan-8, 24(28)-dien-3 β , 22-diol	Mycelium	Baumert et al. (1997) Zamuner et al. (2005)	Switzerland* Oaxaca, México Brazil
Lanosterol	Mycelium	Zamuner et al. (2005)	Brazil
Agnosterol	Mycelium	Zamuner et al. (2005)	Brazil

*Commercial strain

REFERENCIAS

- Ameri, A., Ghadge, C., Vaidya J. G., & Deokule, S. (2011). Anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4), 527–532. Obtenido de <http://www.academicjournals.org/jmpr/PDF/pdf2011/18Feb/Ameri%20et%20al.pdf>
- Baumert, A., Schumann, B., Porzel, A., Schmidt, J., & Strack, D. (1997). Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. *Phytochemistry*, 45(3), 499–504. doi:10.1016/S0031-9422(97)00007-1
- Brundett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 21, 171–313. doi:10.1016/S0065-2504(08)60099-9
- Cairney, J. W. G., & Chambers S. M. (1997). Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: A review of current knowledge. *Mycorrhiza*, 7(3), 117–131. doi: 10.1007/s005720050172
- Castellano, M. A., & Molina, R. (1989). Mycorrhizae. In T. D. Landis, R. W. Tinus, S. E. McDonald, & B. P. Barnett (Eds.), *The container tree nursery manual* (Vol. 5, pp. 101–167). Washington, USA: USDA Forest Service.
- Dahm, H., & Golińska, P. (2011). Ectomycorrhiza and secondary metabolites. In R. Mahendra & V. Ajit (Eds.), *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae, soil biology* (Vol. 25, pp. 371–385). Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-15196-5_16
- De Abreu, P. M., Lobo, A. M., & Prabhakar, S. (1991). Revision of C-22, C-23 configurations of two triterpenoids of the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 30(11), 3818–3819. doi: 10.1016/0031-9422(91)80122-H
- Estrada-Torres, A., & Santiago-Martínez, G. (2003). Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Tlaxcala: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M., & Vaquera-Huerta, H. (2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40, 665–676. Obtenido de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/sep-oct/art-11.pdf>
- Gill, M., Kiefe, I. M. J., Skelton, B. W., & White, H. (1989). The structure and absolute stereochemistry of pisosterol, the

- principal triterpenoid from fruit bodies of the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Australian Journal of Chemistry*, 42(6), 995–1001 doi: 10/1071/CH9890995
- Lobo, A. M., De Abreu, P. M., Prabhakar, S., Godinho, L. S., & Williams, D. J. (1983). Pisolactone a novel triterpenoid isolated from the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Tetrahedron Letters*, 24(21), 2205–2208. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81884-5
- Lobo, A. M., De Abreu, P. M., Prabhakar, S., & Godinho, L. S. (1985). Novel triterpenoids from the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Tetrahedron Letters*, 26(21), 2589–2592. doi: 10.1016/S0040-4039(00)9844-0
- Lobo, A. M., De Abreu, P. J. M., Prabhakar, S., Godinho, L. S., Jones, R., Rzepa, H. S., & Williams, D. J. (1988). Triterpenoids of the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 27(11), 3569–3574. doi: 10.1016/0031-9422(88)80770-2
- Montenegro, R. C., Jimenez, P. C., Feio Farias, R. A., Andrade-Neto, M., Silva Bezerra, F., Moraes, M. E., ... Costa-Lo-tufo L. V. (2004). Cytotoxic activity of pisosterol, a tri-terpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 59(7-8), 519–522. doi: 10.1007/s00204-010-0567-z
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239–247. Obtenido de redalyc.uaemex.mx/pdf/339/33909203.pdf
- Santiago-Martínez, G., Varela, L., & Estrada-Torres, A. (1993). Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. *Revista Mexicana de Micología*, 9, 77–83. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/HomRevRed.jsp?iCveEntRev=883>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press
- Trigos, Á., Reyna, S., & Matamoros B. (1995). Macrophominol, a new diketopiperazine from cultures of *Macrophomina phaseolina*. *Phytochemistry*, 40(6), 1697–1698. doi: 10.1016/0031-9422(95)00626-I
- Tsantrizos, Y. S., Kope, H. H., Fortin, J. A., & Ogilvie, K. K. (1991) Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 30(4), 1113–1118. doi: 10.1016/S0031-9422 (00)95183-5
- Zamuner, M. L. M., Cortez, D. A. G., Dias-Filho, B. P., Lima, M. I. S., & Rodrigues-Filho, E. (2005). Lanostane triterpenes from the fungus *Pisolithus tinctorius*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16(4), 863–867. doi:10.1590/S0103-50532005000500028