

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II



FACOLTA' DI AGRARIA

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

Dottorato di Ricerca in Agrobiologia e  
Agrochimica  
XXIII° Ciclo

Fitotossine prodotte da *Phomopsis foeniculi*,  
patogeno del finocchio, e tossine correlate

Tesi di dottorato presentata  
dalla Dott.ssa Carmen Perrone

Tutor Prof. Antonio Evidente  
Co-Tutor Dott.ssa Anna Andolfi  
Coordinatore Prof. Matteo Lorito

2007/2010

## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 04
<i>1.1 Il finocchio nell'agricoltura europea</i>	pag. 11
<b>1.2 Isolamento e caratterizzazione di <i>Phomopsis foeniculi</i> da tessuti infetti di finocchio</b>	pag. 12
1.2.1 <i>Caratteristiche e morfologia di P.foeniculi</i>	pag. 14
1.2.2 <i>Correlazione tra le tossine prodotte da P.foeniculi e quelle prodotte da P. guepinii</i>	pag. 16
<b>1.3 Importanza economica del nocciolo</b>	pag. 16
1.3.1 <i>Isolamento e caratterizzazione di P.guepinii da tessuti infetti di nocciolo</i>	pag. 17
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 19
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	pag. 21
<b>3.1 Parte Sperimentale Generale</b>	pag. 21
<b>4. PARTE SPERIMENTALE</b>	pag. 24
<b>4.1 Isolamento, caratterizzazione ed accrescimento di <i>P. foeniculi</i></b>	pag. 24
<b>4.2 Estrazione ed isolamento dei metaboliti fitotossici prodotti in coltura liquida da <i>P. foeniculi</i></b>	pag. 25
4.2.1 <i>Idrogenazione del nectriapirone</i>	pag. 27
4.2.2 <i>Reazione di metilazione della macrosporina</i>	pag. 28
4.2.3 <i>Reazione di acetilazione della macrosporina</i>	pag. 29
<b>4.3 Saggi di attività fitotossica</b>	pag. 31
<b>4.4 Isolamento, caratterizzazione ed accrescimento di <i>P.guepinii</i></b>	pag. 32
<b>4.5 Estrazione ed isolamento dei metaboliti fitotossici, correlati al nectriapirone, prodotti in coltura liquida da <i>P.guepinii</i></b>	pag. 32
<b>4.6 Saggi di attività biologica</b>	pag. 33

4.6.1 <i>Saggi di attività fungicida</i>	pag. 34
4.6.2 <i>Saggio di attività antibiotica</i>	pag. 35
4.6.3 <i>Saggio di attività zootossica</i>	pag. 35
<b>5 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	pag. 36
<b>5.1 <i>Isolamento dei metaboliti fitotossici da P. foeniculi</i></b>	pag. 36
5.1.1 <i>Identificazione del nectriapirone (1)</i>	pag. 38
5.1.2 <i>Determinazione strutturale del 7,8-diidronectriapirone (2)</i>	pag. 42
5.1.3 <i>Identificazione della macrosporina (3)</i>	pag. 43
5.1.4 <i>Identificazione della 3-O-metilmacrosporina (4)</i>	pag. 46
5.1.5 <i>Identificazione dell'3,5-O,O'-dimetilmacrosporina (5)</i>	pag. 47
5.1.6 <i>Identificazione dell'3,5-O,O'-diacetilmacrosporina (6)</i>	pag. 47
5.1.7 <i>Identificazione dell'altersolanolo A (7)</i>	pag. 48
5.1.8 <i>Identificazione dell'altersolanolo J (8)</i>	pag. 51
<b>5.2 <i>Attività biologica dei metaboliti prodotti da P. foeniculi</i></b>	pag. 56
<b>5.3 <i>Identificazione dei metaboliti fitotossici, correlati al nectriapirone, prodotti da P. guepinii</i></b>	pag. 58
5.3.1 <i>Identificazione del pestalopirone (9)</i>	pag. 60
<b>5.4 <i>Attività biologica dei metaboliti prodotti da P. guepinii</i></b>	pag. 60
<b>6. CONCLUSIONI</b>	pag. 63
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 66
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	pag. 76

## 1. INTRODUZIONE

La maggior parte dei danni dovuti ad alterazioni patologiche di piante di interesse agrario e forestale sono provocati da differenti funghi microscopici. Essi sono agenti di gravi fitopatologie causando ingenti danni economici legati principalmente alla diminuzione della produzione nonché ad un peggioramento qualitativo dei prodotti stessi sia in termini commerciali, che nutrizionali. La contaminazione degli alimenti e dei mangimi animali, può riguardare sia la fase pre che la fase post-raccolta. Una indagine della FAO del 1985 ha stimato che annualmente circa il 25% dei raccolti nel mondo è contaminato da micotossine (Pohland 1993).

Diversi sono i metodi di controllo utilizzabili per tali avversità, (rotazioni colturali, uso di varietà resistenti), ma spesso la necessità di abbattere i costi di produzione della materia prima limitano l'utilizzo ai metodi più economici, quali l'impiego di pesticidi di sintesi.

A partire dal secondo dopoguerra, infatti, sono stati immessi sul mercato numerosi composti di sintesi che hanno dimostrato efficacia e facilità di impiego, con risultati anche a breve termine. L'utilizzo massivo di tali prodotti ha avuto però notevoli conseguenze in campo agricolo, alimentare e tossicologico quali: l'inquinamento ambientale, l'introduzione nella catena alimentare di sostanze potenzialmente tossiche e la comparsa di numerose forme di resistenza.

Attualmente l'obiettivo principale delle multinazionali del settore fitofarmaci, nonché dell'industria chimica, è volto alla ricerca di principi attivi meno tossici e meno persistenti nell'ambiente.

Infatti, oltre alla lotta biologica, che prevede il ripristino dei normali equilibri tra le diverse specie presenti in un ecosistema naturale e alterati dalla diverse pratiche agricole (Bettini, 1979), si sta sempre più diffondendo il concetto della lotta integrata (Salunke *et al.*, 2009). Tale metodo prevede l'impiego di tutte le strategie disponibili (pratiche agronomiche, lotta biologica, uso di composti naturali e/o di sintesi) per controllare la diffusione di agenti di fitopatie, di fitofagi e piante infestanti, unitamente alla diagnosi precoce delle malattie.

Una delle maggiori cause della diffusione delle fitopatie è da ricercare proprio nell'assenza di efficaci metodi di diagnosi, per i quali è necessaria la messa a punto di tecniche specifiche, sensibili e di facile applicazione, anche in pieno campo (Riley *et al.*, 2002).

Fondamentale appare dunque uno studio ed una conoscenza approfondita dei processi di patogenesi e dei meccanismi in gioco nelle diverse fasi dell'interazione-pianta patogeno, per un rapido riconoscimento della malattia ed una corretta classificazione dell'agente causale della stessa.

Numerosi gruppi di ricerca hanno condotto e conducono numerosi studi multidisciplinari sull'isolamento di metaboliti bioattivi prodotti da microrganismi fitopatogeni o dalla pianta ospite, nelle diverse fasi dell'interazione pianta-patogeno. Tali composti potrebbero essere utilizzati come fungicidi, erbicidi, antibiotici, per stimolare i meccanismi di difesa della pianta ospite e per la selezione di specie resistenti (Graniti *et al.*, 1989).

Nell'ambito della diagnosi precoce sono state svolte numerose ricerche anche nel campo della biologia molecolare. Le tecniche avanzate di caratterizzazione molecolare, utilizzate comunemente nella ricerca di base,

costituiscono potenti mezzi diagnostici a disposizione della micologia in grado di stabilire l'identità di un fungo fitopatogeno non solo a livello di genere e specie, ma anche di forma specialis o di razza fisiologica (Ghignone & Migheli, 2001).

Nell'ambito degli studi dei processi di patogenesi l'isolamento e la caratterizzazione delle fitotossine riveste un ruolo fondamentale. Negli ultimi anni, infatti, molti funghi, isolati da piante infette, sono stati coltivati *in vitro* al fine di studiare le loro caratteristiche morfologiche, di stabilire una classificazione tassonomica, di isolare ed identificare i metaboliti prodotti nel tentativo di correlare la struttura alla relativa attività biologica e di conoscerne meglio i meccanismi d'azione (Graniti, 1991).

Le fitotossine, infatti, possono essere utilizzate quali antagonisti (fungicidi naturali) nei confronti di altri patogeni che attaccano la stessa pianta, e possono essere utilizzate per ottenere specie resistenti, utilizzando tecniche di selezione mediante colture cellulari. Nell'ambito della ricerca sui funghi ad attività antagonista nei confronti di patogeni della stessa pianta, sono da ricordare le sferopsidine (Fig. 1), metaboliti bioattivi prodotti da *Sphaeropsis sapinea*, agente causale del cancro del cipresso. Sottoposte a saggi di attività antimicrobica, le sferopsidine hanno evidenziato una buona attività antagonista nei confronti di *Seiridium cardinale* e *Seiridium cupressi*, agenti causali di una differente forma di cancro del cipresso. Tale attività fungistatica è esplicata ad una concentrazione pari a  $10^{-7}$ - $10^{-8}$ , non tossica per la pianta ospite (Evidente *et al.*, 1996; Evidente *et al.*, 1997).

Il concetto di fitotossina è in continua evoluzione; spesso le fitotossine sono definite quali composti sintetizzati dal patogeno durante il meccanismo di

patogenesi, deleterie per l'ospite (Durbin, 1991). Tale definizione è, forse, la meno restrittiva, anche se non tiene conto della struttura chimica, dei sintomi e degli organi bersaglio. Più in generale le fitotossine possono essere definite come metaboliti secondari la cui funzione principale è di penetrare all'interno delle cellule ed interagire con i processi metabolici, provocando così i sintomi della malattia (Graniti, 1991).

Gran parte dei funghi fitopatogeni è produttore di fitotossine, biosintetizzate attraverso le vie del metabolismo secondario (via dell'acetato, dello shikimato e del mevalonato) e aventi differenti strutture chimiche, meccanismo d'azione, specificità rispetto alla pianta ospite.

Le fitotossine possono appartenere a diverse classi di composti naturali quali: terpeni, citocalasani, derivati aromatici benzenoidi polisostituiti, dimedoni metileteri, idrochinoni, isobenzofuranoni, macrolidi terpenoidi, e recentemente anche polisaccaridi (Evidente & Motta, 2001).

Esse sono in grado di diffondere dal sito di infezione ai tessuti circostanti o di traslocare all'interno della pianta, svolgendo un ruolo fondamentale nell'induzione di gravi fitopatie e costituendo in molti processi i "fattori d'attacco" da cui dipende la patogenicità e la virulenza dei funghi fitopatogeni.

Le fitotossine fungine possono essere classificate in specifiche ed aspecifiche; generalmente le tossine specifiche sono altamente tossiche solo per la specie ospite, risultando scarsamente attive sulle specie non ospiti o resistenti (Graniti *et al.*, 1989).

Molti sono i vantaggi nell'utilizzo di prodotti naturali come fonte di nuovi composti da impiegare nell'ambito di metodi alternativi all'uso di pesticidi di sintesi : innanzitutto la loro più breve emivita ambientale, rispetto a prodotti di

sintesi, li rende preferibili in risposta ad una necessità di pratiche agricole maggiormente “environmental friendly” (UNCED 1992). Inoltre, l’opportunità di individuare composti con strutture chimiche, difficili da ottenere per via sintetica, con diversi siti e meccanismi d’azione, rispetto ai prodotti di sintesi comunemente utilizzati, attribuisce allo studio delle sostanze di origine naturale un ruolo chiave nello sviluppo di nuove classi di composti.

I principali ostacoli allo sviluppo di questo tipo di ricerca risiedono nella scarsa quantità in cui, spesso, tali composti naturali sono prodotti dai microrganismi patogeni, ciò rende complicato la messa a punto di tutti i saggi e metodi di analisi necessari per poter ipotizzare una produzione in larga scala. La complessità stereo strutturale rende spesso difficile e costosa una loro sintesi enantioselettiva in alte rese.

Comunque molti sono gli esempi di prodotti naturali utilizzati in campo agrario per il controllo di importanti avversità. Tra i più importanti fungicidi di origine naturale in commercio sono sicuramente da ricordare le strobilurine (Fig. 2), una grande famiglia di composti ad azione inibitoria dei chinoni (QoI). La strobilurina A è stata isolata dal fungo *Strobilurus tenacellus* e studi di correlazione struttura-attività hanno consentito di preparare diversi composti correlati tra cui l’azoxistrobina (Fig. 2), uno dei fungicidi più venduti (Bartlett *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni nel gruppo di ricerca coordinato dal professore Evidente, presso il quale ho svolto il mio lavoro di tesi, sono state isolate e caratterizzate numerose fitotossine prodotte da specie patogene di piante di interesse agrario, forestale, ornamentale e di piante infestanti.

Frequentemente, i metaboliti isolati appartenevano allo stesso gruppo di composti organici come le pinolidossine (Fig. 3) (pinolidossina, 7-epi-,5,6-didro- e 5,6-epossipinolidossina), nonenolidi e nonalidi tetra sostituiti prodotti da *Ascochyta pinodes*, responsabile dell'antracnosi del pisello (Evidente *et al.*, 1993a). Sintomi molto simili a quelli provocati da *A. pinodes* su foglie e baccelli di pisello sono indotti anche da *A. pisi*, da cui è stato isolato il principale metabolita, con natura chimica molto diversa dalle pinolidossine, caratterizzato come un nuovo derivato trisostituito dell'aldeide salicilica e denominato ascosalitossina (Fig. 3) (Evidente *et al.*, 1993b).

Nell'ambito dello studio delle malattie di piante di interesse agrario, molte ricerche sono state condotte sul mal dell'esca e più recentemente su differenti forme di cancro della vite.

Diversi metaboliti fitotossici, appartenenti a differenti classi di composti naturali, molti dei quali risultati essere dei polichetidi naftalenonici, sono stati isolati da colture di *Phaeoacremonium aleophilum* e *Phaemoniella clamidospora*, due funghi coinvolti nel mal dell'esca della vite. Tra di essi i principali sono: lo scitalone l'isosclerone, il *cis*-4-idrossiscitalone (Evidente *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000), il 2,4,8-triidrossitetralone, il 3,4,8-triidrossitetralone, l'1,3,8-triidrossinaftalene e la flaviolina (Tabacchi *et al.*, 2000) (Fig. 4).

Inoltre, i due funghi hanno evidenziato anche la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPSs) fitotossici (Sparapano *et al.*, 2000).

Diversi studi sono stati condotti sui metaboliti isolati al fine di stabilire il loro ruolo nell'insorgenza dei sintomi e sul possibile meccanismo d'azione,

legato probabilmente alla capacità di ridurre i meccanismi di difesa dell'ospite dai danni ossidativi (Evidente *et al.*, 2010a).

Gli EPSs prodotti da *Phaemoniella clamidospora* sono stati, inoltre, utilizzati per la messa a punto di un metodo immunochimico per la loro rilevazione nei tessuti infetti di vite; il saggio impiegato è basato su un test citofluorimetrico, consistente nel riconoscimento EPSs (antigeni)- anticorpi. Tale saggio ha dato un ottimo livello di riconoscimento degli EPSs negli estratti di foglie sintomatiche (Andolfi *et al.*, 2009).

Negli ultimi anni diverse specie di *Botryosphaeraceae* sono state associate ad importanti malattie quali cancro, morte e formazione delle caratteristiche di necrosi cuneiformi del tronco e dei rami della vite (Van Niekerk *et al.*, 2006; Urbenz-Torres *et al.*, 2006). In particolare da colture liquide di *Neofusicoccum parvum* sono stati isolati i principali metaboliti fitotossici caratterizzati come la (3R,4R)-(-)-4-idrossimelleina, la (3R,4S)-(-)-4-idrossimelleina, il tirosolo e l'isosclerone (Fig. 5), precedentemente già isolato da altri patogeni della vite, ma per la prima volta riportato come metabolita prodotto da specie di *Botryosphaeraceae* (Evidente *et al.*, 2010b).

Diversi esempi hanno evidenziato che ceppi dello stesso fungo, accresciuti nelle stesse condizioni, ma isolati in aree geografiche diverse, possono produrre diversi metaboliti. Da colture liquide di *Dreschlera gigantea*, potenziale micoerbicida di graminacee infestanti, isolato da tessuti naturalmente infetti di *Digitaria sanguinalis*, sono stati isolati, un cromofillano epossido denominato gigantesone (Kenfield, *et al.*, 1989) e successivamente, da colture liquide e solide del fungo, l'ofiobolina A e altre ofioboline minori: la

6-*epi*-ofiobolina A, la 3-anidro-6-*epi*-ofiobolina A e l'ofiobolina I, l'ofiobolina E e la 8-*epi*-ofiobolina J (Evidente *et al.*, 2006a; Evidente *et al.*, 2006b).

### **1.1 Il finocchio nell'agricoltura europea**

Il finocchio (Fig. 6) è una pianta erbacea mediterranea biennale o perenne, appartenente alla famiglia delle Apiaceae (ex *Umbelliferae*), conosciuto fin dall'antichità per le sue proprietà aromatiche. I frutti essiccati del finocchio, comunemente chiamati semi, sono largamente utilizzati in fitoterapia e nell'industria farmaceutica per le loro proprietà diuretiche, carminative, antiemetiche, antispasmodiche ed antinfiammatorie. Sono inoltre comunemente utilizzati nell'industria dei liquori e per la preparazione di cibi dal caratteristico gusto aromatico.

Il genere *Foeniculum* è monospecifico e rappresentato da una unica specie, *Foeniculum vulgare* Miller.

Le due principali sub specie riconosciute dalla maggior parte degli autori sono *Foeniculum vulgare* (Mill.) ssp. *piperitum* (Ucria) Courintho, conosciuta solo allo stato spontaneo, e *Foeniculum vulgare* (Mill.) ssp. *vulgare* (Gilib.) Holmboe.

Come nella maggior parte delle Umbrelliferae, la pianta presenta canali secretori in tutti gli organi (Kadry *et al.*, 1978) e i suoi frutti producono un olio essenziale (1.5 -3 %) ricco in componenti aromatici, oli grassi (9-21%) e tocoferoli tra cui  $\alpha$ -tocoferolo (7%),  $\beta$ -tocoferolo(1.5-2%) e il  $\gamma$ -tocoferolo.

I principali costituenti dell'essenza del finocchio sono l'anelolo, da cui dipende il suo aroma, il fencone, l' estrasgolo, l'anisaldeide e terpeni, ed è

particolarmente ricco in cumarine (umbelliferone, bergaptene, psoralene, xantoxina, ostenolo e seselina (Fujiita *et al.*, 1980; Hanault *et al.*, 1989; Osisiogu 1967; Vlahov *et al.*, 1964).

Per molti anni l' antracnosi delle foglie e dello stelo di finocchio, indotte da *Mycosphaerella anethi* (Pers.) è stato riconosciuto come uno delle più importanti fitopatie di origine fungina in Germania ed in Bulgaria (Petzold 1989; Plesher, 1992, 1997; Rodeva & Gabler, 2004). Il finocchio è anche preda di diversi batteri, tra i quali *Erwinia carotovora*, responsabile del marciume basale e specie di *Pseudomonas*, che provocano striature sugli organi.

Tra gli insetti, che maggiormente colpiscono il finocchio sono da ricordare il *Colacoris norvegicus*, il *Graphosoma linneota*, e gli afidi vettori del patogeno *Phomopsis foeniculi*.

## ***1.2 Isolamento e caratterizzazione di Phomopsis foeniculi da tessuti infetti di finocchio***

E noto da tempo che differenti specie del genere *Phomopsis*, siano coinvolte in numerose patologie a danno di colture di interesse agrario, tra le quali numerose erbe aromatiche di grande importanza economica (Uecker, 1988).

C'è stata un po' di confusione circa la classificazione di *Phomopsis* spp su finocchio. Câmara (1947) rinominò il fungo *Phoma foeniculina* Sacc. come *Phomopsis foeniculina* (Sacc.) Câmara (Câmara, 1947).

Nel 1977 il fungo fu isolato da tessuti infetti di finocchio in Francia, dove causava un imbrunimento dell'ombrella ed una necrosi dello steso, comportando una riduzione di circa il 50% del prodotto totale coltivato. Du manoir e Vegh descrissero i sintomi e il fungo considerandolo come una nuova specie *Phomopsis foeniculi* spec. nov. (Du Manoir & Veigh, 1981). Ulteriori studi hanno accertato la capacità del fungo, se accresciuto *in vitro* in coltura liquida, di produrre tossine che potrebbero essere coinvolte nella patogenesi (Hanault *et al.*, 1989). Successivamente la patologia fu osservata in Italia (Mugnai e Anzidei, 1994) e in Germania (Plesher, 1992). In Italia, nei primi anni novanta, per la prima volta in colture sperimentali in differenti regioni italiane, come Antella (Firenze), Drena (Trento) e Scafati (Salerno), furono osservate grosse alterazioni sul finocchio da serra. Il gruppo di ricerca di cui è coordinatore il professore Evidente, ha isolato il principale metabolita fitotossico da filtrati colturali di *P. foeniculi*. Tale fitotossina, denominata foeniculossina, è stata caratterizzata come un nuovo geranil-idrochinone (Fig. 7) (Evidente *et al.*, 1994).

Il ceppo italiano del fungo ha, inoltre, mostrato capacità di produrre fitotossine idrofiliche ad alto peso molecolare, caratterizzate come un galattano ed un mannano ramificato (Fig. 7) (Corsaro *et al.*, 1998).

Nel 2003 Phillips (Phillips, 2003) ha descritto nuovamente *Diaporthe foeniculacea* Niessl. ed ha stabilito la connessione tra specie anamorfiche e telomorfiche.

Recentemente, sono state riscontrate in Bulgaria, con frequenza crescente, gravi patologie indotte da *P. foeniculi* (specie anamorfica di *Diaporthe angelicae*) sul finocchio da seme (Rodeva & Gabler, 2010). I sintomi osservati

sul finocchio in Bulgaria sono uguali a quelli riportati in Francia ed in Italia (De Manoir & Vegh, 1981; Mugnai & Anzidei, 1994), ed il nome *D. Angelicae*, *Phomopsis foeniculi* nella forma anamorfica, è stato accettato e riconosciuto quale agente causale di tale patologia.

### 1.2.1 *Caratteristiche e morfologia di P.foeniculi*

La presenza di numerose larve all'interno dei frutti della pianta comporta una enorme quantità di semi non vitali (Gupta, 1962). Diverse specie di afidi che attaccano la pianta nel periodo della fruttificazione possono veicolare il fungo (Gupta, 1962).

La fase vegetativa del fungo è caratterizzata dalla presenza di ife ialine a parete sottile di 3.5  $\mu\text{m}$  di diametro che diventano verde scuro, da un micelio intracellulare di forme diverse e di picnidi neri che si diffondono all'interno di tutte le parti infette della pianta.

Le picnidio- spore prodotte dal fungo possono essere di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  (Fig. 8).

Le spore di tipo  $\alpha$  sono unicellulari, ovoidali o fusiformi, ialine da 8 a 10  $\mu\text{m}$  di lunghezza e da 2.0 a 2.5  $\mu\text{m}$  di spessore, mentre le spore di tipo  $\beta$  sono più spesse e lunghe, da 8 a 25  $\mu\text{m}$  e possono essere curve o filiformi (Pignatti 1989).

Quando il fungo è accresciuto in vitro si ha la formazione di colonie bianche gelatinose, che, se tenute a 23° per 15 giorni alla luce, con il tempo possono diventare scure con l'apparire di caratteristiche zone chiare dovute alla massa miceliare e di picnidi neri dopo circa 2-3 settimane (Pignatti, 1989).

I sintomi principali sono espressi come imbrunimento dell'ombrella e necrosi dello stelo. La patologia è riscontrata a livello delle ombrelle, con il parziale o completo disseccamento ed un cambiamento di colore fino al rosso bruno.

Le ombrelle possono essere completamente distrutte, non producendo più frutti (Fig. 9). La necrosi dello stelo, con la comparsa di aree necrotiche bruno-violacee, osservabile nel secondo anno o seguenti della coltivazione, comporta la morte di rami o intere piante (Fig.10).

Il patogeno può interferire con il sistema vascolare della pianta, rendendo difficile la circolazione all'interno del floema, per la presenza di macromolecole prodotte dal patogeno stesso e di sostanze viscosi derivanti dalla digestione enzimatica delle cellule della pianta ospite, causando appassimento e successiva morte della pianta. E' possibile, inoltre, la comparsa piccole pustole nere, localizzate alla base dello stelo, corrispondenti ai picnidi del fungo contenenti  $\alpha$  e  $\beta$ -conidi che possono svilupparsi su ombrelle, rami e steli infetti (Fig. 11), (Mugnai & Anzidei, 1995; Rodeva & Gabler, 2010), portando alla rapida morte della pianta.

L'infezione, infine, può riguardare anche la base delle foglie e la superficie fogliare; col tempo le foglie cambiano colore dal giallo al rosso bruno, appassiscono fino alla morte con il completo distacco (Fig. 12).

### 1.2.2 Correlazione tra le tossine prodotte da *P. foeniculi* e quelle prodotte da *P. guepinii*

Dalle prime indagini spettroscopiche risultava una stretta correlazione tra una delle tossine prodotte da *P. foeniculi* e la principale tossina prodotta da *P. guepinii*, patogeno del nocciolo. Pertanto in tale tesi viene riportato l'isolamento e la caratterizzazione chimica e biologica della principale tossina prodotta da *P. guepinii* ed uno studio di correlazione struttura attività utilizzando quest'ultima e la tossina prodotta da *P. foeniculi*.

### 1.3 **Importanza economica del nocciolo**

Il nocciolo viene ascritto al genere *Corylus*, famiglia delle Cupulifere; a tale famiglia appartengono, oltre al *Corylus avellana*, o nocciolo comune (Fig.13), *C.americana*, *C.colchica*, *C.pontica*, *C.silvestri*, *C.tubulosa* e *C.colurna* o nocciolo turco. E' un arbusto di media grandezza (2-4 m) con attitudine pollonifera. Il frutto è una ghianda con involucro tubuloso che racchiude di norma un solo seme o nocciola ricco di olio (60-65%). L'olio estratto dai frutti nocciolo è comunemente impiegato nell'industria dei colori e in cosmetica per le sue proprietà antinfiammatorie, astringenti e rinfrescanti. Le nocciole trovano il loro maggiore impiego nell'industria alimentare; la loro produzione mondiale si aggira intorno alle 580.000 tonnellate, di cui il 70 % è prodotto in Turchia.

E' stato stimato che l'estensione totale delle coltivazioni di nocciolo in Turchia ha raggiunto i 600.000 ettari, con un totale prodotto di circa 800

tonnellate, con un rendimento medio di circa 1.2 tonnellate nel 2008 (FAO 2008). Le più importanti malattie da funghi che colpiscono il nocciolo sono il mal dello stacco, causato da *Cytospora corylicola*, il cimiciato dei semi, indotto da *Nematospora coryli* e il mal bianco o oidio, causato da *Phyllactinia guttata*. Diversi sono anche gli insetti parassiti tra cui l'*Halpidea etrusca*, il *Balininus nucum* e l'*Eryophies avellanae*. Tra le avversità che colpiscono il nocciolo sono da annoverare anche diverse batteriosi causate principalmente da *Xantomonas campestris coryalina*.

### 1.3.1 Isolamento e caratterizzazione di *P.guepinii* da tessuti infetti di nocciolo

Nei primi anni novanta in Turchia è stata segnalato il diffondersi di una nuova patologia del nocciolo, causata da *Pestalotiopsis guepinii* (Desm) (Yurut, *et al.*, 1994) responsabile di gravi patologie anche a danno del noce (*Juglans* spp) e del lentisco (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*) (Karaca & Erper, 2001; Göre *et al.*, 2010).

Il fungo è caratterizzato da un micelio bianco che produce numerosi acervuli con gocce scure dovute alle spore, osservabili in tessuti infetti. I conidi prodotti hanno dimensioni di 21.2-26.1x6.8-8.1 µm, con cellule mediane scure, 4 setti trasversali, due o più appendici radicali lunghe 16.5-26.1 µm e appendici basali lunghe 4.2-7.8 µm (Fig. 14).

I principali sintomi indotti dal patogeno sul nocciolo consistono nella formazione di ruggine e disseccamento. Il fungo può attaccare le foglie e i germogli, con la comparsa di piccole macchie necrotiche negli stadi precoci

fino al completo appassimento e disseccamento di foglie, l'imbrunimento dei germogli e comparsa di macchie necrotiche anche su giovani rami (Fig. 15).

## 2. SCOPO DELLA TESI

I funghi fitopatogeni producono una grande varietà di fitotossine, che negli ultimi anni sono stati target di numerose ricerche multidisciplinari, al fine di utilizzarle come potenziali erbicidi, fungicidi o antibiotici all'interno di un programma di lotta integrata, in programmi di miglioramento genetico per la selezione di piante resistenti o, infine, per una migliore classificazione tassonomica .

Lo scopo principale del mio lavoro è stato indagare la produzione di metaboliti fitotossici da *P. foeniculi*, agente causale di gravi patologie del finocchio da seme.

1. Il primo obiettivo è stato l'isolamento e l'identificazione di tale fungo dal gruppo coordinato dalla Prof Rosita Rodeva presso l'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria con il quale è in corso un'intensa collaborazione.
2. Il secondo obiettivo è stato quello di trovare le migliori condizioni per l'accrescimento in coltura liquida di *Phomopsis foeniculi*. Tale studio è stato condotto dal gruppo della Prof Rosita Rodeva presso l'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria
3. Il terzo obiettivo è stato l'isolamento dalla coltura liquida di tale fungo dei metaboliti con attività fitotossica utilizzando le comuni tecniche di estrazione e purificazione cromatografia su colonna e strato sottile (CC e TLC).

4. Il quarto obiettivo è stata la determinazione strutturale dei principali metaboliti prodotti da *P. foeniculi* utilizzando le comuni tecniche spettroscopiche (IR e UV), ma essenzialmente la risonanza magnetica monodimensionale e bidimensionale del protone e del carbonio ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR), la spettrometria di massa utilizzando come tecnica di ionizzazione l'ElectroSpray Ionization (ESI) e metodi chimici, mediante la preparazione di derivati.
5. Il quinto obiettivo è stato quello di caratterizzare l'attività biologica dei metaboliti fitotossici isolati, saggiando, mediante l'attività fitotossica dell'estratto organico delle colture, delle frazioni cromatografiche e di metaboliti purificati, su pianta ospite e non, presso i laboratori del gruppo della Prof.ssa Rosita Rodeva dell' Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria.
6. Il sesto obiettivo è stato l'isolamento e la caratterizzazione chimica e biologica di fitotossine strutturalmente correlate a quelle di *P. foeniculi*, prodotte da *P. guepinii*.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Parte Sperimentale Generale

Tutti i reattivi ed i reagenti usati, se non diversamente specificato, sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (Italia), dalla Merck (Germania) e dalla Carlo Erba (Italia).

Il potere ottico rotatorio è stato misurato utilizzando un polarimetro Jasco (Tokyo, Giappone) P-1010 in soluzione di metanolo.

Gli spettri IR e UV sono stati registrati rispettivamente come film liquido ed in soluzione di MeOH, quando non diversamente specificato, su uno spettrometro Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) spectrum one FT-IR e su uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 UV-VIS rispettivamente.

Gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR, mono e bidimensionali, sono stati registrati rispettivamente a 600, 500 e 400 MHz e a 125, 100 e 75 MHz su spettrometri Bruker (Kalsrhue, Germania) in soluzione di  $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$  (95:5 v/v) usando  $\text{CDCl}_3$  come standard interno.

Le molteplicità del carbonio sono state determinate da spettri DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) (Bergen e Braun, 2004).

Gli spettri DEPT, COSY-45 (Correlated Spettroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) e NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spettroscopy) (Berger & Braun, 2004) sono stati effettuati utilizzando microprogrammi Bruker.

I chemical shifts sono dati in valori di  $\delta$  (ppm). Le costanti di accoppiamento ( $J$ ) sono date in Hertz.

Sono stati impiegati i seguenti simboli:  $s$ =singoletto;  $d$ =doppio;  $dd$ =doppio doppio;  $ddd$ =doppio di doppi doppi;  $m$ =multipletto;  $q$ =quartetto;  $dq$ =doppio quartetto;  $t$ =tripletto.

Gli spettri di massa elettrospray ESI sono stati registrati su uno spettrometro Agilent technologies modello Quadrupole 6120 LC/MS (Waghaeusel-Wiesental, Germania).

Le purificazioni cromatografiche sono state condotte su colonne impaccate con gel di silice (Kieselgel 60; 0,063-0,200) della Merck a pressione ordinaria.

Le cromatografie analitiche, preparative su strato sottile (TLC, Thin Layer Chromatography) sono state effettuate su lastre di gel di silice (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) della Merck, aventi uno spessore rispettivamente di 0,25-0,50 mm. Le TLC su fase inversa sono state effettuate su lastre a fase inversa K-C18F<sub>254</sub> della Whatman (Maidstone, U.k) aventi 0,20 mm di spessore.

I sistemi eluenti adoperati sono stati i seguenti :

- eluente A: cloroformio-*iso*-propanolo (87:13 v/v)
- eluente B: cloroformio-*iso*-propanolo (9:1 v/v)
- eluente C: cloroformio-*metanolo* (92:8 v/v)
- eluente D : cloroformio-*metanolo* (9:1 v/v)
- eluente E: etanolo-acqua (6:4 v/v)
- eluente F: cloroformio-*iso*-propanolo (95:5 v/v)
- eluente G: cloroformio-*iso*-propanolo (98:2 v/v)
- eluente H: acetato di etile- *n*-esano (1:1 v/v)

- eluente I : etere di petrolio- diclorometano (8:2 v/v)

I cromatogrammi su strato sottile sono stati evidenziati attraverso esposizione a radiazione UV (253nm), o spruzzando la TLC con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% in MeOH e successivamente con acido fosfomolibdico al 5 % in EtOH, il tutto seguito da riscaldamento in stufa a 110 °C per 10 minuti.

## 4. PARTE SPERIMENTALE

### 4.1 *Isolamento, caratterizzazione ed accrescimento di P. foeniculi*

Il fungo è stato isolato da piante naturalmente infette di finocchio dalla Prof. Rositza Rodeva nei laboratori dell' Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria. La capacità di produzione di metaboliti fitotossici è stata valutata su 5 ceppi monoconidici di *P. foeniculi* (Phf1-1, Phf 30-2, Phf 76-1, Phf 96-1, e Phf 107-3), rappresentanti di 5 diversi gruppi morfologici. Tre dischetti di micelio di circa 5 mm di diametro per ogni ceppo sono stati posti separatamente in beute da 300 mL, contenenti 100 mL di brodo Czapek-Dox integrato con lo 0.02% di estratto di lievito e lo 0,02% di L-asparagina. Le colture sono state incubate a 25 ° C sotto agitazione a 120 rev/min per 14 giorni. Dopo l'incubazione le colture sono state filtrate con un doppio strato di garza per ridurre la biomassa fungina ed ulteriormente filtrati con filtri Millipore da 45 µm di diametro. La fitotossicità dei filtrati colturali, è stata saggiata mediante saggi di immersione su giovani piante di finocchio, cv Berfena (pianta ospite) e su piante di pomodoro, cv Ideal (pianta non ospite). Le radici sono state lavate ed immerse separatamente in 2 mL di filtrato culturale concentrato e in 2 mL di una diluizione 1:10 dello stesso per i 5 diversi ceppi. Le piantine sono state poste a 25° C per 24 ore nella soluzione e quindi trasferite in 2 mL di acqua distillata per 48 ore. Come controllo sono stati utilizzati il brodo di coltura non inoculato e acqua distillata sterile. L'esperimento è stato ripetuto per tre volte per ognuno dei 5 ceppi. Il ceppo Phf 1-1 ha mostrato una maggiore fitotossicità sia su pianta ospite che su

piantine di pomodoro, ed è stato quindi selezionato per lo studio e la caratterizzazione chimica e biologica dei metaboliti secondari da esso prodotti.

Il ceppo è stato depositato presso la National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures di Sofia con il numero NBIMCC 8645.

#### **4.2 Estrazione ed isolamento dei metaboliti fitotossici prodotti in coltura liquida da *P. foeniculi***

Il filtrato colturale liofilizzato ottenuto da 12 L di coltura liquida del ceppo Phf 1-1 è stato estratto con acetato di etile per 3 volte al pH del filtrato colturale (pH 6,69). Gli estratti organici sono stati riuniti e anidrificati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrati ed evaporati sotto pressione ridotta, fornendo un solido bruno (1,83 g) mostrante una significativa attività fitotossica su piante di pomodoro e su pianta ospite. L'estratto organico è stato analizzato mediante TLC su lastre di gel di silice con il sistema eluente A.

L'estratto organico della coltura di *P. foeniculi* (1,83 g) è stato frazionato utilizzando una colonna cromatografica di gel di silice a pressione ordinaria usando il sistema eluente A, seguito da eluizione finale con metanolo (Schema 1). Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante TLC su lastre di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente e raggruppate in 15 gruppi di frazioni omogenee.

L'intero processo di purificazione è stato seguito attraverso saggi di fitotossicità condotti secondo le modalità riportate nella parte sperimentale presso i laboratori dell'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria.

Le frazioni fitotossiche della prima colonna cromatografica sono state ulteriormente purificate. Il residuo della frazione 3 è stato purificato su TLC preparativa utilizzando il sistema eluente B, dando 4 gruppi di frazioni omogenee (Schema 1). Il residuo della terza frazione (13,2 mg) della TLC ottenuto come un solido bianco omogeneo è stato identificato come il nectriapirone ( $R_f$  0,86, eluente B; 1.1mg/L). Il residuo della quarta frazione (32,4 mg) della stessa TLC preparativa, è stato ulteriormente purificato utilizzando lo stesso sistema eluente, ottenendo un solido giallo amorfo, identificato come la macrosporina ( $R_f$  0,78; 2,3 mg/L). I residui delle frazioni da 11 a 13 della prima colonna, mostrando un pattern cromatografico simile, sono stati combinati e purificati su una colonna cromatografica di gel di silice a pressione ordinaria, eluita dal sistema eluente A e seguita da eluizione finale con metanolo. Si sono ottenuti 7 gruppi di frazioni omogenee (Schema 1), che sono stati analizzati mediante TLC su lastre di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente. Il residuo della terza frazione dell'ultima colonna (214 mg) è stato ulteriormente frazionato utilizzando una colonna cromatografica di gel di silice a pressione ordinaria eluita dal sistema eluente A e seguita da eluizione finale con metanolo. Si sono ottenuti 8 gruppi di frazioni omogenee (Schema 1), che sono stati analizzati mediante TLC su lastre di gel di silice, utilizzando lo stesso sistema eluente. Il residuo della terza frazione di questa ultima colonna cromatografica è stato ulteriormente purificato attraverso due stadi successivi di TLC preparative utilizzando i sistemi eluenti C e D rispettivamente. E' stato ottenuto un solido omogeneo, caratterizzato come l'alternasolanolo J ( $R_f$  0,36, sistema eluente D; 0,45 mg/L).

Il residuo della quarta frazione della penultima colonna cromatografica (50 mg) è stato ulteriormente purificato attraverso due stadi successivi di TLC preparativa utilizzando il sistema eluente D e su TLC a fase inversa, utilizzando il sistema eluente E, dando un solido omogeneo arancione identificato come l'altersolanolo A ( $R_f$  0,40 e 0,79, sistema eluente D ed E rispettivamente; 1,0 mg/L).

### *Nectriapirone (1)*

Il nectriapirone **1**, è stato ottenuto come solido omogeneo bianco. UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 227 (4.59) e 321 (4.2), IR  $\nu_{\max}$  1682, 1644, 1619, 1554, 1173 cm<sup>-1</sup>. ESI MS (+)  $m/z$  217 [M+Na]<sup>+</sup>. I dati degli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR sono riportati in Tabella 1.

#### *4.2.1 Idrogenazione del nectriapirone*

Il nectriapirone (4 mg) sciolto in 300  $\mu$ l di metanolo è stato aggiunto sotto agitazione ad una sospensione di palladio su carbone al 10% in metanolo (300  $\mu$ l) presaturata con H<sub>2</sub>.

L'idrogenazione è stata condotta a temperatura ambiente e a pressione atmosferica sotto agitazione magnetica. Dopo un'ora la reazione risultava completa ed è stata interrotta allontanando il catalizzatore mediante filtrazione su setto poroso. La soluzione ottenuta è stata portata a secco mediante pressione ridotta.

Il residuo oleoso ottenuto (3,4 mg) è stato analizzato mediante TLC su lastre di gel di silice con il sistema eluente F e ha mostrato la presenza di

diverse bande, tra cui una presente in maggiore quantità. Il residuo è stato purificato mediante TLC di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente. La banda corrispondente al derivato principale è stata eluita con il sistema eluente utilizzato per la purificazione. L'evaporazione del solvente sotto pressione ridotta ha lasciato un residuo oleoso di 2,4 mg corrispondente al 7,8-diidronectriapirone **2**, (Fig. 21) ( $R_f=0,75$ ; 2,4 mg).

#### *7,8-Diidronectriapirone (2)*

UV (CH<sub>3</sub>CN)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 298 (4,14), 205 (4,74); IR  $\nu_{\max}$  1694, 1644, 1568, 1461 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.97, (s, H-5), 3,87 (s, OMe), 2,48 (tq,  $J = 7,0$  e  $7,0$  Hz, H-7), 1,91 (s, Me-10), 1,72 (dq,  $J = 7,0$  e  $7,0$ , H-8), 1,22 (d,  $J = 7,0$ , Me-11), 0,88 (t,  $J = 7,0$ , Me-9); ESI MS (+)  $m/z$  219 [M+Na]<sup>+</sup>, 197 [M+H]<sup>+</sup>.

#### *Macrosporina (3)*

La macrosporina **3** è stata ottenuta come solido omogeneo giallo. UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 284 (5,48), 305 (5,12), 379 (4,85); IR  $\nu_{\max}$  3289, 1655, 1637, 1572 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS (-)  $m/z$  283 [M-H]<sup>-</sup>. I dati degli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR sono riportati in Tabella 2.

#### *4.2.2 Reazione di metilazione della macrosporina*

Una soluzione eterea di CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> è stata aggiunta alla macrosporina (5 mg) disciolta in metanolo (0,5 mL). Tale miscela è stata lasciata a temperatura ambiente per una notte, quindi l'eccesso di reagente e il solvente sono stati

allontanati sotto flusso di azoto. Il residuo così ottenuto (6 mg), analizzato per TLC con sistema eluente G, ha mostrato la presenza di due prodotti principali a  $R_f$  0,76 e 0,68. Il residuo è stato successivamente purificato mediante TLC di gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente. Le bande corrispondenti rispettivamente alla 3-*O*-metilmacrosporina (**4**), e alla 3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (**5**), sono state eluite con lo stesso sistema eluente utilizzato per effettuare la purificazione; il solvente evaporato sotto pressione ridotta ha fornito due solidi gialli omogenei entrambi con un peso pari a 2 mg corrispondenti ai derivati (**4**) e (**5**).

#### 3-*O*-Metilmacrosporina (**4**)

UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 281 (3,80), 307 (3,50); IR  $\nu_{\max}$  3356, 1667  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$ : H-1 12,9 (s, OH-C-5), 8,03 (s, H-1), 7,63 (s, H-4), 7,35 (d,  $J = 2,2$  Hz, H-8), 6,67 (d,  $J = 2,2$  Hz, H-6), 4,02 e 3,83 (s, 2 x OMe), 2,35 (s, Me); ESI MS (+)  $m/z$ : 299  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 3,5-*O,O'*-Dimetilmacrosporina (**5**)

UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 282 (3,80)  $\text{cm}^{-1}$ ; IR  $\nu_{\max}$  1668, 1593, 1444;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$ : 7,98 (s, H-1), 7,65 (s, H-4), 7,46 (d,  $J = 2,1$  Hz, H-8), 6,76 (d,  $J = 2,1$  Hz, H-6), 4,00, 3,99 e 3,98 (s, 3 x OMe), 2,33 (s, Me); ESI MS (+)  $m/z$ : 313  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 4.2.3 Reazione di acetilazione della macrosporina

Alla macrosporina (3 mg) sciolta in 30  $\mu\text{l}$  di piridina sono stati aggiunti 30  $\mu\text{l}$  di anidride acetica e la reazione è stata condotta a temperatura ambiente.

Dopo una notte la reazione è stata interrotta con aggiunta di metanolo e la piridina è stata allontanata in corrente di azoto come azeotropo formato per aggiunta di metanolo.

Il residuo è stato quindi trasferito con una miscela di cloroformio-*iso*-propanolo (9:1 v/v) ed il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta. Il residuo analizzato mediante TLC di gel di silice, eluito con il sistema eluente H, ha mostrato la presenza di un composto principale a  $R_f$  0,76. Quest'ultimo è stato purificato mediante TLC su gel di silice utilizzando lo stesso sistema eluente. La banda corrispondente al derivato diacetilato è stata eluita con il sistema eluente D. L'evaporazione del solvente, sotto pressione ridotta, ha fornito un residuo oleoso 2,1 mg corrispondente al 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (**6**).

#### 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (**6**)

UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 334 (3,25) e 270 (4,35); IR  $\nu_{\max}$  1772, 1674, 1577, 14356  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$   $\delta$ : 8,13 (s, H-4), 7,86 (s, H-1), 7,37 (d,  $J = 2,4$  Hz, H-8), 6,89 (d,  $J = 2,4$  Hz, H-6), 3,98 (s, OMe), 2,48 e 2,37 (s, 2 x MeCO) 2,34 (s, Me); ESI MS (+)  $m/z$ : 407  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 391  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### *Altersolanolo A* (**7**)

L'*altersolanolo A* **7** è stato ottenuto come solido omogeneo arancione.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -149° ( $c$  0,1 in MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 219 (4,36), e 269 (3,93); IR  $\nu_{\max}$  3370, 1642, 1615  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI MS (+)  $m/z$  359  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 337  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 301  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$  I dati degli spettri  $^1\text{H NMR}$  e  $^{13}\text{C NMR}$  sono riportati in Tabella 3.

### *Altersolanolo J (8)*

L'altersolanolo J **8**, è stato ottenuto come solido omogeneo bianco.  $[\alpha]_D^{25}$  -46 ° (*c* 0,1 in MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 216 (3,21); 265 (2,71) e 328 (2,19); IR  $\nu_{\max}$  3387, 2924, 2847, 1671, 1615  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI MS (-) *m/z* 307 [M-H]<sup>-</sup>. I dati degli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR sono riportati in Tabella 4.

### **4.3 Saggi di attività fitotossica**

Per la determinazione dell'attività fitotossica delle frazioni cromatografiche dei composti puri isolati da *P. foeniculi* è stato utilizzato il saggio di puntura fogliare su foglie di pomodoro, in quanto le foglie di finocchio risultavano non adatte a questo tipo di saggio.

Le frazioni e i composti puri sono stati disciolti in una piccola quantità di metanolo e diluiti con acqua distillata sterile fino ad una concentrazione di 2 mg/mL al 3% di metanolo.

Sono stati applicati 20  $\mu\text{L}$  di soluzione preparata come precedentemente descritto su foglie di pomodoro forate con ago sterile. L'esperimento è stato ripetuto su 3 foglie inoculate in 3 punti, in doppio con tre ripetizioni.

Le foglie inoculate sono state incubate in camera umidificata ed osservate ogni giorno per rilevare i sintomi. La valutazione finale è stata effettuata tre giorni dopo l'inoculo. Come controllo è stata utilizzata una soluzione al 3% di metanolo in acqua distillata sterile. L'attività fitotossica è stata valutata su una scala da 0 a 4: 0= mancanza di lesioni, 1= lesioni da 1 a 2 mm; 2= lesioni da 3 a 5 mm; 3= lesioni da 6 a 7 mm, 4= lesioni da 8 a 10 mm.

#### **4.4 Isolamento, caratterizzazione ed accrescimento di *P.guepinii***

Il ceppo di *P. guepinii* è stato isolato da piante infette di nocciolo a Trabzon in Turchia. Il ceppo monoconidico è stato accresciuto su PDA (Potato Dextrose Agar) a 23 °C per 14 giorni con un fotoperiodo di 12 ore. La coltura è stata risospesa in acqua distillata sterile e le spore raschiate con una spatola di vetro. La sospensione conidica è stata filtrata con filtri di carta Whataman per rimuovere i frammenti di micelio fungino, portata ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  spore e conservata a -80° in glicerolo al 15%. Per la produzione di metaboliti fitotossici 150 µL di sospensione conidica di *P. guepinii* ( $10^6$  spore/mL) sono state inoculate in beute da 250 mL contenenti 150 mL di potato broth medium integrato con il 2% di glucosio. Le beute sono state incubate in fase stazionaria al buio a 27 °C per 7 giorni. Le colture così ottenute sono state filtrate attraverso 4 strati di garza e centrifugate a 10000 rpm per 15 minuti. Il filtrato colturale ottenuto è stato saggiato per l'attività fitotossica e liofilizzato.

#### **4.5 Estrazione ed isolamento dei metaboliti fitotossici, correlati al nectriapirone, prodotti in coltura liquida da *P.guepinii***

Il filtrato colturale liofilizzato (3 L) è stato estratto con acetato di etile per 4 volte al pH del filtrato colturale (pH 5). Gli estratti organici sono stati riuniti e anidrificati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrati ed evaporati sotto pressione ridotta, fornendo un residuo solido bruno (48 mg) mostrante una significativa attività

fitotossica. L'estratto organico della coltura di *P. guepinii* è stato frazionato su TLC preparative utilizzando il sistema eluente F, ottenendo 11 gruppi di frazioni omogenee. Il residuo della frazione 5 (2,9 mg) è stato ulteriormente purificato su TLC preparativa, utilizzando il sistema eluente F, ed ottenendo il principale metabolita come solido amorfo bianco, caratterizzato come il pestalopirone (Fig. 27), ( $R_f$  0,34 sistema eluente F; 0,6 mg/L).

#### *Pestalopirone (9)*

$^1\text{H NMR}$   $\delta$ : 6,69 q ( $J= 7,0\text{Hz}$ ) (H-8), 5,90 d ( $J=1,0\text{ Hz}$ ) ( H-3), 5,45 d, ( $J=1, \text{H-5}$  ), 3,81 s,( MeO), 1,85 s, (H-10), 1,84 d ( $J= 7\text{ Hz}$ ) (H-9). ESI MS (+)  $m/z$ : 181  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 203  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### **4.6 Saggi di attività biologica**

La significativa somiglianza strutturale tra il nectriapirone isolato da *P. foeniculi*, ed il pestalopirone, isolato da *P. guepinii*, ha suggerito di comparare la loro attività fitotossica, per verificarne la potenziale correlazione tra la struttura chimica e l'attività biologica. Il nectriapirone, il suo 7,8-diidroderivato ed il pestalopirone sono stati saggiati per l'attività fitotossica su differenti specie non ospiti: *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Sonchus arvensis* (L.) e *Chenopodium album* L.

I tre composti puri sono stati disciolti in una piccola quantità di MeOH e diluiti con acqua distillata fino ad una concentrazione finale del 4% di MeOH, ed una concentrazione di tossina pari a 2 mg/mL. Sono stati applicati 20  $\mu\text{L}$  di

soluzione su foglie precedentemente forate con ago sterile. Le foglie sono state lasciate in camera umidificata continuamente esposte a luce fluorescente. I sintomi sono stati osservati visivamente per 3 giorni dopo l'applicazione.

I tre composti puri sono stati testati anche per l'attività antifungina su *Geotrichum candidum* (Link), per l'attività antibiotica contro *Bacillus subtilis* (Cohn) ed *Escherichia coli* (Migula) e per l'attività zootossica su larve di *Artemia salina* (L.).

#### 4.6.1 Saggi di attività fungicida

L'attività fungicida è stata saggiata su *G. candidum* (Bottalico *et al.*, 1990) utilizzando dischetti sterili di cellulosa del diametro di 6 mm (Difco), su cui sono state applicate soluzioni metanoliche dei composti da analizzare, utilizzando una concentrazione di tossine pari a 50 µg/ disco. Dopo l'evaporazione del solvente, i dischi sono stati posti su uno strato di PDA in capsule Petri di 10 cm di diametro e spruzzate con una sospensione di micelio di *G. candidum*.

L'attività antifungina è stata valutata dopo 24 ore, misurando l'alone di inibizione dell'accrescimento fungino.

#### 4.6.2 Saggio di attività antibiotica

Il saggio di attività antibiotica è stato effettuato su *B. subtilis* ed *E. coli* (Capasso *et al.*, 1990). I batteri sono stati accresciuti in tubi di PDA per 24 ore a 25 °C e risospesi in 4 mL di H<sub>2</sub>O sterile.

Aliquote di 0,5 mL delle sospensioni così ottenute sono state utilizzate per inseminare 3 mL di soft-agar (0,7%).

I dischetti di cellulosa contenenti preparati come per il saggio di attività fungicida, sono stati depositati dopo aver stratificato il soft- agar su piastre Petri contenenti 8 mL di PDA.

L'attività è stata misurata come alone di inibizione della crescita dei batteri intorno al dischetto.

#### 4.6.3 Saggio di attività zootossica

Il saggio per la valutazione dell'attività zootossica è stato condotto su larve di gamberetto di mare (*A. salina*).

Il saggio è stato realizzato in piastre per colture cellulari con 24 pozzetti contenenti ciascuno 30-40 larve in 500  $\mu$ L di acqua marina. Le sostanze, disciolte in una soluzione all'1% MeOH, sono state saggate fino a  $2 \times 10^{-4}$  M.

La mortalità larvale è stata misurata come rapporto percentuale tra il numero delle larve morte dopo 36 ore a 27° C ed il numero di larve in ogni pozzetto.

## 5 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 Isolamento dei metaboliti fitotossici da *P. foeniculi*

Il finocchio da seme è particolarmente diffuso in Europa centrale e meridionale e riveste grande importanza dal punto di vista economico sia per l'industria alimentare che in fitoterapia.

I semi di finocchio sono ampiamente utilizzati nell'industria dei liquori ed in molti prodotti alimentari con sapore aromatico.

*Diaporthe angelicae*, forma sessuata di *Phomopsis foeniculi* è stato individuato quale agente causale di necrosi dello stelo e dell'imbrunimento dell'ombrella nel finocchio da seme in Bulgaria. Il genere *Phomopsis* è noto per la capacità di produrre metaboliti secondari bioattivi. In particolare da ceppi di *P. foeniculi* isolati dallo stesso ospite in provincia di Firenze, è stata precedentemente isolata la principale fitotossina denominata foeniculossina (Fig. 7) (Evidente *et al.*, 1994) e due EPSs fitotossici caratterizzati come un mannano ramificato ed un galattano (Fig. 7) (Corsaro *et al.*, 1998).

In considerazione dell'importanza delle fitotossine quali fattori di virulenza e della possibilità di mettere a punto metodi di diagnosi precoce della malattia, basati sul loro rilevamento in piante infette, è stato intrapreso uno studio sull'isolamento dei metaboliti prodotti dal ceppo bulgaro di *P. foeniculi* con lo scopo di isolare e caratterizzare le fitotossine da esso prodotte e di verificare se tale ceppo producesse la foeniculossina e gli EPSs isolati da filtrati colturali del ceppo italiano. Il fungo utilizzato in questo studio è stato isolato dal gruppo della Prof.ssa. Rosita Rodeva dell'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria. A

tale scopo presso i laboratori bulgari sono state ottimizzate le condizioni di crescita *in vitro* di diversi isolati.

I migliori risultati per la produzione di un filtrato colturale fitotossico sono stati ottenuti con il ceppo Phf 1-1, accresciuto in coltura liquida, nelle condizioni descritte nella parte sperimentale (Par. 4.1). L'estratto organico (1,86 g) del filtrato colturale (12 L) è stato ottenuto mediante estrazione esaustiva con acetato di etile, come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.2).

Infatti, in una esperienza preliminare, condotta utilizzando solventi organici a polarità crescente (*n*-esano, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-butanolo) a 3 diversi pH, tale solvente è risultato il più idoneo per l'estrazione esaustiva delle fitotossine dal filtrato colturale. Tale estratto è stato sottoposto a saggi di fitotossicità presso l'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria.

I saggi di fitotossicità di puntura fogliare, condotti come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.3), hanno evidenziato una elevata fitotossicità.

L'estratto organico è stato quindi analizzato mediante TLC su lastre di gel di silice. Il profilo cromatografico mostrava la presenza di diversi metaboliti, ed è stato dunque purificato mediante cromatografia di adsorbimento su colonna di gel di silice, come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.2), fornendo 15 gruppi di frazioni omogenee (Schema 1).

I saggi di attività fitotossica delle frazioni della colonna effettuati su foglie di pomodoro come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.3), hanno mostrato per le frazioni dalla 3 alla 5 la formazione di necrosi del diametro di 6-7 mm, per la frazione 2 e per le frazioni dalla 6 alla 9, la formazione di una necrosi di 3-5 mm, per le frazioni dalla 10 alla 13 la formazione di una necrosi

di 6-7 mm, mentre frazione 1 e la frazione metanolica, non hanno mostrato attività significativa. Infine, la frazione 7:3 ha mostrato una elevata fitotossicità, con una necrosi di 8-10 mm.

Si è proceduto quindi alla purificazione delle frazioni attive, iniziando dalla terza frazione, la quale è stata ulteriormente purificata, mediante diversi stadi su TLC preparative, ottenendo due metaboliti principali identificati come il nectriapirone (**1**) e la macrosporina (**3**). Il nectriapirone, saggiato su piante di pomodoro, ha indotto la formazione di piccole lesioni intorno al punto di inoculo, mentre la macrosporina, saggiata nelle stesse condizioni non ha mostrato attività fitotossica.

Le frazioni dalla 11 alla 13, sono state unite e purificate come riportato in dettaglio nella parte sperimentale (Par. 4.2), portando all'isolamento di due metaboliti fitotossici identificati come l'altersolanolo A (**7**) e l'altersolanolo J (**8**). Infatti l'altersolanolo A quando saggiato su foglie di pomodoro ha indotto una rapida necrotizzazione nervature ed una completa deformazione della foglia, mentre l'altersolanolo J ha indotto formazione di necrosi, e perdita di turgore delle foglie inoculate.

I metaboliti isolati appartengono a diversi sottogruppi della famiglia dei polichetidi e risultano totalmente differenti dalla foeniculossina e dagli esopolisaccaridi EPSs prodotti dal ceppo italiano.

La loro identificazione strutturale è stata effettuata utilizzando metodi spettroscopici (IR, UV), ma essenzialmente 1D e 2D del  $^1\text{H}$  NMR e del  $^{13}\text{C}$  NMR, spettrometria di massa ESI MS e metodi chimici.

### 5.1.1 Identificazione del nectriapirone (1)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva ha indicato per il nectriapirone (Fig. 16) un peso di 194 u.m.a (Fig. 17). Lo spettro IR (Fig. 18) ha mostrato la presenza di diverse bande tipiche di alcuni gruppi funzionali (Nakanishi & Solomon, 1977). In particolare si osservava la presenza di 2 bande a 1682 e 1644  $\text{cm}^{-1}$  relative rispettivamente ad un gruppo C=O e ai doppi legami di un  $\alpha$ -pirone, ed una banda a 1619  $\text{cm}^{-1}$ , caratteristica di un C=C coniugato.

Tali fattori strutturali sono stati confermati dallo spettro UV (Fig. 19) che mostrava due picchi massimi di assorbimento a 227 e a 331 nm tipici di un cromoforo costituito da un 2-pirone coniugato.

I fattori strutturali evidenziati dall'analisi degli spettri IR ed UV sono stati confermati da un esame accurato degli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR. In particolare, lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 20, Tabella 1) ha mostrato la presenza di un doppio quartetto ( $J= 7,0$  Hz) a  $\delta$  6,68, tipico di un protone di un gruppo olefinico trisostituito, attribuibile al protone H-8. Come osservato nello spettro COSY (Fig. 21) tale protone era accoppiato con il gruppo metilico (Me-9) osservato come doppietto ( $J= 7,0$  Hz) a  $\delta$  1,84. Il protone H-8 risultava, inoltre, accoppiato mediante una costante allilica ai protoni di un metile vinilico (Me-11), apparso come doppietto ( $J= 1,0$  Hz) a  $\delta$  1,88. Tali sistemi erano consistenti con la presenza di una catena 1-metil-propenilica legata ad 2-pirone. La presenza del residuo del 2-pirone era confermata dal singoletto a  $\delta$  6,09 (H-5), attribuibile al protone di un sistema  $\alpha$ -pironico trisostituito, con un metossile presente come singoletto a  $\delta$  3,90 ed un metile presente come singoletto a  $\delta$

1,93. L'indagine accurata dello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 22, Tabella 1) congiuntamente a quella del corrispondente spettro DEPT (Fig. 23), che definisce la molteplicità degli atomi di C, confermava le strutture parziali descritte in precedenza. Infatti, si osservava la presenza di atomi di C quaternari a  $\delta$  165,9 (C-4), 165,1 (C-2), 160,2 (C-6), 101,9 (C-3) attribuibili il primo ad un carbonio ossigenato dell'anello pironico trisostituito, verosimilmente legato al gruppo metossilico presente come quartetto a  $\delta$  56,3, il secondo al carbonio carbonilico, il terzo al carbonio a cui è legata la catena 1-metil-propenilica ed il quarto al carbonio in  $\alpha$  al gruppo carbonilico, e legato al gruppo metilico (C-10, q), presente a  $\delta$  14,2.

Infine, nello spettro si evidenziava la presenza del segnale relativo ad un carbonio secondario a  $\delta$  91,4, attribuibile al C-5 dell'anello pironico. La presenza della catena 1-metil-propenilica legata al C-6 dell'anello del 2-pirone era consistente con i segnali a  $\delta$  129,7 (C-8) e 126,8 (C-7), relativi ai carboni di un sistema olefinico trisostituito, con segnali attribuibili ai gruppi metilici C-9 e C-11 a  $\delta$  12,9 e 8,6, rispettivamente.

Gli esperimenti 2D  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR hanno consentito di osservare gli accoppiamenti tra tutti i protoni ed i corrispondenti carboni.

Infatti, gli accoppiamenti osservati nello spettro HSQC (Fig. 24) hanno confermato le assegnazioni fatte in precedenza. Particolarmente significativi erano gli accoppiamenti tra il C-8 a  $\delta$  129,7 e l' $^1\text{H}$ -8 a  $\delta$  6,68, tra il C-5 a  $\delta$  91,4 e l' $^1\text{H}$ -5 a  $\delta$  6,09. Sono state anche evidenziate le correlazioni tra i carboni e i protoni del gruppo metossilico e dei 3 gruppi metilici a  $\delta$  56,3, 14,2, 12,1, 8,6 con i protoni a  $\delta$  3,90, 1,93, 1,84, 1,88.

Sulla base di tali risultati si potevano assegnare i chemical shifts a tutti i carboni e ai corrispondenti protoni del nectriapirone, come riportato in Tabella 1.

Tale struttura è stata confermata dalle correlazioni osservate nello spettro HMBC (Fig. 25 , Tabella 1). In particolare, dalla correlazione osservata tra il carbonio C-2 a  $\delta$  165,1 e i protoni a  $\delta$  1,93 del (Me-10), tra il carbonio C-6 a  $\delta$  160,2 con i protoni a  $\delta$  6,68 e 1,88 (H-8) e (Me-11), confermando il punto di attacco della catena laterale al C-6. La posizione del gruppo metossilico era confermata dalla correlazione osservata tra il carbonio C-4 a  $\delta$  165,9 e i protoni a  $\delta$  3,90 del metossile, inoltre lo stesso carbonio risultava correlato al protone H-5 presente a  $\delta$  6,09.

La stereochimica del doppio legame C7-C8 della catena 1-metilpropenilica è stata determinata dall'analisi degli effetti osservati nello spettro NOESY (Fig. 26).

Si osservava, infatti, una correlazione tra i protoni del gruppi metilico Me-11 ed il protone H-5 del 2-pirone e tra i protoni del gruppo metilico Me-9 e il protone H-8 della catena 1-metilpropenilica. Tali osservazioni hanno consentito di assegnare al doppio legame C7-C8 una configurazione *E*.

Lo spettro ESI MS (Fig. 17) registrato in modalità positiva ha mostrato la presenza del picco ionico pseudomolecolare a  $m/z$  195  $[M+H]^+$  e dell'addotto con lo ione sodio a  $m/z$  217  $[M+Na]^+$ .

L'insieme di questi dati ha permesso di identificare il metabolita come l'(E)-4-metossi-3-metil-6-(1'-metil-propenil)-piran-2-one (composto **1**, Fig. 16).

Ulteriore conferma della struttura assegnata al nectriapirone è stata ottenuta mediante la preparazione del 7,8-diidroderivato.

#### 5.1.2 *Determinazione strutturale del 7,8-diidronectriapirone (2)*

Il 7-8-diidronectriapirone (**2**) è stato preparato mediante idrogenazione catalitica di **1** condotta utilizzando palladio su carbone al 10% in metanolo, come riportato dettagliatamente nella parte sperimentale (Par. 4.2).

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva, ha indicato per il 7,8-diidronectriapirone (Fig. 27) un peso molecolare di 196 u.m.a (Fig. 28).

Lo spettro IR (Fig. 29) mostrava, rispetto a quello di **1**, l'assenza della banda dovuta al gruppo olefinico coniugato a  $1619\text{ cm}^{-1}$ . Lo spettro UV (Fig. 29) mostrava un picco massimo di assorbimento tipico dei pironi (Scott, 1994). Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 30), comparato con quello del nectriapirone, mostrava come unica differenza la presenza di sistemi dovuti ad una catena sec-butilica al posto della catena 1-metil-propenilica attaccata al C-6. Infatti, il quartetto dovuto al protone olefinico H-8, presente a  $\delta$  6,68 nello spettro  $^1\text{H}$  NMR del nectriapirone, risulta assente, mentre sia il metile in posizione 11 che quello in posizione 9 erano shiftati rispettivamente a  $\delta$  1,22 e 0,88, e apparivano come un doppietto ( $J = 7,0\text{ Hz}$ ) ed un tripletto ( $J = 7,0\text{ Hz}$ ). In fine è stata osservata la presenza aggiuntiva di un triplo quartetto ( $J = 7,0$  e  $7,0\text{ Hz}$ ) ed un doppio tripletto ( $J = 7,0$  e  $7,0\text{ Hz}$ ), rispettivamente a  $\delta$  2,48 e 1,72, assegnati ai protoni H-7 e H-8.

Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 28) registrato in modalità positiva ha mostrato la presenza di un picco ionico pseudo molecolare a  $m/z$  197  $[M+H]^+$ .

Questo derivato, differisce dal tetraidroderivato (**2 bis** Fig. 32 ) riportato in letteratura (Nair & Carey, 1975), in quanto mostra soltanto una riduzione del doppio legame C7-C8.

D'altra parte, il catalizzatore utilizzato è simile, ma il solvente è differente e ciò probabilmente giustifica la differente riduzione del nectriapirone.

### 5.1.3 Identificazione della macrosporina (**3**)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità negativa indicava per la macrosporina (Fig. 33) un peso di 284 u.m.a. (Fig. 34)

Lo spettro IR (Fig. 35) mostrava la presenza di diverse bande : in particolare, una banda marcata a 3289, dovuta alla vibrazione di gruppo idrossilico legato attraverso legame a idrogeno ad un gruppo carbonilico, e di due bande a 1665 e 1637 dovute rispettivamente alla vibrazione di stiramento di un gruppo carbonilico libero e quello sopracitato, fattori strutturali tipici di un sistema antrachinonico (Suemitsu *et al.*, 1957).

Tali fattori strutturali sono stati confermati dallo spettro UV (Fig. 36) che mostrava un picco massimo di assorbimento a 224 nm dovuto alla presenza di una struttura diidrossiantrachinonica, ed un picco di assorbimento a 284 nm anch'esso caratteristico del residuo chinonico di un antrachinone (Briggs *et al.*, 1952).

I fattori strutturali dedotti dall'analisi degli spettri IR ed UV, che hanno consentito di ipotizzare per il composto **3** una natura antrachinonica, sono stati

confermati da un'analisi accurata degli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR registrati in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v.

Lo spettro  $^1\text{H}$ -NMR (Fig. 37, Tabella 2) mostrava, infatti, la presenza di due singoletti a  $\delta$  7,28 (H-1) e 7,54 (H-4) attribuibili ai protoni di un anello benzenico 1,2,4,5 tetrasostituito e di due doppietti a  $\delta$  7,31 (H-8) e 6,65 (H-6) attribuibili ai due protoni di un anello benzenico 1,2,3,5 tetrasostituito. La costante di 3,4 Hz, infatti, è tipica di un accoppiamento di tipo meta.

Tale accoppiamento era osservabile anche nello spettro COSY (Fig. 38).

Lo spettro protonico mostrava, inoltre, la presenza di due ulteriori singoletti a  $\delta$  3,93 e a  $\delta$  2,34 relativi ad un gruppo metossilico (OMe) e ad un gruppo metilico (Me-1), legati all'anello antrachinonico.

L'analisi dello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 39, Tabella 2) mostrava la presenza di due atomi di carbonio quaternari a  $\delta$  187,7 (C-10) e 182,6 (C-9), risuonanti a chemical shift tipici di due carboni carbonilici di un sistema antrachinonico.

Nello spettro  $^{13}\text{C}$  NMR si evidenziava, inoltre, la presenza di 3 ulteriori atomi di carbonio quaternari a  $\delta$  166,8 (C-5), 165,4 (C-7) e 162,4 (C-3) attribuibili ai carboni dell'anello antrachinonico legati al gruppo metossilico e verosimilmente ai due gruppi ossidrilici. I segnali a  $\delta$  134,2 (C-8a), 136,0 (C-10a), 132,9 (C-9a) e 126,0 (C-4a) sono stati attribuiti ai carboni quaternari in  $\alpha$  ai due carboni carbonilici C-9 e C-10.

Infine, lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR mostrava la presenza di quattro segnali a  $\delta$  131,1 (C-1), 119,4 (C-4), 106,3 (C-6) e 108,0 (C-8) attribuibili ai carboni metinici dell'anello antrachinonico e di due segnali a  $\delta$  56,3 (OMe) e 16,6 (Me) relativi al gruppo metossilico e metilico rispettivamente.

Gli esperimenti 2D  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR hanno consentito di osservare gli accoppiamenti tra tutti i protoni con i corrispondenti carboni.

Le correlazioni osservate nello spettro HSQC (Fig. 40) hanno permesso di confermare le assegnazioni fatte in precedenza. In particolare, significativa appariva la correlazione tra C-1 a  $\delta$  131,1 con il rispettivo protone H-1 a  $\delta$  7,98, del C-4 a  $\delta$  119 con il protone H-4 a  $\delta$  7,54, del C-6 a  $\delta$  106,3 con il protone H-6 a  $\delta$  6,65 ed infine del C-8 a  $\delta$  108,0 con il protone H-8 a  $\delta$  7,31.

Gli atomi di carbonio del gruppo metossilico e metilico presenti a  $\delta$  56,3 e 16,6 risultavano accoppiati con i protoni a  $\delta$  3,93 e 2,34.

La struttura è stata confermata dalle correlazioni osservate nello spettro HMBC (Fig. 41, Tabella 2) in cui si notava la correlazione tra il C-1 a  $\delta$  131,1 e il protone a  $\delta$  7,54 (H-4), tra il C-3 a  $\delta$  162,4 ed il protone a  $\delta$  7,98 (H-1), mentre i carboni C-4a a  $\delta$  126,0 e il C-9a a  $\delta$  132,9, punti di giunzione tra gli anelli B e C, risultavano correlati al protone H-4 a  $\delta$  7,54. Il gruppo metilico è stato collocato sul C-2 per la correlazione osservata tra il suo atomo di carbonio a  $\delta$  16,6 e il protone H-1 a  $\delta$  7,98.

Lo spettro evidenziava, inoltre, le correlazioni esistenti tra gli atomi di carbonio a  $\delta$  108,0 (C-8) e a  $\delta$  165,4 (C-7) con il protone a  $\delta$  6,65 (H-6) e degli atomi di carbonio carbonilici C-9 ( $\delta$  182,6) e C-10 ( $\delta$  187,7) con i protoni H-1 ( $\delta$  7,98), H-8 ( $\delta$  7,31) e H-4 ( $\delta$  7,54), rispettivamente.

I fattori strutturali dedotti in precedenza sono stati confermati dall'analisi dello spettro NOESY (Fig. 42), che mostrava un' accoppiamento tra i protoni del gruppo metilico sul C-2 e il protone H-1 del carbonio adiacente e tra i protoni del gruppo metossilico sul C-7 e i protoni H-6 ed H-8.

Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 34), condotto in modalità negativa, mostrava la presenza di un picco a 283  $m/z$  dovuto alla perdita di un protone.

L'insieme di questi dati ha permesso di identificare il metabolita **3** come la macrosporina, un 3,5-diidrossi-7metossi-2metil-antrachinone.

L'ulteriore conferma della struttura della macrosporina è stata ottenuta mediante la preparazione di tre derivati chiave, ottenuti dalla trasformazione dei due gruppi fenolici nei corrispondenti metil-eteri e acetil-esteri derivati.

La reazione di metilazione della macrosporina, condotta con una soluzione eterea di  $\text{CH}_2\text{N}_2$  a temperatura ambiente per una notte, ha fornito la 3-*O*-metilmacrosporina (**4**) e la 3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (**5**).

#### 5.1.4 Identificazione della 3-*O*-metilmacrosporina (**4**)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva indicava per la 3-*O*-metilmacrosporina (Fig. 43) un peso di 298 u.m.a (Fig. 44). Lo spettro IR (Fig. 45) e lo spettro UV (Fig. 46) risultavano molto simili a quelli della macrosporina **3**.

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 47) di **4**, mostrava come uniche differenze rispetto a quello della macrosporina la presenza di un ulteriore singoletto a  $\delta$  4.02 relativo ad un gruppo metossilico sul C-3, e la presenza di un singoletto a  $\delta$  12.9 relativo al protone del gruppo ossidrilico sul C-5 legato mediante legame idrogeno con il gruppo carbonilico  $\text{C}=\text{O}$  adiacente (C-10, rendendo tale gruppo meno reattivo nella reazione di metilazione con diazometano. Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 44) registrato in modalità positiva mostrava la presenza del picco ionico pseudo molecolare  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  299.

### 5.1.5 Identificazione dell'3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (**5**)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva indicava per 3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (Fig. 43) un peso di 312 u.m.a (Fig. 48). Lo spettro IR (Fig. 49) di **5** mostrava, rispetto a quello della macrosporina, l'assenza della banda relativa ai gruppi ossidrilici. Lo spettro UV (Fig. 50) risultava simile a quello del composto **3**. Lo spettro <sup>1</sup>H NMR (Fig. 51) del composto **5** risultava simile a quello di **3**, eccetto che per la presenza di due ulteriori singoletti a  $\delta$  4.0 e 3.99, dovuti ai due gruppi metossilici sul C-3 e sul C-5. Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 48) registrato in modalità positiva mostrava la presenza di un picco ionico pseudo molecolare  $[M+H]^+$  a  $m/z$  313.

### 5.1.6 Identificazione dell'3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (**6**)

Usuale reazione di acetilazione della macrosporina, condotta con anidride acetica e piridina per una notte a temperatura ambiente come spiegato in dettaglio nella parte sperimentale (Par.4.2.3) ha fornito la corrispondente 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (**6**) (Fig. 52).

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva ha indicato per la 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina un peso di 384 u.m.a (Fig. 53). Lo spettro IR (Fig. 54) di **6** mostrava, rispetto a quello della macrosporina, l'assenza della banda relativa ai gruppi ossidrilici e la presenza di una banda a 1772  $\text{cm}^{-1}$  dovuta alla presenza di due ulteriori gruppi carbonilici relativi agli acetili.

Lo spettro UV (Fig. 55) mostrava un picco massimo di assorbimento a 270 nm.

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 56) del composto **6** risultava simile a quello della macrosporina, eccetto che per la presenza di due ulteriori singoletti a  $\delta$  2.48 e 2.37, dovuti ai due gruppi acetili, e per i tipici “downfield shift” osservati per i protoni H-4 e H-6 a  $\delta$  8.13 e 6.89, rispettivamente. Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 53) registrata in modalità positiva mostrava la presenza di picchi a  $m/z$  407 e  $m/z$  391, relativi rispettivamente agli addotti con lo ione sodio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e potassio  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

#### 5.1.7 Identificazione dell'altersolanolo A (7)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità positiva indicava per l'altersolanolo A (Fig. 57) un peso di 336 u.m.a (Fig. 58). Lo spettro IR (Fig. 59) mostrava la presenza di una banda molto marcata a  $3370\text{ cm}^{-1}$ , dovuta alla presenza di gruppi ossidrilici e due bande a  $1642$  e  $1615\text{ cm}^{-1}$ , dovute rispettivamente alla vibrazione di stiramento di un gruppo C=O carbonilico libero e di un gruppo C=O carbonilico impegnato in un legame a idrogeno (Stoessl 1967).

Tali fattori strutturali sono stati confermati dall'analisi dello spettro UV (Fig. 60) che mostrava picchi di assorbimento a 219 e a 269 nm dovuti alla presenza di un sistema idrossiantrachinonico polisostituito.

Le evidenze strutturali dedotte dall'interpretazione degli spettri IR ed UV hanno permesso di ipotizzare anche per il composto **7** una natura antrachinonica, confermata da un'analisi accurata degli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR mono e bidimensionali.

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR di **7** (Fig. 61, Tabella 3) mostrava la presenza di un singoletto a  $\delta$  1.25, dovuto al gruppo metilico (Me-C2), di un singoletto dovuto ad un protone (H-1) di un carbonio metinico ossigenato a  $\delta$  4.55, di due doppietti ( $J = 7.4$  Hz) a  $\delta$  4.77 e a  $\delta$  3.88 dovuti a protoni di due carboni ossigenati secondari adiacenti accoppiati tra di loro. Questi sistemi erano consistenti con la presenza di un anello 1,2,3,4, tetra idrogenato e polioidrossilato

I fattori strutturali evidenziati dallo spettro protonico sono stati confermati dallo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 62, Tabella 3), nel quale si osservava, infatti, rispetto allo spettro di **3**, la presenza di 4 carboni ossigenati, tre metinici a:  $\delta$  70.3 (C-1), 70.7 (C-4) e 75.3 (C-3) ed un quaternario a  $\delta$  74.6 (C-2) e la presenza del segnale attribuibile al carbonio del gruppo metilico (Me-C2), presente a  $\delta$  22.3.

Tali dati permettevano di identificare il metabolita **7** come l'altersolanolo A, un 1,2,3,4,5-pentaidrossi-7-metossi-2-metil-1,2,3,4-tetraidroantrachinone.

Gli spettri 1D e 2D  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR hanno consentito di osservare gli accoppiamenti tra tutti i protoni e i corrispondenti carboni.

Lo spettro COSY (Fig. 63) ha evidenziato le correlazioni tra i protoni ed in particolare la correlazione tra il protone H-3 a  $\delta$  3.88 ed il protone H-4 a  $\delta$  4.77 dell'anello cicloesenilico.

Lo spettro HSQC (Fig. 64) ha permesso di confermare le assegnazioni fatte in precedenza. In particolare, si osservano la correlazione tra il carbonio C-3 a  $\delta$  75.3 ed il protone H-3 a  $\delta$  3.88 e tra il C-4 a  $\delta$  70.7 ed il protone H-4 a  $\delta$  4.77, confermando la presenza di un anello 1,2,3,4-tetraidrossicicloesenilico.

Tale struttura è stata confermata dalle correlazioni dello spettro HMBC (Fig. 65, Tabella 3) che mostrava le correlazioni tra il C-1 a  $\delta$  70.3 ed il gruppo metilico in posizione 2 a  $\delta$  1.25, tra il C-2 a  $\delta$  74.6 ed il protone H-1 a  $\delta$  4.55, tra il C-4a a  $\delta$  70.7 ed il protone H-3 a  $\delta$  3.88 e tra il C-9a  $\delta$  143.4 ed il protone H-4 a  $\delta$  4.77. Il carbonio C-9a risultava inoltre correlato con il protone H-1 presente a  $\delta$  4.55 e con i protoni del gruppo metilico risuonanti a  $\delta$  3.95.

L'analisi degli spettri bidimensionali ha quindi consentito di assegnare i chemical shifts a tutti i protoni e ai corrispondenti carboni come riportato in Tabella 3.

La configurazione relativa degli atomi di carbonio C-1, C-2, C-3 e C-4 dell'altersolanolo A è stata assegnata sulla base delle costanti di accoppiamento, in particolare la costante di accoppiamento misurata tra i protoni H-3 e H-4  $J_{3,4}=7.4$  (Stoessl 1969) e degli effetti osservati nello spettro NOESY (Fig. 66).

Si osservava, infatti, una correlazione tra i protoni del gruppo metilico sul C-2 e i protoni H-1 e H-3. Tali osservazioni hanno consentito di assegnare al protone H-1 un orientamento *pseudo equatoriale*, all'OH-C2 un orientamento *pseudo-assiale* e *pseudo-equatoriale* all' OH-C3*cis* ed un orientamento *trans-pseudo-assiale-pseudoassiale* ai protoni H-3 e H-4.

E' stato, pertanto, possibile assegnare all'altersolanolo A la struttura di un (1*R*, 2*S*, 3*R*, 4*S*)-1,2,3,4,5-pentaidrossi-7-metossi-2-metil-1,2,3,4-tetraidroantrachinone.

Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 58) registrato in modalità positiva mostrava la presenza di un picco ionico pseudo molecolare a  $m/z$  337  $[M+H]^+$ , di un picco a  $m/z$  359 relativo all'addotto del metabolita con lo ione sodio

$[M+Na]^+$  e di un picco di frammentazione a  $m/z$  301 dovuto alla perdita di un gruppo metilico  $[M-CH_3]^+$ .

#### 5.1.8 Identificazione dell'altersolanolo J (**8**)

Lo spettro di massa ESI MS registrato in modalità negativa indicava per l'altersolanolo J (Fig. 67) un peso di 306 u.m.a (Fig. 68). Lo spettro IR (Fig. 69) mostrava la presenza di una banda a  $3387\text{ cm}^{-1}$ , dovuta alla presenza di più gruppi ossidrilici, di una banda a  $1671\text{ cm}^{-1}$ , dovuta alla vibrazione di stiramento di un gruppo C=O chinonico libero, appartenente ad un sistema antracenonico.

Lo spettro UV (Fig. 70) mostrava picchi di assorbimento a 216 e 265 nm relativi ad un sistema idrossiantracenonico (Scott 1964).

I fattori strutturali evidenziati dall'analisi degli spettri IR ed UV, erano confermati da un'analisi accurata degli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR, che evidenziavano analogie strutturali con i composti **3** e **7**.

Infatti, lo spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 71, Tabella 4) di **8** mostrava la presenza di un singoletto a  $\delta$  1.26 attribuibile ai protoni di un gruppo metilico (Me-C2), di due doppi doppietti presenti a  $\delta$  1.36 ( $J=14.5, 12.4\text{ Hz}$ ) e 2.31 ( $J=14.5, 3.6\text{ Hz}$ ) attribuibili ai protoni di un gruppo metilenico ( $\text{H}_2\text{C}-1$ ), che risultavano accoppiati tra di loro, come evidenziato nello spettro COSY (Fig. 72). Nello stesso spettro entrambi risultavano accoppiati con un doppietto di doppi doppietti a  $\delta$  2,50 ( $J=12.8, 12,4, 3,8\text{ Hz}$ ) attribuibile al protone H-9a di un carbonio metinico rappresentante una delle giunzioni tra gli anelli B e C. Infatti, quest'ultimo, come osservato nello spettro COSY, risultava accoppiato

con il protone dell'altro carbonio metinico (HC-4a), l'altra giunzione tra gli stessi anelli B e C, presente come multipletto a  $\delta$  1,84. Quest'ultimo risultava a sua volta accoppiato con i protoni di un' altro gruppo metilenico (H<sub>2</sub>C-4) che appariva a  $\delta$  2,21 e 1,57, un doppietto di doppi doppietti ( $J=$  11.8, 3.8, 4.1 Hz) ed quartetto ( $J=$  11.8 Hz), e con il protone di un' altro gruppo metinico (HC-10) dell'anello B, presente come doppietto ( $J=$  9.7 Hz)  $\delta$  4,83. I protoni del gruppo metilenico H<sub>2</sub>-C4 risultavano, inoltre, accoppiati con il protone di un carbonio secondario ossidrilato (H-3), presente come doppio doppietto ( $J=$  4.4, 11.8 Hz)  $\delta$  3,31.

Tali protoni risultavano compatibili con la presenza di un anello cicloesanilico 2,2,3,5,6-pentasostituito.

L'analisi dello spettro <sup>13</sup>C NMR (Fig. 73, Tabella 4) evidenziava segnali compatibili con la struttura parziale ipotizzata. In particolare mostrava la presenza di un segnale a  $\delta$  26.4 relativo al carbonio del gruppo metilico (Me-C2), di un segnale a  $\delta$  32.5 attribuibile al C-4, notevolmente shiftato rispetto al C-4 di 7, verosimilmente perché non più ossigenato. Erano inoltre presenti un segnale a  $\delta$  43.7 relativo al C-9a ed un segnale a  $\delta$  45.2 attribuibile al C-4a. Questi ultimi due atomi di C risultano notevolmente shiftati rispetto a quelli di 7, per l' assenza nell'altersolanolo J del doppio legame C-4a-C-9a. Lo spettro <sup>13</sup>C NMR mostrava, inoltre, la presenza di due carboni metinici ossigenati risuonanti come a  $\delta$  70.5 e a  $\delta$  73.5, attribuibili rispettivamente al C-2 e al C-3, confermando l'ipotesi della presenza di un anello cicloesanilico 2,2,3,5,6-pentasostituito diidrossilato.

Nello spettro si evidenziava, infine, la presenza del segnale relativo ad un carbonio ossigenato presente come doppietto a  $\delta$  72.4 attribuibile al C-10,

anch'esso notevolmente shiftato rispetto al C-10 del composto 7. Tale spostamento è verosimilmente compatibile con l'idrogenazione del gruppo carbonilico presente in 7.

Gli esperimenti 2D  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR hanno consentito di osservare gli accoppiamenti tra tutti i protoni e corrispondenti carboni.

Le correlazioni osservate nello spettro HSQC (Fig. 74) hanno permesso di confermare le assegnazioni fatte in precedenza. In particolare significative risultavano le correlazioni esistenti tra gli tra l'atomo di carbonio a  $\delta$  26.4 e i protoni del gruppo metilico (Me-C2) presenti come singoletto a  $\delta$  1.26, tra il C-1 a  $\delta$  37.0 e i protoni metilenici H<sub>2</sub>-C1 a  $\delta$  1.36 e 2.31, tra il C-9a a  $\delta$  43.7 ed il protone H-9a a  $\delta$  2.50, tra il C-4a a  $\delta$  45.4 ed il protone H-4a a  $\delta$  1.89, tra il carbonio a  $\delta$  55.3 ed i protoni del gruppo metossilico (Ome-C7) a  $\delta$  3.74 ed infine tra il C-3 a  $\delta$  73.5 ed il protone H-3 a  $\delta$  3.31.

La struttura è stata confermata dalle correlazioni osservate nello spettro HMBC (Fig. 75, Tabella 4). Particolarmente significative erano le correlazioni del C-1 a  $\delta$  37.0 con i protoni del gruppo metilico (Me-C2) a  $\delta$  1.26 e con il protone H-9a a  $\delta$  2.5, del C-2 a  $\delta$  70.5 con i protoni del gruppo metilico Me-C2 a  $\delta$  1.26, il protone H-1 a  $\delta$  1.36 ed il protone H-4 a  $\delta$  4.38, del C-3 a  $\delta$  73.5 con i protoni del gruppo metilico a  $\delta$  1.26, con il protone H-1 a  $\delta$  1.36 e con il protone H-4 a  $\delta$  2.31, confermando la posizione del gruppo metilico al C-2 e la reciproca disposizione del C-1 e del C-3 con il C-2.

Lo spettro evidenziava inoltre le correlazioni del C-4a presente come a  $\delta$  43.7 con i protoni H-1 a  $\delta$  1.36 e H-4 a  $\delta$  2.21, del C-4a a  $\delta$  45.4 con i protoni H-1 a  $\delta$  2.31, H-4 a  $\delta$  1.57, H-9a a  $\delta$  2.5 ed H-10 a  $\delta$  4.83, del C-10a a  $\delta$  72.4 con i protoni H-4 a  $\delta$  1.57, H-4a a  $\delta$  1.89 e H-9a a  $\delta$  2.50.

Nello spettro NOESY (Fig. 76) molto significative erano le correlazioni tra i segnali di entrambi i protoni H-6 e H-8 con i protoni del gruppo metossilico. Lo spettro mostrava inoltre la correlazione tra il protone H-10 con i protoni H-4a, H-9a e i protoni del gruppo metilenico H<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, così come il protone H-3 risultava accoppiato con i protoni del gruppo metilico legato al C-2. Infine, era possibile osservare la correlazione tra i protoni dei due gruppi metilenici H<sub>2</sub>-C<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> e quella tra i protoni H-9a con il protone H-1.

Tali evidenze portano ad identificare il composto **8** come l'altersolanolo J, un 2,3,5,10-tetraidrossi-1,3,4,4a,9a,10-esaidroantracen-9-one.

La stereochimica relativa dell'altersolanolo J è stata determinata sulla base degli accoppiamenti e delle correlazioni osservate negli spettri COSY e NOESY.

In particolare il grande valore della  $J_{4a-9a}$  (12.8 Hz) e della  $J_{4a-10}$  (9.7 Hz) hanno indicato per l'H-4a una posizione *trans*-diassiale rispetto ai protoni H-9a e H-10.

Il valore della  $J_{3-4ax}$  (11.8 Hz) ha suggerito per il protone H-3 un orientamento assiale (Holler *et al.*, 2002). Infine il downfield chemical shift del carbonio del gruppo metilico a  $\delta$  26.9 suggerisce per il gruppo metilico un'orientamento di tipo equatoriale (Dalling & Grant 1967).

Questi risultati consentivano di identificare il metabolita come il (2*R*, 3*R*, 4a*S*, 9a*S*, 10*R*)-2,3,5,10-tetraidrossi-7metossi-2metil-1,2,3,4,4a,9a,10-esaidrossi-2H-antracen-9-one.

Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 74) registrato in modalità negativa mostrava la presenza di un picco a 307*m/z* dovuto alla perdita di un protone.

## **5.2 Attività biologica dei metaboliti prodotti da *P. foeniculi***

I saggi biologici effettuati sui filtrati colturali e sui metaboliti puri isolati da *P. foeniculi* sono stati condotti presso il laboratorio della Prof.ssa Rosita Rodeva del l'Institute of Plant Pathology and Genetic Bulgarian Academy of Sciences di Sofia, Bulgaria secondo le modalità riportate nella parte sperimentale (Par. 4.3). I composti puri sono stati saggiati in un intervallo di concentrazione 6-10,3 x 10<sup>-3</sup> M, come mostrato in Tabella 5.

Il nectriapirone (**1**), saggiato alla concentrazione di 10,3 x 10<sup>-3</sup> M, è risultato moderatamente fitotossico, inducendo sulle foglie di pomodoro piccole necrosi del diametro compreso tra 1 e 2 mm intorno al punto di inoculo (Fig. 77, Tabella 5).

Il nectriapirone è un pentachetide monoterpeneoide isolato per la prima volta da *Gyrostoma Missourense* (Nair & Carey 1975), e successivamente da *Phomopsis oblonga* (Claydon *et al.*, 1985), da colture di *Scytalidium sp.* (Thines & Anke 1998), da specie di *Phomopsis* (Lee *et al.*, 1999), da 12 diverse specie di *Phomopsis* endofiti di *Erythrina crista galli* (Weber *et al.*, 2005), da funghi endofitici isolati da *Vigueiera arenaria* e da *Tithonia diversifolia* (Guimares *et al.*, 2008). Il nectriapirone ha mostrato una elevata attività citotossica contro cellule umane T- leucemiche e contro linee cellulari tumorali di melanoma (Guimares *et al.*, 2008), una attività inibitoria dose-dipendente sulla MAO (Lee *et al.*, 1999) ed ha indotto la formazione di DOPA melanina in cellula di melanoma B16-F1 in assenza dell'ormone melanina-stimolante (Thines & Anke, 1998).

La macrosporina (**3**), saggiata alla concentrazione di  $7 \times 10^{-3}$  M, non è risultata fitotossica, non inducendo formazione di necrosi o altri sintomi sulle foglie inoculate.

La macrosporina era stata isolata per la prima volta da *Macrosporium porri* (Suemitsu *et al.*, 1957) e successivamente isolato da *Dactylaria lutea* (Becker *et al.*, 1978), *Alternaria solani* (Stoessl & Unwin 1983), *Stemphylium eturminum* (Andersen *et al.*, 2004), *Alternaria tomatophilia* (Andersen *et al.*, 2008), *Ampelomyces sp.* (Aly *et al.*, 2008) e da *Stemphylium globuliferum* (Debbab *et al.*, 2009). La macrosporina ha mostrato una moderata citotossicità contro cellule di linfoma di ratto L5178Y (Aly *et al.*, 2008) ed una attività inibitoria sulla crescita di *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Holler, *et al.*, 2002).

L'altersolanolo A e J, saggiati alla concentrazione di 6 e  $6,4 \times 10^{-3}$  M sono risultati particolarmente fitotossici. L'altersolanolo A ha infatti indotto formazione di necrosi del diametro compreso tra 8 e 10 mm, inducendo, inoltre, una rapida necrotizzazione delle nervature e successivamente la completa deformazione della foglia (Fig. 78, Tabella 5). L'altersolanolo J ha indotto la formazioni di necrosi del diametro leggermente inferiore (6-7 mm), causando, inoltre, la perdita del turgore delle foglie (Fig. 79, Tabella 5).

L'altersolanolo A è stato precedentemente isolato da *Alternaria solani* (Stoessl 1967, 1969), *D. lutea* (Becker *et al.*, 1978), *Phomopsis juniperovora* (Wheeler *et al.*, 1975) ed *Alternaria porri* (Suemitsu & Nakamura. 1981), e con l'altersolanolo J da *Ampelomyces sp.* (Aly *et al.*, 2008), *S. globuliferum* (Debbab *et al.* 2009) e da un *Cladosporium sp.* Non determinato (Holler *et al.*, 2002).

L'altersolanolo A ha mostrato fitotossica su piantine di lattuga e porro, un

attività antibiotica contro *Escherichia coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* (Suemitsu *et al.*, 1984), ed un attività inibente della crescita di colture cellulari di *Nicotiana rustica* (Haraguchi *et al.*, 1996). L'altersolanolo J aveva mostrato soltanto una debole attività citotossica contro cellule di linfoma di ratto L5178 (Wheeler *et al.*, 1975; Aly *et al.*, 2008).

I sintomi indotti dai singoli metaboliti puri sono risultati inferiori, rispetto a quelli indotti dal filtrato colturale utilizzato come controllo positivo. Tale filtrato ha infatti indotto la formazione di estese necrosi del diametro maggiore di 11 mm su tutta la lamina fogliare, causando anche il rapido appassimento della foglia.

Tale risultato potrebbe essere dovuto ad un effetto sinergico tra i diversi metaboliti presenti nel filtrato colturale.

I funghi fitopatogeni, sono noti produttori sia di antrachinoni, come la macrosporina, che di congeneri idrogenati come l'altersolanolo A (Debbab *et al.*, 2009).

Non stupisce l'isolamento della macrosporina e dell'altersolanolo A e J come metaboliti prodotti da uno stesso fungo, in quanto tali metaboliti fanno parte delle stesse vie biosintetiche, prodotti per condensazione di unità di acetato o mevalonato (Debbab *et al.*, 2009).

E' interessante notare come funghi appartenenti a generi differenti possano mostrare un profilo metabolico simile (Becker *et al.*, 1978; Stoessl *et al.*, 1979, Suemitsu e Nakamura 1981; Ali *et al.*, 2008; Debbab *et al.*, 2009), mentre differenti isolati dello stesso fungo o lo stesso fungo, isolato in diverse aree geografiche, possano produrre metaboliti secondari completamente diversi (Evidente *et al.*, 2006a; Cabras *et al.*, 2006), come evidenziato dal confronto

tra l'isolato bulgaro e l'isolato italiano di *P. foeniculi* (Evidente *et al.*, 1994; Corsaro *et al.*, 1998).

### **5.3 Identificazione dei metaboliti fitotossici, correlati al nectriapirone, prodotti da *P. guepinii***

Dalle prime indagini spettroscopiche risultava che la principale tossina prodotta da *P. guepinii* era strutturalmente correlata al nectriapirone. Pertanto in tale tesi viene riportato l'isolamento e la caratterizzazione chimica e biologica della principale fitotossina prodotta da *P. guepinii* ed uno studio di correlazione struttura attività utilizzando anche il nectriapirone ed il suo diidroderivato.

E' ben nota l'importanza economica del nocciolo sia per l'industria alimentare, che per quella cosmetica. La Turchia è uno dei maggiori produttori di nocciole con una produzione annua di circa 800 mila tonnellate. Molti agenti patogeni sono responsabili di gravi fitopatie del nocciolo, riducendone la produttività.

In particolare *P. guepinii* è stato identificato negli ultimi anni quale agente causale della ruggine dei ramoscelli di nocciolo in Turchia (Yürüt *et al.* 1994). Diverse specie del genere *Pestalotiopsis* sono state identificate quali produttori di metaboliti bioattivi nell'interazione pianta-patogeno.

Il fungo è stato isolato da piante infette di nocciolo a Trabzon in Turchia dal dott. Muharrem Turkkan del dipartimento di Plant Protection dell'Università di Ordu, Turchia, presso il quale il fungo è stato accresciuto *in vitro*.

I migliori risultati per la produzione di un filtrato colturale fitotossico sono stati ottenuti accrescendo il fungo in coltura liquida, nelle condizioni descritte nella parte sperimentale (Par. 4.4). L'estratto organico (48 mg) è stato ottenuto da 3 L di filtrato colturale di *P. guepinii*, mediante estrazione esaustiva con acetato di etile, come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.5).

Le preliminari prove di estrazione, condotte utilizzando solventi organici a polarità crescente (*n*-esano, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, *n*-butanolo) a 3 diversi pH, hanno evidenziato che tale solvente era il più idoneo per l'estrazione esaustiva delle fitotossine dal filtrato colturale.

I saggi di fitotossicità di puntura fogliare, condotti come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.6), hanno evidenziato sia per l'estratto organico, che per la sua restante fase acquosa una elevata fitotossicità.

Si ipotizzava, quindi, la presenza di metaboliti fitotossici sia liposolubili che idrosolubili.

L'estratto organico è stato quindi analizzato mediante TLC su lastre di gel di silice. Il profilo cromatografico mostrava la presenza di diversi metaboliti liposolubili, il principale dei quali è stato purificato mediante due stadi di cromatografia su TLC come riportato nella parte sperimentale (Par. 4.5). I dati ottenuti dalle indagini spettroscopiche essenzialmente <sup>1</sup>H NMR ed ESI MS, comparati a quelli precedentemente descritti (Venkatasubbaiah & Van Dyke, 1991), hanno permesso l'identificazione del principale metabolita come il pestalopirone **9**.

### 5.3.1 Identificazione del pestalopirone (9)

Lo spettro di massa ESI MS del pestalopirone (Fig. 80) registrato in modalità positiva ha indicato un peso di 180 u.m.a (Fig. 81).

L'analisi dello spettro  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 82) mostrava numerose analogie strutturali con lo spettro del nectriapirone. Lo spettro mostrava infatti come uniche differenze rispetto a quello del nectriapirone la presenza di due doppietti ( $J=1.0$  Hz) a  $\delta$  5.90 e 5.45, attribuibili ai protoni H-5 e H-3 di un 2-pirone 4,6-disostituito.

Si evidenziava, inoltre, l'assenza del singoletto relativo al gruppo metilico ME-11 legato al C-3, presente nello spettro di **1** a  $\delta$  1.88 .

Lo spettro di massa ESI MS (Fig. 79) registrato in modalità positiva mostrava la presenza di un picco ionico pseudomolecolare  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$ : 181, ed un picco a  $m/z$  203 relativo all'addotto del metabolita con lo ione sodio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Tali fattori strutturali hanno permesso di assegnare al pestalopirone la struttura di un 4-metossi-6-(1'-metil-propenil)-piran-2-one.

### 5.4 Attività biologica dei metaboliti prodotti da *P. guepinii*

L'elevata somiglianza strutturale del pestalopirone con il nectriapirone isolato da *P. foeniculi*, dal quale differisce solo per la mancanza di un gruppo metilico al C-3, ha suggerito di comparare la loro attività biologica, per stabilire una eventuale correlazione tra la struttura e l'attività biologica.

Il pestalopirone, il nectriapirone ed il suo 7,8- diidroderivato sono stati dunque saggiati per valutare la loro attività fitotossica, antimicrobica e zootossica nelle condizioni riportate in dettaglio nella parte sperimentale (Par. 4.6). Il pestalopirone, saggiato utilizzando il saggio di puntura fogliare, ha mostrato una debole attività fitotossica su *C. arvense* e di *S. arvensis*, ed una buona attività fitotossica su *C. album* (Tabella 6).

Sia il nectriapirone che il suo diidroderivato hanno mostrato una buona fitotossicità su foglie di *C. arvense* e *S. arvensis*, ed una elevata fitotossicità su foglie di *C. album* (Tabella 6). Tali risultati hanno consentito di ipotizzare che il doppio legame del gruppo 1-metil-propenilico al C- 6 dell'anello 2-pironico non abbia un ruolo essenziale nell'impartire la fitotossicità, mentre il gruppo metilico al C-3 costituisce una importante caratteristica strutturale.

I tre composti sono stati saggiati anche per valutare la loro attività antifungina, antibiotica e zootossica secondo le modalità riportate nella parte sperimentale (Par. 4.6).

I composti non hanno mostrato attività antibatterica quando saggiati ad una concentrazione di 50 µg/disco, né attività zootossica, quando saggiati su larve di *A. salina*. Solo il pestalopirone ha mostrato una debole attività fungistatica su *G. candidum*, quando saggiato alla concentrazione di 50 µg/disco.

## 6. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono stati isolati e caratterizzati i principali metaboliti secondari prodotti da *P. foeniculi*, patogeno del finocchio da seme e le tossine ad essi correlate, prodotte da *P. guepinii*, patogeno del nocciolo.

- 1) Da colture liquide di *P. foeniculi* sono stati purificati ed isolati 4 metaboliti .
- 2) I metaboliti isolati sono stati identificati mediante l'utilizzo di tecniche spettroscopiche (essenzialmente NMR ed ESI MS) e metodi chimici, come il nectriapirone, la macrosporina, l'altersolanolo A e l'altersolanolo J.
- 3) I quattro metaboliti erano stati precedentemente isolati da altre specie fungine, ma per la prima volta in questo lavoro sono stati riportati come metaboliti secondari isolati da *P. foeniculi*.
- 4) Il nectriapirone, la macrosporina e l'altersolanolo A e J sono stati utilizzati per condurre saggi di attività fitotossica su foglie di pomodoro; l'altersolanolo A e J sono risultati i metaboliti maggiormente attivi; il nectriapirone ha mostrato una debole attività fitotossica, mentre la macrosporina è risultata non fitotossica.
- 5) E' stato preparato un nuovo derivato del nectriapirone, il 7,8-diidronectriapirone, che differisce dal tetraidroderivato riportato in letteratura (Nair & Carey, 1975) per la mancanza della riduzione del legame C5-C6 dell'anello aromatico.

- 6) Per la prima volta è stata riportata l'attività fitotossica del nectriapirone e dell'altersolanolo J.
- 7) Da colture liquide di *P. guepinii* è stato isolato il principale metabolita fitotossico.
- 8) Il metabolita isolato è stato identificato mediante l'utilizzo di tecniche spettroscopiche (essenzialmente NMR ed ESI MS) come il pestalopirone.
- 9) Il pestalopirone era stato precedentemente riportato come minore metabolita fitotossico isolato da filtrati culturali di *P. oenothera*, agente causale di una grave malattia dell'enotera (Venkatasubbaiah & Van Dyke 1991), ma per la prima volta in questo lavoro è stato riportato come metabolita fitotossico prodotto da *P. guepinii*.
- 10) L'elevata somiglianza del pestalopirone con il nectriapirone isolato da *P. foeniculi*, dal quale differisce per la mancanza del gruppo metilico al C-3 sull'anello aromatico, ha suggerito la comparazione dell'attività biologica dei due composti per stabilire una correlazione struttura attività. Il pestalopirone, il nectriapirone ed il suo 7,8-diidroderivato sono stati saggiati per l'attività fitotossica su *C. arvensis*, *S. arvensis* e *C. album*: il nectriapirone ed il suo 7,8-diidroderivato hanno mostrato una buona attività fitotossica in tutti i saggi, il pestalopirone ha mostrato, invece, una debole attività fitotossica su *C. arvensis* e *S. arvensis* ed una buona attività fitotossica su *C. album*. Tali risultati suggeriscono che la presenza del gruppo metilico al C-3 dell'anello aromatico sia un importante fattore strutturale nell'impartire la fitotossicità.

- 11) I tre composti sono stati sottoposti a saggi di attività antifungina su *G. candidum*, di attività antibiotica su *B. subtilis* ed *E. coli* e di attività zootossica su larve di *A.salina*.
- 12) I tre composti non hanno mostrato attività antibiotica o zootossica. Il pestalopirone ha mostrato una debole attività fungistatica su *G. candidum*.
- 13) *P. guepinii* come mostrato da indagini preliminari condotte sul filtrato colturale, mostrava produrre anche metaboliti fitotossici idrosolubili probabilmente macromolecolari.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**Aly, A.H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Muller, W.E.G., Kozytska, S., Hentshel, U., Proksch, P. & Ebel, R.** (2008). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*, 69, 1716-1725.

**Andersen, B. & Frisvad, J.C.** (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in Moldy Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7507-7513

**Andersen, B., Dongo, A. & Prior, B.M.** (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*, 112, 241-250.

**Andolfi, A., Cimmino, A., Evidente, A., Iannaccone, M., Capparelli, R., Mugnai, L. & Surico, G.** (2009). A new flow cytometry technique to identify *Phaeoemoniella chlamydospora* exopolysaccharides and study mechanisms of esca grapevine foliar symptoms. *Plant Disease*, 93, 680-684.

**Bartlett, D.W., Clought, J.M., Godwin, J.R., Hall, A. A., Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B.** (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58, 649-662.

**Becker, A.M., Rodney, W., Schmalzl, K.J. & Ick, Ho C.** (1978). Metabolites of *Dactylaria lutea*. The structures of dactylariol and the antiprotozoal antibiotic dactylarin. *Journal of Antibiotics*, 31 (4), 324-329.

**Berger, S. & Braun, S.** (2004) *200 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course* 1<sup>st</sup> edition (VCH, Weinheim: Wiley).

- Bettini, S.** (1979). Lotta biologica in Enciclopedia del Novecento. Istituto della Enciclopedia Italiana, Roma, vol III, pp 1071-1080.
- Bottalico, A., Capasso, R., Evidente, A., Randazzo, G. & Vurro, M.** (1990) Cytochalasins: structure-activity relationship, *Phytochemistry*, 29, 93-96.
- Briggs, L. H., Nicholls, G. A. & Paterson, R. M. L.** (1952). Chemistry of the *Coprosma* genus. Part VI. Minor anthraquinone colouring matters from *Coprosma australis*. *Journal of Chemical Society*, 1718-1722
- Cabras, A., Mannoni, M.A., Serra, S., Andolfi, A., Fiore, M. & Evidente, A.** (2006). Occurrence, isolation, and biological activity of phytotoxic metabolites produced in vitro by *Sphaeropsis sapinea*, pathogenic fungus of *Pinus radiata*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 187-193.
- Câmara, E.S.** (1947). Mycetes aliquot Lusitaniae VII. *Agronomia Lusitana*, 9, 85-128.
- Claydon, N., Grove, J.F. & Pople, M.** (1985). Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry*, 24, 937-943.
- Corsaro, M.M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Molinaro, A., Mugnai L., Parrilli, M. & Surico, G.** (1998). Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis foeniculi*. *Carbohydrate Research*. 308, 349-357.
- Dalling, D.K. & Grant, D.M.** (1967). Carbon-13 magnetic resonance. XI. The methylcyclohexanes. *Journal of American Chemical Society*. 89, 6612-6622.
- Debbab, A., Aly, A.H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Muller, W.E.G., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schachtele, C., Kubbutat, M.H.G., Lin, W.H., Mosaddak, M., Hakiki, A., Proksch, P. & Ebel, R.** (2009). Bioactive

metabolites from endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *Journal of Natural Products*, 72, 626-631.

**Du Manoir, J. & Vegh, I.** (1981). *Phomopsis foeniculi* spec. nov. sur *Fenouil* (*Foeniculum vulgare* Mill.) *Journal of Phytopathology*, 100, 319-330.

**Durbin, R. D.** (1991). Bacterial phytotoxins: mode of action. *Experientia*, 47, 776- 780.

**Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M. & Charudattan, R.** (2006a). Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1774-1783.

**Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., Charudattan, R. & Motta, A.** (2006b). Ophiobolin E and 8-epi-ophiobolin J produced by *Drechslera gigantea*, a potential mycoherbicide of weedy grasses, *Phytochemistry*, 20, 2281-2287.

**Evidente, A., Capasso, R., Vurro, M. & Bottalico, A.** (1993b). Ascosalitoxin, a phytotoxic trisubstituted salicylic aldehyde from *Ascochyta pisi*. *Phytochemistry*, 34, 994- 998.

**Evidente, A., Lanzetta, R., Abouzeid, M.A., Corsaro, M.M., Mugnai, L. & Surico, G.** (1994). Foeniculoxin, a new phytotoxic geranylhydroquinone from *Phomopsis foeniculi*. *Tetrahedron*, 50, 10371-10378.

**Evidente, A., Lanzetta, R., Capasso, R., Vurro, M. & Bottalico, A.** (1993a). Pinolidoxin, a phytotoxic nonenolide from *Ascochyta pinodes*. *Phytochemistry*, 34, 999-1003.

**Evidente, A. & Motta, A.** (2001). Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestal and weedy plants. In: C. Tringali (Ed.) *Bioactive Compounds from Natural Sources*, Taylor & Francis, London, pp 473-525

**Evidente, A., Peduto, F., Andolfi, A., Marchi, G., Mugnai, L. & Surico, G.** (2010a). Fattori di virulenza dei funghi dell'esca. Fitotossine di *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*; produzione e attività biologica. In: G. Surico & L. Mugnai (Eds) *Il mal dell'esca della vite. Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia. Progetto Mes Vit*, Il Bandino, Firenze, pp 214-231

**Evidente, A., Punzo, B., Andolfi, A., Cimmino, A., Melck, D. & Luque, J.** (2010b). Lipophylic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia mediterranea*, 49, 74-79.

**Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A. & Bruno, G.** (2000). Two naphthalenones pentaketides from the liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 162-168.

**Evidente, A., Sparapano, L., Fierro, O., Bruno, G., Giordano, F. & Motta, A.** (1997). Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarane diterpenes from *Sphaeropsis sapinea* f.sp. *cupressi* and *Diplodia mutila*. *Phytochemistry*, 45, 705-713.

**Evidente, A., Sparapano, L., Fierro, O., Bruno, G. & Motta, A.** (1999). Sapinofuranones A and B, two new 2(3H)-dihydrofuranones produced by *Sphaeropsis sapinea*, a common pathogen of conifers. *Journal of Natural Products*, 62, 253-256.

- Evidente, A., Sparapano, Motta, A., Giordano, F., Fierro, O. & Frisullo, S.** (1996). A phytotoxic pimarane diterpene of *Sphaeropsis sapinea* f.sp. *cupressi*, the pathogen of a canker disease of cypress. *Phytochemistry*, *42*, 1541-1546.
- Fujita, S.I., Asami, Y. & Nozaki, K.** (1980). The constituents of the Essential Oils from *Foeniculum vulgare* Miller. *Journal of Agricultural Chemical Society of Japan*, *54*, 765-767.
- Ghignone, S. & Migheli, Q.** (2001). Nuovi strumenti di diagnosi per i funghi fitopatogeni. *Informatore Fitopatologico*, *51*, 7-22.
- Göre M.E., Parlak, S. & Aydın, M.H.** (2010). *Pestalotiopsis guepinii* newly reported to cause dieback on *Pistacia lentiscus* var. *chia* in Turkey. *Plant Pathology*, *21*, 8.
- Graniti, A.** (1991). Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Introduction. *Experientia*, *47*, 751-755.
- Graniti, A., Durbin, R.D. & Ballio, A.** (1989). *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*. NATO ASI Series Cell Biology. Springer Verlag. New York, London, Paris, Tokio.
- Guimares, D.O., Borges, W.S., Warley, S., Kawano, C., Ribeiro, P., Goldman, G.H., Nomizo, A., Thiemann, O.H., Oliva, G., Lopes, N.P. & Pupo, M.T.** (2008). Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *52*, 134-144.
- Gupta, J.S.** (1962). Pathological anatomy of the floral parts and fruits of coriander affected with *Protomyces macrosporus* Ung. *Agra University Journal of Research: Science*, *11*, 307-320.

- Haraguchi, H., Abo, T., Fukuda, A., Okamura, N. & Yagi, A.** (1996). A. Mode of action of altersolanolos, *Phytochemistry*, 43, 989-992.
- Holler, U., Gloer, J.B. & Wicklow, D.T.** (2002). Biologically active polyketide metabolites from an undetermined fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*. *Journal of Natural Products* , 65, 876-882.
- Hunault, G., Desmarest, P. & Du Manoir, J.** (1989). XI *Foeniculum vulgare* Miller: cell culture regeneration, and the production of anethole. (in Y.P.S. Baja (Ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 7: *Medicinal and Aromatic Plants II*. Springer-Verbag. Berlin. pp 187-212
- Kadry, A., Tewfe, H.A. & Habib, S.A.** (1978). Morphology and distribution of glandular structures in *Foeniculum vulgare* Miller. *Journal of Horticultural Science*, 5, 13-19.
- Karaka, J.H. & Erper, I.** (2001). First report of *Pestalotiopsis guepinii* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey, *Plant Pathology*, 50, 415.
- Kenfield, D., Bunkers, G., Wu, Y., H., , Strobel, G., Sugawar, E., Hallock, Y. & Clardy, J.** (1989). Gigantenone, a novel sesquiterpene phytohormone mimic, *Experientia*, 45, 900-902.
- Lee, I.K., Yun, B. S., Oh, S., Kim, Y.H., Lee. M.K. & Yoo I.D.** (1999). 5-Methylmellein and nectriapyrone, two new monoamine oxidase inhibitors. *Journal of Medical Sciences Research*, 27, 463-465.
- Mugnai, L. & Anzidei, M.** (1994). Casi di necrosi corticale da *Phomopsis foeniculi* del finocchio da seme in Italia. *Petria*, 4, 237-244.

- Nair, M.S.R. & Carey, S.T.** (1975). Metabolites of pyrenomycetes: nectriapyrone, an antibiotic monoterpeneoid. *Tetrahedron Letters*, 19, 1655-658.
- Nakanishi, K. & Solomon, P.H.** (1977). *Infrared Absorption Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> edition (Holden Day, Oakland).
- Osiogun, I.U.W.** (1967). Essential oils of Nigeria. Part II: A study of the oil of fennel produced at Nsukka. *Planta Medica*, 15, 30-31.
- Petzold, S.** (1989). Zur Biologie, Epidemiologie und Schadwirkung des Erregers der Blett- und Stengelanthraknose ( *Mycosphaerella anethi* Petr.) an Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) – 1. Mitteilg. *Drogenport*, 3,49-65.
- Plesher, A.** (1992). Bericht über das Auftreten wichtiger Schaderreger im Arznei-Gewürzpflanzenanbau im Jahre 1991 in den ostdeutschen Bundesländern. *Drogenreport*, 5, 9-12.
- Plesher, A.** (1997). Diagnose von Krankheiten und Beschädigungen an Fenchel (*Foeniculum vulgare* spp. Vulgare Mill.). *Drogenreport*, 10, 37-58.
- Phillips, A.J.L.** (2003). Morphological characterization of *Diaporthe foeniculacea* and its *Phomopsis* anamorph on *Foeniculum vulgare*. *Sydowia*, 55, 274-285.
- Pignatti, S.** (1982). *Flora d'Italia*, Edagricole Bologna, vol.2.
- Pohland, A. E.** (1993). Mycotoxins in review. *Food additives and Contaminants*, 10, pp 17-28.
- Riley, M.B., Williamson, M.R. & Maloy, O.** (2002). Plant disease diagnosis. *The Plant Health Instructor*, doi: 10.1094/PHI-I-2002, 1021-01

**Rodeva, R. & Gabler, J.** (2004). Investigations on the reaction of fennel cultivar to *Mycosphaerella anethi*. In: Scientific Conference Intern Partecipation, Stara Zagora, Vol. II, Parte 2, pp 286-290.

**Rodeva, R. & Gabler, J.** (2010). Umbel browning and stem necrosis: a new disease of fennel in Bulgaria. *Journal of Phytopathology*, doi: 10.1111/J.1439-0434.2010.01728.x

**Salunke, B.K., Prakash, K., Vishwakarma, K.S. & Maheshwari, V.L.** (2009). Plant metabolites: an alternative and sustainable approach towards post harvest pest management in pulses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, doi: 10.1007/s12298-009-0023-9, 15,185-197.

**Scott, A.** (1964). *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products* p. 89. (Oxford :Pergamon Press LTD).

**Stoessl, A.** (1967). Altersolanol A, a novel tetrahydroantrachinone. *Chemical Communications*, 7, 307-308.

**Stoessl, A.** (1969). Some metabolites of *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Chemistry*, 47, 767-775.

**Stoessl, A. & Unwin, C.H.** (1983). On the biosynthesis of some polyketide metabolites in *Alternaria solani*: <sup>13</sup>C and <sup>2</sup>Hmr studies. *Canadian Journal of Chemistry*, 61, 372-377.

**Suemitsu, R. & Nakamura, A.** (1981). Isolation and identification of altersolanol A from the culture liquid of *Alternaria Porri* (Ellis) Ciferri. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2363-2364

**Suemitsu, R., Nakajima, M. & Hiura, M.** (1957). Studies on the metabolic products of *Macrosporium porri* Elliott Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 21, 337.

- Suemitsu, R., Nakajima, M. & Hiura, M.** (1959). M. Studies on the metabolic products of *Macrosporium porri* Elliott. Part III. Structure of macrosporin. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 21, 547-551.
- Suemitsu, R., Yamada, Y., Sano, T. & Yamashita, K.** (1984). Phytotoxic activities of alternasolanol A, B and dactylariol, and activities of altersolanol A against Some Microorganism. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2383-2384.
- Tabacchi R., Fkyerat, A., Poliart, C. & Dubin, G.M.** (2000). Phytotoxins from fungi of esca grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 156–161.
- Thines, E. & Anke, H.** (1998). Scytalols A, B, C, and D and other modulators of melanin biosynthesis from *Scytalidium* sp. *Journal of Antibiotics*, 51, 387-393.
- Yürüt H.A., Erkal, Ü. & Gürer, M.** (1994). Hazelnut diseases in Bolu, Zonguldak and Bartın. In: *Turkish Phytopathological Society Publications No. 7. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 1994*. Kıpadasý-Aydýn, Türkiye: Turkish Phytopathological Society, 417–9.
- Uecker, F.A.** (1988). A word list of Phomopsis names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir*, 13, 1-231.
- Urbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. & Gubler, W. D.** (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California, *Plant Disease*, 90, 1490–503.
- Venkatasubbaiah, P. & Van Dyke, C.G.** (1991). Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis oenotherae*, a pathogen of evening primrose. *Phytochemistry*, 30, 1471-1474.

- Van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F. & Crous, P. W.** (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 43-S54.
- Vlanov, R., Ognyanov, I. & Tsankova, E.** (1964). Composition of Bulgarian essential oil from *Foeniculum dulce* (Mill.) fruit. *C.R. Bulgarian Academy of Science*, 17, 569-572.
- Weber, D., Gorzalczany, S., Martino, V., Acevedo, C., Sterner, O. & Anke, T.** (2005). Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina crista galli*. *Journal of Biosciences*, 60, 467-477.
- Wheeler, M.M., Wheeler, D.M.S. & Peterson, G.W.** (1975). Anthraquinone pigment from the phytopathogen *Phomopsis Juniperivora* Hahn. *Phytochemistry*, 14, 288-289.

## **RINGRAZIAMENTI**

Il mio primo grazie è per il Prof. Evidente, mio tutor, per avermi trasmesso il suo amore per la ricerca e per avermi insegnato che se credi in tutto ciò che fai anche l'impossibile diventa possibile.

Un doveroso ringraziamento alla mia co-tutor Dott.ssa Anna Andolfi, per essere stata continuo supporto e per avermi incoraggiato in ogni momento come guida, ma soprattutto come "amica".

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi, Marco, amico nonché "tesista preferito", Fabiana e Danilo, ed in ultimo, non per importanza, la mia cara amica Bianca, per aver condiviso con me i momenti più belli di questa esperienza, e per aver reso sopportabili anche quelli più brutti.

Un enorme grazie è per la mia famiglia, mia madre, mio padre e mia sorella per essere stati presenti in ogni momento e per essermi stati vicini con tutto l'amore possibile.

Un ringraziamento speciale per mio marito, compagno di vita e sostegno continuo, per aver appoggiato le mie scelte con amore e dedizione, per aver gioito con me nei momenti più belli e per essermi stato accanto in quelli più difficili.

Un ringraziamento al Dr. Andrea Motta e alla Dott.ssa Dominique Melck (Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR, Pozzuoli, Napoli) per la registrazione degli spettri NMR.

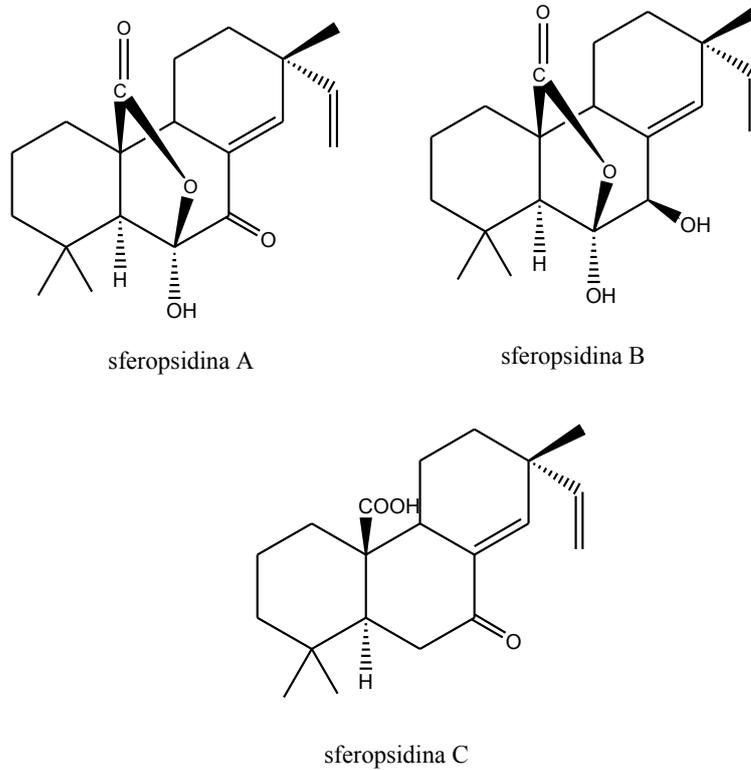
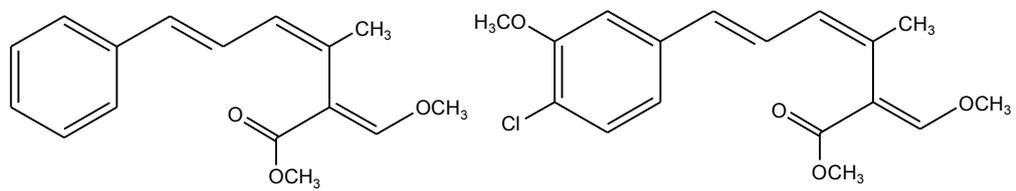
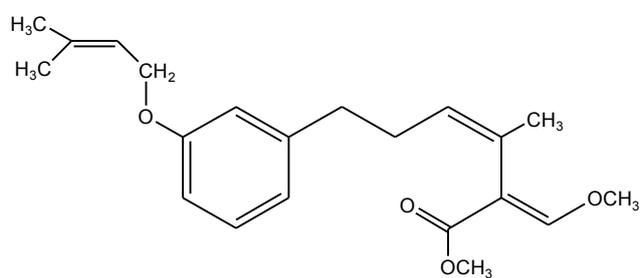


Figura 1: Struttura delle sferopsidine, isolate da *Sphaeropsis sapinea*

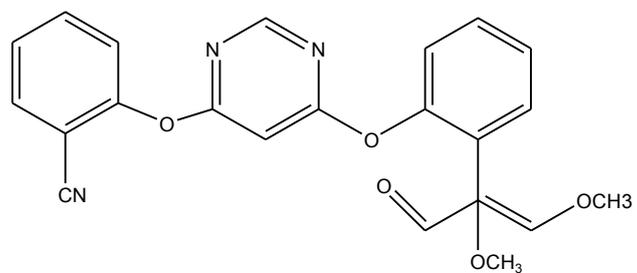


strobilurina A

strobilurina B



strobilurina C



azoxystrobina

Figura 2: Struttura delle strobilurine A-C e dell'azoxystrobina ad esse correlata

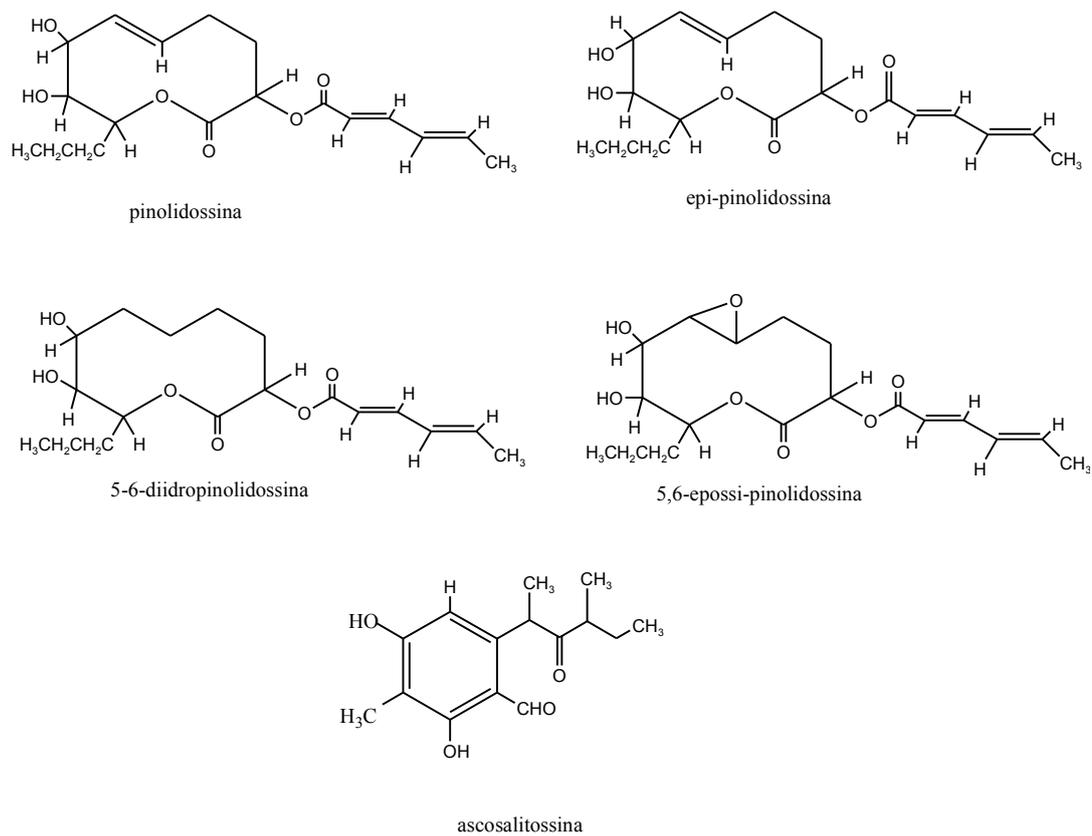


Figura 3: Struttura delle pinolidossine isolate da *A. pinodes* e della ascosalitossina isolata da *A. pisi*

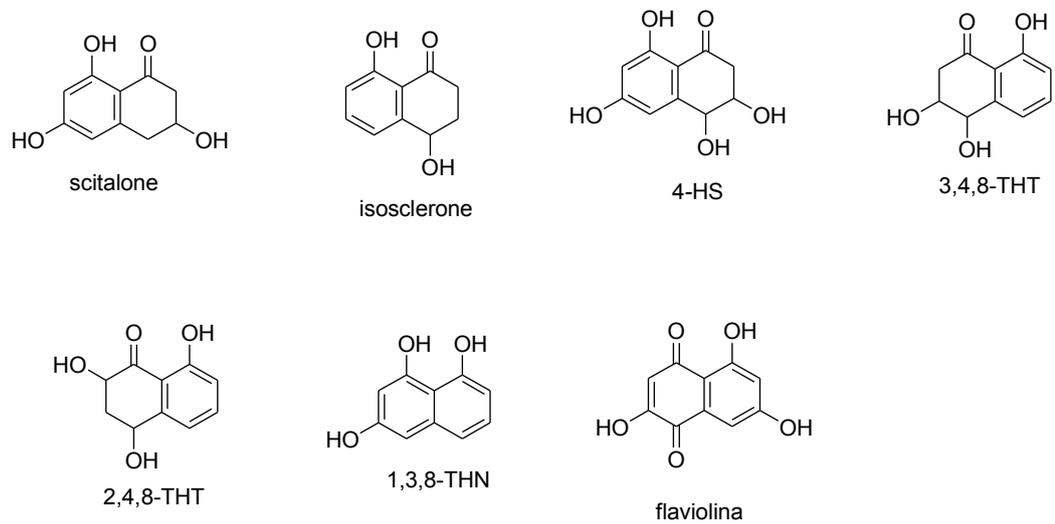
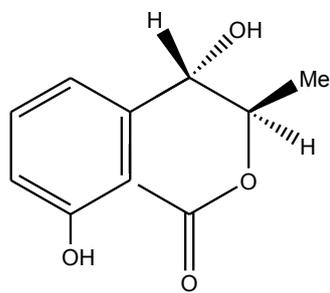
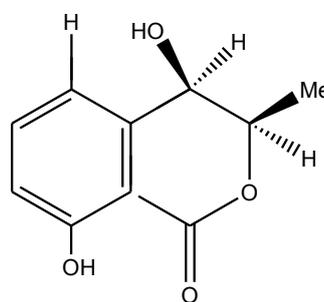


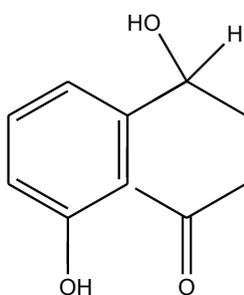
Figura 4: Metaboliti isolati da *Pheocremonium aleophilum* e *Phaemoniella clamidospora*: scitalone, isosclerone, *cis*-4-idrossi-scitalone (4-HS); 3,4,8-triidrossitetralone; (3,4,8-THT); 2,4,8-triidrossitetralone (2,4,8-THT) 1,3,8-triidrossinaftalene (1,3,8-THN), flaviolina.



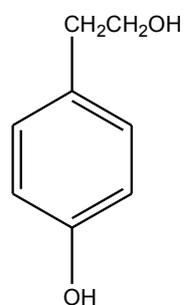
(3R,4S)-(-)-4-idrossimelleina



(3R,4R)-(-)-4-idrossimelleina



isosclerone

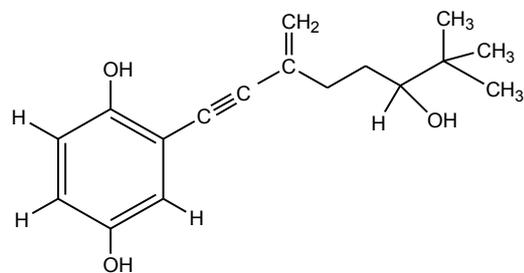


tirosolo

Figura 5: Metaboliti isolati da colture liquide di *Neofusicoccum parvum*

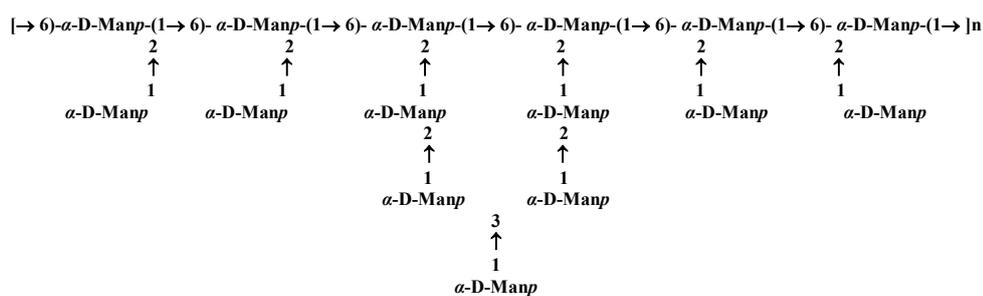


Figura 6: *Foeniculum vulgare*



foeniculossina

**A**



**B**



Figura 7: Struttura della foeniculossina, del mannano ramificato A e del galattano B isolati da colture liquide di *P.foeniculi*

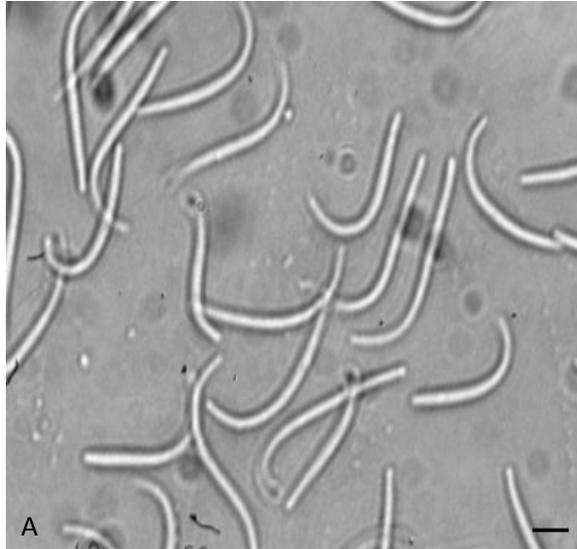


Figura 8:  $\alpha$ -conidi (A) e  $\beta$ -conidi (B)  
di *P. foeniculi*



Figura 9 : Sintomi indotti da *P.foeniculi* su ombrelle di *F. vulgare*



Figura 10: Sintomi indotti da *P. foeniculi* su stelo di *F. vulgare*



Figura 11: Picnidi di *P.foeniculi* su stelo di *F. vulgare*



Figura 12: Sintomi indotti da *P. foeniculi* su foglie di *F. vulgar*



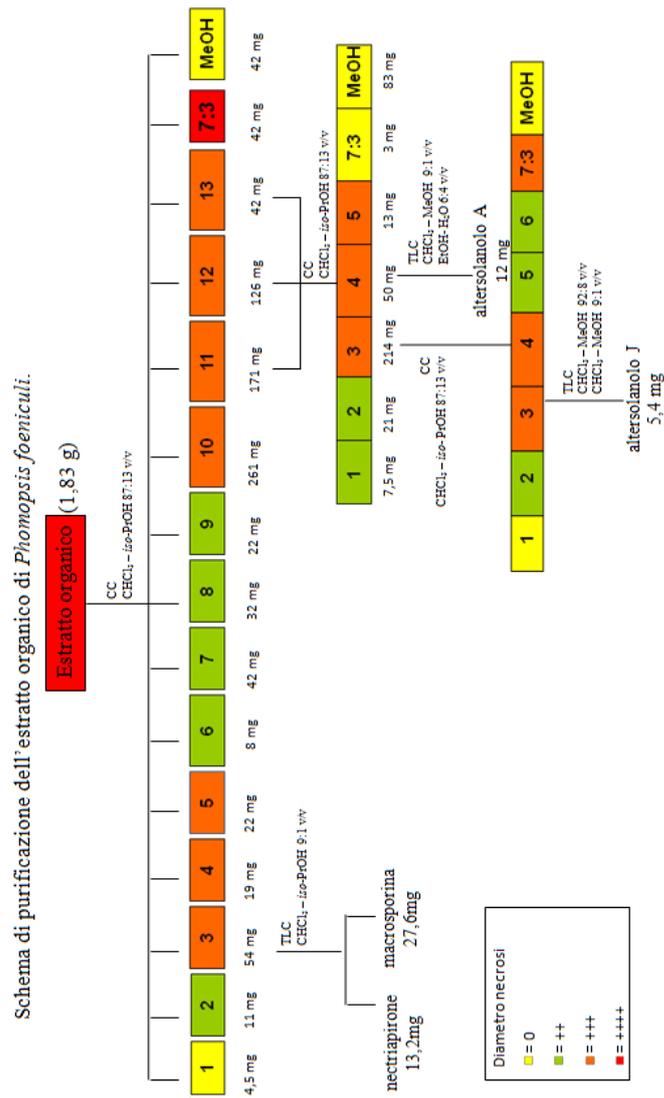
Figura 13: *Corylus avellana*



Figura 14: Conidi di *P.guepinii*



Figura 15: Sintomi indotti da *P. guepinii* su nocciolo



Schema 1: Schema di purificazione dell'estratto organico di *P. foeniculi*

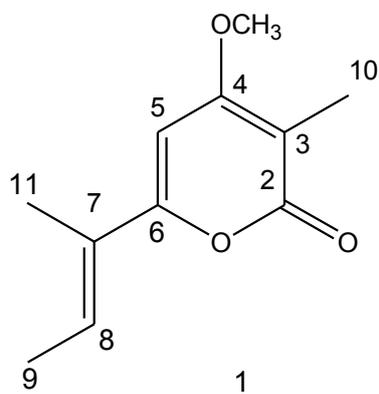


Figura 16: Struttura del nectriapirone (1)

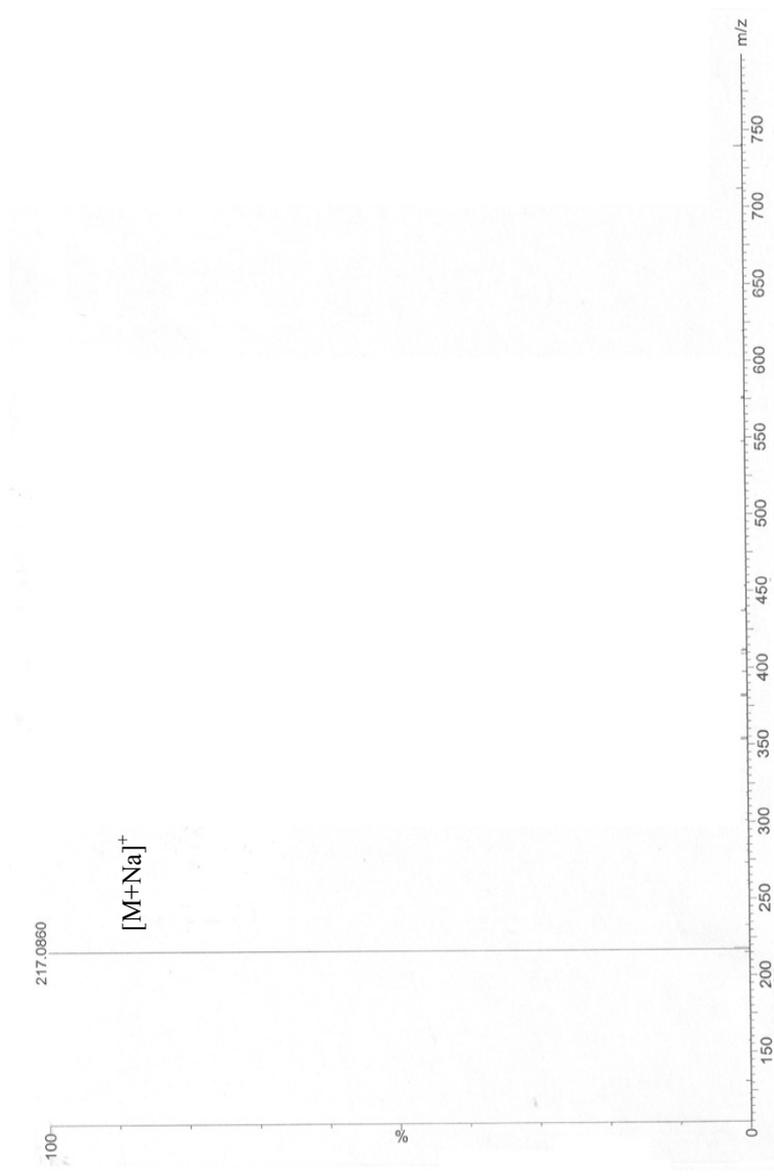


Figura 17: Spettro ESI MS del nectriapirone (I)

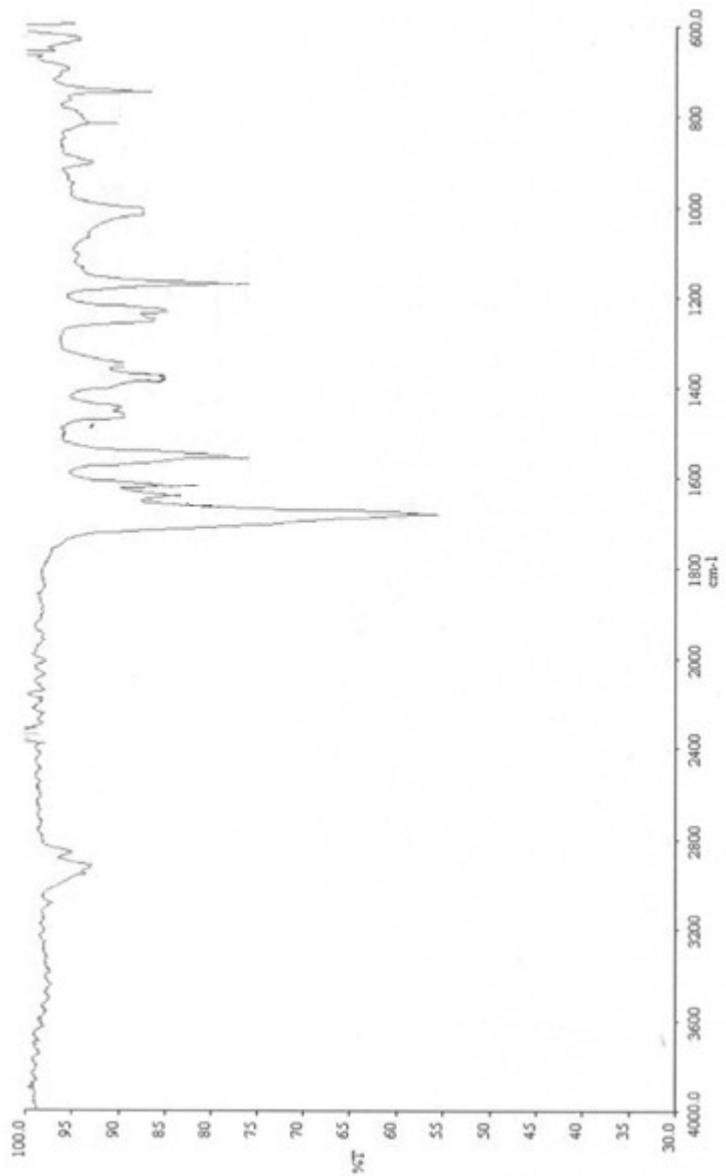


Figura 18: Spettro IR del nectriapirone (1) registrato come film liquido

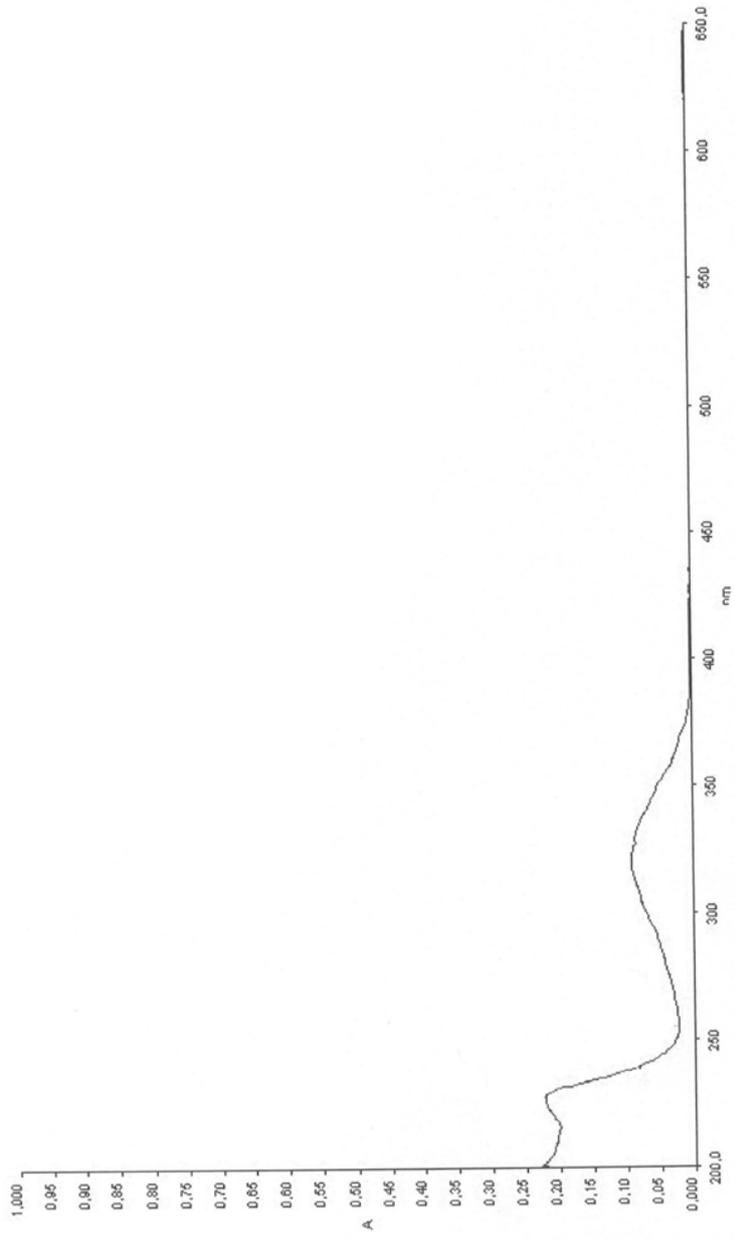


Figura 19: Spettro UV del nectriapirone (1) registrato in CH<sub>3</sub>CN

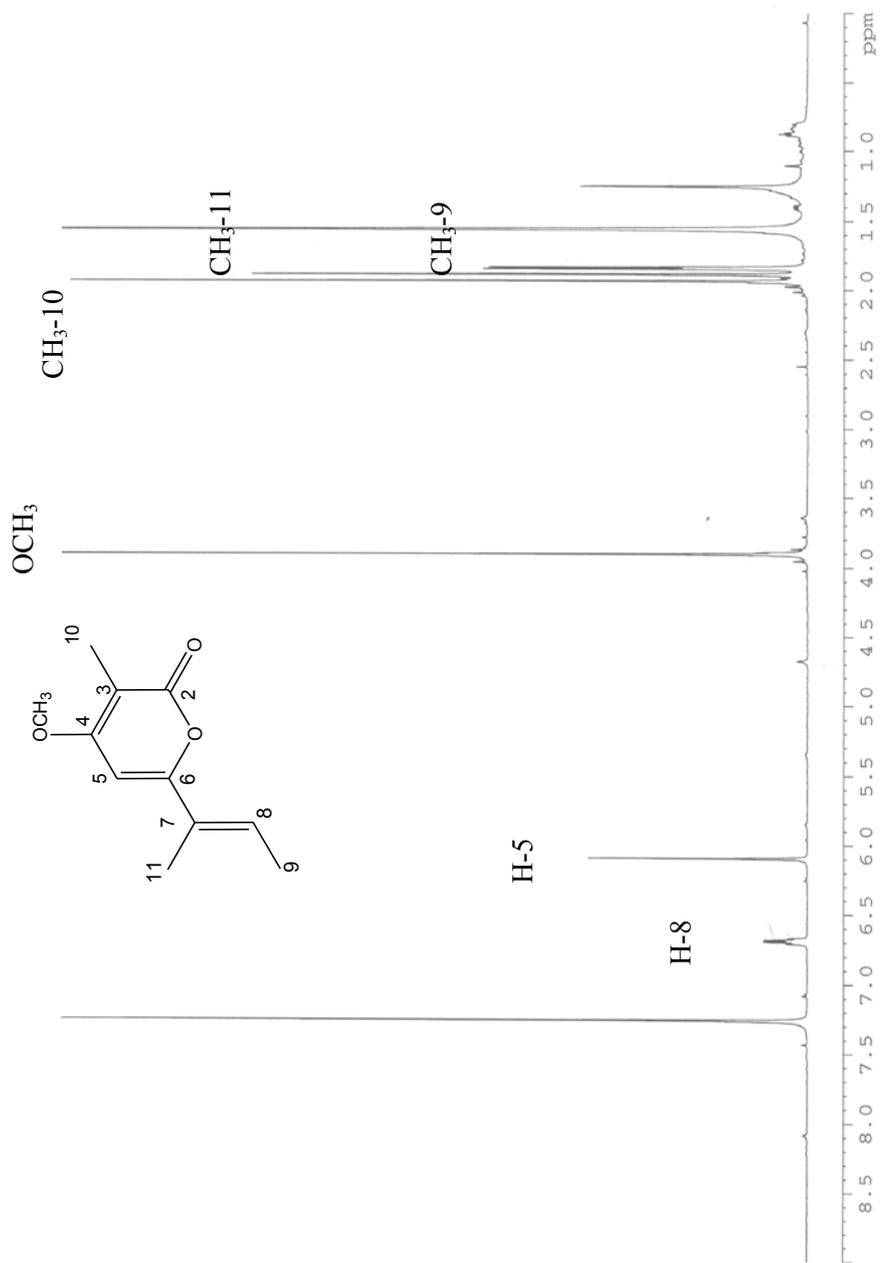


Figura 20: Spettro  $^1\text{H}$  NMR del nectriapirone **1** registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3$

**Tabella 1: Dati  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR del nectriapirone <sup>a,b</sup>**

<b>Position</b>	<b><math>\delta\text{C m}^{\text{c}}</math></b>	<b><math>\delta\text{H}</math></b>	<b>HMBC</b>
<b>2</b>	<b>165,1 s</b>		<b>H-10</b>
<b>3</b>	<b>101,9 s</b>		<b>H-5, H-10</b>
<b>4</b>	<b>165,9 s</b>		<b>OCH<sub>3</sub>, H-5</b>
<b>5</b>	<b>91,4 d</b>	<b>6,09 s</b>	<b>H-10</b>
<b>6</b>	<b>160,3 s</b>		<b>H-8, H-5, H-11</b>
<b>7</b>	<b>126,8 s</b>		<b>H-5</b>
<b>8</b>	<b>129,7 d</b>	<b>6,68 dq (<math>J= 7,01, 1,0</math> Hz)</b>	<b>H-11</b>
<b>9</b>	<b>12,1 q</b>	<b>1,84 d (<math>J= 7,0</math> Hz)</b>	
<b>10</b>	<b>14,2 q</b>	<b>1,93 s</b>	
<b>11</b>	<b>8,6 q</b>	<b>1,88 d (<math>J= 1,0</math> Hz)</b>	
<b>OCH<sub>3</sub></b>	<b>56,3 q</b>	<b>3,9 s</b>	

<sup>a</sup> I chemical shifts sono calcolati in  $\delta$  (ppm) rispetto al TMS.

<sup>b</sup> 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (COSY)  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  (HSQC) NMR hanno delineato le correlazioni dei protoni e dei corrispondenti atomi di carbonio.

<sup>c</sup> La molteplicità è stata assegnata tramite confronto con lo spettro DEPT.

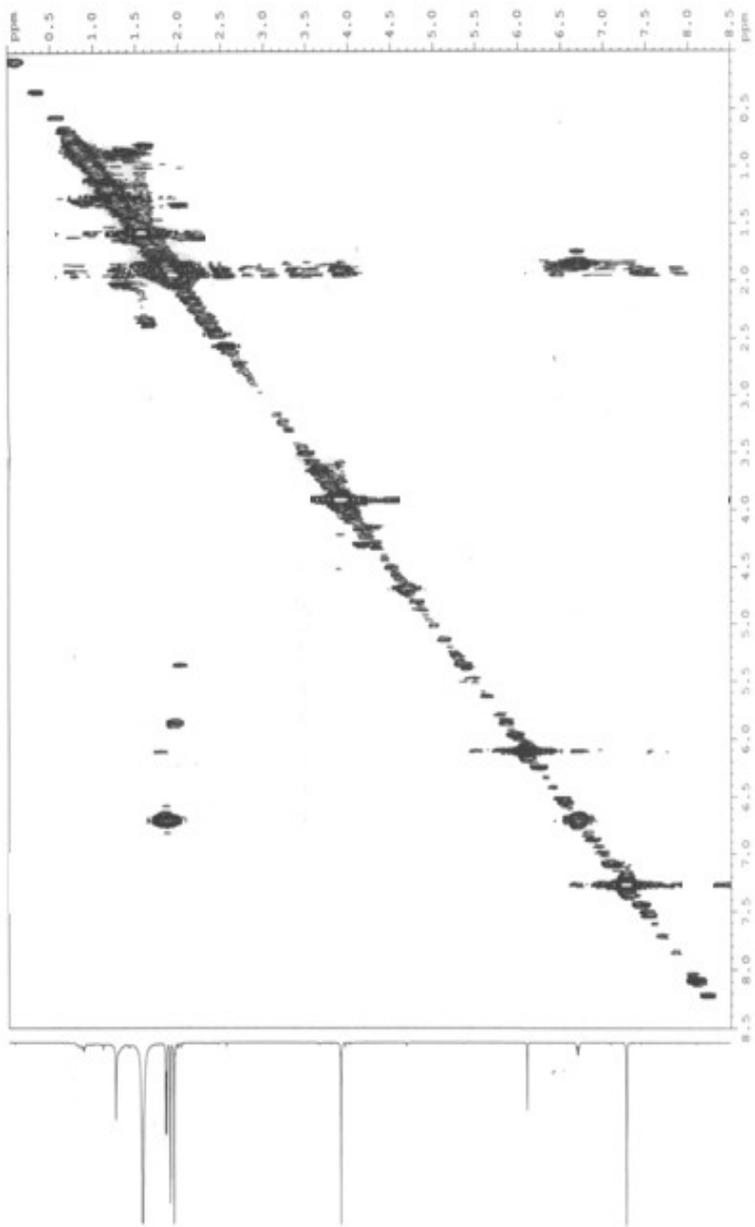


Figura 21: Spettro COSY del nectriapirone (**1**) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>

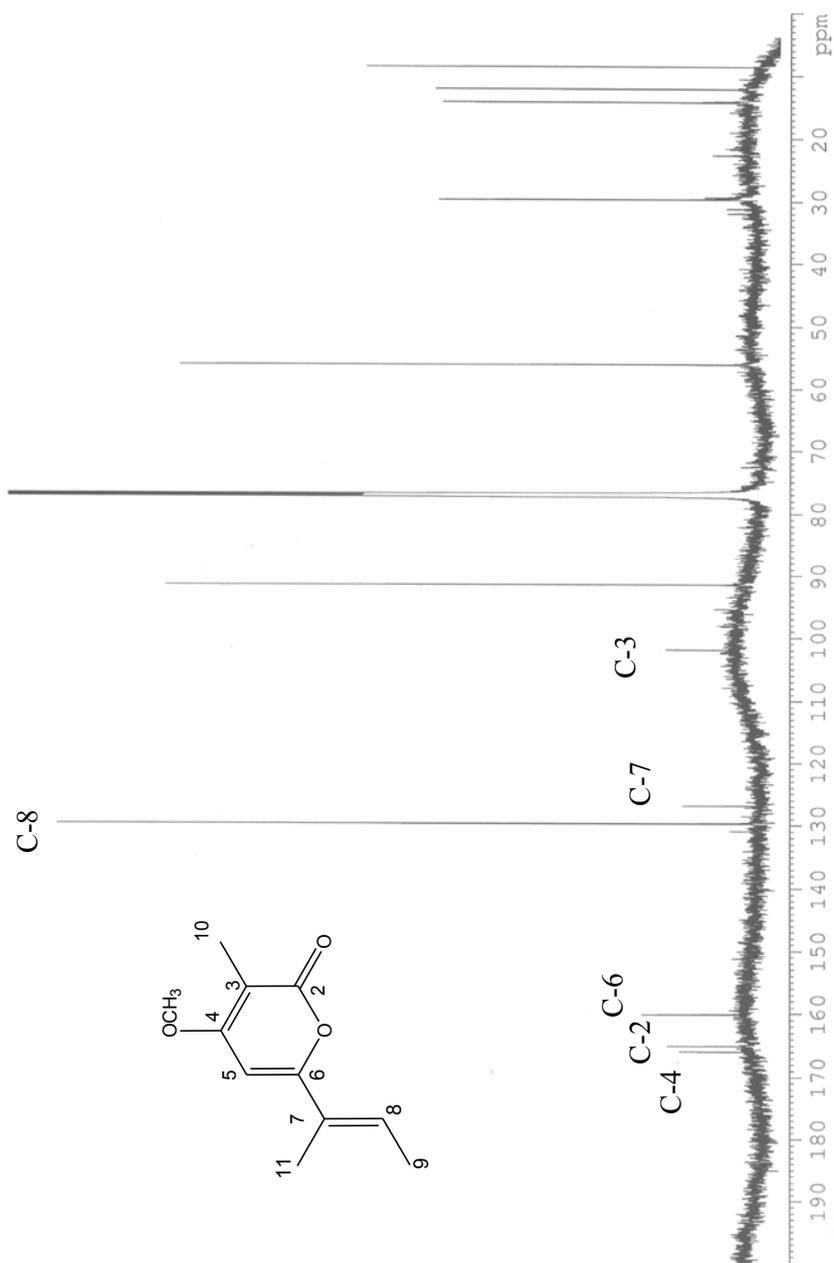


Figura 22: Spettro  $^{13}\text{C}$  del nectriapirone (1) registrato a 150 MHz in  $\text{CDCl}_3$

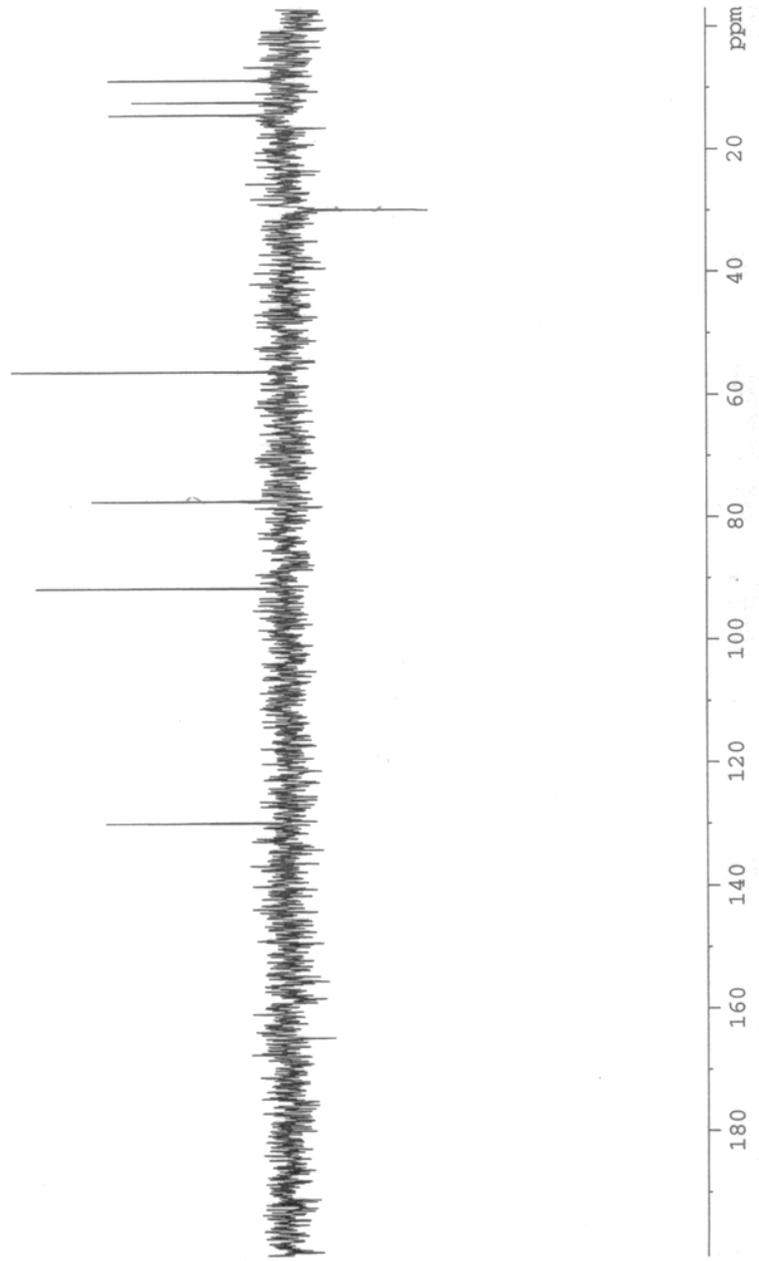


Figura 23: Spettro DEPT del nectriapirone (1) registrato a MHz in CDCl<sub>3</sub>

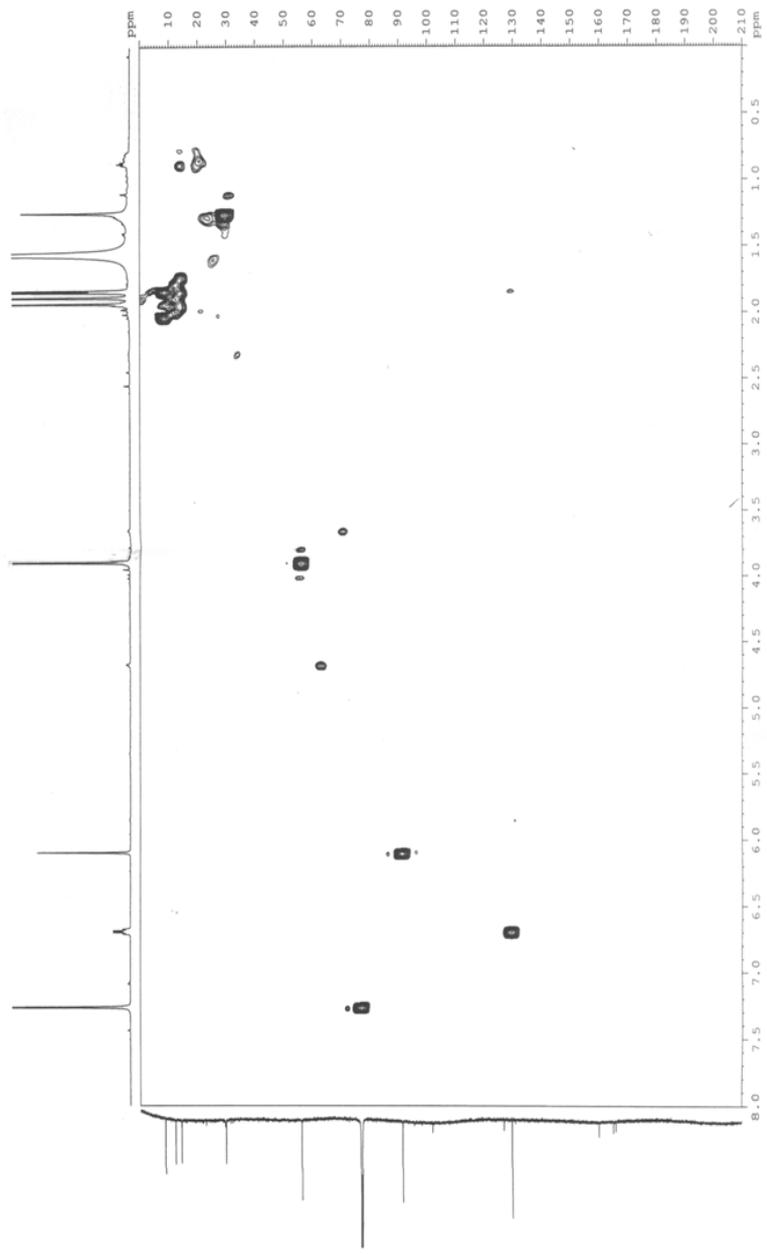


Figura 24: Spettro HSQC del nectriapirone (1) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>

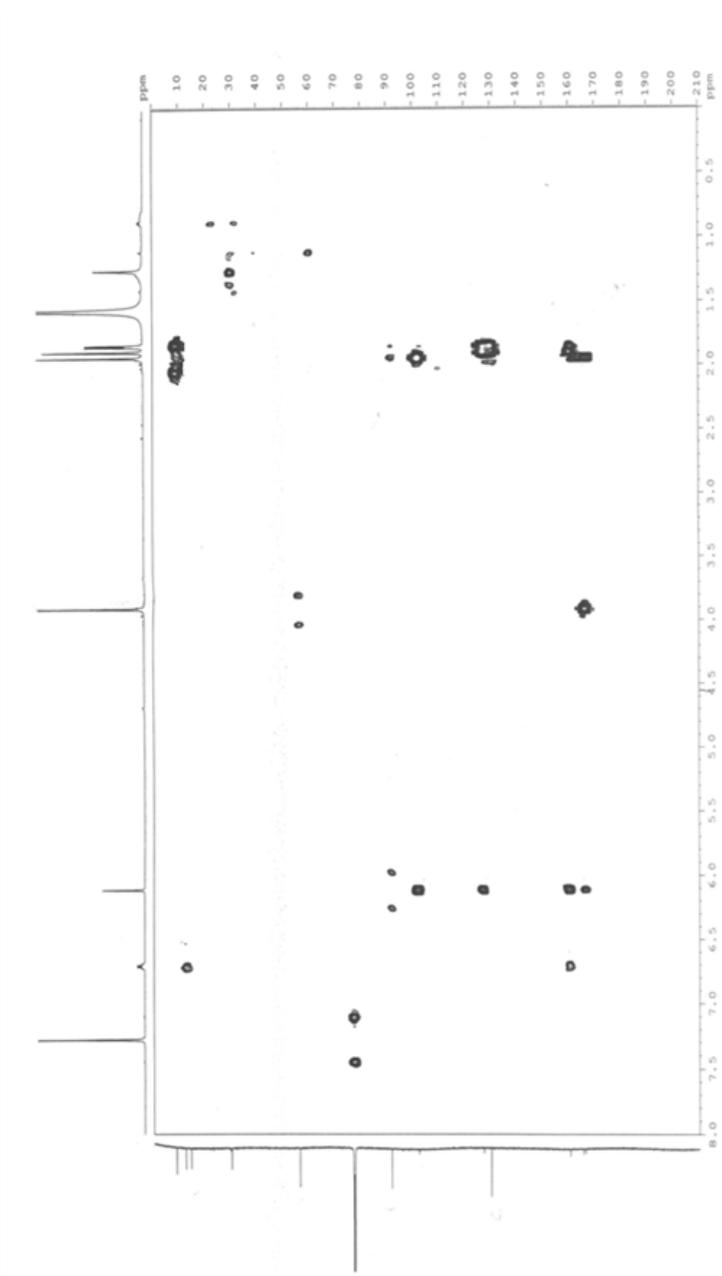


Figura 25: Spettro HMBC del nectripirone (**1**) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>

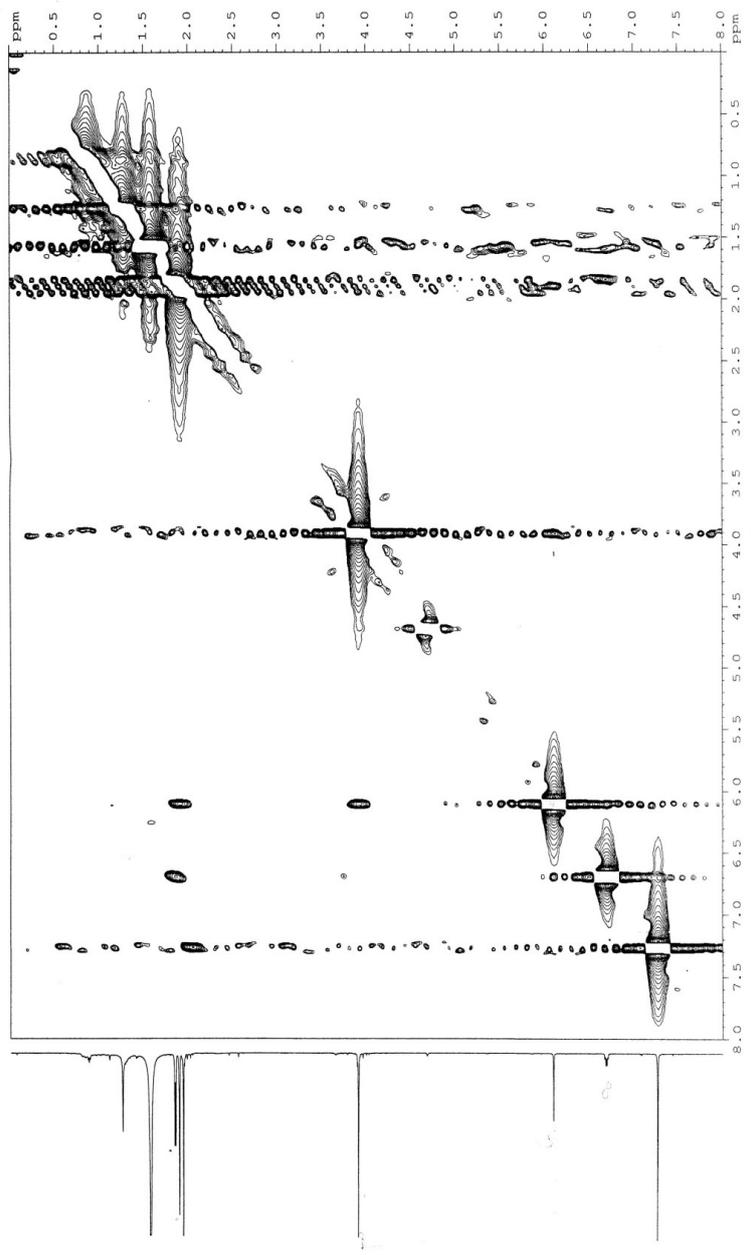


Figura 26: Spettro NOESY del nectriapirone (1) registrato a 600MHz in  $\text{CDCl}_3$

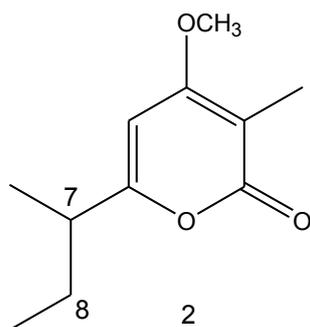
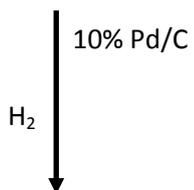
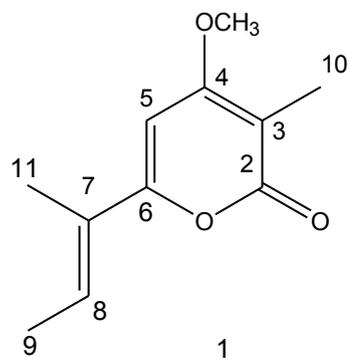


Figura 27: Reazione di idrogenazione del nectriapirone



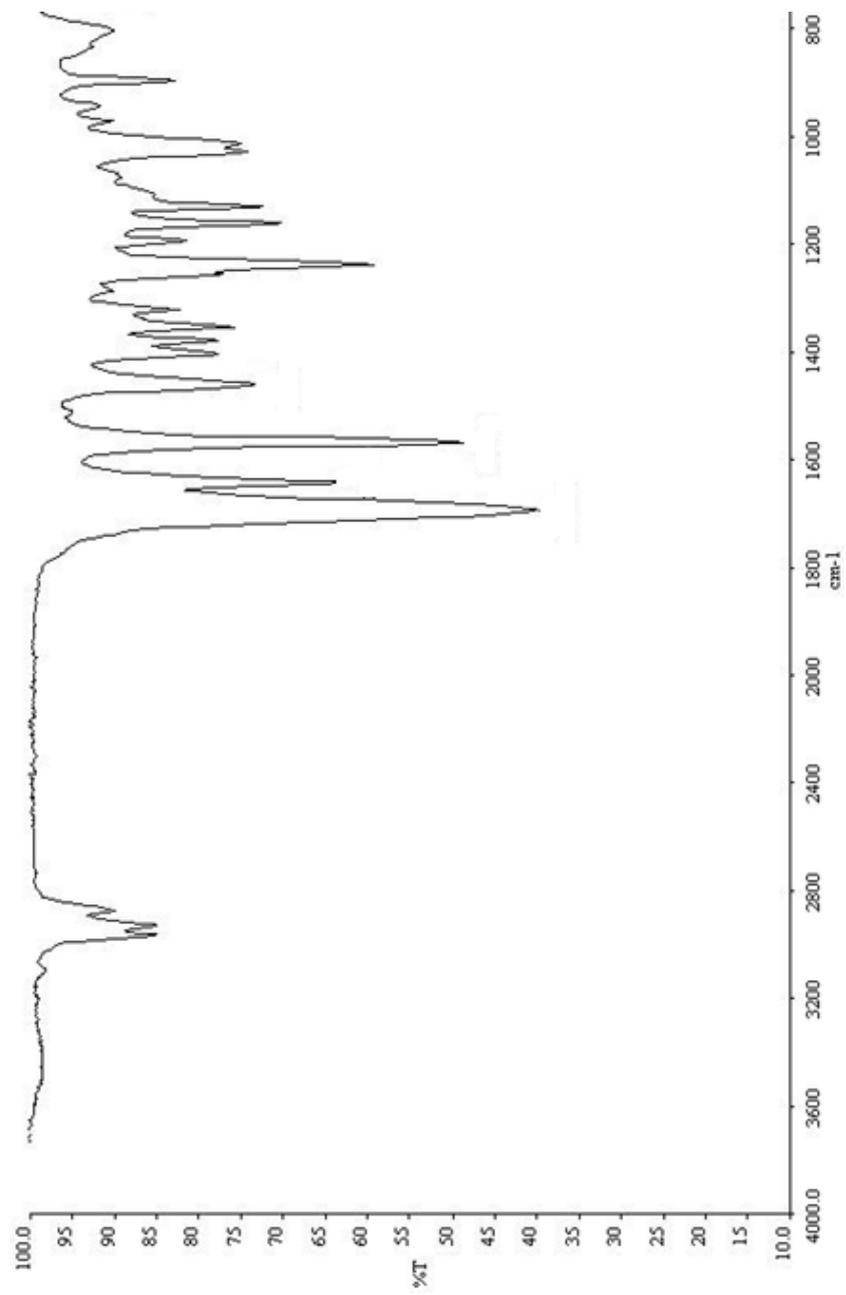


Figura 29: Spettro IR del 7,8-diidronectriapirone (2) registrato come film liquido

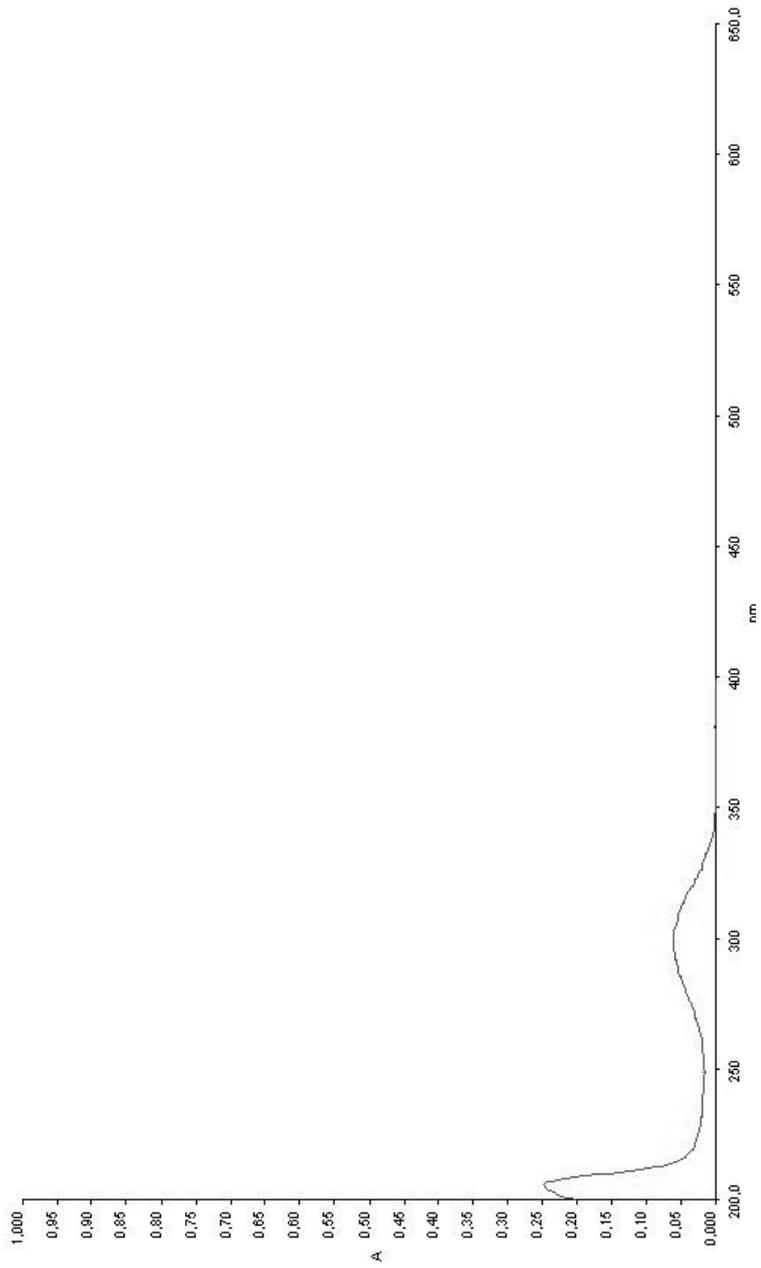


Figura 30: Spettro UV del 7,8-dihydronectriapirone (2) registrato in CH<sub>3</sub>CN

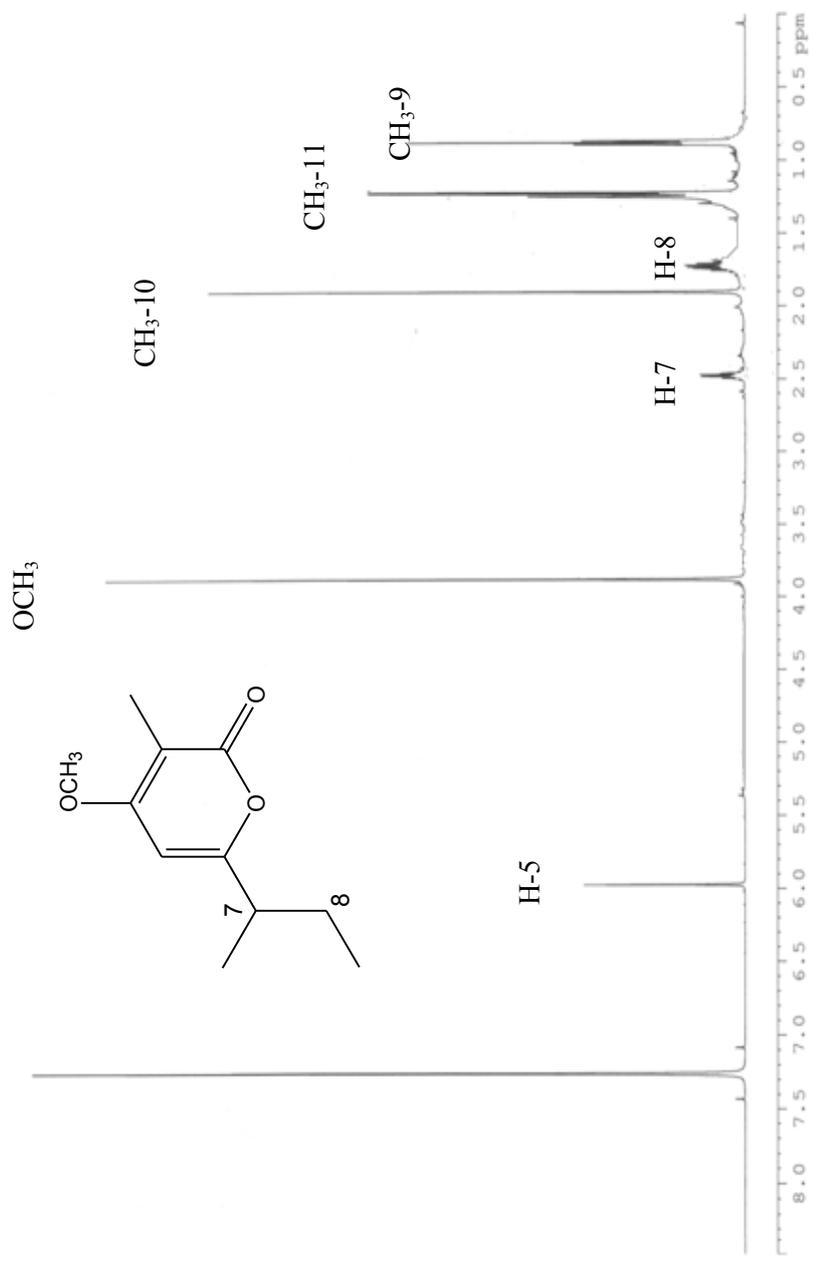
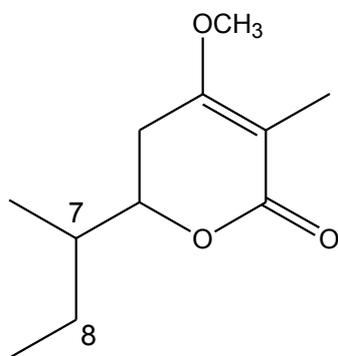


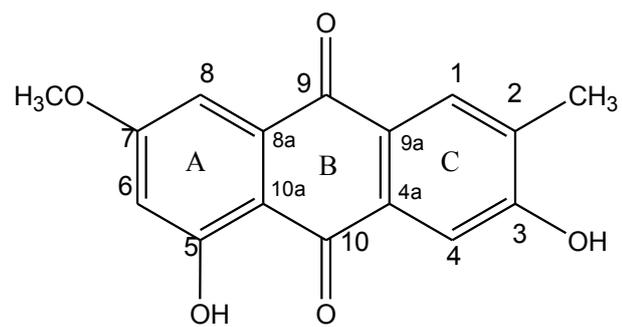
Figura 31: Spettro <sup>1</sup>H NMR del 7,8-diidronectriapirone (2) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>



*2 bis*

Figura 32: Struttura del tetraidroderivato del nectriapirone (**2 bis**)

(Nair & Carey, 1975)



3

Figura 33: Struttura della macrosporina (3)

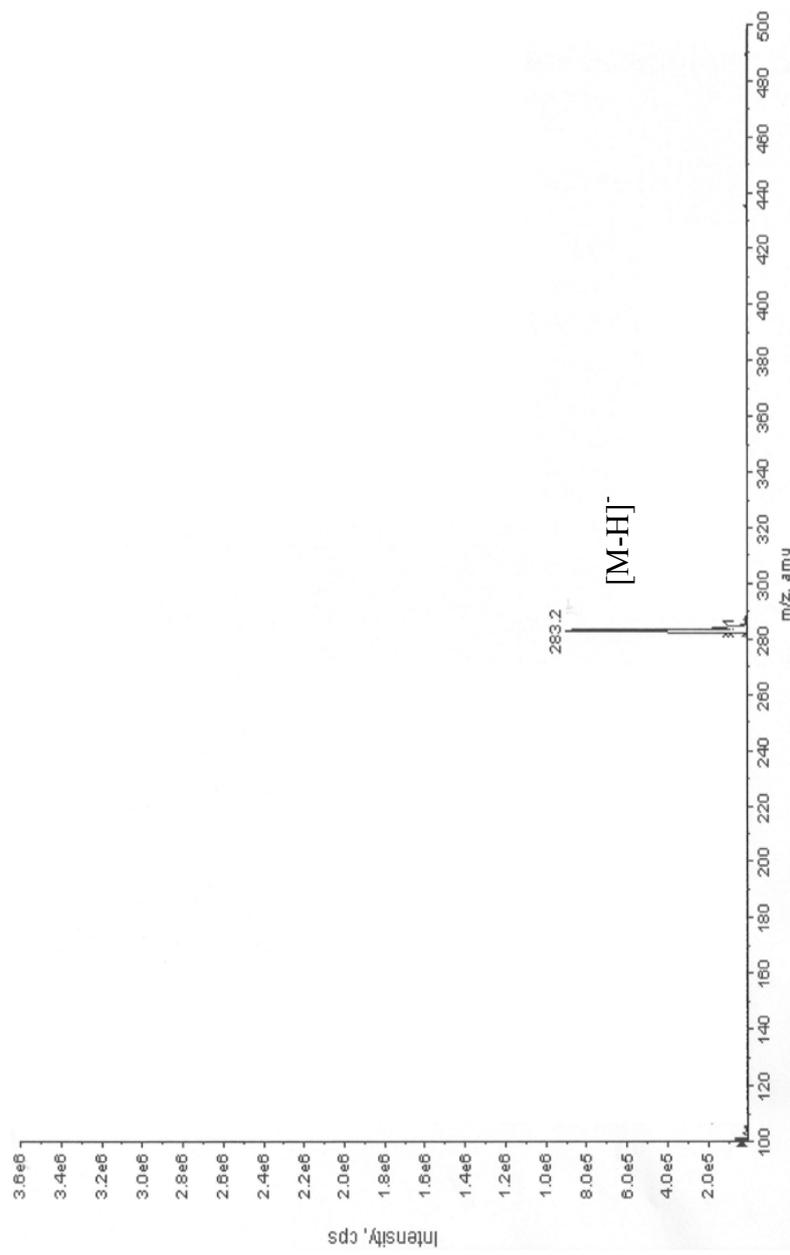


Figura 34: Spettro ESI MS della macrosporina (3)

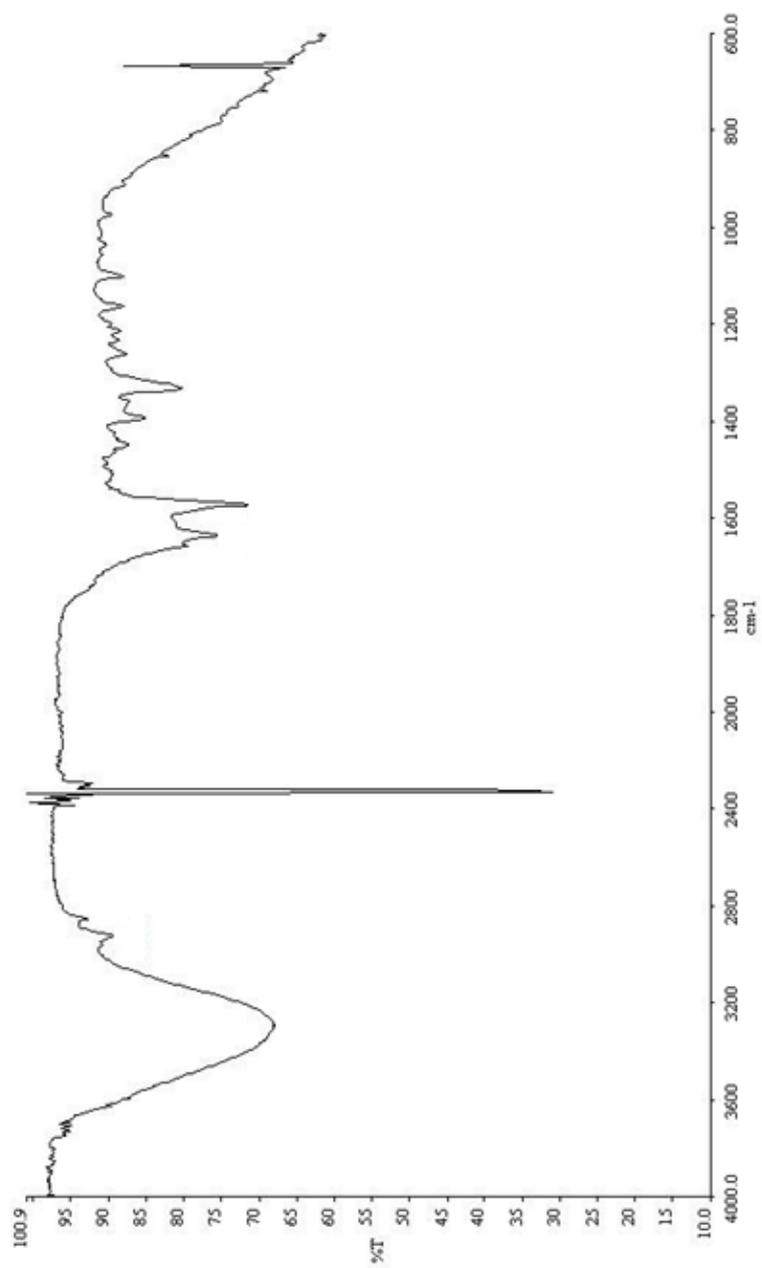


Figura 35: Spettro IR della macrosporina (3) registrato come film liquido

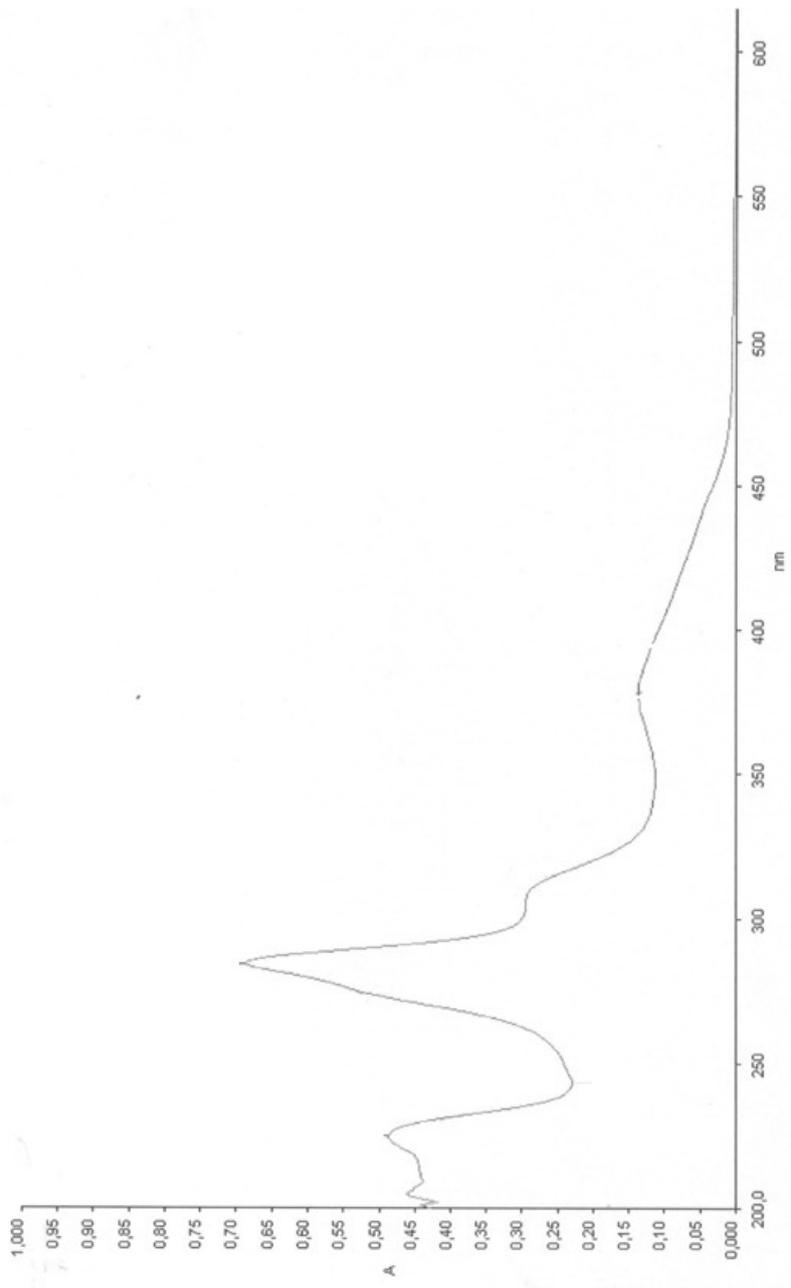


Figura 36: Spettro UV della macrosporina (3)

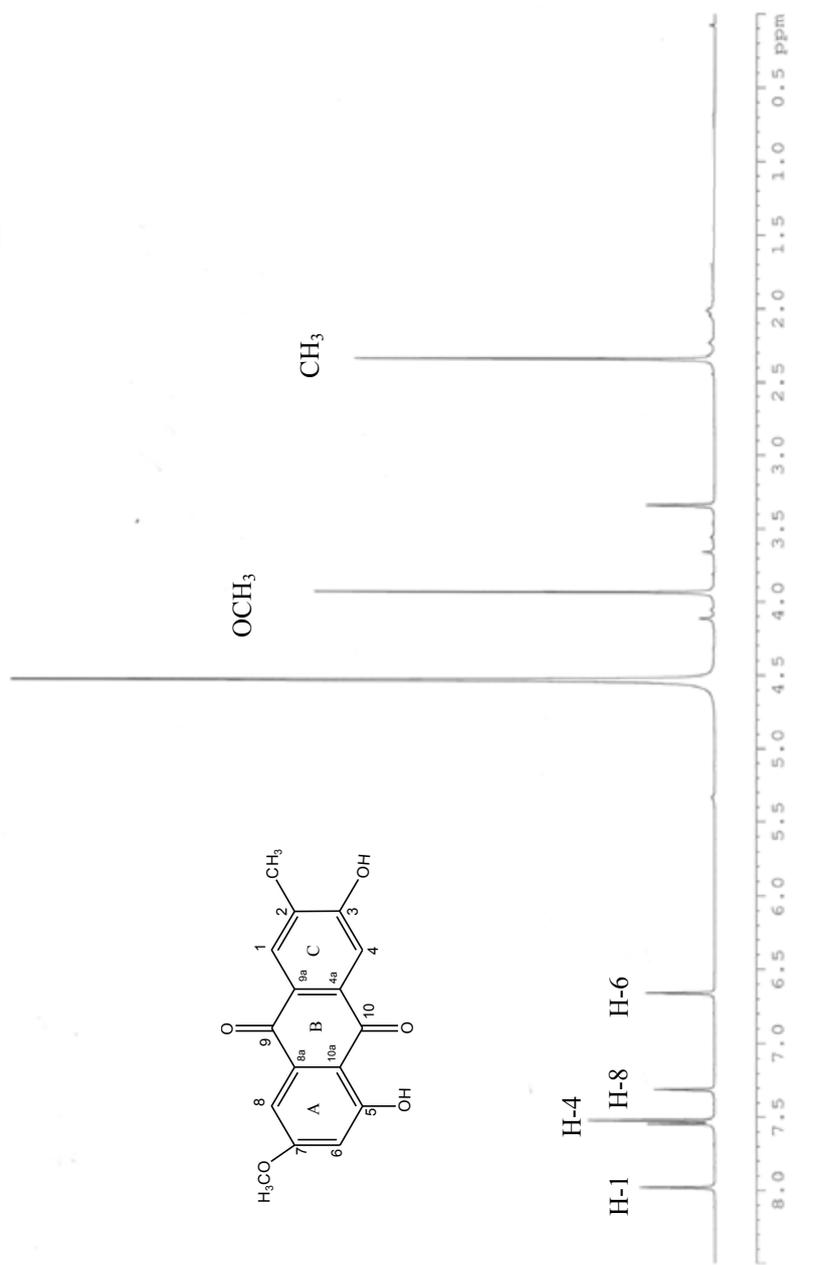


Figura 37: Spettro <sup>1</sup>H NMR della macrosporina (3) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD

95:5 v/v

**Tabella 2: dati  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR della macrosporina <sup>a,b</sup>**

<b>Position</b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>	<b><math>\delta\text{H}</math></b>	<b>HMBC</b>
<b>1</b>	<b>131,1 d</b>	<b>7,98 s</b>	<b>H-4</b>
<b>2</b>	<b>111,3 s</b>		
<b>3</b>	<b>162,4 s</b>		<b>H-1</b>
<b>4</b>	<b>111,9 d</b>	<b>7,54 s</b>	
<b>4a</b>	<b>126,0 s</b>		<b>H-4</b>
<b>5</b>	<b>166,8 s</b>		<b>H-8</b>
<b>6</b>	<b>106,3 d</b>	<b>6,65 d (<math>J= 3,4</math> Hz)</b>	<b>H-8</b>
<b>7</b>	<b>165,4 s</b>		<b>H-6</b>
<b>8</b>	<b>108,0 d</b>	<b>7,31 d (<math>J= 3,4</math> Hz)</b>	<b>H-6</b>
<b>8a</b>	<b>134,2s</b>		<b>H-1</b>
<b>9</b>	<b>182,6 s</b>		<b>H-1, H-8</b>
<b>9a</b>	<b>132,9 s</b>		<b>H-4</b>
<b>10</b>	<b>187,7 s</b>		<b>H-4</b>
<b>10a</b>	<b>136,0 s</b>		
<b>CH<sub>3</sub>-C2</b>	<b>16,6q</b>	<b>2,34</b>	<b>H-1</b>
<b>OCH<sub>3</sub>-C7</b>	<b>56,3q</b>	<b>3,93</b>	

<sup>a</sup> I chemical shifts sono calcolati in  $\delta$  (ppm) rispetto al TMS.

<sup>b</sup> 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (COSY)  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  (HSQC) NMR hanno delineato le correlazioni dei protoni e dei corrispondenti atomi di carbonio

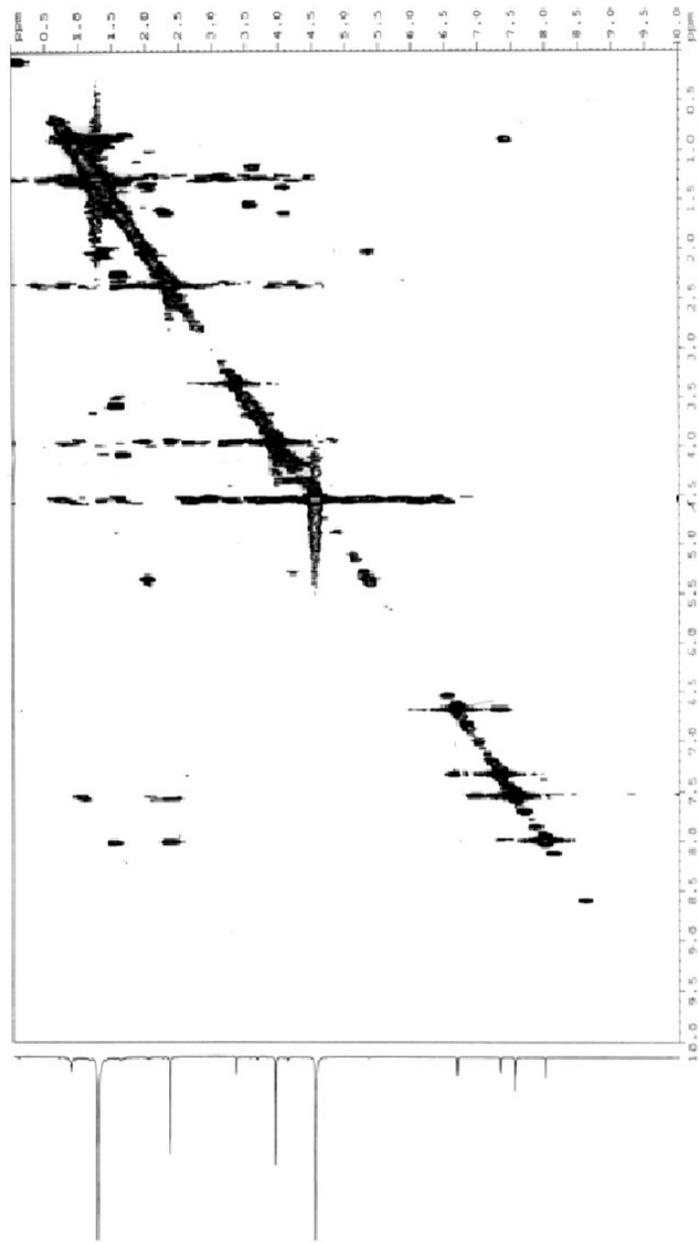


Figura 38: Spettro COSY della macrosporina (3) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

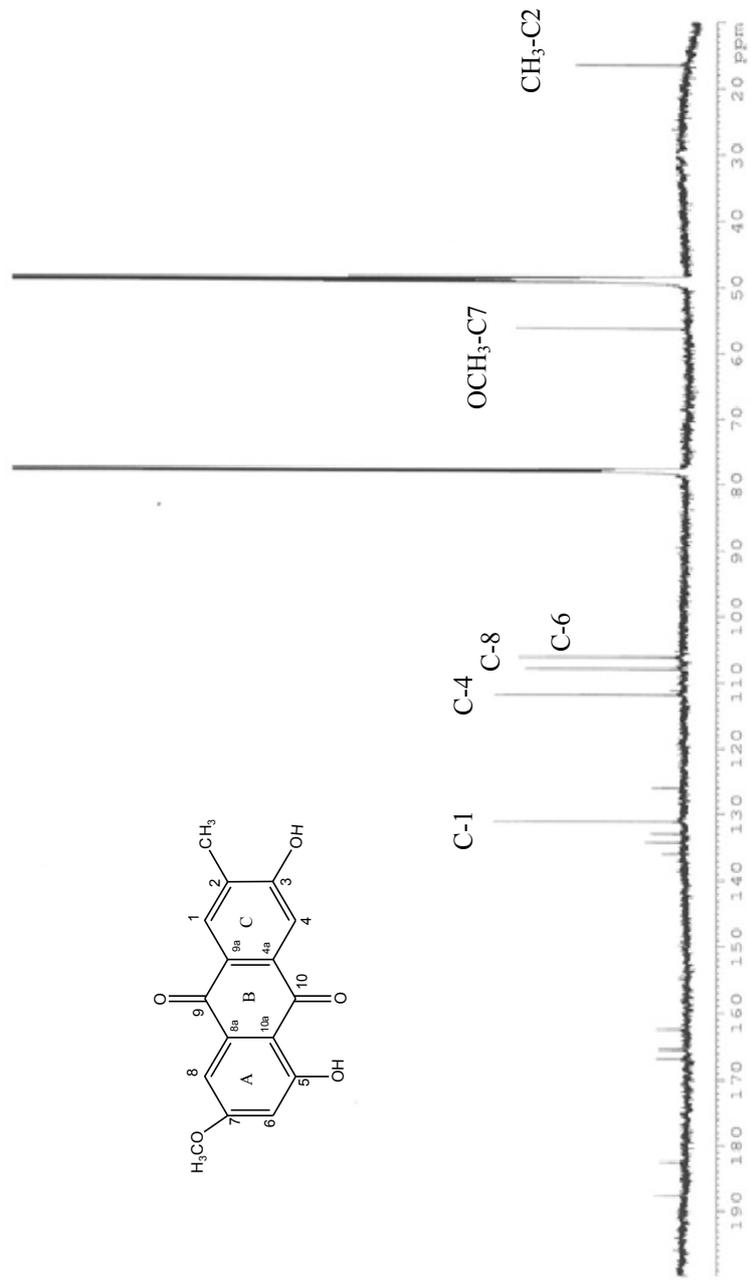


Figura 39: Spettro  $^{13}\text{C}$  della macrosporina (3) registrato a 150 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

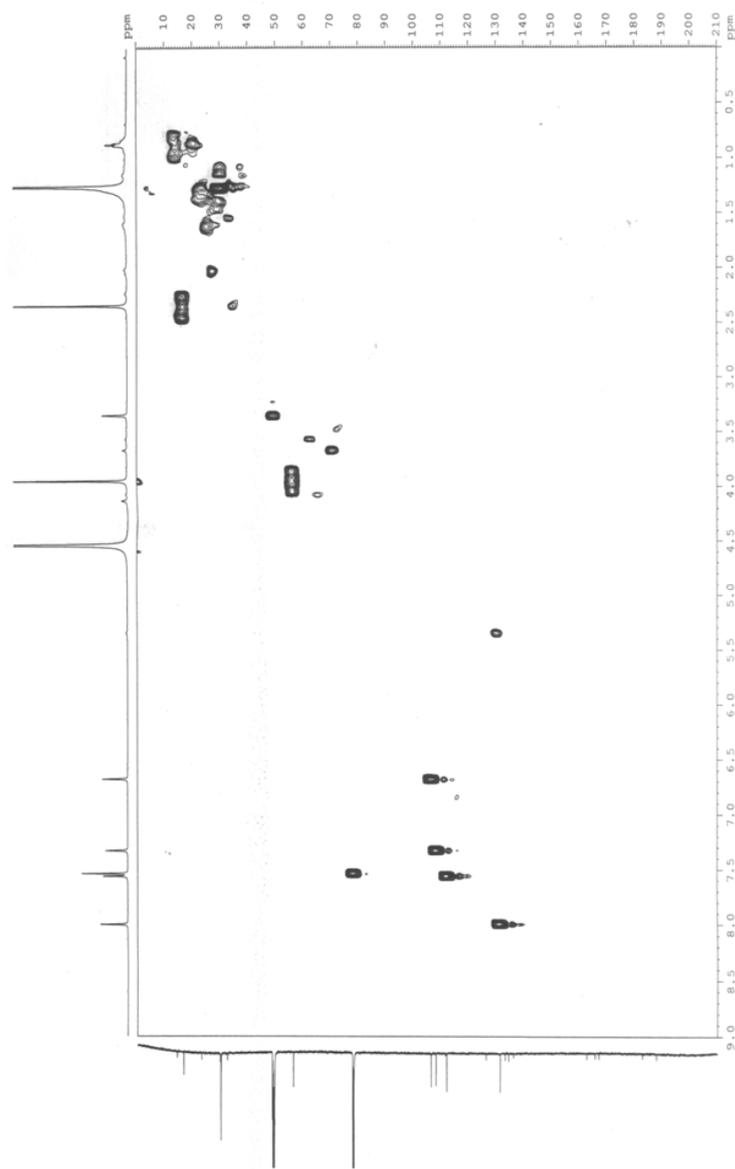


Figura 40: Spettro HSQC della macrosporina (**3**) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

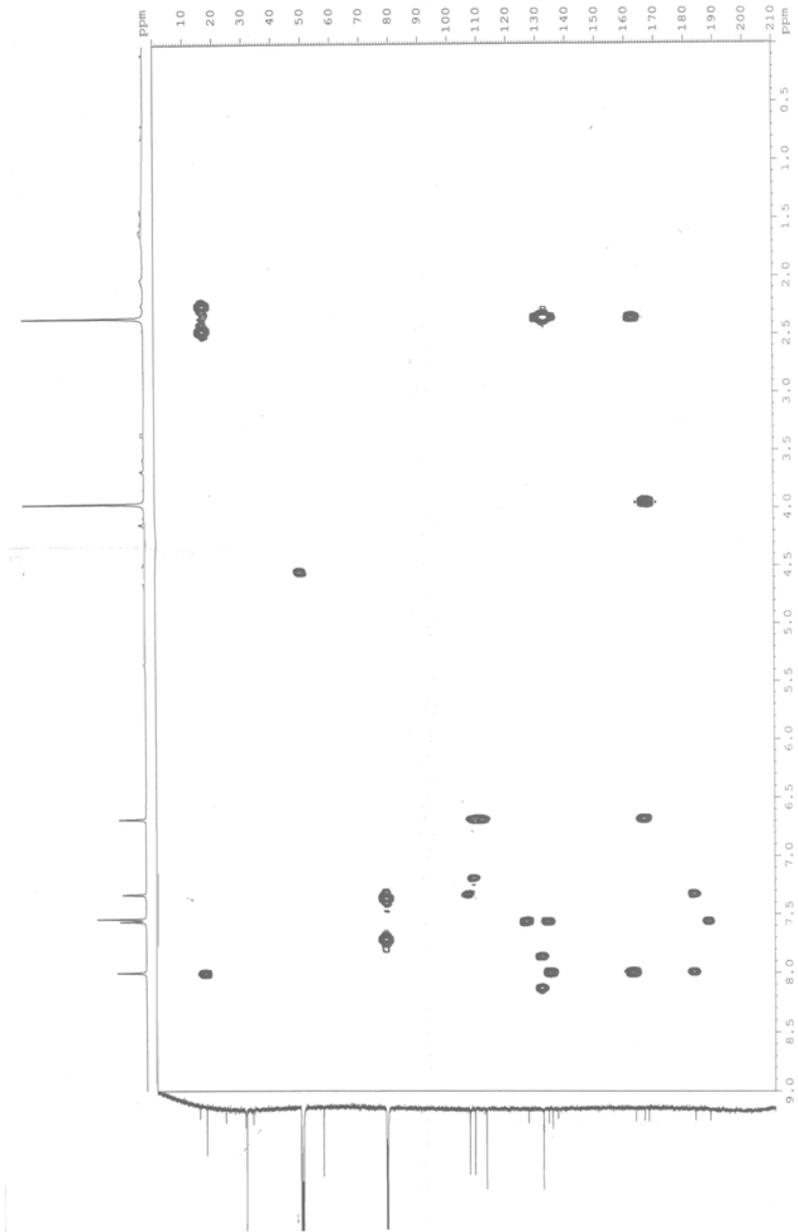


Figura 41: Spettro HMBC della macrosporina (3) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v

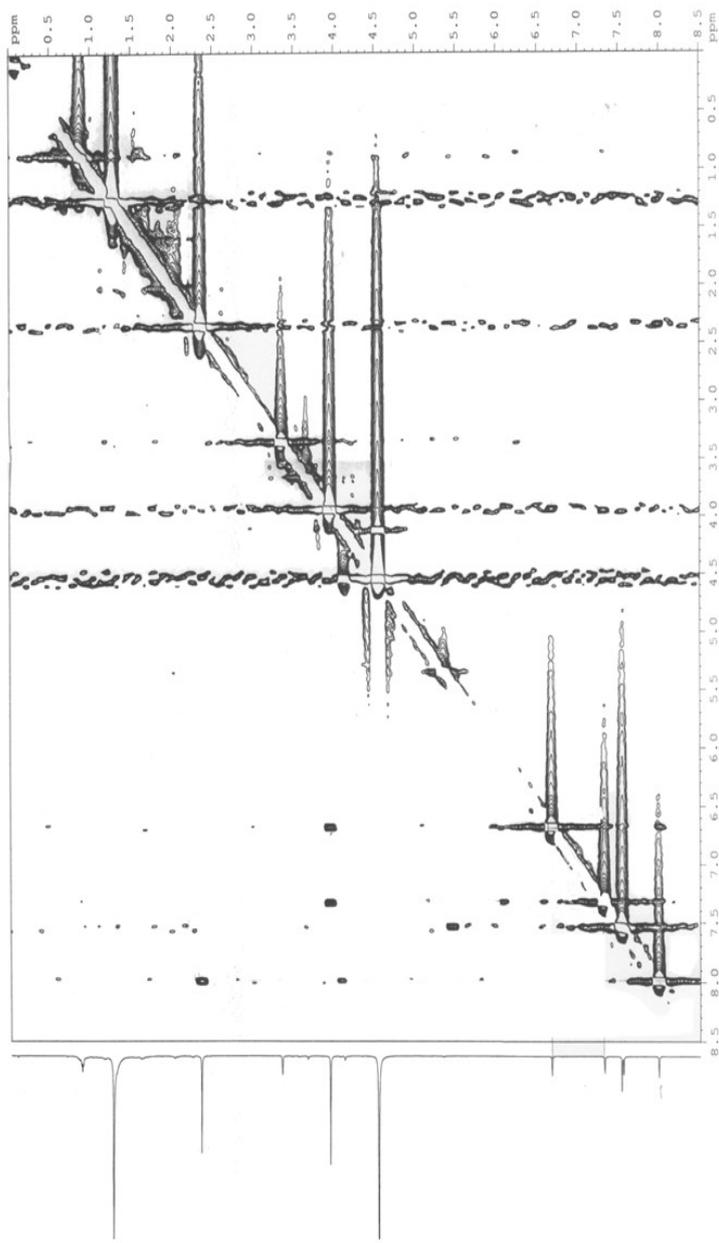
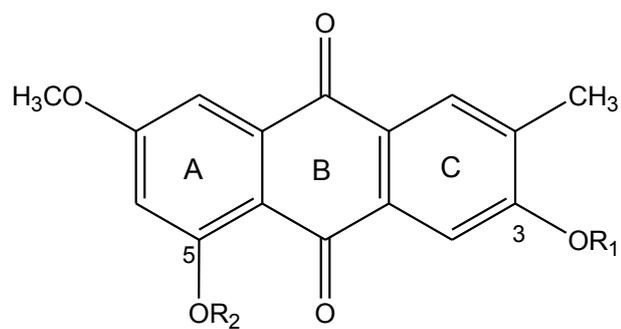
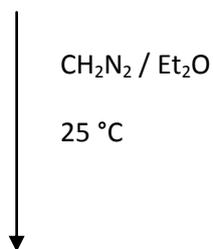
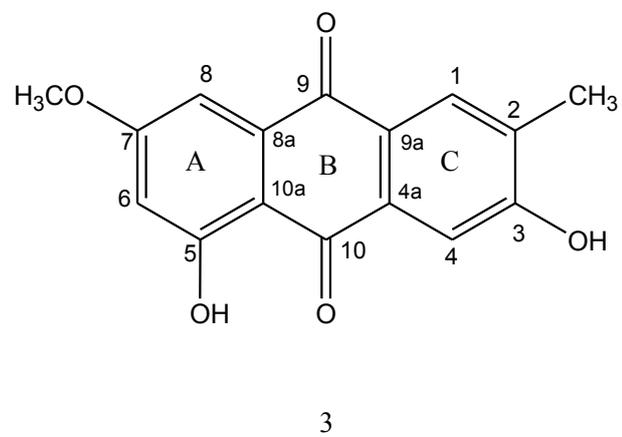


Figura 42: Spettro NOESY della macrosporina (3) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v



**3-O-methylmacrosporina (4)** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H  
**3,5-O,O'-dimethylmacrosporina (5)** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

Figura 43: Reazione di metilazione della macrosporina (3)

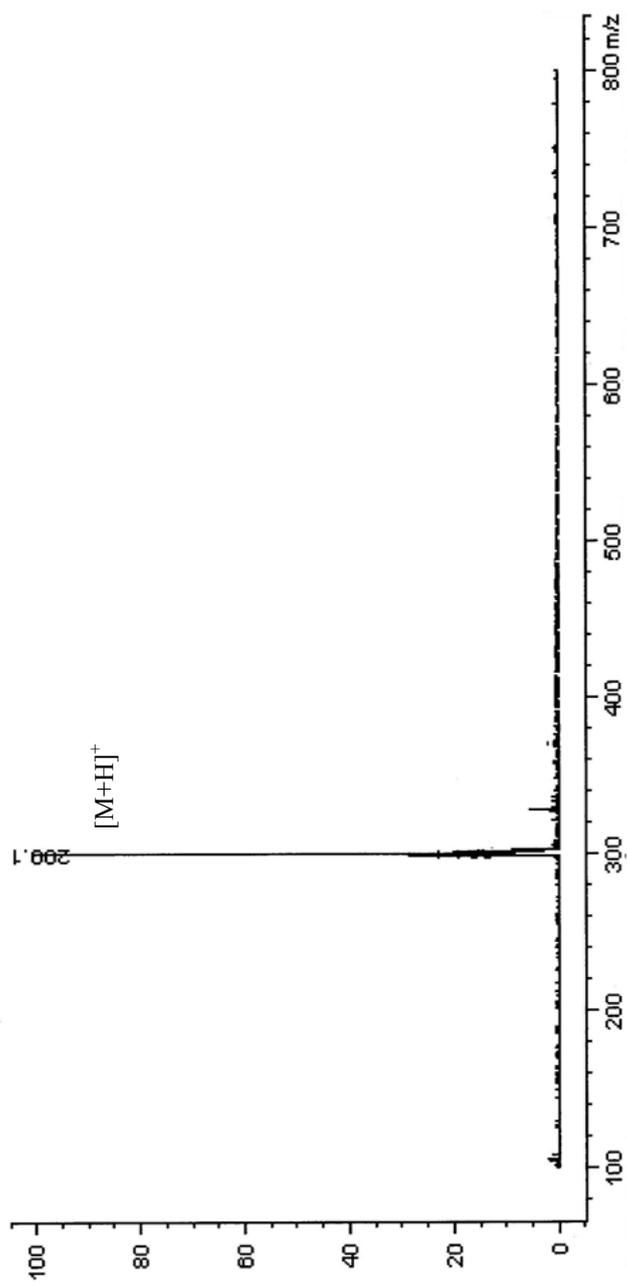


Figura 44: Spettro ESI MS della 3-*O*-metilmacrosporina (4)

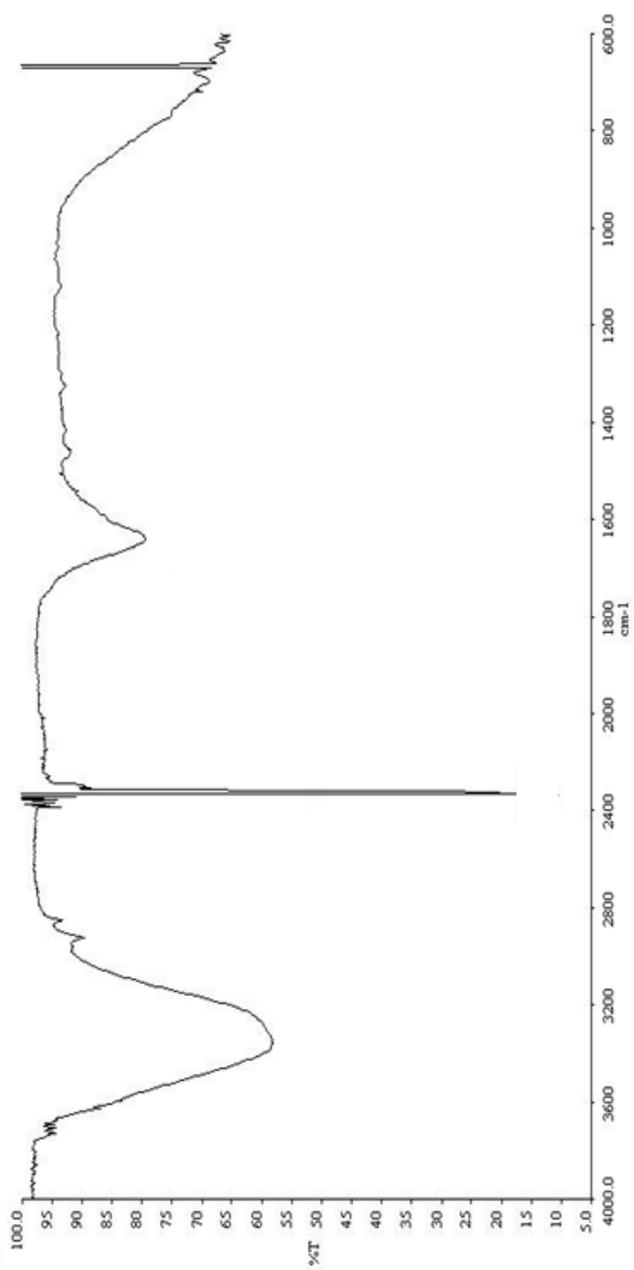


Figura 45: Spettro IR della 3-*O*-metilmacrosporina (4) registrato come film liquido

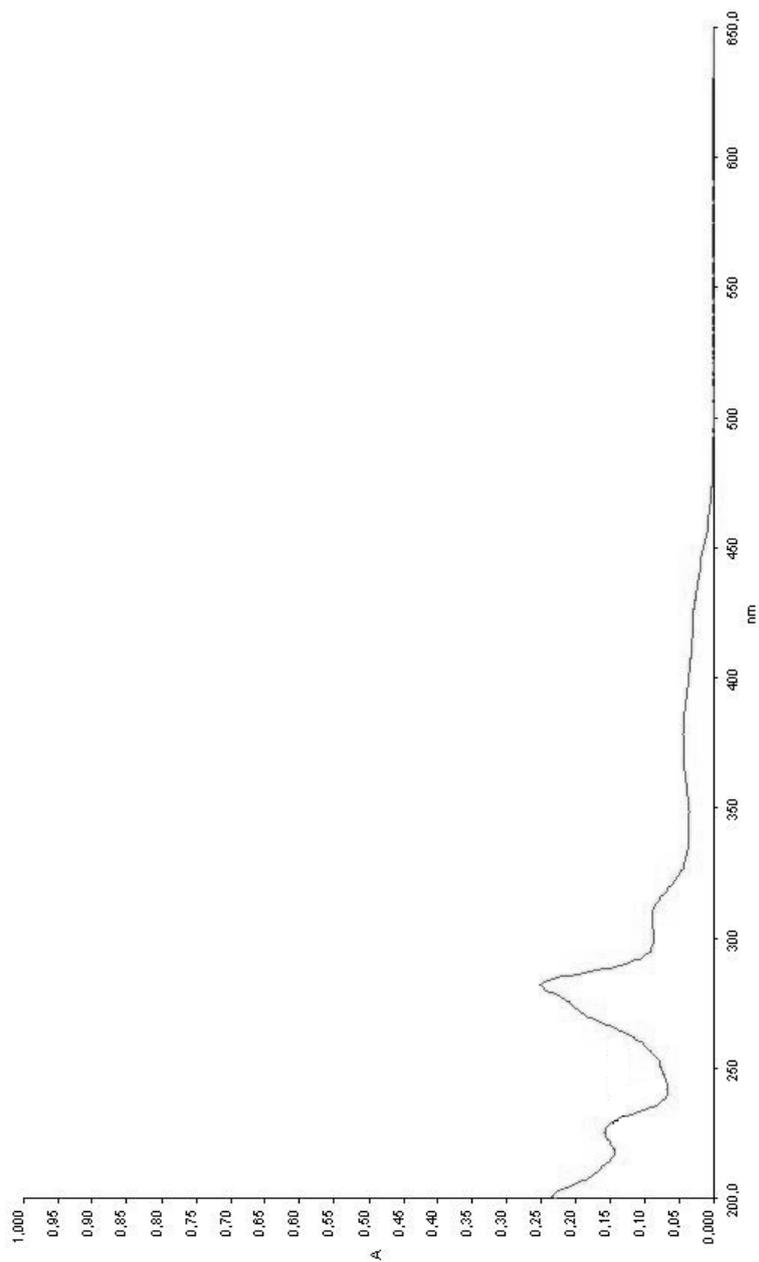


Figura 46 Spettro UV della 3-*O*-metilmacrosporina (4)

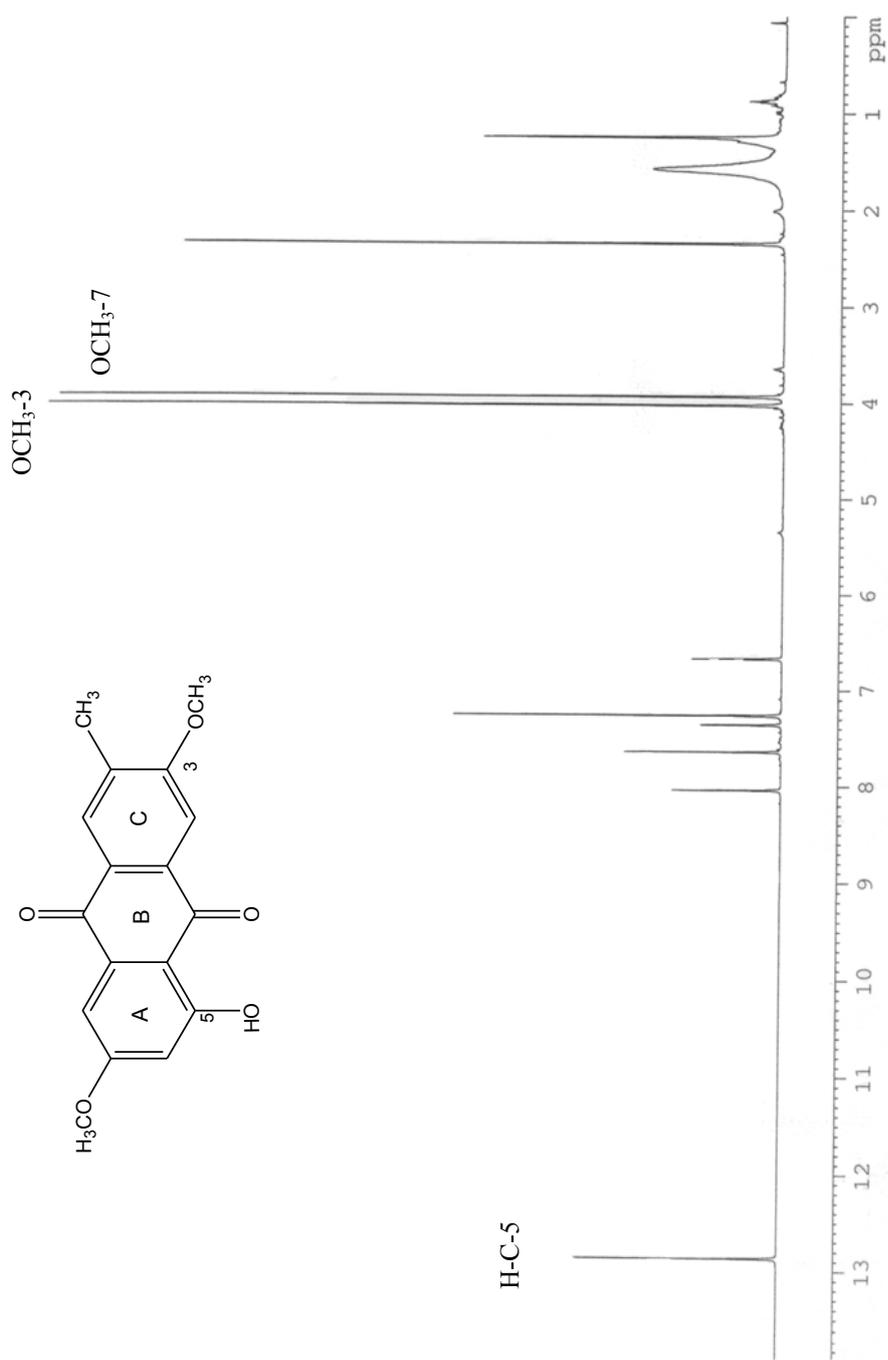


Figura 47: Spettro <sup>1</sup>H NMR della 3-O-metilmacrosporina (4) registrato a 600 MHz

in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v

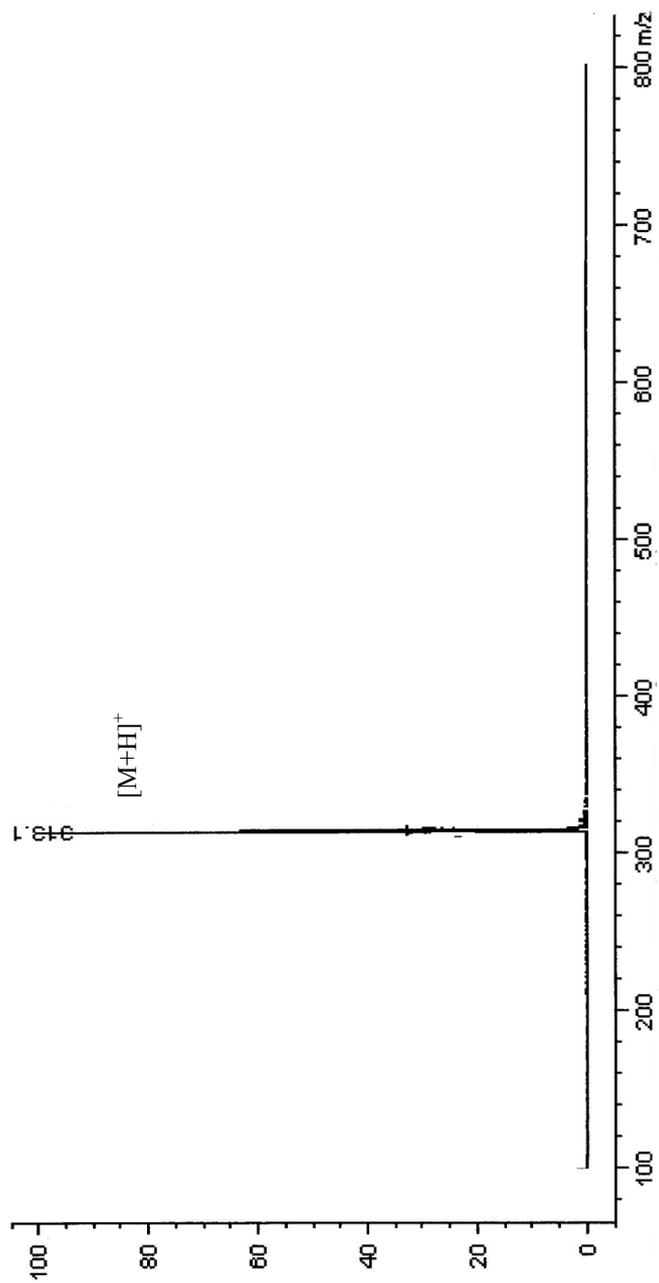


Figura 48 :Spettro IESI MS della 3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (5)

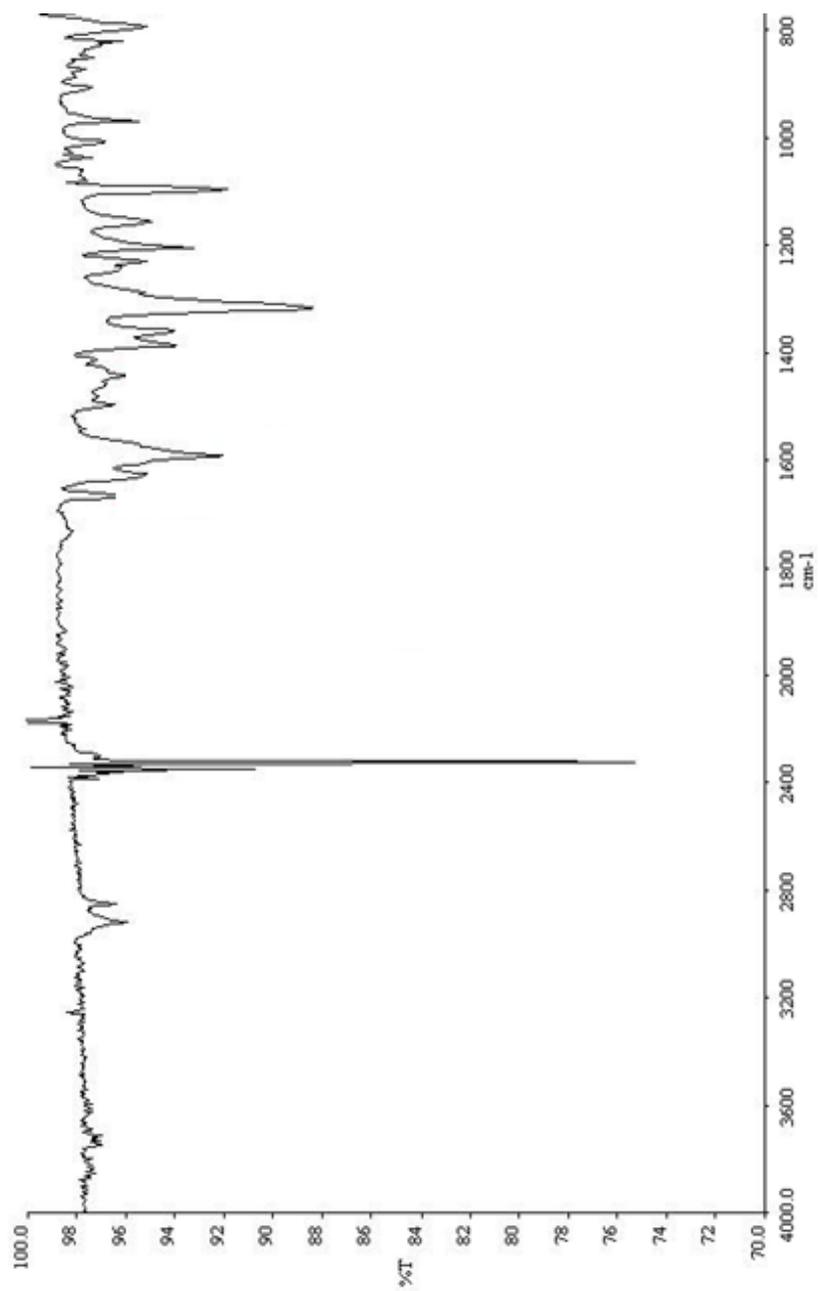


Figura 49: Spettro IR della 3,5-*O,O'*-dimethylmacrosporina (5) registrato come film liquido

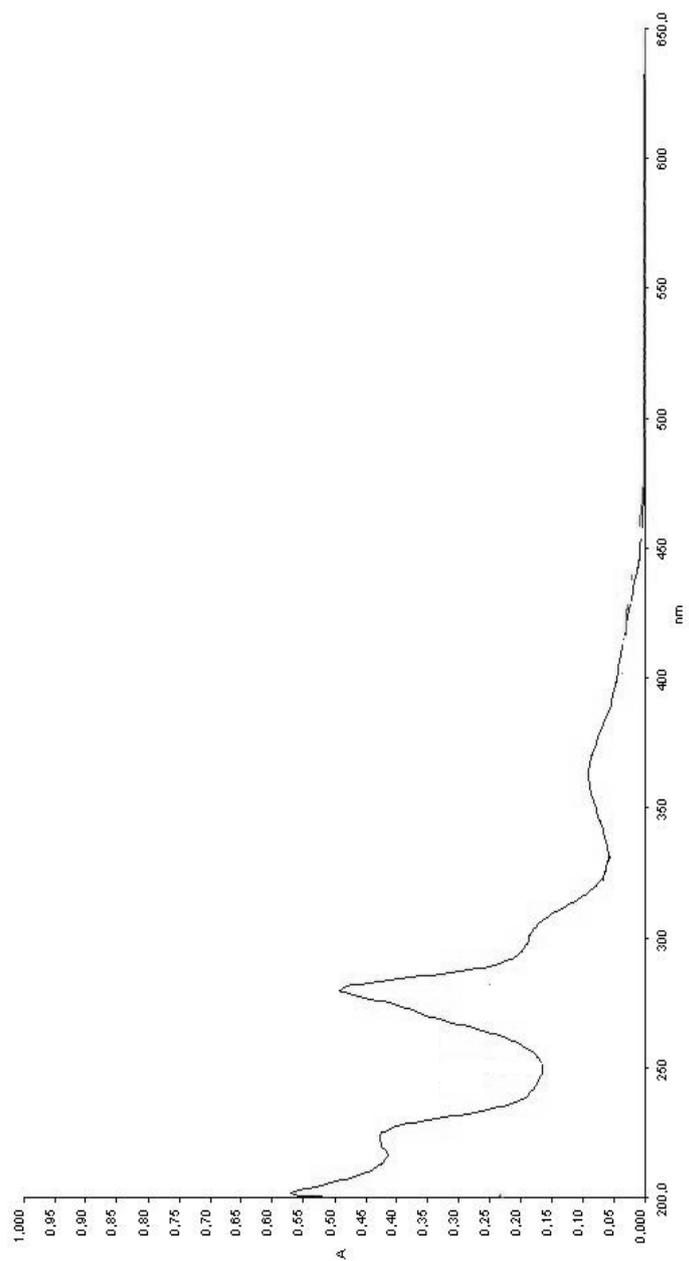


Figura 50: Spettro UV della 3,5-O,O'-dimethylmacrosporina (5)

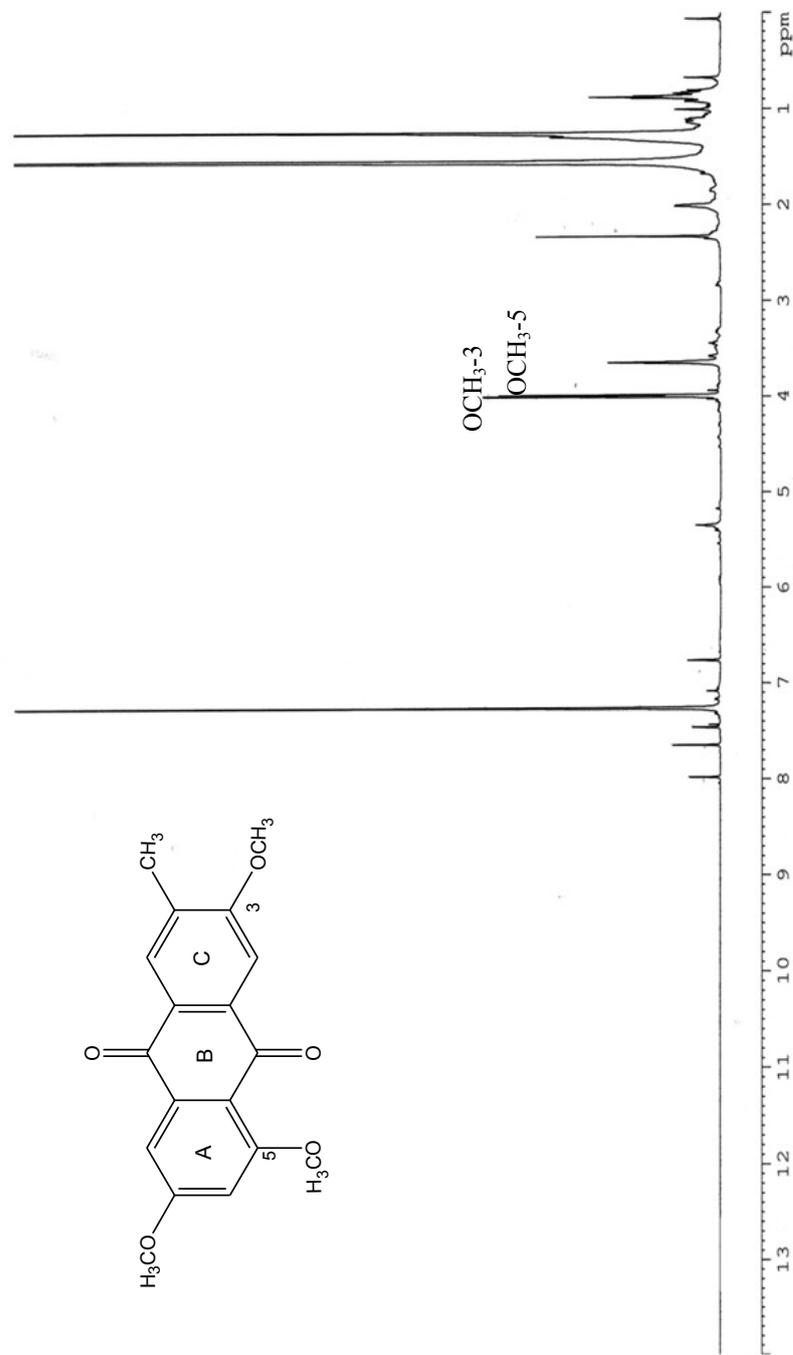
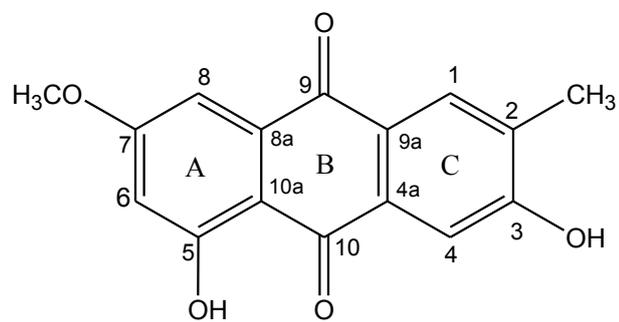
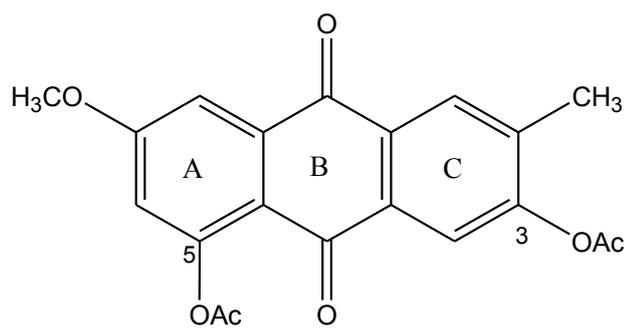
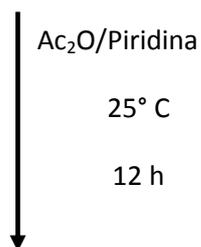


Figura 51: Spettro <sup>1</sup>H NMR della 3,5-*O,O'*-dimetilmacrosporina (5) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v



macrosporina (3)



3,5-O,O'- diacetylmacrosporina (6)

Figura 52: Reazione di acetilazione della macrosporina (3)

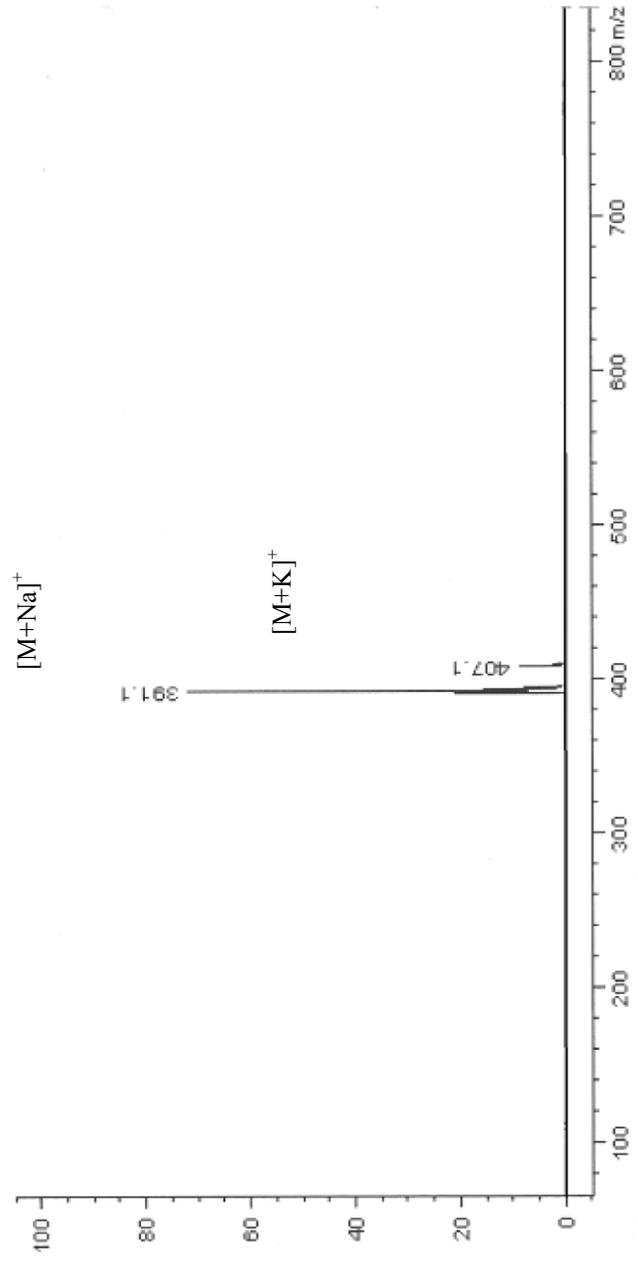


Figura 53: Spettro ESI MS della 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (**6**)

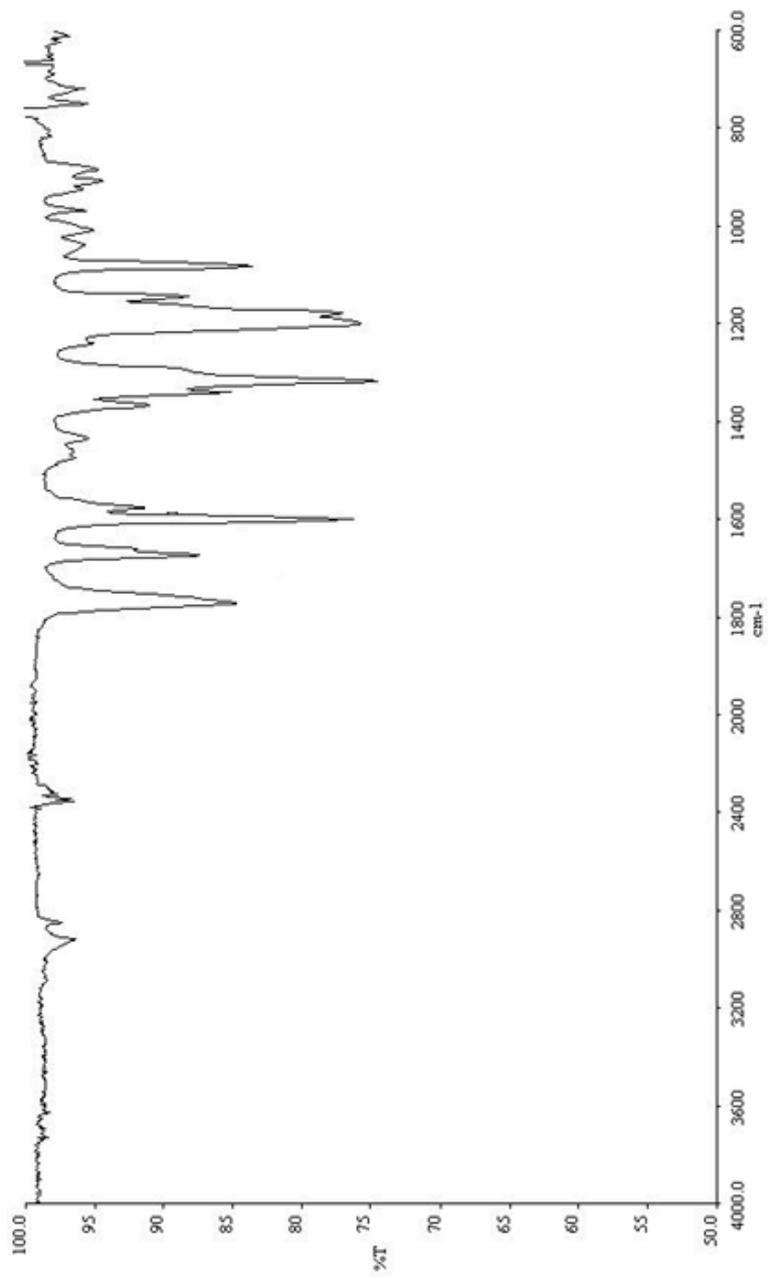


Figura 54: Spettro IR della 3,5-*O,O'*-diacetilmacrosporina (6) registrato come film liquido

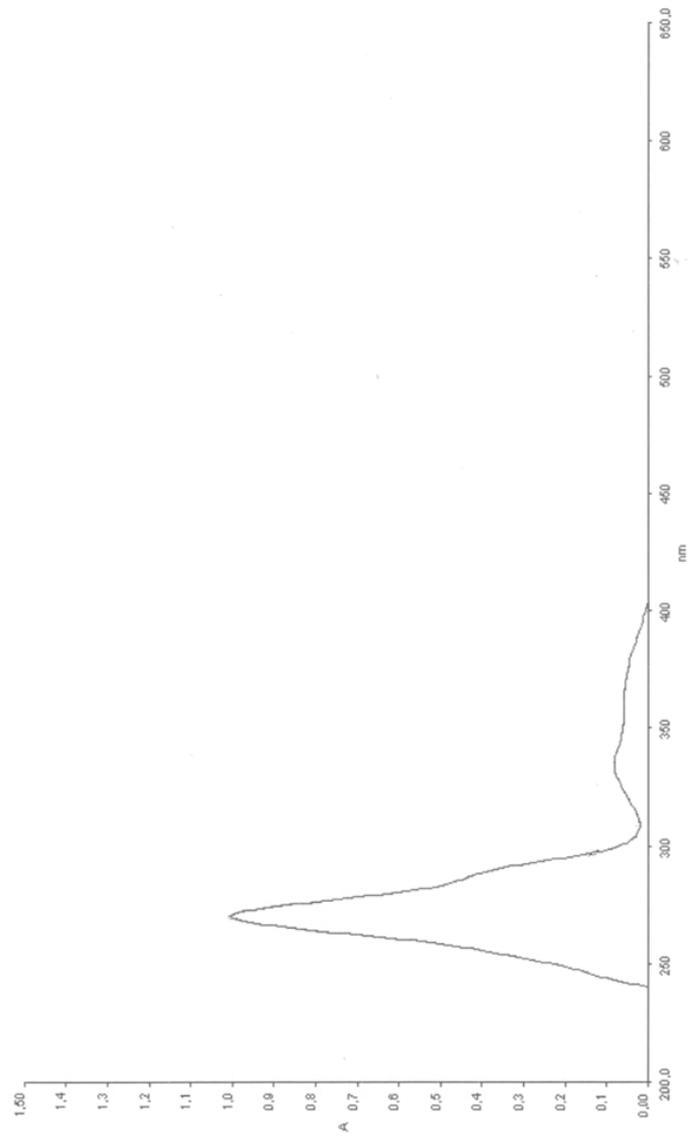


Figura 55: Spettro UV della 3,5-O,O'-diacetylmacroporina (6)

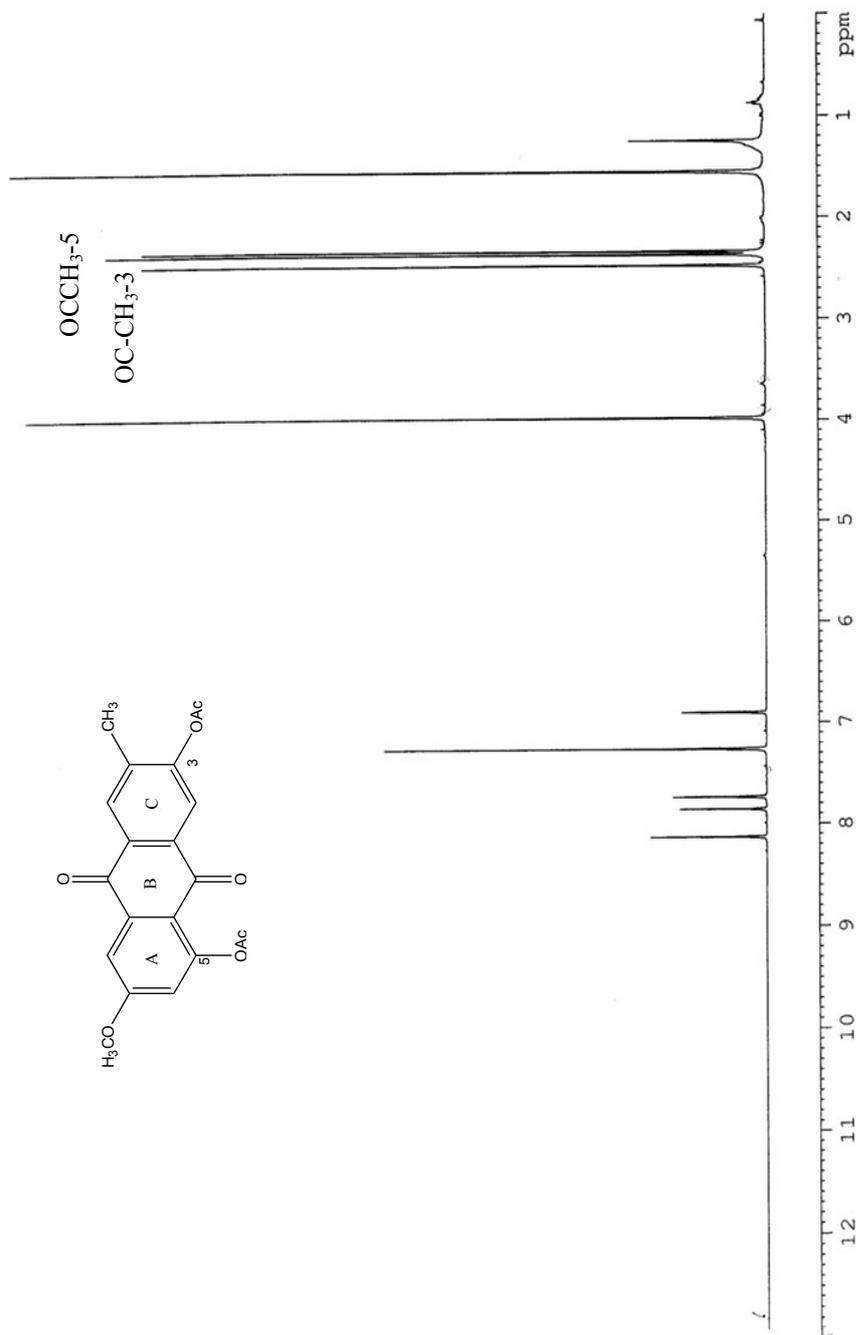
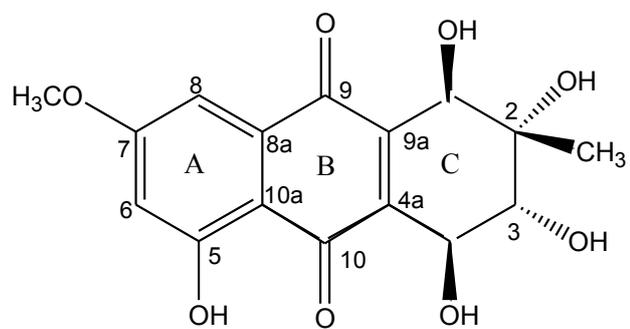


Figura 56: Spettro  $^1\text{H}$  NMR della 3,5-O,O'-diacetilmacrosporina (**6**) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v



7

Figura 57 : Struttura dell'altersolanoloA (7)

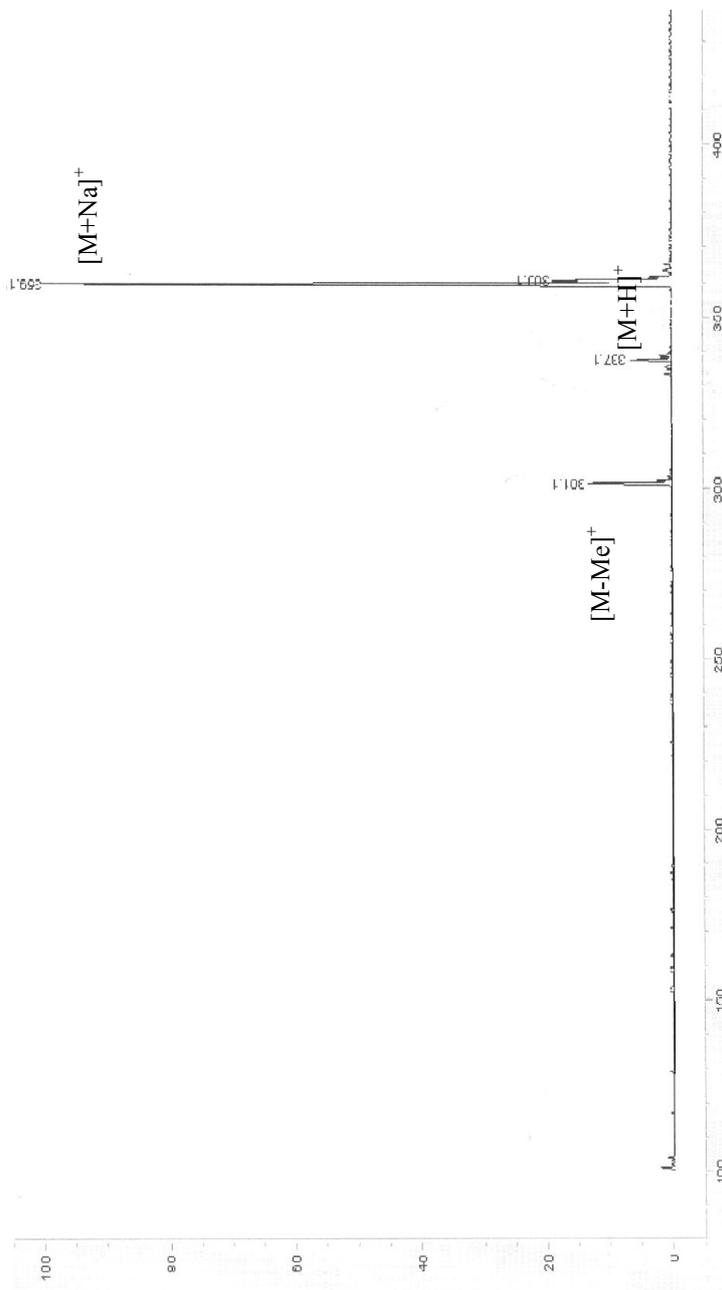


Figura 58: Spettro ESI MS dell'altersolanolo A (7)

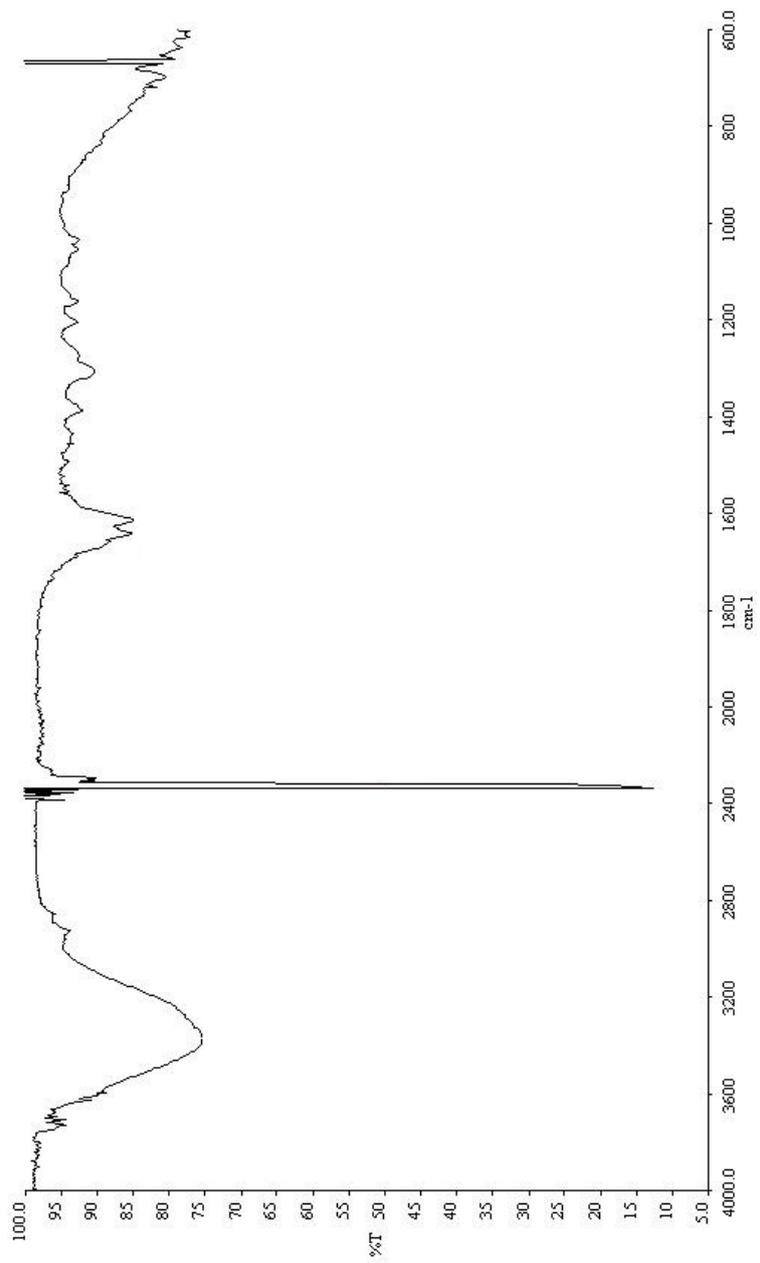


Figura 59: Spettro IR dell'altersolanolo A (7) registrato come film liquido

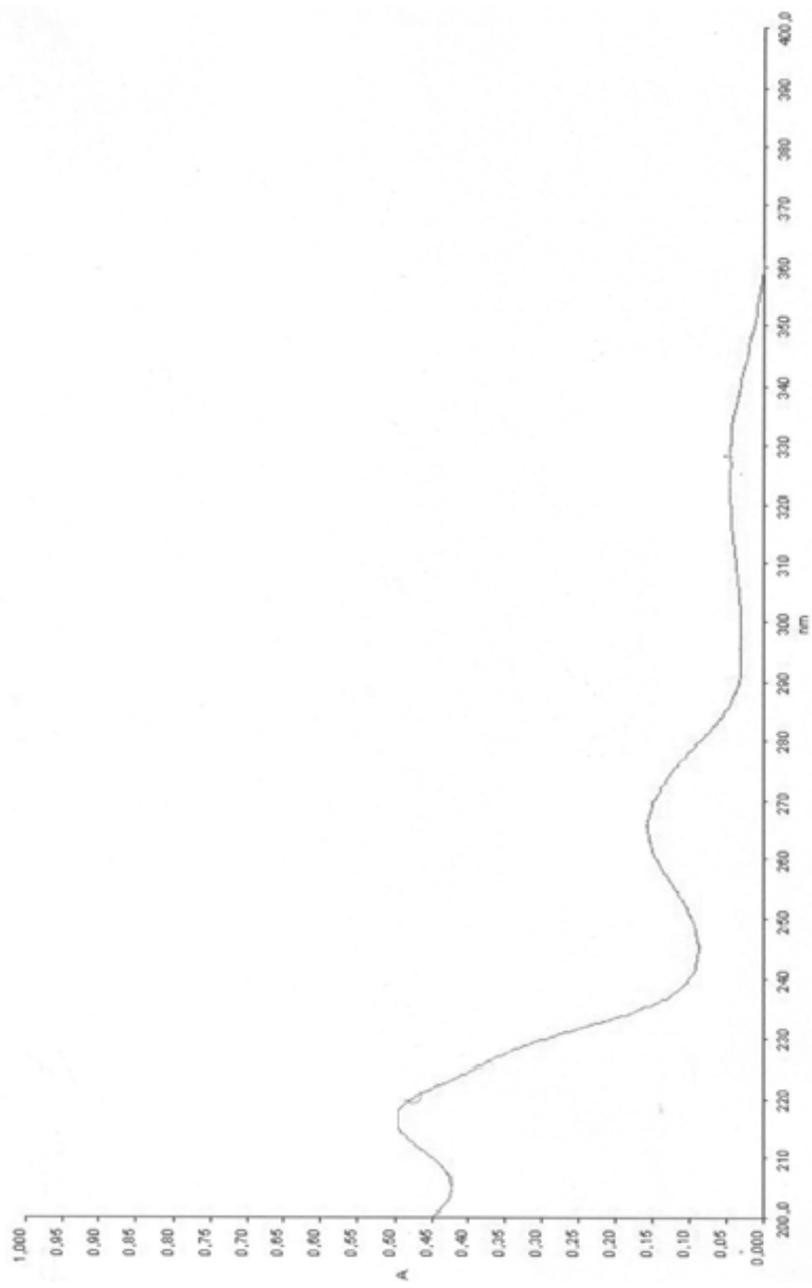


Figura 60: Spettro UV dell'altersolanolo A (7)

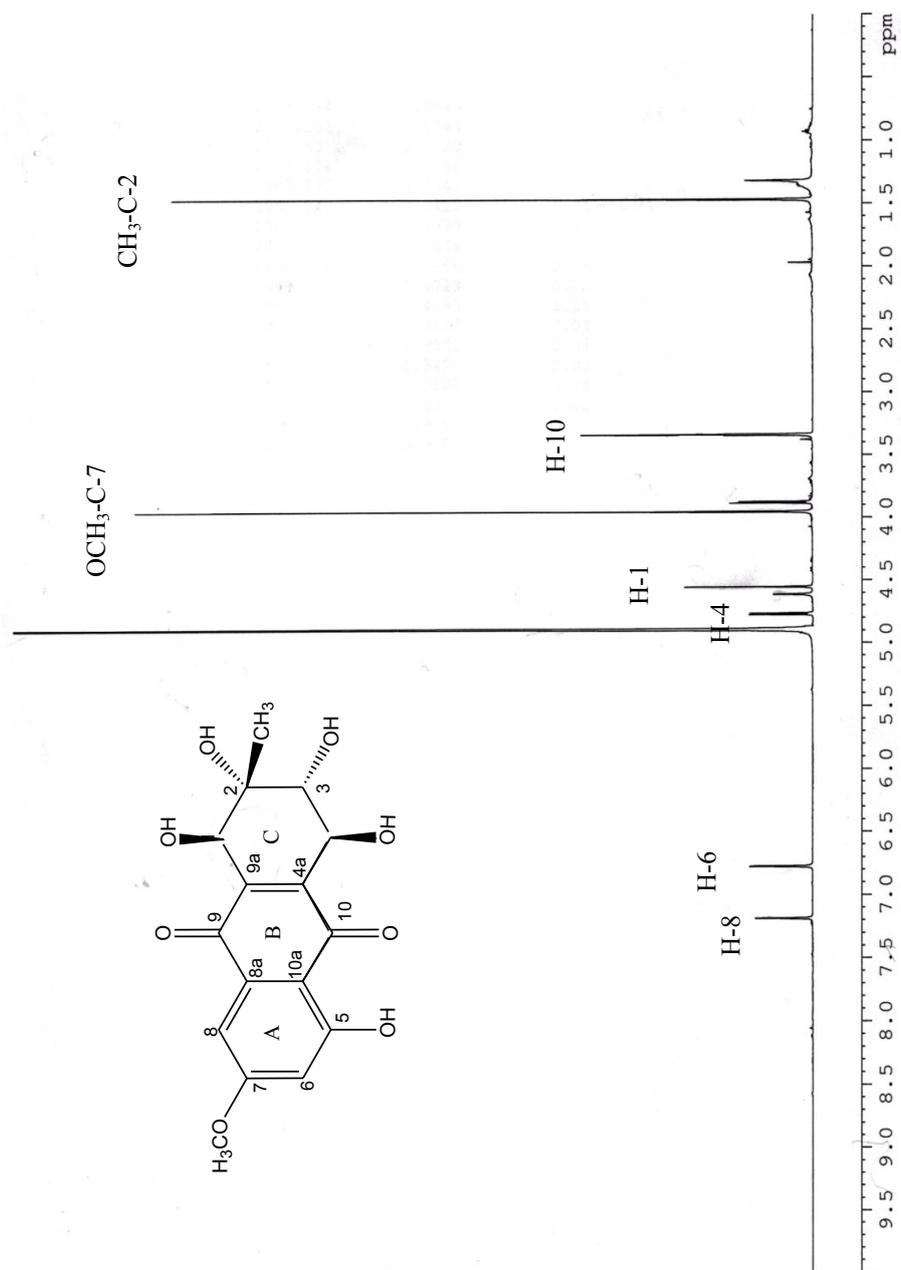


Figura 61: Spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'altersolanolo A (7) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

**Tabella 3: dati  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR dell'altersolanolo J <sup>a,b</sup>**

Position	$\delta\text{C m}$	$\delta\text{H}$	HMBC
1	70,3d	4,55 s	$\text{CH}_3\text{-2}$
2	74,6s		H-1, $\text{CH}_3\text{-2}$
3	75,3d	3,88 d ( $J= 7,4$ Hz)	H-4
4	70,7d	4,77 d ( $J= 7,4$ Hz)	H-3
4a	145s		H-1
5	165,6s		H-6
6	106,8d	6,77 d ( $J= 1,2$ Hz)	H-8
7	167,8s		H-8, H-6, $\text{OCH}_3\text{-7}$
8	108,5d	7,19 d ( $J= 1,2$ Hz)	H-6
8a	133,5s		H-8
9	185s		H-1, H-8
9a	143,4s		H-4, H-1, $\text{CH}_3\text{-2}$
10	190,4d		H-4
10a	111,7s		
$\text{CH}_3\text{-2}$	22,3q	1,25	
$\text{OCH}_3\text{-7}$	56,7q	3,95	

<sup>a</sup>chemical shifts sono calcolati in  $\delta$  (ppm) rispetto al TMS.

<sup>b</sup>2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (COSY)  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  (HSQC) NMR hanno delineato le correlazioni dei protoni e dei corrispondenti atomi di carbonio.

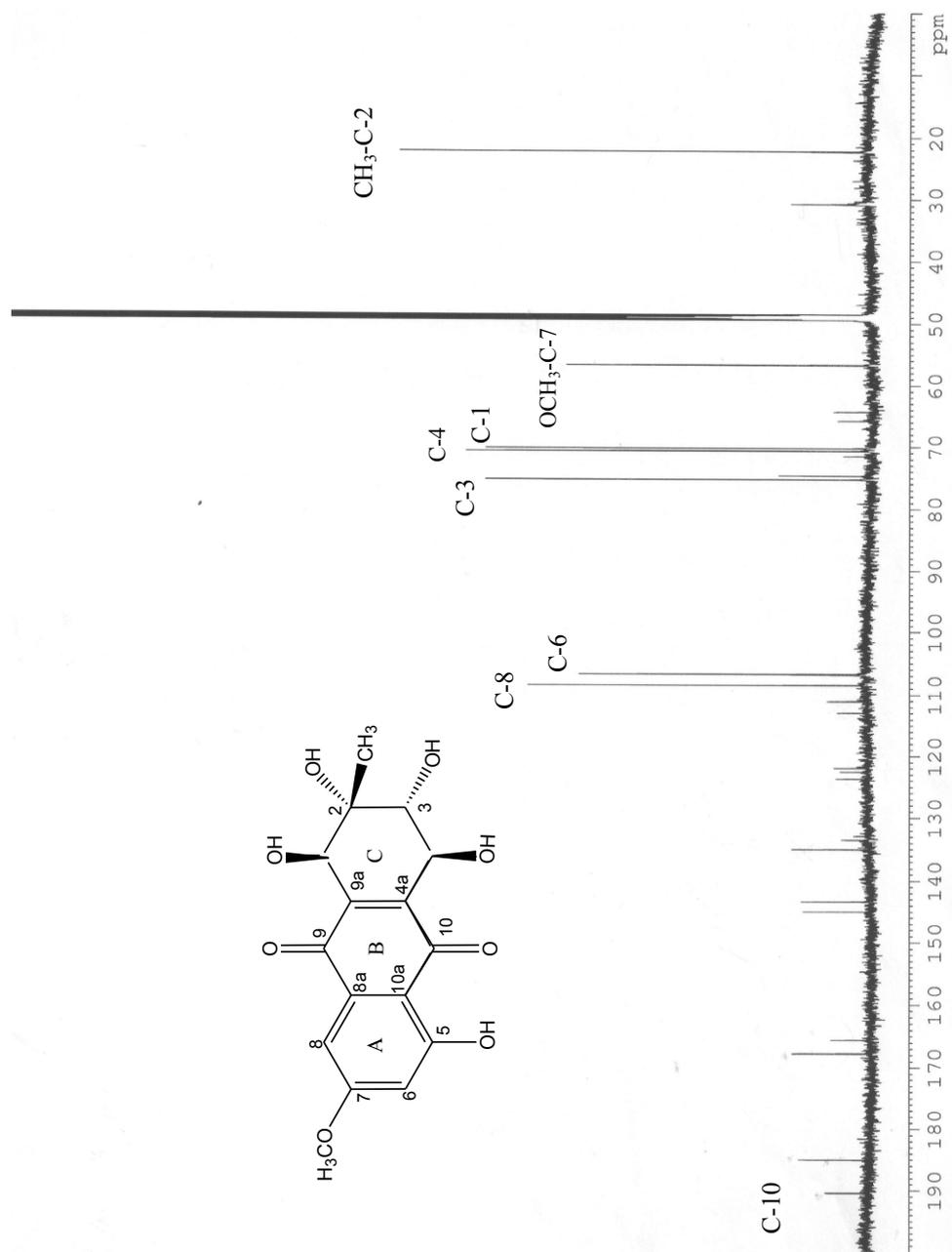


Figura 62: Spettro  $^{13}\text{C}$  dell'altersolanolo A (7) registrato a 150 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

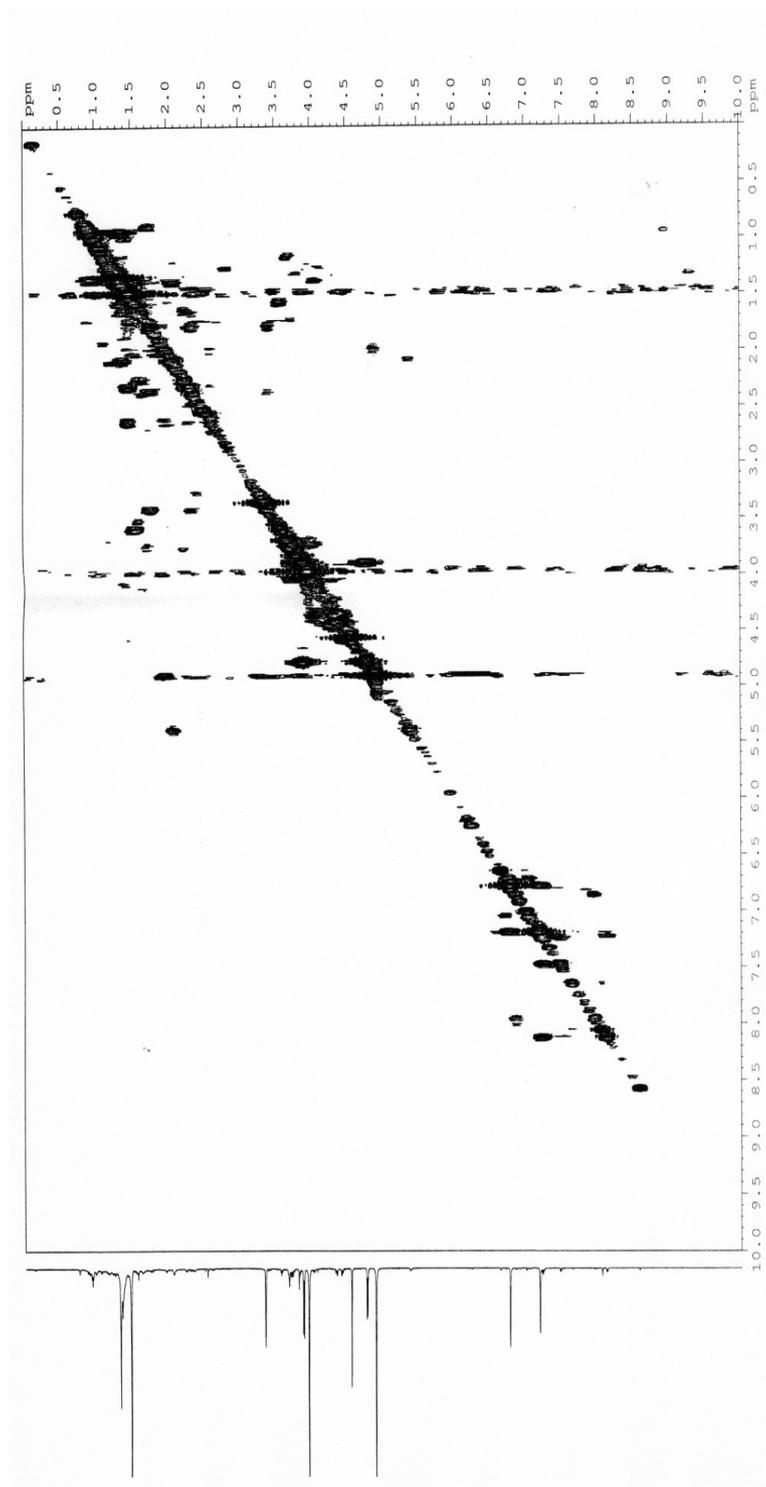


Figura 63: Spettro COSY dell'altersolanolo A (7) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

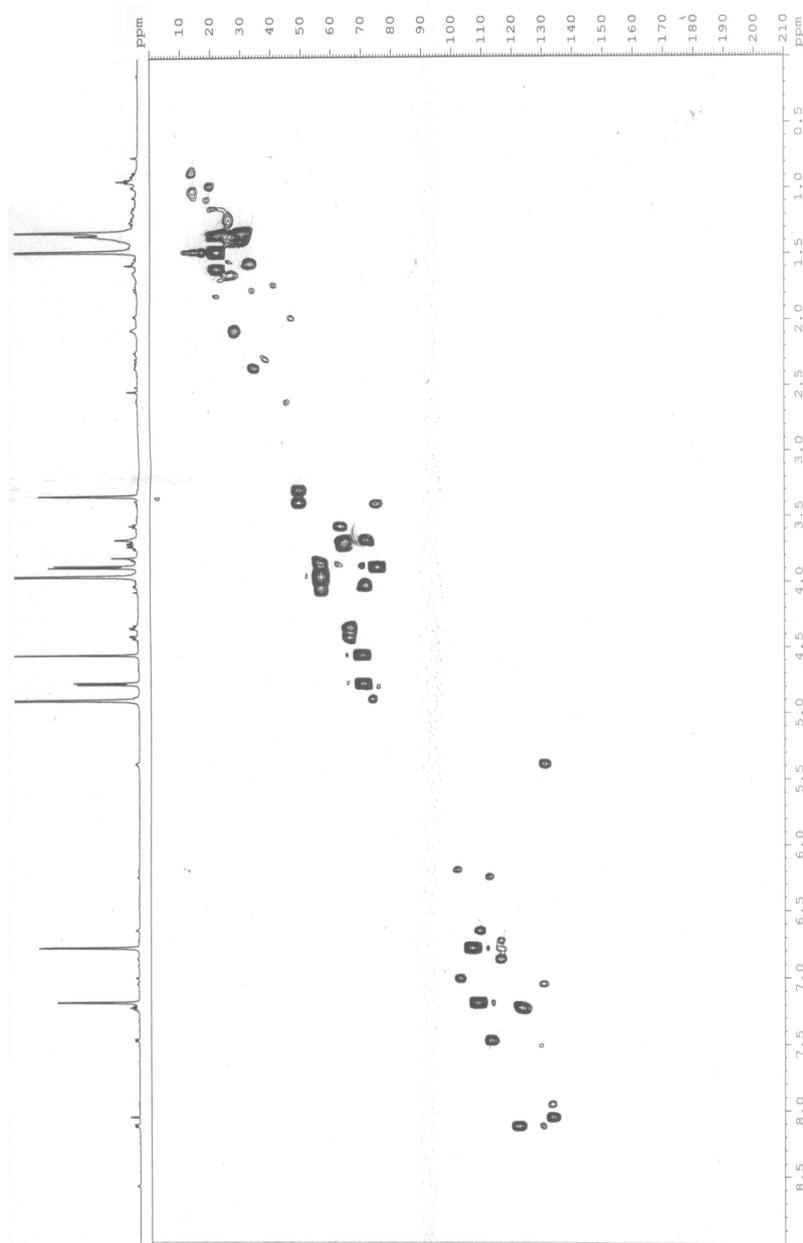


Figura 64: Spettro HSQC dell'alterosolanolo A registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

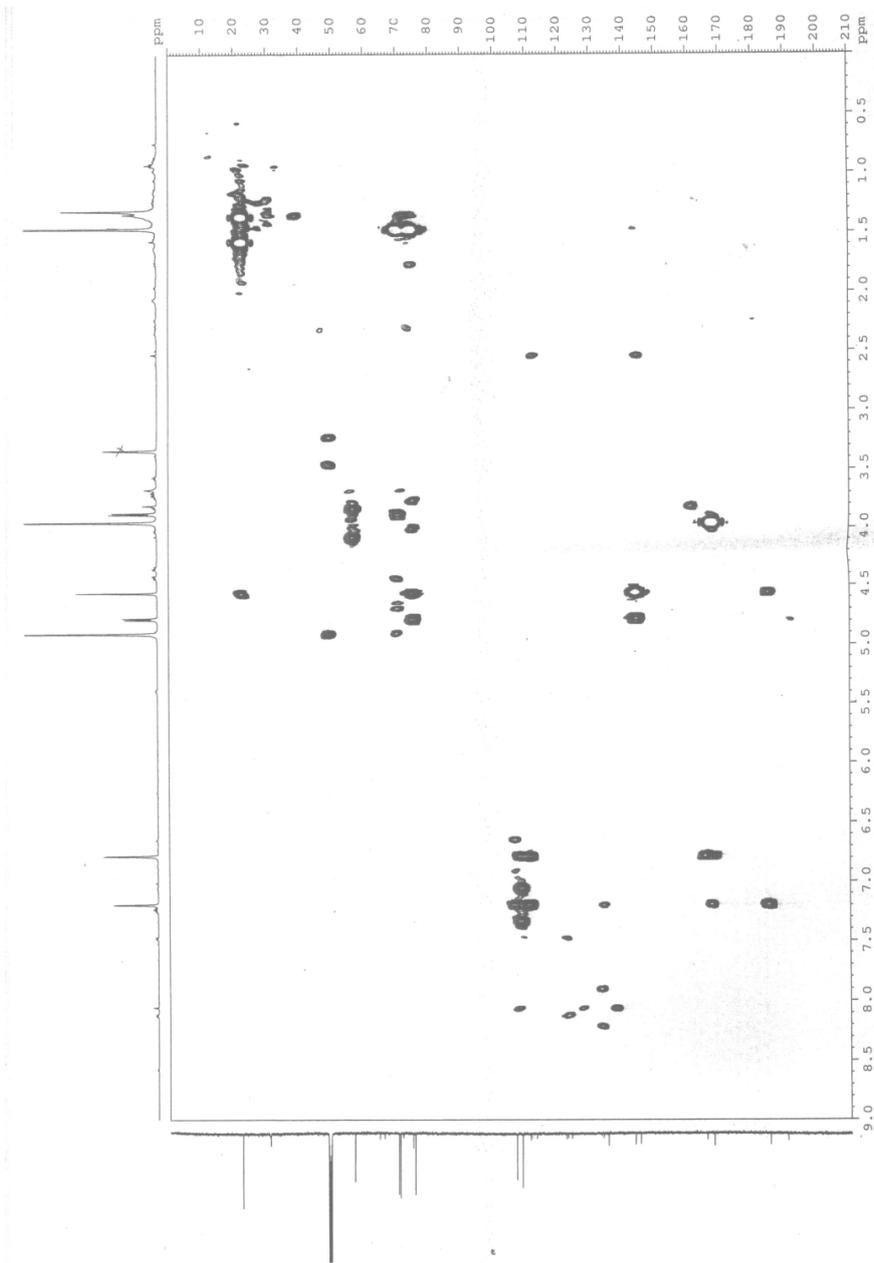


Figura 65: Spettro HMBC dell'altersolanolo A (7) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

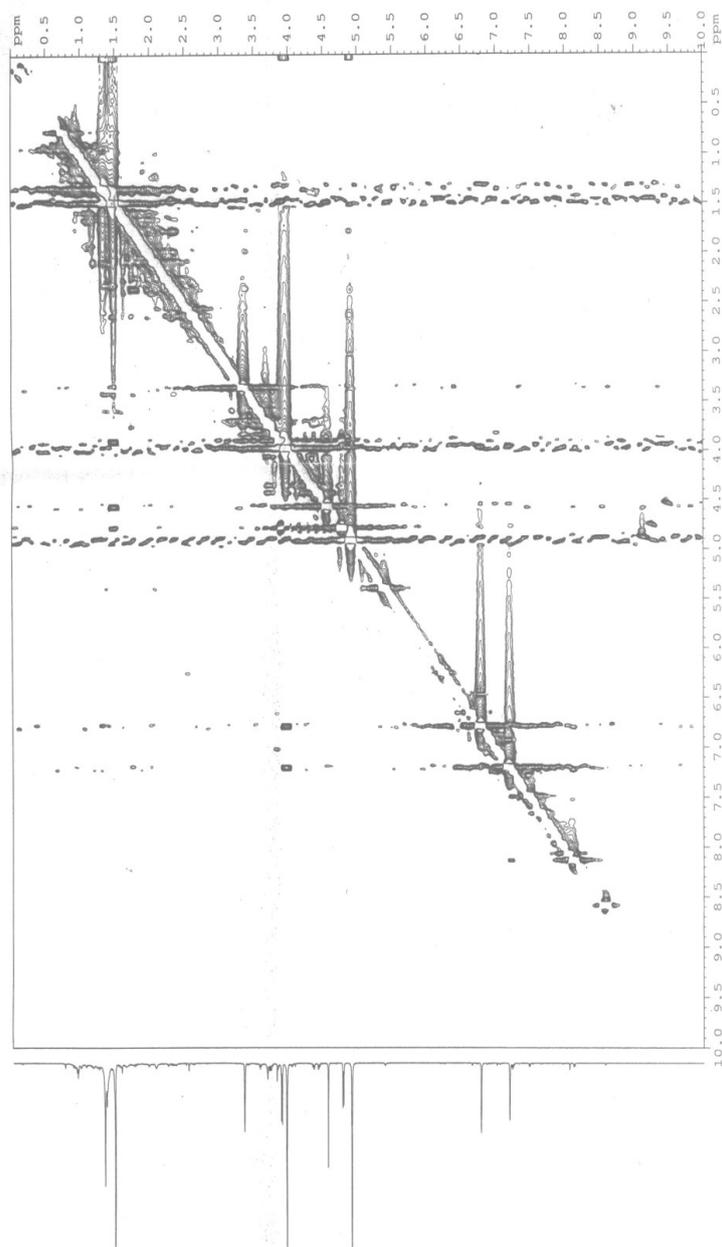
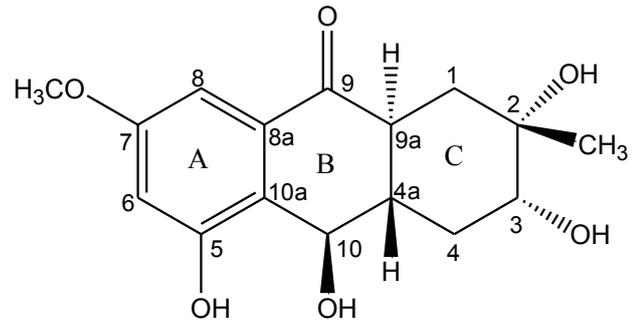


Figura 66: Spettro NOESY dell'altersolanolo A (7) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v



8

Figura 67 : Struttura dell'altersolanolo J (8)

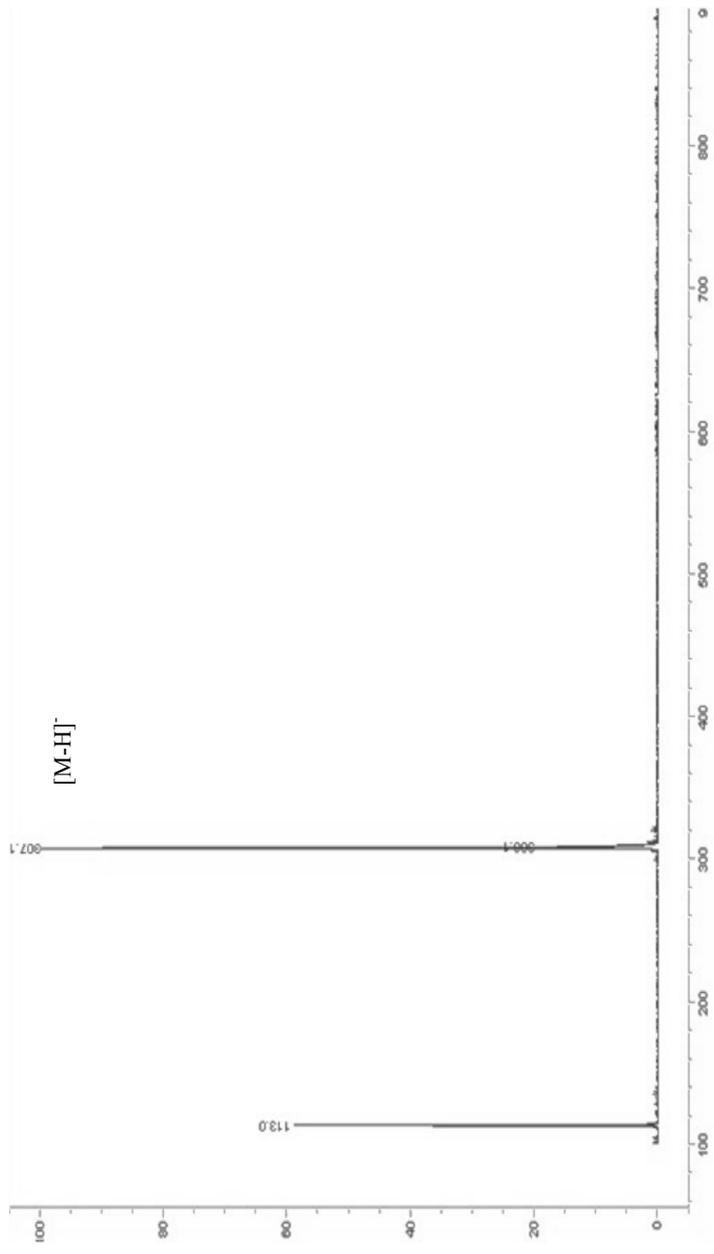


Figura 68: Spettro ESI MS dell'altersolanolo J (8)

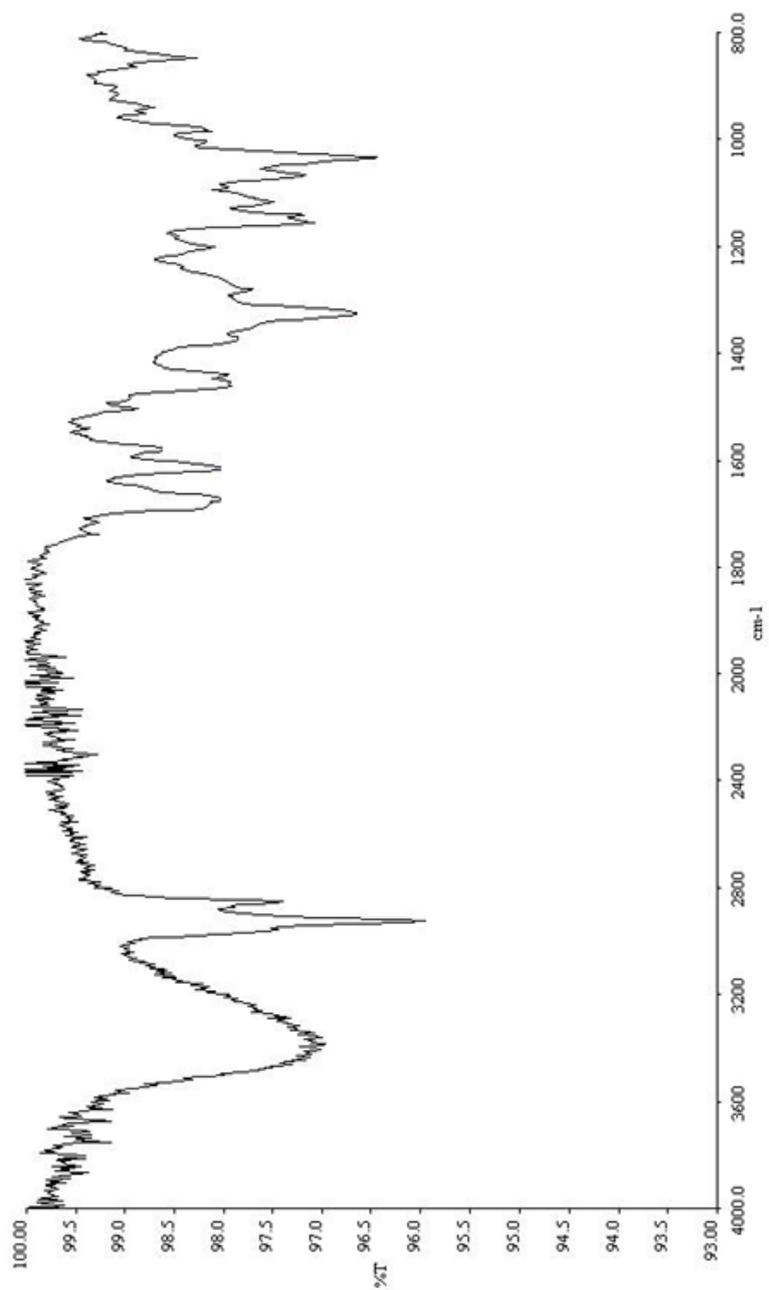


Figura 69: Spettro UV dell'altersolanolo J (8)

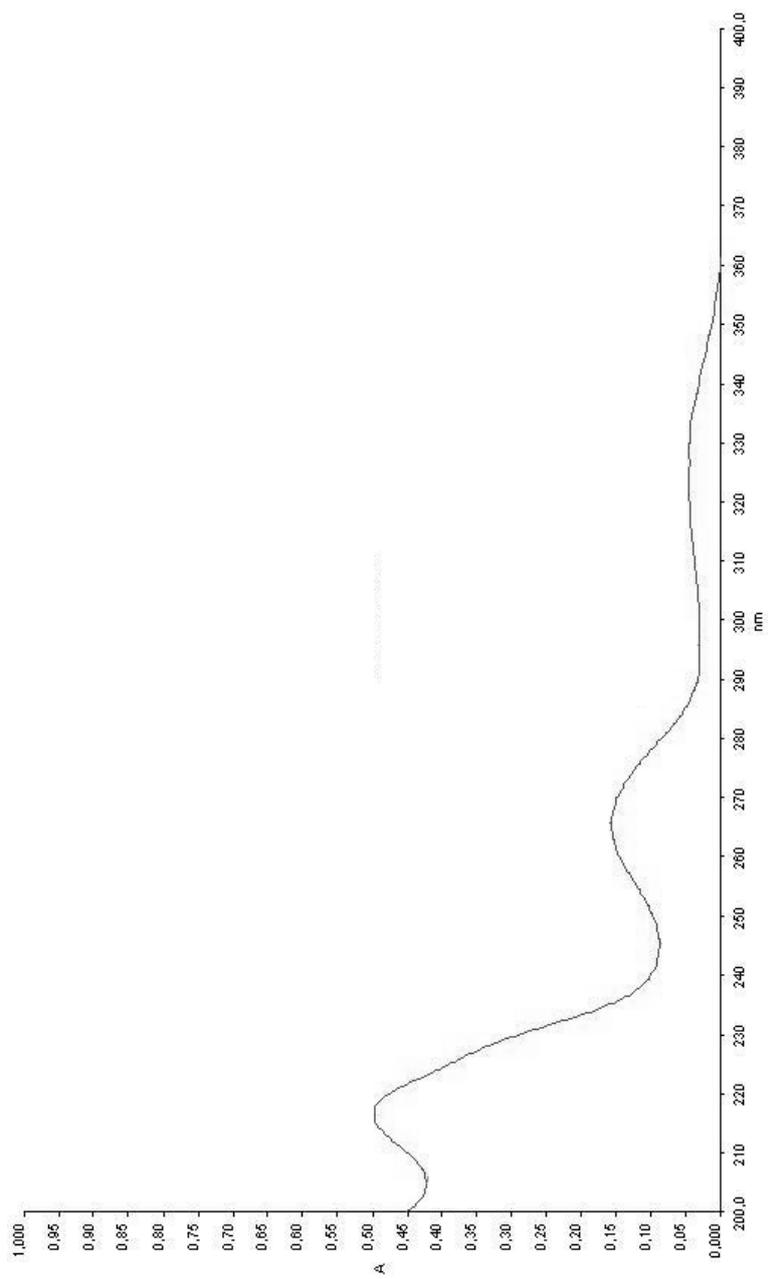


Figura 70: Spettro UV dell'altersolanolo J (8)

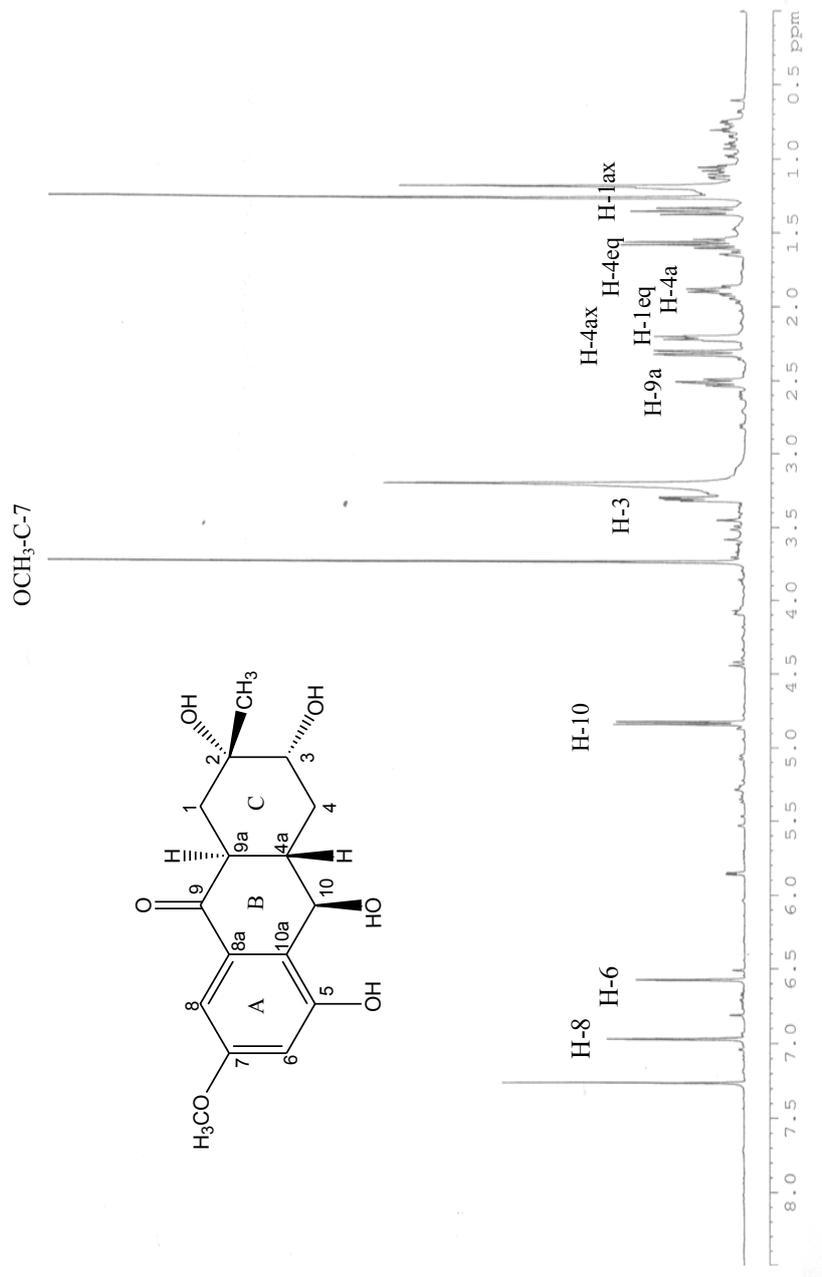


Figura 71: Spettro <sup>1</sup>H NMR dell'altersolanolo J (8) registrato a 150 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v

**Tabella 4: dati  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR dell'altersolanolo J <sup>a,b</sup>**

Positior	$\delta\text{C m}$	$\delta\text{H}$	HMBC
1 <sub>ax</sub>	37,0 t	1,36 dd ( $J= 14,5, 12,4$ Hz)	H-9a, CH <sub>3</sub> -2
1 <sub>eq</sub>		2,31 dd ( $J= 14,5, 3,6$ Hz)	
2	70,5 s		H-1 <sub>eq</sub> , H-4 <sub>ax</sub> , CH <sub>3</sub> -2
3	73,5 d	3,31 dd ( $J= 4,4, 11,8$ Hz)	H-1 <sub>eq</sub> , H-4 <sub>ax</sub> , CH <sub>3</sub> -2
4 <sub>ax</sub>	32,0 t	2,21 m ( $J= 11,8, 3,8, 4,1$ Hz)	H-10 <sub>ax</sub> , H-4 <sub>eq</sub>
4 <sub>eq</sub>		1,57q ( $J= 11,8$ Hz)	
4a		1,84 m ( $J=12,8, 1,8, 9,7, 3,8$ Hz)	
5	157,4 s		H-6
6	108,5 d	6,57 d ( $J= 2,1$ Hz)	H-8
7	160 s		H-8, H-6, OCH <sub>3</sub> -7
8	101,9 d	6,97 d ( $J= 2,1$ Hz)	H-6
8a	122,2 s		H-8, H-6, H-10 <sub>ax</sub> , H -4a
9	199,0 s		H-8, H-9a, H-1 <sub>ax</sub>
9a	43,7 d	2,5 ddd (12,8,12,4, 3,6 Hz)	H-4 <sub>ax</sub> , H-1 <sub>ax</sub>
10	72,4 d	4,83 d ( $J= 9,7$ Hz)	H-9a, H-4a, H-4 <sub>eq</sub>
10a	132,8 s		H-10 <sub>ax</sub>
CH <sub>3</sub> -C2	26,4 q	1,26	H-1
OCH <sub>3</sub> -C7	55,3 q	3,74 s	

<sup>a</sup> I chemical shifts sono calcolati in  $\delta$  (ppm) rispetto al TMS.

<sup>b</sup>2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (COSY)  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  (HSQC) NMR hanno delineato le correlazioni dei protoni e dei corrispondenti atomi di carbonio

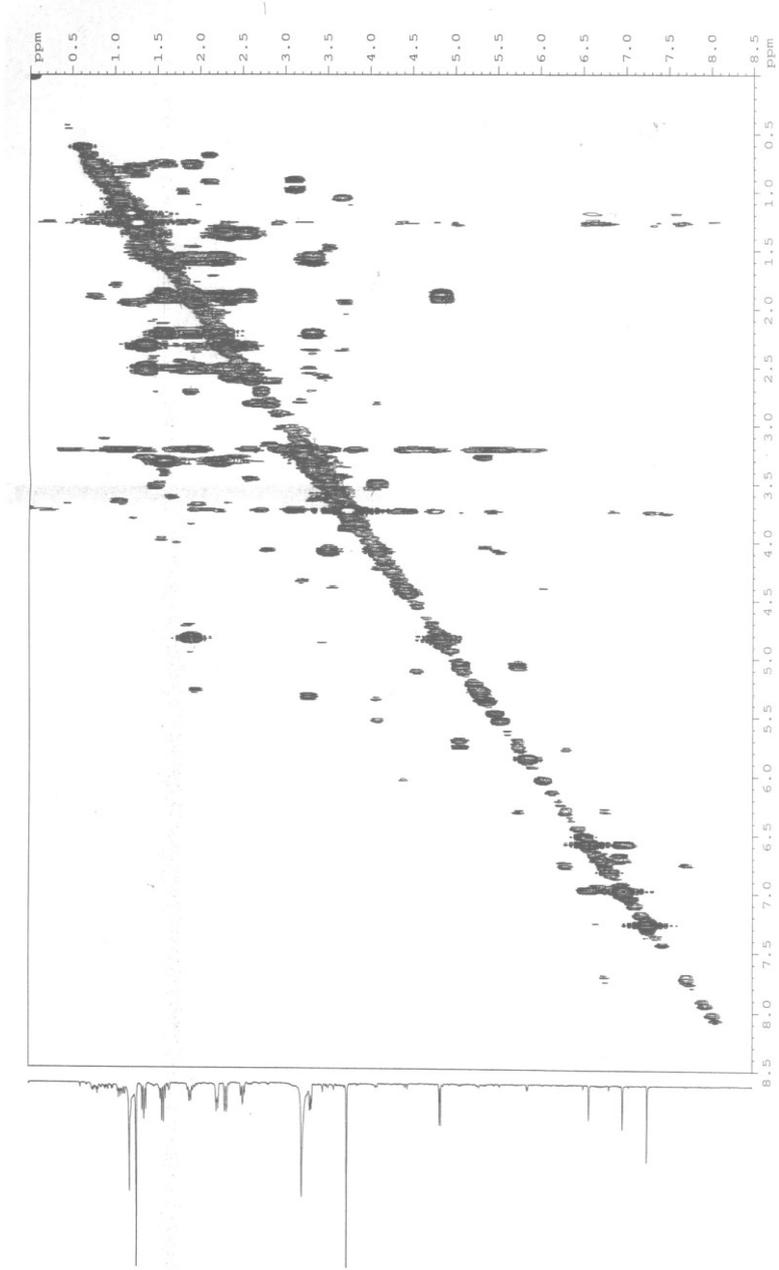


Figura 72: Spettro COSY dell'altersolanolo J (**8**) registrato a 600 MHz in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 95:5 v/v

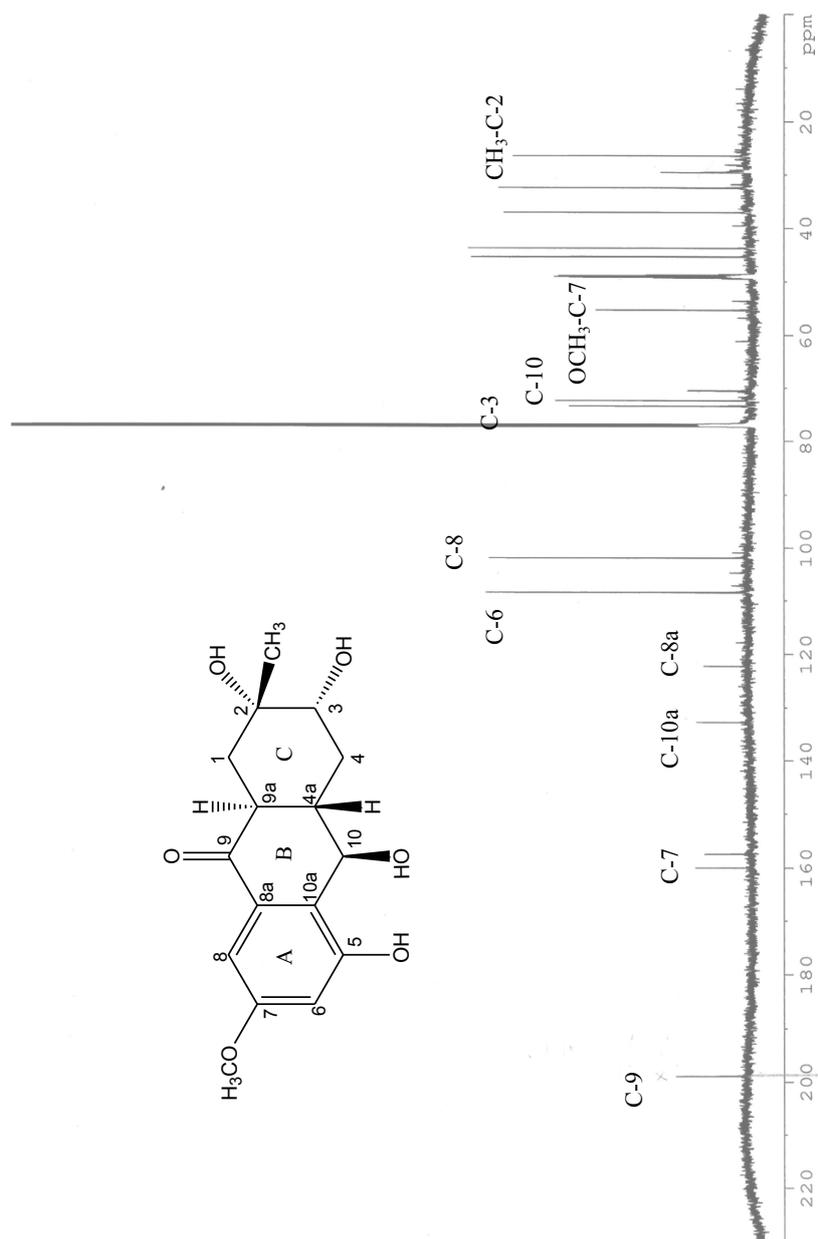


Figura 73: Spettro  $^{13}\text{C}$  NMR dell'altersolanolo J (**8**) registrato a 150 MHz

in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

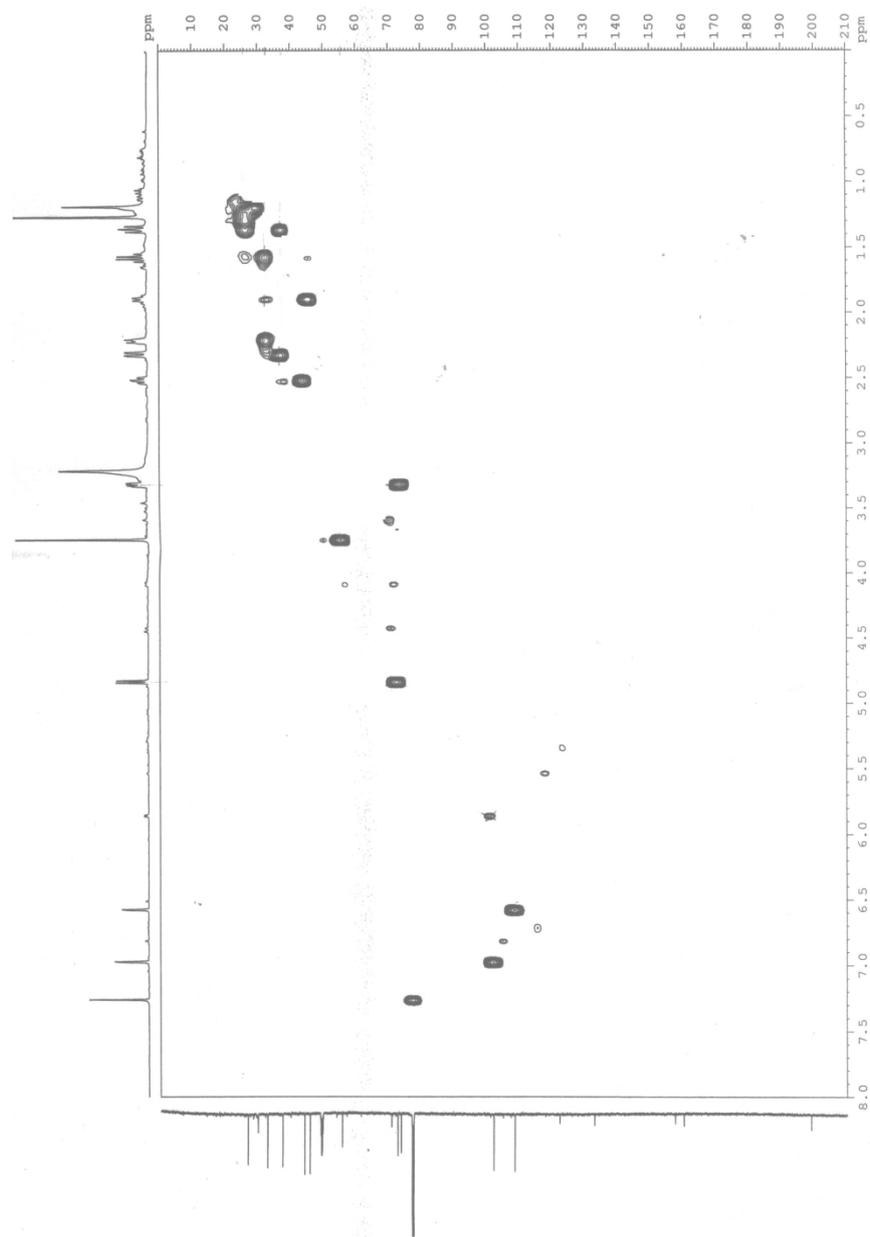


Figura 74: Spettro HSQC dell'altersolanolo J (8) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

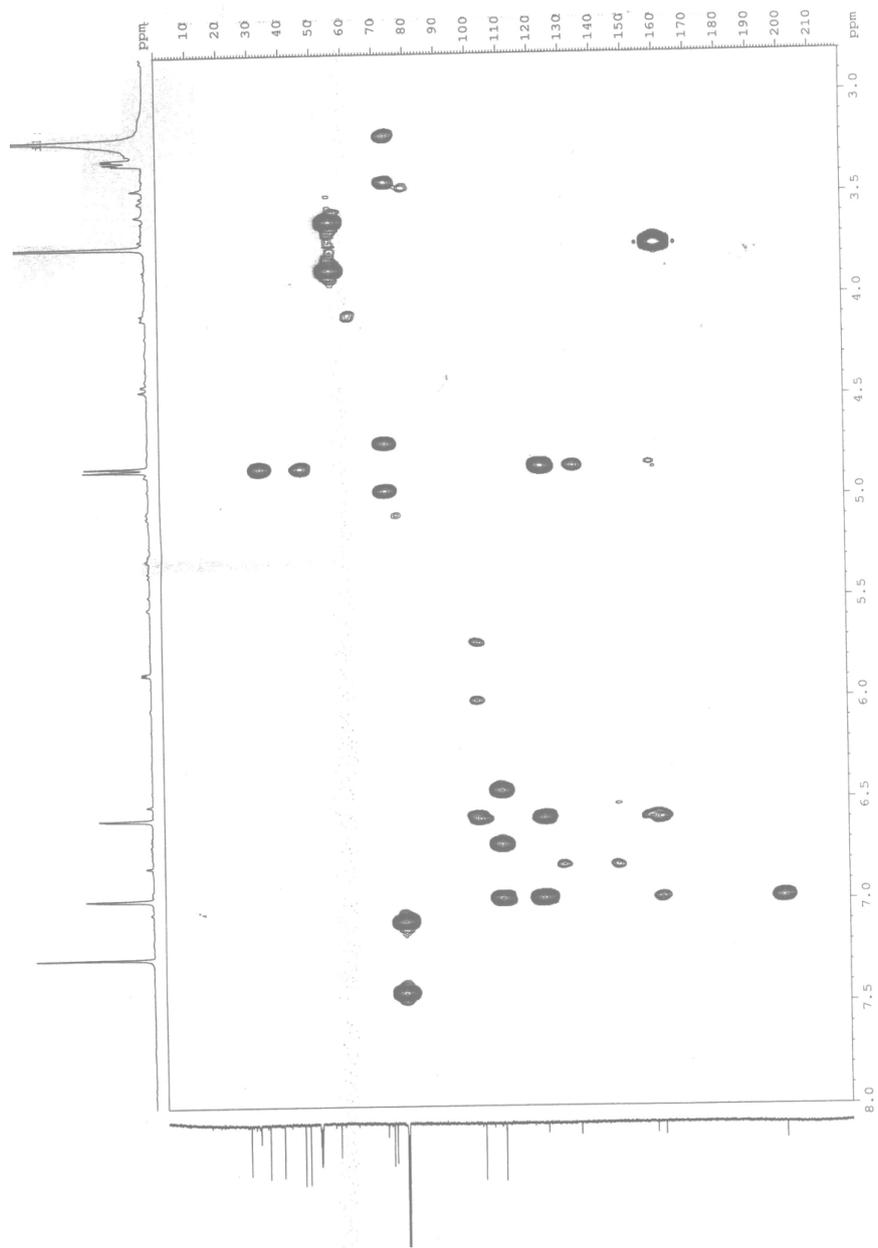


Figura 75: Spettro HMBC dell'altersolanolo J (8) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v

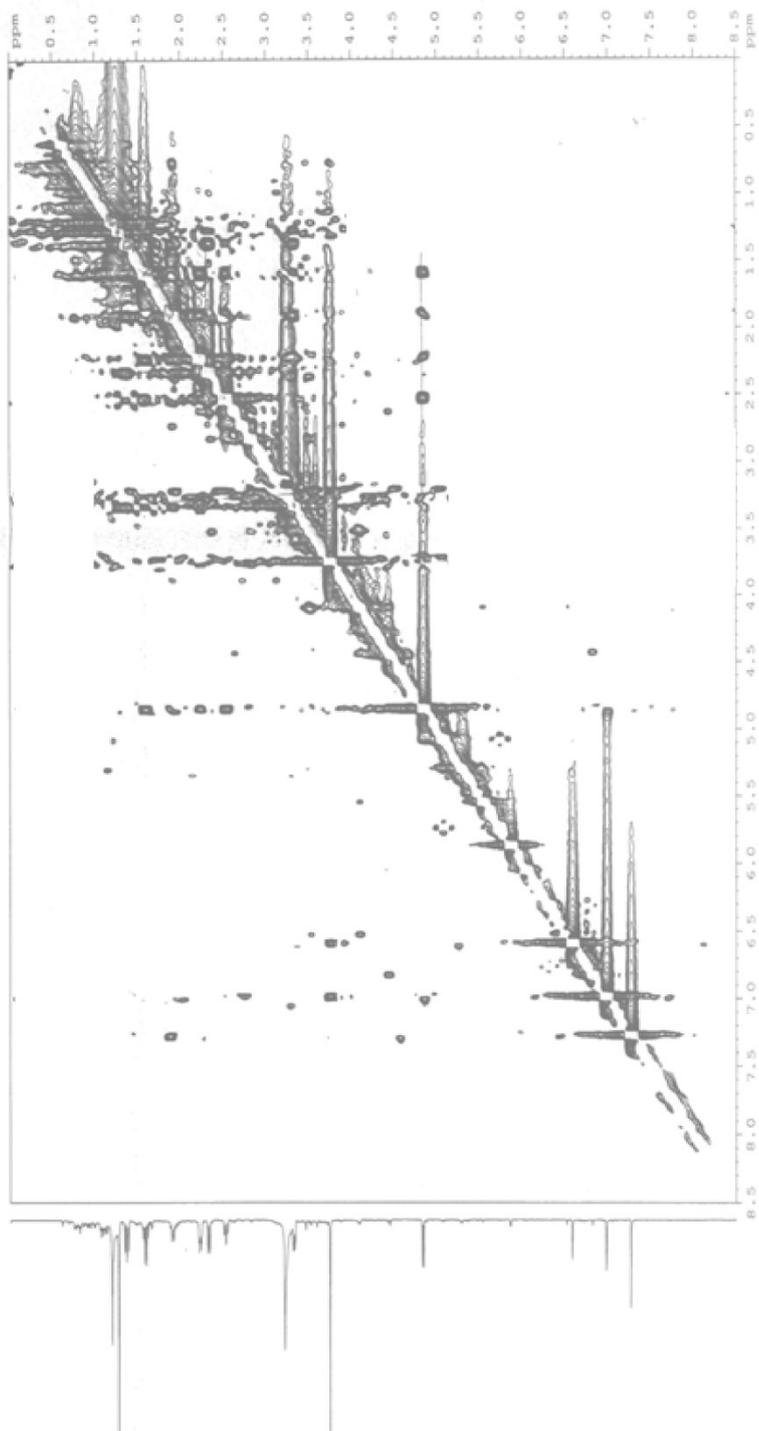


Figura 76: Spettro NOESY dell'altersolanolo J (8) registrato a 600 MHz in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  95:5 v/v



Figura 77: Sintomi indotti dal necriapirone su foglie di pomodoro



Figura 78: Sintomi indotti dall'altersolanolo A su foglie di pomodoro



Figura 79: Sintomi indotti dall'altersolanolo J su foglie di pomodoro

**Tabella 5:** Effetti del nectriapirone, della macrosporina e dell'altersolanolo A e J (**1, 3, 7 e 8**) nel saggio di puntura fogliare su foglie di pomodoro

Composto	Concentrazione [M]	Tossicità <sup>a)</sup>
Nectriapirone ( <b>1</b> )	$10,3 \times 10^{-3}$	1
Macrosporina ( <b>3</b> )	$7 \times 10^{-3}$	0
Altersolanolo A ( <b>7</b> )	$6 \times 10^{-3}$	4
Altersolanolo J ( <b>8</b> )	$64 \times 10^{-3}$	3
Controllo <sup>b</sup> negativo	-	0
Controllo <sup>c</sup> positivo		5
Acqua	-	0

<sup>a)</sup> Sono state applicate gocce di 20  $\mu$ L di soluzione. L'attività fitotossica è stata valutata su una scala da 0-4, dove 0 = assenza di lesioni; 1 = lesioni 1-2 mm; 2 = lesioni 3-5 mm; 3 = lesioni 6-7 mm; 4 = lesioni 8-10; 5 = lesioni > 11 mm.

<sup>b)</sup> 3% MeOH in acqua distillata.

<sup>c)</sup> Filtrato colturale.

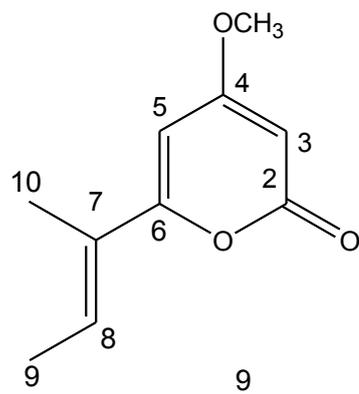


Figura 80: Struttura del pestalopirone (9)

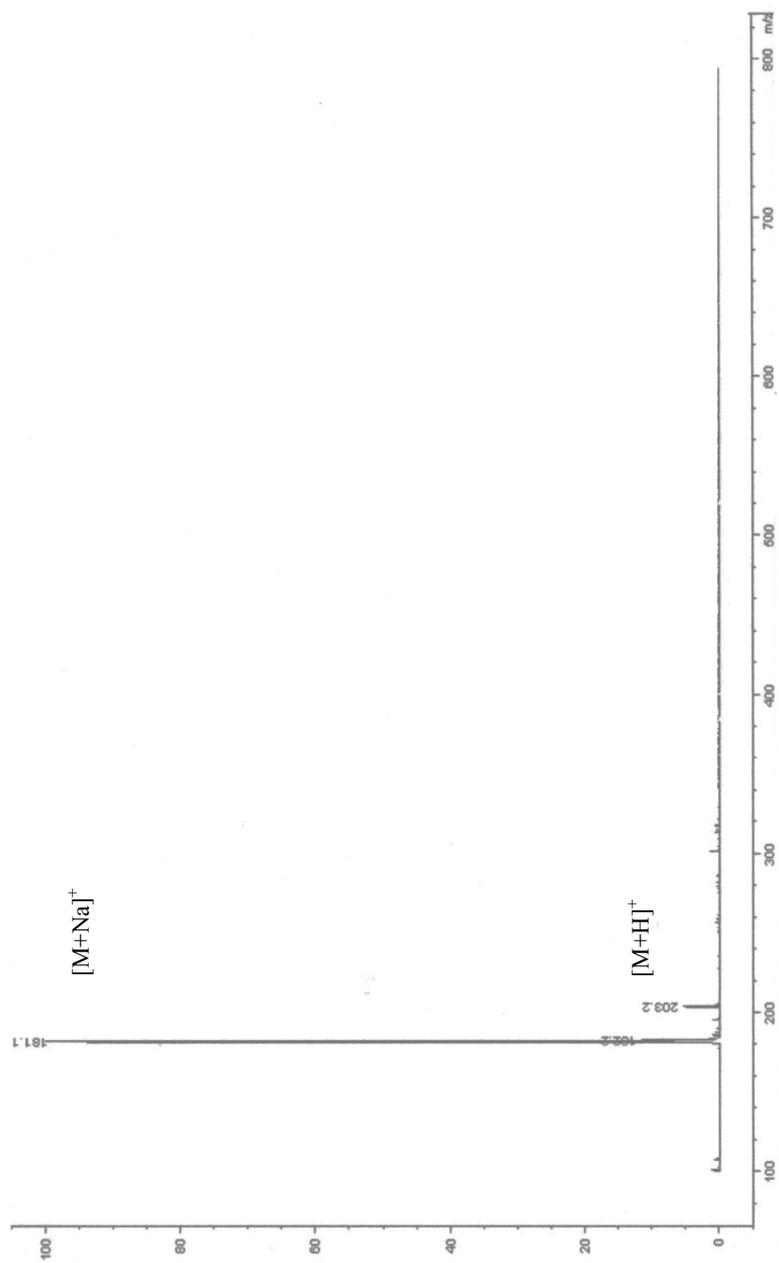


Figura 81: spettro ESI MS del pestalopirone (9)

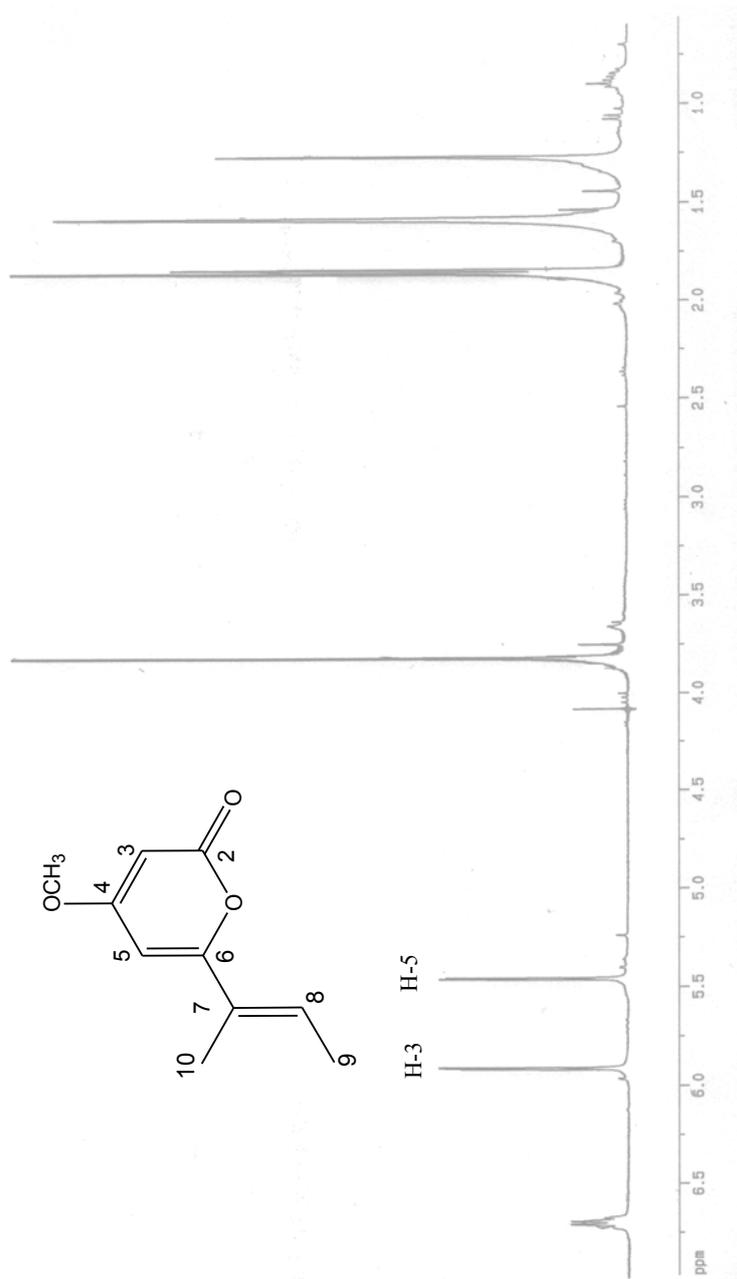


Figura 82: Spettro <sup>1</sup>H NMR del pestalopirone (9) registrato in CDCl<sub>3</sub> a 600 MHz

**Tabella 6:** Effetti del nectriapirone, 7,8-diidronectriapirone e pestalopirone (1, 2 e 9) nel saggio di puntura fogliare su *C. arvensis*, *S. arvensis* e *C. album*.

Composto	<sup>a)</sup> <i>C. arvensis</i>	<sup>a)</sup> <i>S. arvensis</i>	<sup>a)</sup> <i>C. album</i>
Nectriapirone (1)	3	3	4
7,8Diidronectriapirone(2)	3	3	4
Pestalopirone (8)	2	2	3
Controllo <sup>b)</sup>	0	0	0

<sup>a)</sup>Sono state applicate gocce di 20 µL di soluzione. L'attività fitotossica è stata valutata su una scala da 0-4, dove 0 = assenza di lesioni; 1 = lesioni 1-2 mm; 2 = lesioni 3-5 mm; 3 = lesioni 6-7 mm; 4 = lesioni 8-10.

<sup>b)</sup> 4% MeOH in acqua distillata.

<sup>c)</sup> Filtrato colturale