

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Composti volatili presenti nei coni e nei germogli del luppolo

Volatile compounds in hop cones and young shoots

Relatore

Prof. Stefano Bona

Correlatrice

Dott.ssa Francesca Scanferla

Laureando

Alvise Giovanni Carazzolo

Matricola 1240701

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Indice

Riassunto	5
Abstract.....	5
1. Introduzione.....	7
1.1 Botanica	8
1.2 Metaboliti secondari	10
1.2.1 Acidi amari	10
1.2.2 Prenilflavonoidi	11
1.2.3 Terpeni e terpenoidi.....	12
1.2.4 DIV	13
2. Obiettivi.....	15
3. Materiali e metodi.....	16
3.1 Località e cultivar	16
3.2 Analisi SPME-GC.....	18
3.3 Software	19
4. Risultati e discussione	20
4.1 Aromi volatili dei germogli	20
4.2 Correlazioni tra composti volatili nei germogli.....	26
4.3 Analisi delle componenti principali dei germogli	29
4.4 Analisi gerarchica dei germogli.....	32
4.5 Aromi volatili dei conifere.....	34
4.6 Correlazioni tra composti volatili nei conifere	40
4.7 Analisi delle componenti principali dei conifere.....	44
4.8 Analisi gerarchica dei conifere	46
4.9 Relazioni tra conifere e germogli.....	48
5. Conclusioni.....	53
Bibliografia.....	55
Librerie R.....	58
Sitografia	59
Allegati	60
Allegato 1	60
Allegato 2	62
Allegato 3	64

Riassunto

Il luppolo (*Humulus lupulus* L.) è una pianta erbacea perenne, le cui infiorescenze femminili rappresentano l'ingrediente fondamentale per conferire aroma ed amaro alla birra. Sebbene siano state ampiamente caratterizzate le componenti volatili emesse dalle infiorescenze, lo sono meno quelle presenti nei germogli. Il presente studio ha coinvolto 47 cultivar certificate di diversa origine, varietà d'appartenenza e destinazione d'utilizzo. Le porzioni di pianta sono state analizzate via HS-SPME-GC e sono state identificate le principali componenti volatili emesse. Le tecniche di analisi utilizzate hanno permesso di evidenziare peculiari caratteristiche tra varietà (*lupulus/neomexicanus*) o utilizzi commerciali differenti. L'aroma volatile dei germogli è risultato essere composto in prevalenza da composti volatili verdi delle foglie (Green Leaf Volatiles) (GLV) con una quota non trascurabile di composti non ancora identificati (circa 35%). Nei coni è stato riscontrato un numero maggiore di composti volatili rispetto ai germogli; i terpeni sono risultati essere i prodotti prevalenti, mentre la quota di composti indeterminati è risultata di circa il 9%. Rispetto alle varietà *lupulus*, i germogli e i coni di varietà *neomexicanus* sono risultati produrre maggiori quantità di trans- β -ocimene e possedere un rapporto umulene/cariofillene inferiore ad uno. Le correlazioni riscontrate tra composti nello stesso, o in tessuti differenti, sono state valutate anche alla luce dell'intricata rete di enzimi e vie biosintetiche che regolano la produzione di tali composti. Trans- β -ocimene e β -cariofillene sono gli unici terpeni dei germogli risultati essere correlati significativamente con i livelli prodotti nei coni. Gli esiti conseguiti hanno consentito di differenziare le cultivar in base all'aroma volatile evidenziando risultati talora diversi, in relazione alla porzione di pianta analizzata.

Abstract

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a perennial herbaceous plant, whose female inflorescences represent the fundamental ingredient to give aroma and bitterness to beer. Even if inflorescences have been widely characterized by the volatile components produced by inflorescences, they are less present in the young shoots (buds). This trial studied 47 certified cultivars of different origin, variety and intended use. The plant parts were analyzed by HS-SPME-GC and the main volatile components produced were identified. The analyses allowed to highlight peculiar characteristics between two varieties (*lupulus/neomexicanus*) or among different groups of commercial uses. The volatile aroma is mainly composed of green leaf volatiles (GLV) with a non-negligible share of unidentified compounds (about 35%). A greater number of volatile compounds was found in the cones than in the shoots; terpenes were the main products, while the share of unidentified compounds is around 9%. The shoots and cones of the *neomexicanus* variety, when compared to those of *lupulus* variety, were

found to produce greater quantities of trans- β -ocimene and a lower ratio between α -humulene and β -caryophyllene. Correlations between compounds in the same, or in different tissues, were also evaluated in the light of the intricate network of enzymes and biosynthetic pathways that regulate the production of these compounds. Trans- β -ocimene and β -caryophyllene are the only terpenes found in shoots being correlated with the levels in cones. These results indicate possible ways for differentiating the studied cultivars, according to their volatile aroma, highlighting, sometimes, different results, in relation to the analyzed portion of a plant.

1. Introduzione

Il luppolo (*Humulus lupulus* L.) è una pianta rampicante perenne, le cui infiorescenze femminili vengono utilizzate per conferire il sapore amaro e diversi sentori alla birra. Possono essere utilizzate sia fresche che essiccate, in forma pellettata o in polvere, ed infine anche in estratti concentrati. Secondo la Commissione Europea (2021), circa 2.600 aziende agricole in UE coltivano il luppolo, coprendo 26.500 ettari totali, che rappresentano circa il 60% della superficie mondiale. Il luppolo è coltivato in 14 paesi dell'UE, dei quali la Germania è il maggiore produttore, con una superficie coltivata di circa 17.000 ettari, pari al 60% della superficie coltivata a luppolo dell'UE e circa un terzo di quella mondiale. Gli altri principali produttori dell'UE sono Repubblica Ceca, Polonia e Slovenia.

In Italia risulta essere una coltura ancora poco diffusa. Da quanto riportato da Rossetto et al. (2021) la birra era conosciuta e consumata nella penisola italiana a partire da alcuni secoli prima di Cristo, utilizzata nell'antica Roma e prodotta anche nel Medioevo e Rinascimento. In Italia, un tangibile interesse per questa bevanda si è sviluppato solo a metà del 1800 con la nascita di alcuni birrifici di impostazione industriale, ma con tecnologia ancora artigianale. La produzione di birra è aumentata fino ai primi decenni del Novecento, raggiungendo una produzione di circa 1,6 milioni di ettolitri. Tale crescita ha subito un arresto durante il periodo fascista che impose una tassazione (legge Marescalchi) sulla birra, per favorire la produzione vinicola. Dopo la II Guerra Mondiale si è assistito ad una ripresa della produzione e consumo di birra. In questi ultimi tre decenni vi è stato un incremento del consumo medio pro-capite pari a circa 34 litri/anno (2019), raggiungendo quasi i consumi di vino (circa 37-38 litri pro-capite/anno). Parallelamente ai consumi, è cresciuta anche la produzione interna, sia quella industriale che quella artigianale, quest'ultima, in particolare, negli ultimi 20 anni e con una quota produttiva ancora contenuta. In Veneto, risultano attive 138 realtà produttive, perlopiù in forma di agribirrifici. Il termine indica che la produzione di birra è realizzata da imprenditori agricoli, in quanto una parte delle materie prime utilizzate nel processo produttivo proviene dalla stessa azienda agricola. Gli agribirrifici presenti in Veneto sfiorano il 40% delle realtà attualmente operative e realizzano oltre il 60% della produzione artigianale di birra.

Il luppolo, quindi, sembra essere una specie vegetale la cui coltivazione può trovare crescente interesse ed espansione anche nelle realtà produttive italiane.

1.1 Botanica

Il luppolo (*Humulus lupulus* L.) è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Cannabacee. Si pensa che la zona d'origine sia l'Asia, poiché è l'unica zona geografica in cui sono state rinvenute tutte e tre le specie appartenenti al genere, ovvero *Humulus lupulus*, *Humulus japonicus* e *Humulus yunnanensis* (Neve 1991). A differenza di *H. japonicus* e *H. yunnanensis*, *H. lupulus* presenta al suo interno cinque entità morfo-geografiche, definite da Small (1978) come varietà tassonomiche e sono:

- var. *lupulus*: luppoli selvatici e varietà europee.
- var. *neomexicanus*, var. *lupuloides* e var. *pubescens*: luppoli selvatici del Nord America.
- var. *cordifolius*: luppoli giapponesi.

Secondo Murakami et al. (2006) le cultivar odierne possono essere sommariamente divise in due gruppi, composti da landraces europee (var. *lupulus*) e luppoli selvatici americani (var. *lupuloides* e var. *neomexicanus*). Il materiale genetico utilizzato negli impianti attuali è prevalentemente di origine europea, solamente di sesso femminile ed ottenuto mediante la propagazione agamica dei rizomi provenienti dalle piante madri (Edwardson, 1952). La ripresa vegetativa comincia indicativamente da metà marzo e prosegue fino ad aprile con la schiusura e la crescita delle gemme radicali, in numero variabile da 15 a 40 per pianta (Vidmar et al., 2019).

In ambito produttivo, l'elevato numero di getti vegetativi non permette una gestione ottimale dell'impianto, motivo per cui è consuetudine diradare manualmente fino a circa 5-6 germogli per pianta, oppure meccanicamente per mezzo di una fresatrice, per poi lasciare crescere i nuovi steli attorno alla corda di sostegno (Edwardson, 1952). I germogli emersi da poco sono commestibili e posseggono maggiori proprietà antiossidanti rispetto a coni e foglie (Vidmar et al, 2019). In Veneto sono chiamati dialetticamente "bruscandoli" e vengono utilizzati in diverse ricette culinarie, nonché in particolari circoli culinari. Osservando lo stelo in Figura 2, ad ogni nodo sono poste due gemme ascellari e due foglie lobate, opposte, con margine seghettato, di dimensione e forma variabile a seconda della specie. La riproduzione avviene tra individui con sessi separati tramite impollinazione anemofila. I fiori staminiferi sono disposti in infiorescenze a pannocchia mentre quelli pistilliferi in infiorescenze a forma di cono (strobilo), di lunghezza variabile tra i 2.5-5 centimetri. Il cono (Figura 3) consiste in un asse centrale (rachide) sul quale sono inseriti piccoli assi laterali, alla cui base è inserito un paio di brattee e ciascuno porta quattro fiori pistillati sottesi da una bratteola. Al momento dell'impollinazione le brattee sono piccole e solamente quelle basali sono visibili, mentre gli stigmi sono numerosi e capaci di intercettare i granuli portati dal vento. Dopo l'impollinazione gli stimmi cadono, le bratteole cominciano ad ingrossarsi, il seme comincia lo sviluppo e la forma del cono tende

sempre più a somigliare quella di una pigna (Edwardson, 1952). A maturità, la sezione interna del cono è ricca di una resina gialla, amara e odorosa, comunemente chiamata “luppolina” (Figura 3), la cui composizione verrà trattata in maniera più approfondita nei capitoli successivi.



Figura 1 Linea sperimentale di *H. lupulus* var. *neomexicanus* in fioritura. La forma e il numero di lobi della foglia sono tipici di questa varietà



Figura 2 Porzione apicale di un germoglio prodotto da un individuo selvatico.



Figura 3 Sezione di un cono con secrezione di luppolina sulle brattee.



Figura 4 Germogli primaverili di *H. lupulus* var. *lupulus*.

1.2 Metaboliti secondari

Ogni famiglia di piante, genere e specie produce una miscela caratteristica di sostanze chimiche, che talvolta possono essere utilizzate come caratteri tassonomici nella classificazione delle piante. Molte fonti scientifiche affermano che il loro ruolo non è cruciale per le cellule viventi, bensì agiscono come mezzo di protezione della pianta da ogni possibile danno derivante dall'ambiente o da altre specie (Kabera et al., 2014). Il luppolo produce diversi metaboliti secondari in strutture specializzate chiamate tricomi ghiandolari, le cui teste formano la struttura granulosa della luppolina. I principali composti prodotti all'interno sono alfa e beta acidi, prenilflavonoidi, terpeni e terpenoidi.

1.2.1 Acidi amari

Gli acidi amari sono chimicamente definiti come acil-floro-glucinoli, una classe di composti biosinteticamente correlata ai prenilflavonoidi (Stevens e Page, 2004) ed unicamente sintetizzati all'interno dei tricomi ghiandolari. Il contenuto di alfa e beta acidi è strettamente legato all'uso e alle condizioni di crescita delle piante (Zhang et al., 2021) tanto da poter variare nei coni dal 5 al 30% sul peso secco, e determinare il valore, nonché la destinazione d'utilizzo di una cultivar (Wang et al., 2008). Nello specifico gli α -acidi sono composti da umulone (35-70% degli α -acidi totali), co-umulone (20-65%) e ad-umulone (10-15%), mentre i β -acidi da lupulone (35-70% dei β -acidi totali), co-lupulone (20-65%) e ad-lupulone (10-15%). Differentemente dagli α -acidi, i β -acidi hanno una importanza minore perché presentano una minore solubilità sia nel mosto che nella birra (2 ppm). Il contenuto di β -acidi totali nei coni varia tra 2 e 10%, una quota tale da non influenzare la qualità e il prezzo del luppolo. Le modificazioni e le isomerizzazioni degli α -acidi invece, che avvengono durante la bollitura del mosto a temperatura e pH alto, sono le reazioni più importanti nel processo di produzione della birra e trasformano le molecole originali in diversi iso- α -acidi, responsabili del sapore amaro della bevanda

(Zhang et al., 2021). Per questi motivi, una varietà che produce alti livelli di α -acidi sarà utilizzata nelle prime fasi di bollitura per conferire amaro, mentre se produce livelli minori (5-10%) sarà più opportuno utilizzarla per conferire aroma durante le fasi finali di bollitura. Le varietà che

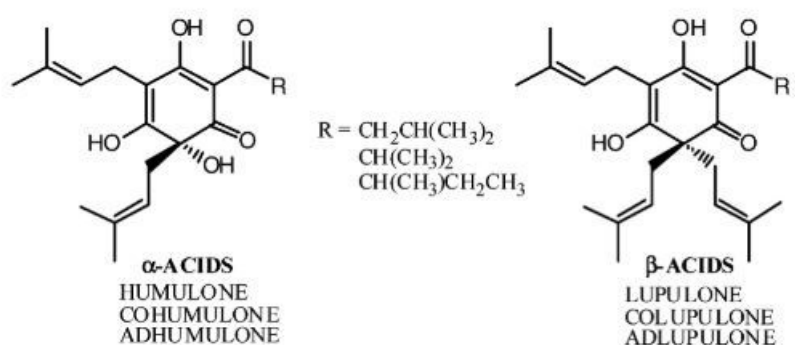


Figura 5 Struttura chimica di base di alfa e beta acidi. Immagine presa da De Keukeleire et al. (2003)

presentano sia alti livelli di acidi amari che di oli essenziali sono dette a “duplice attitudine” e possono essere utilizzate in purezza durante tutte le fasi di bollitura (Beer Maverik, 2021). C’è da evidenziare che negli ultimi anni, come risultato del progresso tecnologico e delle crescenti preferenze del consumatore verso birre sempre meno amare, il contenuto di luppolo nella birra sta crollando di anno in anno. Sebbene la produzione mondiale di birra sia in aumento, la domanda di α -acidi non sta aumentando molto; e poiché l’offerta attualmente supera la domanda, i prezzi medi sul mercato libero e dei contratti sono piuttosto bassi dal 2009 (Commissione Europea, 2021).

1.2.2 Prenilflavonoidi

I prenilflavonoidi sono una sottoclasse dei flavonoidi conosciuti per possedere proprietà antiossidanti e fitoestrogene (De Keukeleire et al., 2003). Tra questi, il maggiore costituente è lo xantumolo, presente in percentuali variabili tra 0.1–1% sulla sostanza secca dei coni. Sebbene sia il principale prenilflavonoide nei coni, lo è di meno nella birra a causa dell’isomerizzazione termica dei calconi in flavoni durante il processo di bollitura. Considerati i consumi medi di birra di un cittadino americano (225 mL giornalieri), l’assunzione giornaliera di prenilflavonoidi si attesta intorno a 0,14 mg, mentre il dato relativo alla sola 8-prenilnaringerina varia da 3,3 (birre “lager” e “pilsner”) a 54 μ g (birre “ale”, “porter” e “stout”) (Stevens e Page, 2004).

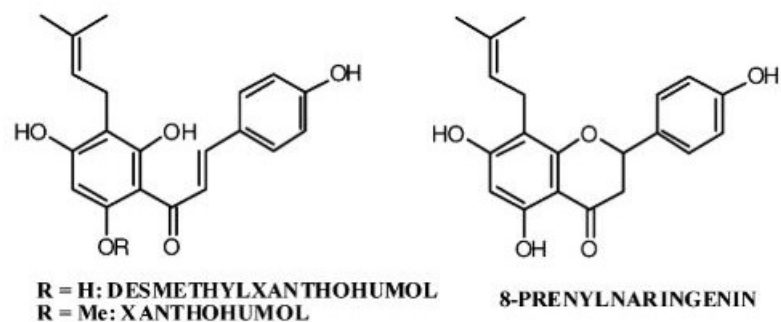


Figura 6 Struttura chimica di base di xantumolo, desmetilxantumolo e 8-prenilnaringenina. Immagine presa da De Keukeleire et al. (2003).

1.2.3 Terpeni e terpenoidi

I terpeni consistono fondamentalmente in unità di isoprene (C_5) combinate in diversi modi, tali da formare emiterpeni (C_5), monoterpeni (C_{10}), sesquiterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), sesterterpeni (C_{25}), triterpeni (C_{30}) o altri politerpeni (C_{5n}). I terpenoidi, invece, sono formati da unità terpeniche alle quali sono stati aggiunti diversi gruppi funzionali. La biosintesi avviene nei tricomi ghiandolari sia a livello citosolico che plastidiale, coinvolgendo rispettivamente la via biosintetica del mevalonato (MVA) o del metileritolo fosfato (MEP); quest'ultima la maggiormente coinvolta (Champagne, 2017). Monoterpeni e sesquiterpeni sono sintetizzati a partire da geranyl-difosfato (GPP) e farnesil-difosfato (FPP), rispettivamente, per mezzo di diverse terpene-sintasi specifiche (Murakami et al., 2006). I monoterpeni ritrovati nell'olio essenziale di luppolo, in base al numero di anelli aromatici presenti nella struttura chimica, possono essere divisi in aciclici, monociclici e

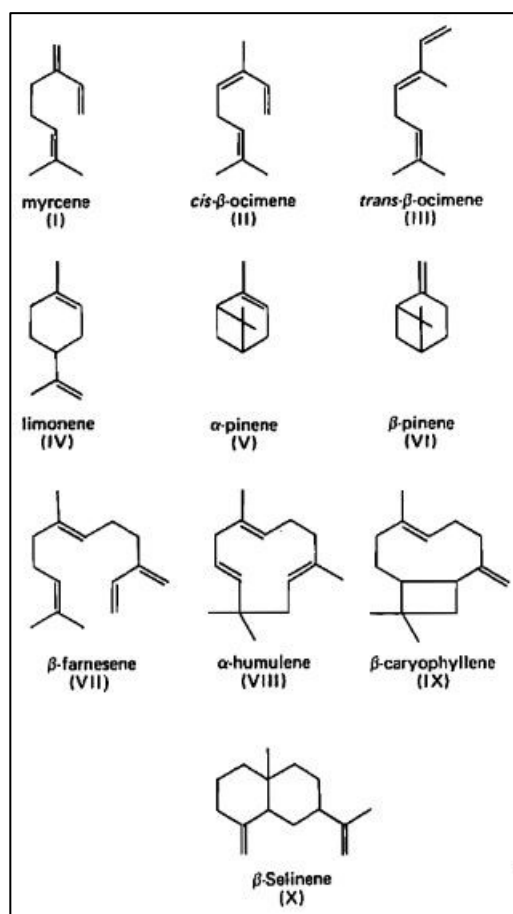


Figura 7 Principali terpeni presenti nell'olio essenziale di luppolo. Immagine presa da Sharpe et al. (1981).

Secondo Sharpe et al. (1981) il terpene più abbondante (circa 30% dell'olio essenziale) è il monoterpene aciclico mircene (i) (Figura 7), seguito da α -umulene (viii) e β -cariofillene (ix). Secondo Inui et al. (2013) il mircene nella birra può essere descritto come pepato, terpenico, speziato, balsamico e plastico, mentre l'ossido di cariofillene come dolce, fresco, secco, legnoso e speziato; infine, l'ossido di umulene (II) come erbaceo. Nell'olio è presente il monoterpene aciclico β -ocimene in entrambe le conformazioni cis (ii) e trans (iii). Alcuni terpeni monociclici sono limonene (iv), α -pinene (v), β -pinene (vi), p-cimene (dolcymene), alfa e beta fellandrene e sabinene (Figura 8). I sesquiterpeni a loro volta possono essere suddivisi in aciclici, monociclici, biciclici e tricyclici. L'unico sesquiterpene aciclico ritrovato nell'olio essenziale è il farnesene (vii), sia nella forma alfa che beta. Il β -selinene (x) è un sesquiterpene biciclico risultato uno dei maggiori componenti dell'olio essenziale di Wye Challenger. Altri terpeni minori (<1%) sono β -bisabolene,

dolcymene	
beta-phellandrene	
sabinene	

Figura 8 Nome e struttura chimica di alcuni monoterpeni presenti nell'olio essenziale di luppolo; dolcymene è sinonimo di p-cimene. Figura creata con WolframAlpha.

α -muurolene, γ -muurolene, α -cubebene, calamenene, γ -calacorene, α -calacorene, β -elemene e cadalene. Alcuni monoterpenoidi sono indicati in Figura 9, tra i quali il più abbondante risulta essere il linalolo (Figura 9), seguito da altri minori come geraniolo, nerolo, α -terpineolo, terpinen-4-olo, mirtenolo e mircenolo. Infine, composti come nerolidolo, umulenolo, umulolo e α -eudesmolo compongono la frazione di sesquiterpenoidi (Sharpe et al., 1981). In generale i composti sopra citati cominciano ad essere instabili ad alte temperature, ragione per cui risulta essenziale aggiungere i luppoli aromatici solo a fine cottura, per evitare che il processo di bollitura ad alte temperature deteriori la componente aromatica (Beer Maverik, 2021).

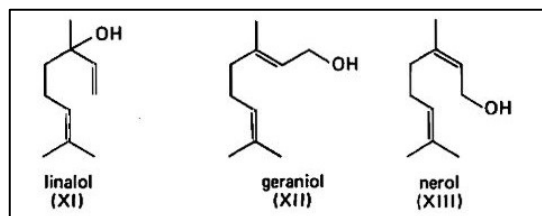


Figura 9 Struttura chimica di alcuni monoterpenoidi presenti nell'olio essenziale di luppolo. Immagine presa da Sharpe et al. (1981).

1.2.4DIV

I composti volatili indotti da danni (Damage Induced Volatiles) (DIV) rappresentano una classe di composti volatili eterogenea appartenente alla famiglia dei DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), coinvolta nelle risposte di difesa delle piante (Meents e Mithöfer, 2020). Una parte di questi composti è formata dai cosiddetti composti volatili verdi delle foglie, tradotti dall'inglese "Green Leaf Volatiles" (GLV). Sono molecole C_6 (aldeidi, alcoli ed esteri) emesse dalle piante in seguito alla distruzione di tessuti cellulari o in concomitanza a stress biotici e abiotici. Sono prodotti attraverso l'ossidazione di acidi grassi come l'acido linoleico e l' α -linolenico, attraverso la via biosintetica dell'ossilipina (Matsui, 2006). Esiste poi un'altra categoria, strutturalmente diversa dalle precedenti, composta da benzoidi e fenilpropanoidi provenienti dalla via biosintetica dello shikimato (Meents e Mithöfer, 2020). Contrariamente a quanto accade con terpeni e terpenoidi, la biosintesi dei GLV è immediata e richiede da pochi secondi a qualche minuto (Scala et al., 2013). Questa classe di composti è coinvolta in numerosi meccanismi di difesa della pianta, nonché nelle interazioni tra piante ed insetti, tanto da poter fungere da segnale di "triggering priming", ovvero uno stato che prepara la pianta a rispondere velocemente ad attacchi di erbivori o patogeni (ul Hassan, 2019) (Scala et. Al. 2013). Meents e Mithöfer (2020) affermano che alcuni composti (Figura 10), come il salicilato di metile, benzaldeide, cavicolo, eugenolo, fenil-etanolo ed alcol benzilico siano specifici di alcuni generi o specie e possono essere emessi in numerosi aromi volatili. Inoltre, Heiden et al. (1999) riportano che alcune piante sono capaci di emettere il toluene, il composto aromatico più presente nelle atmosfere urbane. L'emissione di toluene è stata osservata in piante di girasole (*Helianthus annuus* L. cv. Gigante) e pino (*Pinus sylvestris* L.) in condizioni di stress, tuttavia, la via biosintetica di questo composto non è stata ancora definita.

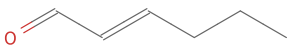
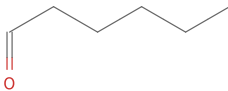
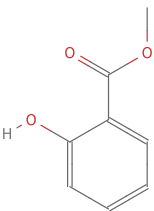
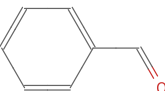
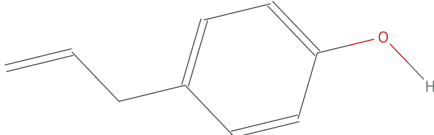
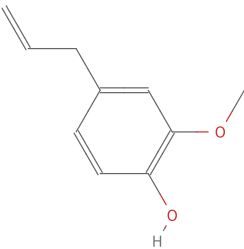
trans-2-hexenal	
caproic aldehyde	
methyl salicylate	
benzaldehyde	
chavicol	
eugenol	

Figura 10 Nome e struttura chimica di alcuni DIV prodotti dalle piante. L'esenale è chiamato anche aldeide caproica. Figura creata con WolframAlpha.

2. Obiettivi

In merito alla produzione di composti volatili da parte di alcune porzioni delle piante di luppolo, dall'analisi della bibliografia emerge una sostanziale carenza di informazioni, in particolar modo per i germogli. Sulla base di quanto detto, si è avviata una ricerca al fine di caratterizzare l'aroma volatile di 47 cultivar di luppolo, riunite in gruppi con attributi differenti. La finalità principale è stata quella di determinare il profilo in sostanze volatili sia dei germogli che dei coni freschi e, successivamente, di poter distinguere le cultivar e i gruppi a cui esse appartengono, in base ai principali composti prodotti. Un'ulteriore finalità è stata quella di individuare i rapporti esistenti tra le diverse sostanze volatili emesse dalle due porzioni di pianta, allo scopo di permettere una selezione degli individui dotati di determinate caratteristiche, già a partire dalle prime fasi fenologiche.

3. Materiali e metodi

3.1 Località e cultivar

I rilievi del materiale vegetale sono stati svolti tra aprile e settembre dell'anno 2021 presso l'azienda agricola "Strano Ma Verde", a Mussolente (VI) sulle pendici del Monte Grappa (coordinate: 45°46'35.8"N, 11°49'00.9"E). Nell'azienda è presente un luppolo sperimentale che ospita più di cento varietà di luppolo, piante sia maschili che femminili, dell'età di circa un anno. Le piantine, disposte in file, sono state trapiantate circa ad 1,5 m di distanza l'una dall'altra e consociate con un miscuglio da sovescio invernale a base di senape bianca e rafano, e distanziate da interfile di *Festuca arundinacea*. La struttura dell'impianto è formata da pali di cemento da 7 metri, disposti in rettangoli 6 x 10 metri. All'apice di ciascun palo scorrono i tiranti in metallo, ai quali sono attaccate ortogonalmente le funi in fibra di cocco utili al sostegno di ciascuna pianta. L'intero impianto è stato protetto da una rete antinsetto bianca e da una rete antigrandine nera che copre la parte superiore dello stesso. Durante l'intera stagione sono stati forniti i giusti apporti di acqua e nutrienti, in particolare sono stati erogati i composti Fulvin e Spinner attraverso l'impianto di microirrigazione a goccia, di cui è dotato il luppolo, posto a circa un metro di altezza dal suolo. I rilievi sperimentali dei germogli sono stati svolti nei giorni 16 e 21 aprile 2021, seguendo l'ordine delle piante lungo i filari, ovvero cominciando dalle prime file composte da varietà *lupulus* e concludendo con le ultime varietà *neomexicanus*. Sono state raccolte manualmente due repliche di germogli da 47 piante femmine (33 *lupulus* e 14 *neomexicanus*) indicate in Tabella 1, entro gli stadi fenologici 09 e 11 della scala BBCH (Robbauer et al., 1995). Per ciascuna replica sono stati recisi due o tre germogli lunghi 2-10 cm dall'apice utilizzando delle forbici, le quali sono state disinfettate ripetutamente in ogni passaggio da una pianta all'altra. Successivamente i germogli sono stati posti in una busta di plastica sigillata. Le repliche raccolte sono state conservate all'interno di una borsa frigo per l'intera durata della rilevazione e del trasporto; in seguito, sono state poste in un freezer a -16 °C presso l'azienda Sperimentale Lucio Toniolo, a Legnaro (PD). Per ciascuna cultivar cui erano stati rilevati i germogli, il 17 agosto è stata prelevata una singola replica di coni, scelta tra le piantine che presentavano apparentemente i coni più maturi e sviluppati. Durante la raccolta si è seguito l'ordine di avanzamento lungo le file utilizzato precedentemente con i germogli. Successivamente anche la conservazione delle repliche di coni è avvenuta in maniera analoga a quella eseguita per i germogli. In particolare, si evidenzia, come anticipato, che la presenza di piante maschili vicino alle piante femminili, ha comportato lo sviluppo di semi all'interno dei coni analizzati.

Paese	Nr.	Cultivar	Uso	Paese	Nr.	Cultivar	Uso
CZE	1	Saaz	aroma		25	Mount Rainier	aroma
	2	Hersbrucker	aroma		26	Nugget	doppio
DEU	3	Magnum	amaro		27	Olympic	aroma
	4	Merkur	doppio		28	Tahoma	aroma
	5	Mittelfruh	aroma		29	Triple Pearl	doppio
NZL	6	Alpharoma	doppio		30	Triumph	doppio
	7	Bramling Cross	doppio		31	Ultra	aroma
	8	Brewers Gold	amaro		32	Vanguard	aroma
	9	Bullion	amaro		33	Williamette	aroma
UK	10	Crusader	ind		34	N106	neomex
	11	Eastwell Golding	aroma	USA	35	N107	neomex
	12	Yeoman	doppio		36	N108	neomex
	13	Cashmere	doppio		37	N127	neomex
	14	Centennial	doppio		38	N129	neomex
	15	Chinook	doppio		39	N130	neomex
	16	Columbus	doppio		40	N131	neomex
	17	Comet	amaro		41	N134	neomex
USA	18	Crystal	aroma		42	N143	neomex
	19	Eroica	amaro		43	N161	neomex
	20	Galena	amaro		44	N69	neomex
	21	Glacier	doppio		45	N78	neomex
	22	Late Cluster	doppio		46	N83	neomex
	23	Liberty	aroma		47	N97	neomex
	24	Mount Hood	aroma				

Tabella 1 Cultivar di luppolo utilizzate nel presente studio. Per ciascuna cultivar è indicato il paese di provenienza: CZE (Repubblica Ceca), DEU (Germania), NZL (Australia), UK (Regno Unito), USA (Stati Uniti). I nomi che contengono i caratteri "N xxx" indicano le linee sperimentali di var. *neomexicanus*. Solo per le varietà commerciali (tranne Crusader) è stato possibile riportare l'utilizzo principale mentre per le var. *neomexicanus*, che non hanno un utilizzo ben preciso, è stato semplicemente assegnato "neomex"

3.2 Analisi SPME-GC

Durante le analisi, dai germogli sono stati pesati circa 1.110 ± 0.27 grammi di tessuto fresco per mezzo di una bilancia analitica, preferibilmente appartenente alla porzione apicale, comprendente lo stelo e le giovani foglie ancora non distese. Il processo è avvenuto in maniera diversa nei coni, a causa della maggior presenza di composti volatili, di conseguenza, ciascun sacchetto è stato scosso per favorire la disgregazione delle brattee dall'asse principale, e successivamente sono stati pesati mediamente per ciascuna replica circa 0.617 ± 0.02 grammi di tessuto fresco. Al termine della pesatura, entrambi i processi sono seguiti in maniera analoga, i tessuti vegetali sono stati inseriti all'interno di una vial da 20 ml (Gerstel) con 2 grammi di solfato di sodio anidro (Na_2SO_4) per assorbire parte dell'acqua presente. Le vial una volta chiuse, sono state poste in un pozzetto e condizionate alla temperatura di $40\text{ }^\circ\text{C}$ per un'ora. Al termine del condizionamento, in ogni vial è stato introdotto manualmente l'ago nello spazio di testa ed esposta la fibra SPME (50/30 um DVB/CAR/PDMS, Stableflex, 2 cm, Supelco) per 30 min. Terminata l'esposizione, la fibra è stata inserita all'interno del gascromatografo GC 7890B (Agilent Technologies) dotato di una colonna J&W HP5 ID 0.32 60 m e collegato ad un detector VGA 101 (VUVAnalytics). Ulteriori parametri di lavoro possono essere consultati nell'Allegato 1. I cromatogrammi sono stati elaborati e visualizzati dal software VUVision (VUV Analytics), che calcola l'area di ciascun picco e riporta il nome del composto che presenta la curva di assorbanza più simile a quella rilevata, grazie al confronto di quest'ultima con gli spettri presenti nella libreria locale. Tuttavia, l'indice di corrispondenza restituito non sempre è sufficiente a discriminare l'identità dell'analita, per cui si è scelto di utilizzare l'indice di Kováts (1958), come mezzo supplementare. Dopo aver considerato i risultati provenienti da questi due indici, si è proceduto ad assegnare un nome definitivo al picco, ed in caso contrario, a catalogarlo con il proprio nome attraverso l'analisi del proprio tempo di eluizione in minuti e se l'analita non si riusciva a identificare si è utilizzato il prefisso "unk" (indefinito). Considerando i coni, dalle analisi preliminari si è notato che le alte quantità di mircene provocavano la sovrasaturazione del detector e deterioravano il valore dell'area restituita. Per ovviare a questo problema, si è scelto di programmare la pressione del gas di makeup (MGP) (azoto) in corrispondenza dell'intervallo di eluizione del mircene, al fine di diminuire il tempo di permanenza dell'analita nella cella di flusso. La pressione è stata variata da 0,32 psi (standard) ad 1 psi per l'intervallo considerato. Per determinare il fattore di soppressione (diminuzione) del mircene tra 0,32 e 1 psi, sono state pesate due repliche da 0,95 mg di mircene puro in vial da 60 ml e condizionate in un pozzetto a $40\text{ }^\circ\text{C}$ per 10 min. Successivamente la fibra SPME è stata esposta nello spazio di testa per 5 sec ed iniettata all'interno del GC. Il rapporto tra le due aree alle diverse pressioni (0,32 e 1 psi) fornisce un fattore di soppressione del mircene pari a 2,07. Quindi, per ciascuna replica di coni, il valore dell'area del mircene è stato ricavato

moltiplicando l'area a 1 psi per il fattore di soppressione riportato. Inoltre, considerato che, a parità di composto, le repliche con peso maggiore presentano aree più grandi, l'area di ciascun analita presente nei due tessuti, è stata sempre normalizzata rispetto al peso della replica, secondo la formula:

$$\text{Area pesata} = \frac{\text{Area cromatografica}}{\text{Peso replica}}$$

L'area pesata rappresenta così la quantità di analita rapportata all'unità di peso e permette il confronto tra aree dello stesso nei tessuti.

3.3 Software

Il software Excel (v. 2112) (Microsoft) ha semplificato la trascrizione e la correzione dei valori delle aree degli analiti, mentre l'analisi statistica è stata condotta utilizzando il linguaggio R (v 4.1.2) (R Core Team, 2021) ed il software RStudio (v 1.3.1093) (RStudio Team, 2020). Le statistiche descrittive di ciascun composto sono state ottenute mediante il pacchetto *pastecs* (v. 1.3.21) (Grosjean, Ibanez, 2018). I boxplot sono stati ottenuti grazie ai pacchetti *dplyr* (v. 1.0.7) (Wickham et al., 2021), *tidyr* (v. 1.1.4) (Wickham, 2021) e *plyr* (Wickham, 2011) mentre la rappresentazione grafica con *ggplot2* (Wickham, 2016) e *ggforce* (v. 0.3.3) (Pedersen, 2021). Il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson è stato compiuto grazie al pacchetto *hmisc* (v. 4.6-0) (Harrel, 2021) mentre la rispettiva rappresentazione grafica con il pacchetto *corrplot* (v. 0.92) (Wei e Simko, 2021), *ggplot2* (Wickham, 2016) e *ggpubr* (v. 0.4.0) (Kassambara, 2020). Durante il calcolo delle correlazioni nei germogli sono stati considerati composti che si presentavano in misura superiore a zero in oltre il 50% delle cultivar, mentre per i coni il 60%. L'analisi della componente principale è stata condotta sull'intero set di dati, mediante la funzione di base *prcomp* del pacchetto *stats*, mentre la rappresentazione grafica di composti volatili e cultivar utilizzando il pacchetto *factoextra* (v. 1.0.7) (Kassambara e Mundt, 2020). Infine, l'analisi gerarchica tra cultivar si è basata sulle funzioni *hclust* e *dist* (pacchetto *stats*) (R Core Team, 2021), mentre per rappresentare i risultati si è utilizzata la libreria *ggdendro* (De Vries e Ripley, 2020).

4. Risultati e discussione

4.1 Aromi volatili dei germogli

Attraverso l'analisi HS-SPME-GC effettuata sui germogli è stato possibile identificare 33 composti volatili su 133 rilevati, e quantificare le relative aree. Le medie dei principali costituenti dell'aroma volatile emesso (circa 90%) sono riportati in Tabella 1; inoltre, poiché non sempre la media permette di descrivere in dettaglio l'insieme di dati osservato, specialmente quando questi variano molto, per ciascuna media è riportato il rispettivo coefficiente di variabilità. Le maggiori componenti volatili sono risultate essere l'aldeide (E)-2-esenale (33,35%) ed il composto indefinito unk 18,007 (14%), che sommate rappresentano circa la metà delle aree pesate totali. In questo tessuto, i composti che dominano la frazione terpenica sono i due sesquiterpeni α -umulene e β -cariofillene, seguiti dai monoterpeni trans- β -ocimene e β -mircene. Altri terpeni riscontrati in misura inferiore o uguale a 0,3% sono β -selinene, α -copaene, β -burbonene, trans- β -farnesene, α -bisabololo, β -elemene, γ -elemene e β -pinene. Per quanto concerne la famiglia dei DIV, oltre all'aldeide principale (GLV) sono stati rilevati anche altri composti con struttura chimica diversa; tra questi si riportano benzaldeide, esanale, alcol isobutilico, alcol isoamilico, esano, toluene, isovaleraldeide, salicilato di metile e 2-metil-1-butanolo. Oltre ai composti sopra citati, c'è da evidenziare comunque che i composti indefiniti ammontano a 100 e la loro somma rappresenta circa il 35% del totale delle aree. Molti di questi composti, durante il riconoscimento con VUVision, sono risultati possedere uno spettro d'assorbimento simile ad esteri o aldeidi, ma non abbastanza pulito tale da consentire una precisa identificazione. Per questo motivo, si ipotizza che parte dei composti in questione appartengano alla famiglia dei DIV, essendo prodotti in grandi quantità in risposta alla distruzione dei tessuti (ul Hassan et al., 2015).

Da queste prime informazioni, ed in particolare dalla colonna "N" in Tabella 2, si evince che alcuni composti sono condivisi tra tutte le cultivar (N=47), mentre altri sono prodotti in numero minore e solamente da alcuni individui. Quindi, conosciuti i diversi utilizzi e varietà di appartenenza delle piante, risulta interessante osservare come alcuni composti varino a seconda della varietà (*lupulus/neomexicanus*) o della classe d'uso (amaro, doppio, aroma). Per fare chiarezza, le classi amaro, aroma e doppio (conferenti sia amaro che aroma) sono composte unicamente dalla varietà *lupulus*; mentre il gruppo neomex (senza un uso specifico perché sperimentali) da varietà *neomexicanus*. Se si pone lo sguardo sulla Figura 11 si notano diversi boxplot (grafici a scatole) che raffigurano i valori mediani ed estremi dei maggiori terpeni, divisi per classi di utilizzo (ascisse). Inoltre, tra i gruppi compare il gruppo "ind", che non è altro che la cultivar Crusader, per la quale, sebbene siano state svolte lunghe ricerche con esperti del settore, non si è riusciti ad indicare un utilizzo certo; in ogni caso si è scelto di mantenere le repliche e di comporre un gruppo separato; da

questo deriva il nome "ind" (indefinito). Osservando la figura si nota che il primo terpene per abbondanza, l' α -umulene, presenta un valore mediano pressoché uguale entro le tre classi d'uso commerciale (*lupulus*), mentre il gruppo neomex possiede la mediana prossima allo zero ed un box molto stretto. Discorso diverso è per il β -cariofillene, per il quale è difficile notare differenze evidenti tra le mediane dei quattro gruppi. I gruppi doppio e neomex presentano i valori più alti e variabili, mentre aroma ed amaro l'opposto. Sicuramente è più semplice osservare che tutte le classi, tranne neomex, presentano la mediana dell' α -umulene maggiore di quella del β -cariofillene. Questo conferma quanto riportato da Knobloch et al. (1982), ovvero che i *neomexicanus* sembrano presentare un rapporto tra umulene e cariofillene inferiore ad uno. Il trans- β -ocimene risulta essere presente in tutte le classi, in particolar modo nel gruppo neomex ed amaro, mentre in minore quantità per doppio e aroma. Quarto terpene per importanza, il mircene, si può constatare come questo prevalga nelle classi da amaro e doppio uso, mentre i gruppi aroma e neomex presentano valori mediani simili. Interessante notare come il gruppo doppio possieda i valori massimi (outlier) nei primi quattro terpeni per abbondanza. Il β -selinene, rispetto ai precedenti, presenta una scala di valori inferiore e non è stato rilevato in tutte le cultivar. In particolare, sembra essere prodotto in maggior numero dai neomessicani e dalle varietà a doppio uso, mentre nelle rimanenti è stato riscontrato solamente in due individui. Infine, il trans- β -farnesene è stato rilevato maggiormente nelle classi da aroma (5 cultivar), in qualche traccia nelle altre due commerciali e del tutto assente nel gruppo neomex. Non c'è da meravigliarsi se questo sesquiterpene viene normalmente utilizzato per discriminare i coni provenienti da determinate cultivar da aroma, nonché come chiave per l'identificazione dei luppoli selvatici europei. Ciò conduce all'ipotesi che le piante capaci di produrre alti livelli di farnesene, o di qualsiasi altro composto nei germogli, siano in grado di compiere lo stesso nei coni. Questo fenomeno è stato investigato successivamente, dopo la determinazione dei principali composti nelle infiorescenze. Per riassumere quindi, i neomessicani sembrano essere caratterizzati da un maggiore contenuto in trans- β -ocimene e β -selinene rispetto altri tre gruppi; al contempo però, sono coloro che possiedono i valori mediani di α -umulene più bassi e non producono β -farnesene. Il gruppo aroma presenta un minore contenuto di β -cariofillene, β -mircene e β -selinene, rispetto a tutti gli altri gruppi; senza tralasciare però, che è l'unico a possedere i valori più alti di β -farnesene.

Per quanto concerne i DIV invece, possono essere osservati i valori dei principali in Figura 12. Nello specifico, l'(E)-2-esenale risulta essere prodotto da tutte le cultivar, ma all'interno dei gruppi presenta alcune differenze tra la posizione delle mediane e i baffi dei box. Il gruppo amaro possiede una mediana maggiore ed al contempo una box molto stretto; mentre i limiti dei box di aroma e doppio sono ampie ed indicano una maggiore variabilità entro gruppo; infine, il gruppo neomex presenta il valore mediano più basso e distante da tutti. Di conseguenza, questo composto può rappresentare una

possibile chiave di discriminazione per il gruppo neomex, che sarà trattata più approfonditamente durante la PCA. Unk 18,007 risulta essere particolarmente presente nel gruppo da aroma mentre le mediane degli altri gruppi presentano valori simili fra loro, ma comunque inferiori al primo. La benzaldeide presenta valori mediani vicini tra i diversi gruppi e si osserva anche una maggiore variabilità entro il gruppo aroma e doppio; più ridotta invece per amaro e neomex. L'esanale risulta essere prodotto in tutte le classi ed in quantità piuttosto variabili, evidenziate dalla forma allungata dei box dei quattro gruppi; in particolare nella categoria doppio, si osservano molti outlier. Come i precedenti, il toluene è stato riscontrato in tutte le classi d'uso, ma in questo caso tutti i boxplot assumono una forma a candela. Questa conformazione è dovuta ad una distribuzione di dati vicino a zero tale da influenzare la posizione della linea mediana, mentre il bordo superiore ed i baffi sono spinti verso l'alto da qualche picco. L'unico gruppo che presenta la linea mediana maggiore delle altre è l'amaro. Infine, il metil salicilato è l'unico tra i composti elencati a non essere prodotto dal gruppo neomex, mentre il gruppo amaro e doppio presentano mediane vicine a 0,5; il gruppo aroma, come per il composto precedente, presenta solamente alcuni picchi. È curioso notare che il gruppo neomex condivide valori mediani simili agli altri gruppi solo per esanale e toluene, mentre per 2-esenale e metil-salicilato le mediane sono molto più distanti.

Considerate le differenze nella capacità di produrre determinati composti (fra gruppi) nei germogli, risulta interessante osservare se le differenze tra boxplot possano essere ricondotte a fattori genetici indipendenti, o che in realtà, esistono delle correlazioni fra composti, tali da governare il rapporto fra di essi.

<i>Composto</i>	<i>Media</i>	<i>CV</i>	<i>Quota</i> %	<i>Cumulativo</i> %	<i>N</i>
(E)-2-Esenale	24,31	0,47	33,35	33,35	47
unk 18,007	10,20	0,40	14,00	47,35	46
α -Umulene	5,67	1,31	7,77	55,12	43
β -Cariofillene	5,29	1,42	7,25	62,38	47
unk 5,665	2,16	0,71	2,96	65,33	47
unk 7,348	1,88	0,70	2,59	67,92	47
Benzaldeide	1,86	0,96	2,55	70,47	47
Esanale	1,44	0,37	1,97	72,44	47
trans- β -Ocimene	1,23	1,48	1,69	74,13	24
β -Mircene	1,09	0,90	1,49	75,62	43
Isobutil alcol	1,08	0,25	1,48	77,10	47
unk 8,248	1,08	0,77	1,48	78,58	44
unk 18,132	1,00	0,73	1,37	79,96	41
unk 4,669	0,86	1,65	1,18	81,14	19
Isoamil alcol	0,86	0,32	1,18	82,32	47
unk 4,648	0,81	1,34	1,11	83,43	28
Esano	0,77	0,28	1,06	84,49	47
Toluene	0,70	1,80	0,96	85,45	17
unk 7,865	0,60	1,22	0,82	86,28	29
unk 7,715	0,44	1,85	0,61	86,88	20
Germacrene	0,42	6,34	0,58	87,47	2
Isovaleraldeide	0,40	0,40	0,55	88,02	46
unk 6,181	0,34	0,70	0,47	88,49	38
unk 18,64	0,28	0,80	0,39	88,88	34
Metil salicilato	0,27	1,79	0,37	89,25	19
unk 8,707	0,23	0,82	0,32	89,57	31
unk 31,532	0,22	1,22	0,30	89,87	26
β -Selinene	0,22	2,08	0,30	90,17	13
unk 26,152	0,22	1,30	0,30	90,47	23
unk 10,611	0,21	0,99	0,29	90,76	29
unk 48,198	0,21	1,89	0,28	91,04	17
2-Metil-1-butanolo	0,19	1,31	0,26	91,30	20
unk 48,707	0,19	2,10	0,26	91,56	17
α -Copaene	0,18	1,67	0,25	91,81	20

Tabella 2 Principali composti volatili presenti nei germogli freschi di 47 cultivar di luppolo. Per ogni analita è riportato nome, media, coefficiente di variabilità, quota percentuale, quota cumulativa e la numerosità. Quest'ultima colonna non rappresenta il numero di cultivar che hanno composto la media (sempre 47), bensì il numero di cultivar che hanno prodotto il composto in quantità maggiore di zero.

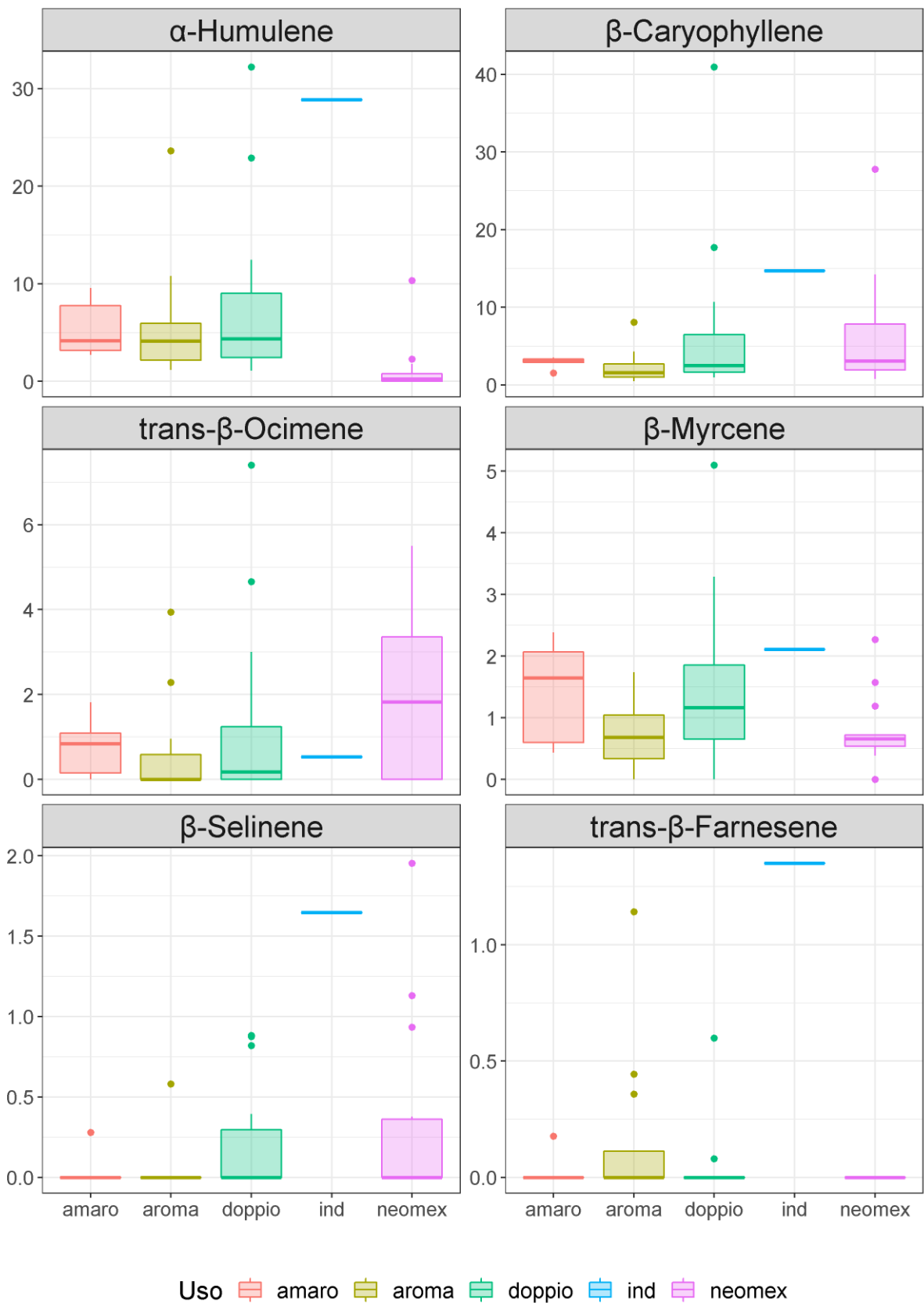


Figura 11 Nei riquadri sono riportati i sei maggiori terpeni per abbondanza presenti nei germogli di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse il gruppo di appartenenza. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" rappresenta un individuo a parte (Crusader). Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier).

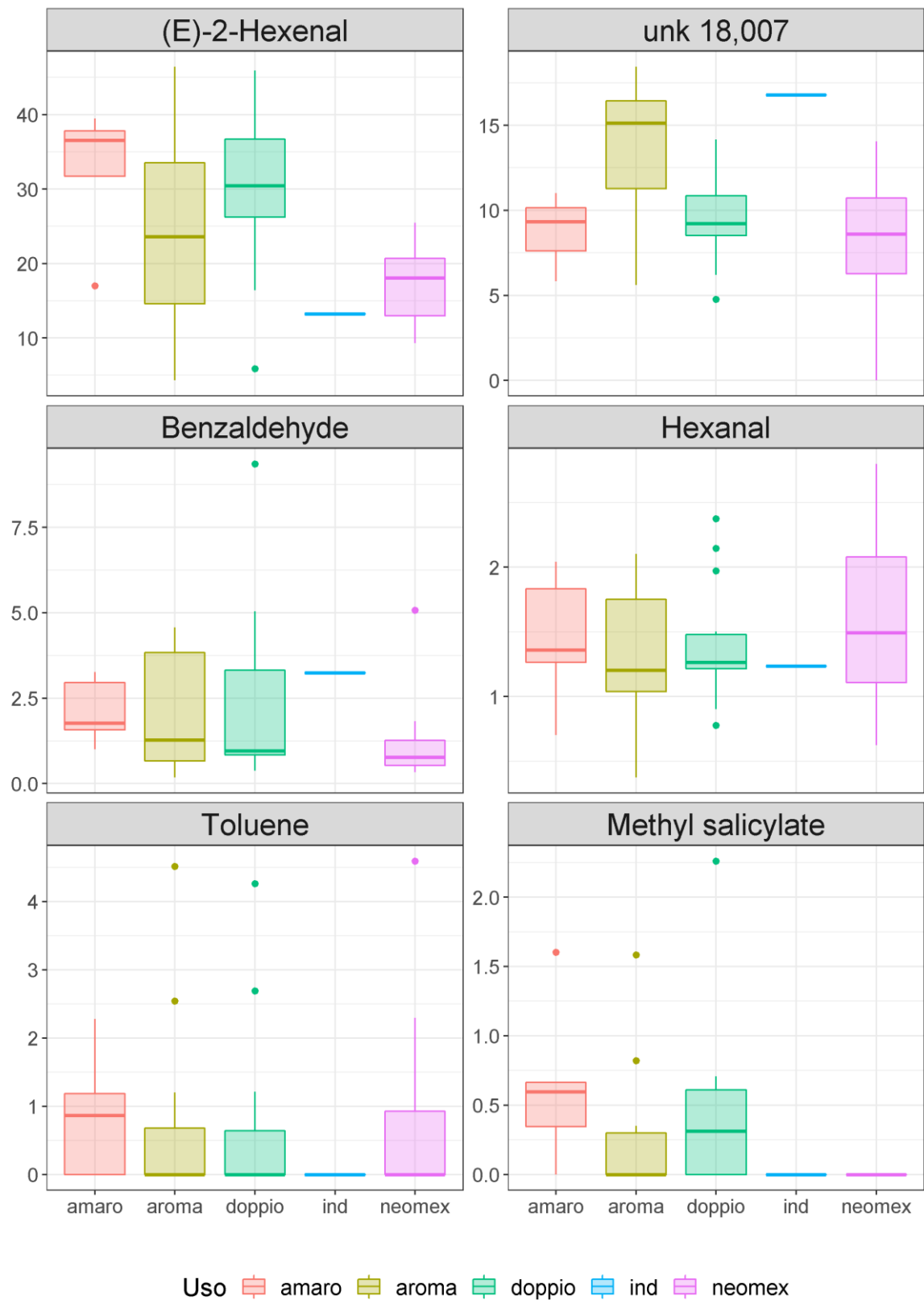


Figura 12 Nei riquadri sono riportati i sei maggiori DIV presenti nei germogli di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse il gruppo di appartenenza. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" rappresenta un individuo a parte (Crusader). Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier).

4.2 Correlazioni tra composti volatili nei germogli

Come accennato anche nei capitoli precedenti, molti composti volatili, specialmente quelli appartenenti alla stessa famiglia, condividono la medesima via biosintetica o persino lo stesso enzima. Ad esempio, la sesquiterpene-sintasi-I (HISTS1) catalizza la formazione sia di α -umulene che β -cariofillene, oppure la monoterpene-sintasi-II (HIMTS2) la formazione di β -mircene (Wang et al., 2008). Perciò, al fine di determinare tutte le possibili correlazioni esistenti tra i composti volatili, si è deciso di calcolare per ciascuna coppia il coefficiente di correlazione di Pearson. I dati sono rappresentati in forma tabulare in Allegato 2 ed in forma grafica nel correlogramma in Figura 13. Una correlazione significativa può indicare che i due composti sono co-regolati all'interno dello stesso tessuto; nello specifico, se positive, si può ipotizzare che questi condividano lo stesso substrato o lo stesso enzima, come già citato per i due maggiori sesquiterpeni; invece, se negative, uno dei due può fungere da substrato o competere nel processo di biosintesi. È bene ricordare comunque, che per questioni di carattere statistico, sono stati considerati nel calcolo delle correlazioni solo i composti prodotti da almeno il 50% degli individui (in totale 31). In questo modo ciascuna correlazione ha coinvolto sempre almeno 16 individui (media 33 ± 9). Su 31 composti totali, eccetto esanale ed unk 5,419, tutti hanno dimostrato di possedere almeno una correlazione significativa ($p < 0,05$). Come si può notare in Figura 13, su 465 correlazioni diverse, 74 sono risultate significative, coinvolgendo principalmente DIV e composti indefiniti, ma anche alcuni terpeni, presenti però in minor numero. Si anticipa comunque che, fatta eccezione per pochi composti indefiniti, saranno commentate in seguito solamente le correlazioni riguardanti composti conosciuti. Il correlogramma presenta 30 righe e 30 colonne, disposte a formare un triangolo per rappresentare tutte le possibili diverse correlazioni, ciascuna evidenziata con un colore diverso secondo la scala di valori riportata. Inoltre, ogni correlazione significativa è indicata con uno o più asterischi.

Cominciando ad osservare il maggiore costituente dei germogli, l'(E)-2-esanale, si può constatare che è uno dei composti che condivide il maggior numero di correlazioni significative (11); alcune di queste sono positive, come per esempio quelle con i composti unk 10,611 ($r=0,82$; $p < 0,001$) ed unk 18,132 ($r=0,76$; $p < 0,001$); altre invece negative, come quelle con isovaleraldeide ($r=-0,47$; $p < 0,001$) ed isoamil-alcol ($r=-0,31$; $p < 0,05$). Inoltre, sono state evidenziate molte altre correlazioni interessanti tra composti di natura chimica diversa; in particolare, l'isoamil-alcol è risultato correlato con isobutil alcol ($r=0,75$, $p < 0,001$) e crotonaldeide ($r=0,47$; $p < 0,001$), mentre l'esano con isovaleraldeide ($r=0,29$; $p < 0,05$), ed inaspettatamente, anche con trans- β -ocimene ($r=-0,41$; $p < 0,05$) e β -cariofillene ($r=-0,32$; $p < 0,05$). Infine, il 3-pentanone (chetone) risulta correlato con isobutil alcol ($r=0,51$; $p < 0,01$) ed altri tre composti indefiniti. Per quanto riguarda la classe dei terpeni invece, β -cariofillene e α -umulene risultano correlati significativamente ($r=0,58$; $p < 0,001$), mentre il β -mircene non risulta

possedere alcuna correlazione significativa; nemmeno con il monoterpene β -ocimene, che presenta anch'esso uno scheletro C₁₀. Quest'ultimo è coinvolto in quattro correlazioni significative (negative), di cui una con l'esano e le rimanenti tre con composti indefiniti, a loro volta correlati significativamente con diversi GLV. Il numero di correlazioni significative tra composti volatili, appartenenti a famiglie chimiche diverse, si limita a due, ovvero esano-ocimene ed esano-cariofillene. Queste due correlazioni risultano particolari perché per i composti in questione sono stati riportati enzimi e percorsi biosintetici differenti; pertanto, una possibile spiegazione a questo, può essere la competizione tra questi composti per uno stesso substrato. L'alta significatività della correlazione tra umulene e cariofillene, supportata dal rapporto medio prossimo ad 1 (Tabella 2), permettono di confermare nei germogli quanto riportato da Wang et al. (2008) sulla specificità di sintesi di HLSTS1 nei tricomi ghiandolari. Inoltre, poiché il mircene non ha presentato correlazioni significative con altri monoterpene, si può confermare la specificità di sintesi di HIMTS2. Tuttavia, serve anche evidenziare che, a differenza di quanto affermato dagli autori citati, il mircene è risultato essere presente anche nei germogli di luppolo, seppur in basse quantità.

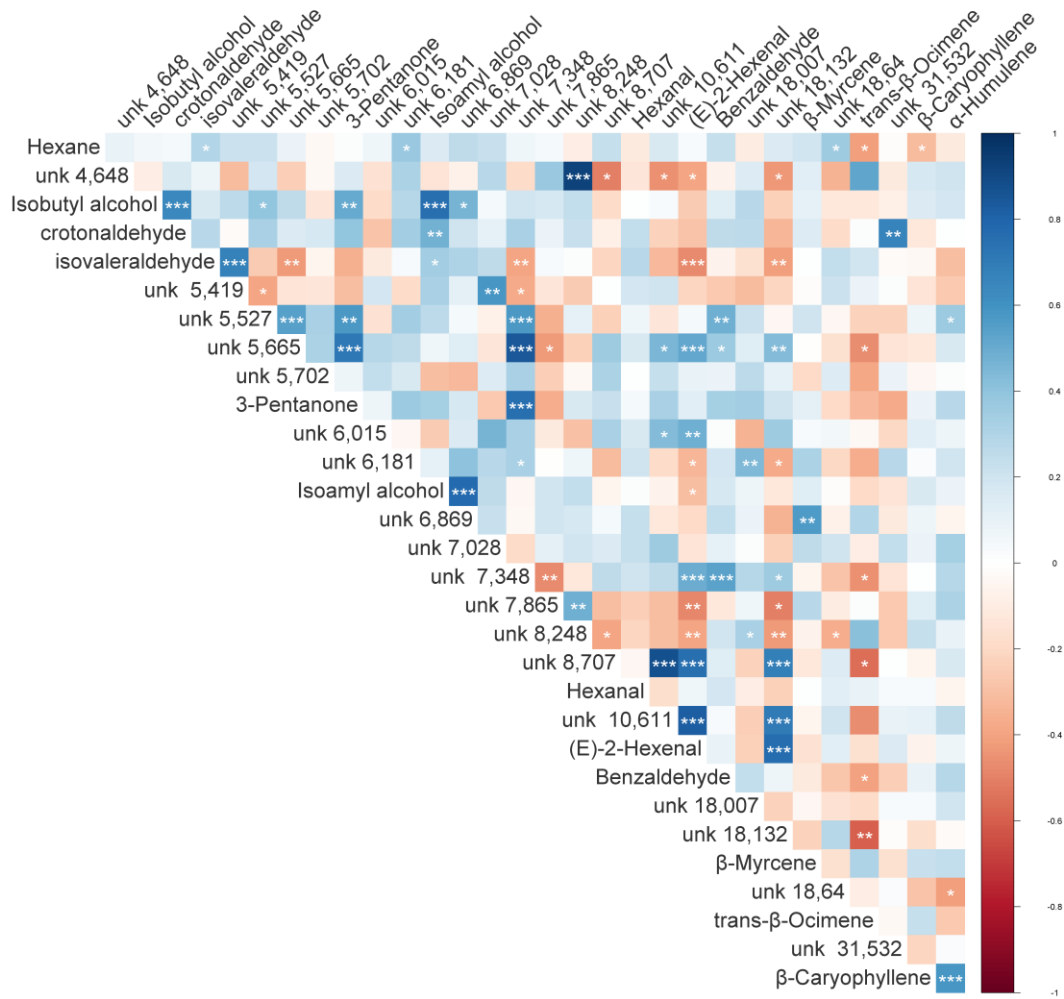


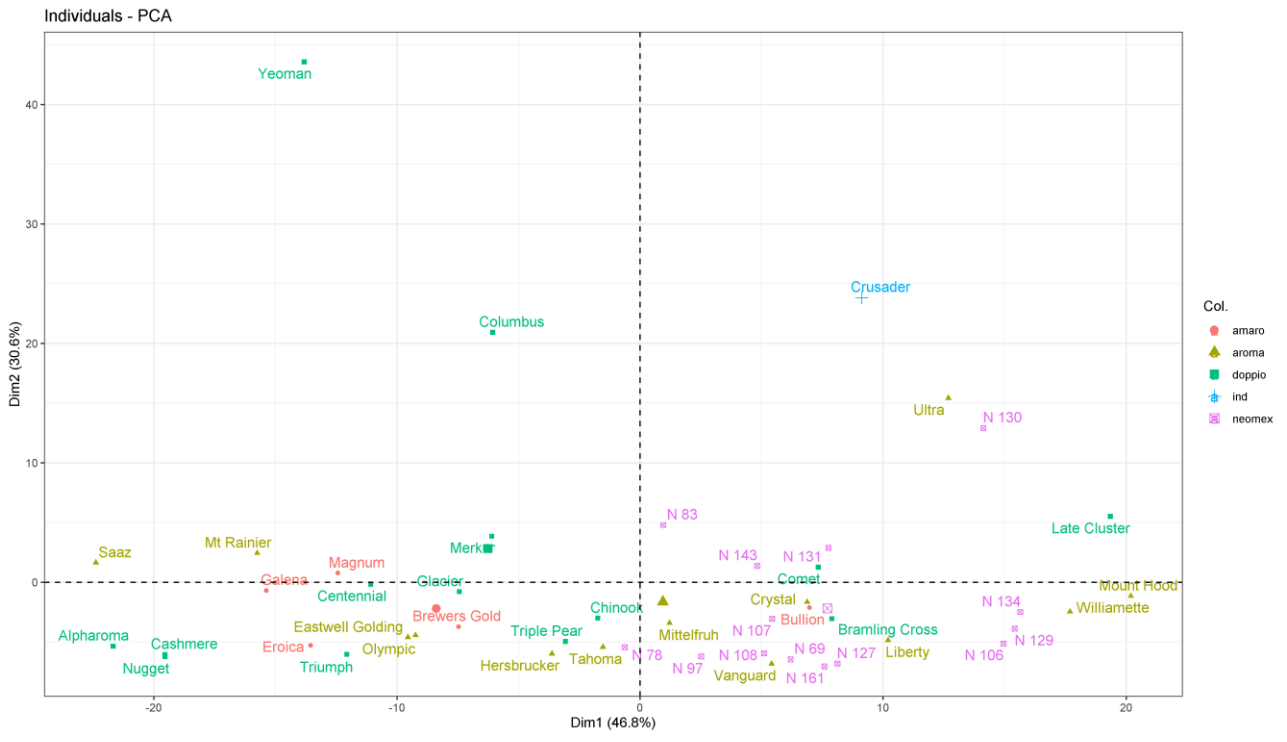
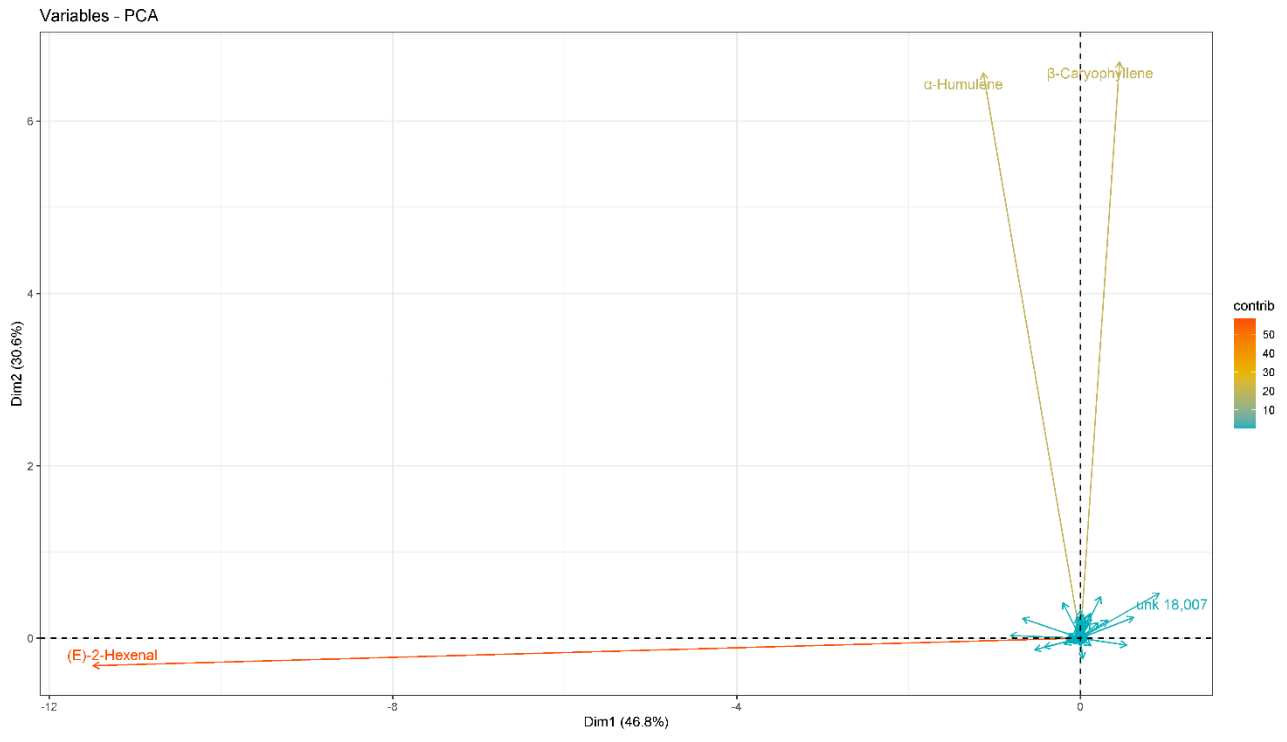
Figura 13 Nel correlogramma sono indicate le correlazioni tra i principali composti volatili dei germogli. Ciascuna correlazione è colorata secondo la scala di valori riportata a destra. Le correlazioni significative sono evidenziate da uno o più asterischi ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

4.3 Analisi delle componenti principali dei germogli

La Tabella 2 e le Figure 11 e 12, riportate precedentemente, permettono di visualizzare e comprendere le differenze tra i principali composti nelle diverse varietà o classi d'uso, mentre le correlazioni in Figura 13 evidenziano i legami fra di essi; di contro però, questi risultati non permettono di rappresentare la complessità "in toto" degli aromi volatili emessi dai germogli. Per determinare in maniera differente le variazioni di concentrazione dei diversi composti nelle cultivar, si è scelto di eseguire l'analisi delle componenti principali (PCA) sull'intero set di dati. Questa tecnica di analisi multivariata consente di visualizzare la matrice di dati in uno spazio cartesiano con un numero di variabili ridotto, definito dalle componenti principali (PC). PC1 e PC2 sono gli assi lungo cui la varianza dei campioni è massima, rispettivamente, ed è grazie a queste scale di valori che ciascuna variabile, ed individuo, riescono ad essere rappresentati. Nella Figura 14 (Variables) sono rappresentate le variabili (composti) mediante frecce di colore e lunghezza diversi, in base al contributo che ciascuna di esse apporta sulla varianza totale dei dati; l'angolo formato dagli assi di due frecce indica la correlazione fra esse, mentre la direzione della freccia è indirizzata verso la PC con cui condivide la correlazione più alta. Nella figura 14 (Individuals) sono rappresentate le proiezioni degli individui lungo le PC (Dim1 e Dim2). Come si può osservare, quando due punti si trovano a distanza ravvicinata significa che condividono punteggi simili, e quindi, anche la composizione degli aromi volatili risulta essere simile. Nei germogli, i composti che contribuiscono maggiormente a spiegare la varianza lungo le PC sono gli stessi indicati precedentemente in Tabella 2 e in Figura 11 e 12; differentemente da prima però, questi composti hanno importanza diversa. Il composto che presenta la freccia di lunghezza maggiore, e che quindi possiede un forte ruolo nella discriminazione degli individui, nonché sulla varianza totale dei dati, risulta essere l'(E)-2-esenale. La direzione della freccia di questo composto indica una forte correlazione con l'asse negativo PC1, ai cui estremi sono posti gli individui con un contenuto superiore di (E)-2-esenale, come Saaz ed Alpharoma. Al contempo, Williamette, Late Cluster, Mount Hood ed N 130 sono disposti nel quadrante opposto, e ciò significa che questi presentano i valori minimi rilevati. Inoltre, è evidente notare che il gruppo neomex si ritrovi confinato nel quadrante di destra, fatta eccezione per N 78; ciò indica che gli individui neomessicani, rispetto alla totalità degli individui, sono caratterizzati da un basso contenuto in 2-esenale. Tale esito trova conferma in quanto già evidenziato precedentemente in Figura 12 (boxplot). Tuttavia, c'è da evidenziare che nel cluster di neomessicani figurano anche altre cultivar appartenenti a gruppi diversi, come Vanguard, Bullion, e Comet. Riguardo il β -cariofillene e α -umulene, il ridotto angolo fra le due frecce indica che sono correlati, mentre la loro direzione indica una forte correlazione con l'asse PC2; come conseguenza, gli individui collocati nei due quadranti superiori presentano un alto contenuto in questi due composti. Alcuni esempi sono

Yeoman e Columbus per l' α -umulene, mentre Crusader per il β -cariofillene. In generale, si nota che la maggior parte delle cultivar è distribuito lungo l'asse PC1 e relativamente pochi elementi si trovano distanti dall'origine di PC2. Infine, sebbene unk 18,007 risulti dalla Tabella 2 come secondo composto per importanza, in questo tipo di analisi è considerato il quarto per contributo; in particolare, risulta correlato positivamente con PC1 ed indirizzato nel verso opposto del (E)-2-esenale. Unk 18,007 è particolarmente presente negli individui posti nel quadrante superiore di destra, di cui i maggiori produttori risultano Ultra, Crusader e N 130.

Complessivamente, la PCA ha permesso di rappresentare in maniera efficiente i punteggi dei diversi aromi volatili emessi dai germogli, e di discriminare il gruppo neomex dal resto dei dati. Inoltre, le rimanenti classi d'uso hanno mostrato un'ampia variabilità e risultano essere distribuite in tutti e quattro i quadranti; fatta eccezione per il gruppo aroma (tre). Ciò significa che le cultivar presenti nei gruppi aroma e doppio presentano una più ampia scelta in combinazioni aromatiche, rispetto a quelle che si riscontrano in amaro e neomex.



4.4 Analisi gerarchica dei germogli

Oltre alle qualità uniche che possiede la PCA, è giusto evidenziare alcuni limiti, tra i quali l'assenza di un'indicazione sulle effettive distanze tra cultivar. Per esempio, se si osservano le distanze tra i diversi punti in Figura 14, è difficile stabilire se N 134 sia più distante da Late Cluster o Crusader. A tal proposito quindi, si è scelto di stabilire le distanze per ogni coppia di cultivar mediante la funzione *dist (stats)* con il metodo "euclidean"; successivamente, la matrice di dissimilarità ottenuta è stata analizzata mediante la funzione *hclust (stats)*. Il risultato grafico finale è rappresentato nel dendrogramma in Figura 15. Come si può notare nel grafico, le cultivar possono essere suddivise macroscopicamente in due gruppi, identificabili seguendo i binomi Crusader-Saaz e Tahoma-N 106. Il primo gruppo, fatta eccezione per N 130 e N 68, è composto unicamente da cultivar commerciali, mentre il secondo comprende sia quest'ultimo che le linee sperimentali neomessicane. Questa valutazione conferma quanto osservato precedentemente, ovvero che il gruppo dei neomessicani non è puro, ma distinguibile dal resto delle cultivar. Se si osserva più nello specifico il primo gruppo, si nota che presenta un cluster solitario formato da Crusader, Ultra, N130, Yeoman e Columbus. Queste cultivar sono risultate essere distanti dal resto degli individui, similmente a quanto riportato nell'analisi PCA. Inoltre, il binomio Mt Rainier-Saaz identifica un cluster di cultivar unicamente lupulus. Si può quindi affermare che questo strumento di analisi fornisce risultati simili a quelli osservati nella PCA, ma permette di visualizzare più marcatamente le similarità, e le differenze, tra i germogli delle cultivar considerate.

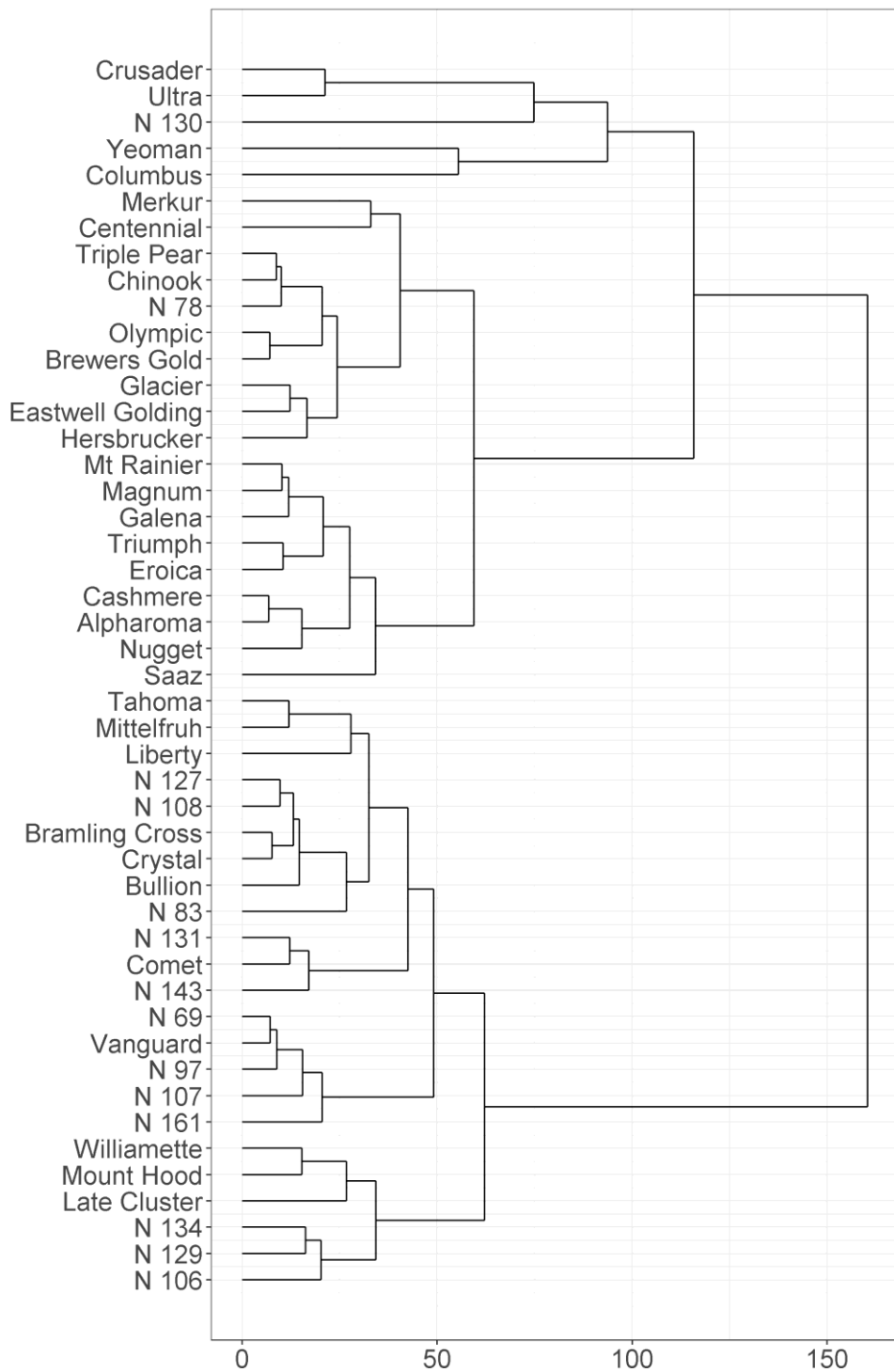


Figura 15 Nel dendrogramma, sono rappresentate le differenze e somiglianze tra gli aromi volatili emessi dai germogli di 47 cultivar di luppolo. Sull'asse delle ascisse è indicata la distanza euclidea mentre ciascun "braccio" (da destra) indica distanza euclidea relativa a ciascuna coppia o cluster di cultivar.

4.5 Aromi volatili dei coni

Dalle analisi effettuate, i coni sono risultati produrre un numero maggiore di composti volatili rispetto ai germogli. Sono stati identificati 81 composti volatili su 252 rilevati. Come si può notare dalla Tabella 3, nei coni, la classe dei terpeni domina l'aroma volatile, di cui il maggiore componente è il β -mircene (68%). Questo dato conferma i contenuti medi di mircene nei coni riportati da Ligor et al. (2014). Seguono poi per ordine di abbondanza α -umulene, β -cariofillene e trans- β -ocimene, che sommati al primo compongono l'82% del totale delle aree pesate. Dal confronto con la porzione di pianta in precedenza presa in esame, si osserva come anche i coni producano gli stessi terpeni che compongono in maggior quota l'aroma volatile dei germogli, prodotti però in quote differenti. Si riportano altri terpeni minori, quali trans- β -farnesene, β -felandrene, β -citronellene, R(+)-limonene, β -selinene β -pinene; e i terpenoidi linalolo e lanceolo. Oltre ai composti riportati, seppur con quote percentuali uguali o minori di 0,15%, sono stati identificati i monoterpene α -copaene, β -elemene, γ -elemene, cis- β -ocimene, α -terpinene, trans-cadina-1(6),4-diene, γ -terpinene, valencene, α -terpinolene, α -pinene, α -felandrene, α -tujone, trans α -farnesene, germacrene, α -fenchene, e α -bulnesene. Con quote molto limitate, uguali o inferiori a 0.15%, tra i terpenoidi si rilevano geraniolo, borneolo, diidrocarvone, trans-citrale, mentolo, trans-nerolidolo, mentolo, α -bisabololo ed ossido di linalolo. Relativamente alla famiglia dei DIV, il GLV (E)-2-esenale rimane l'aldeide presente in maggiori quantità, sebbene siano stati riscontrati anche altri composti simili in percentuali minori. Inoltre, il toluene risulta essere prodotto in quantità maggiori rispetto a quelle riscontrate nei germogli. Se si considera che per ciascuna replica di tessuto le condizioni di crescita, raccolta e conservazione erano simili, i coni risultano emettere una quantità ed un numero minore di DIV rispetto ai germogli (Tabella 2). Da queste prime informazioni appare evidente come questa porzione di pianta, a differenza dei germogli, sia caratterizzata in prevalenza da terpeni e terpenoidi, mentre in quote inferiori da DIV (2%) e composti indefiniti (9%). Analogamente a quanto fatto per i germogli, in Figura 16 sono raffigurati i valori dei principali terpeni in funzione della classe d'uso. Seguendo l'ordine dei grafici, il mircene presenta i valori mediani più alti nelle classi aroma e doppio, mentre amaro e neomex possiedono valori mediani inferiori. Questo composto nei germogli rappresentava solamente il quarto terpene per importanza percentuale, mentre in questo tessuto presenta i valori massimi. Questo esito sembra indicare che la produzione di mircene sia regolata diversamente nelle due porzioni di pianta. In un precedente lavoro, Wang et al. (2008) hanno riscontrato un'elevata espressione di HIMTS2 nei tricomi ghiandolari dei coni.

L' α -umulene sembra essere prodotto in quantità superiori (e variabili) nei gruppi aroma e doppio, mentre meno per amaro e neomex. Il β -cariofillene risulta prodotto in quantità variabili tra i diversi gruppi, tranne che per il gruppo amaro, che presenta la mediana più bassa fra tutte. Interessante notare

che anche in questo tessuto, il gruppo neomex presenti valori di umulene minori di quelli osservati per il cariofillene. Appare quindi chiaro che tale rapporto (< 1) sia conservato non solo nei germogli, ma anche nei coni di questa varietà. Il trans- β -ocimene è caratteristico del gruppo neomex, così come lo è stato anche per i germogli, mentre il gruppo doppio presenta un intervallo di valori stretto e vicino alla mediana di neomex. Il β -farnesene è emesso in alte quantità solamente dai coni del gruppo aroma, con qualcuna eccezione per il gruppo doppio e amaro; anche neomex è capace di produrlo, ma solo in tracce. A riguardo, risulta interessante la posizione dell'individuo selvatico nel terzo quartile del gruppo aroma, poiché indica che i luppoli selvatici europei possono produrre questo sesquiterpene, anche in quantità paragonabili a quelle di cultivar commerciali. Ciò conferma quanto affermato da Dabbous-wach et al. (2021) sui livelli terpenici riscontrati in alcuni individui selvatici in Corsica e da Mockute et al. (2008) riguardo i livelli riscontrati nei luppoli selvatici in Lituania.

Il β -fellandrene, così come per il β -cariofillene, presenta valori mediani simili tra i diversi gruppi, tranne che per il gruppo amaro. Per il β -citronellene, i valori maggiori sono riscontrati nei gruppi aroma e doppio, in quantità inferiore e variabile per amaro, e presente solo in alcune linee di var. *neomexicanus*. Infine, il R(+)-limonene sembra essere prodotto soprattutto da aroma e doppio, mentre meno in neomex e amaro; quest'ultimo però presenta l'outlier con il valore massimo rilevato. Viste le presenti differenze tra gruppi, appare evidente come in generale il gruppo aroma e doppio, rispetto ad amaro, presentino valori mediani maggiori (per i principali terpeni). Questo esito conferma l'attitudine delle cultivar comprese nel gruppo aroma e doppio a soddisfare gli alti livelli e le diversità nella composizione di olio essenziale per la produzione di determinate birre. Per quanto riguarda il gruppo neomex, rispetto alle differenze riscontrate nei germogli, questo appare nuovamente discriminabile grazie al contenuto in trans- β -ocimene; e in β -citronellene rispetto ai terpeni. Per quanto concerne i DIV, in Figura 17 sono raffigurati i prodotti in quantità più elevata nei coni. Osservando il grafico del (E)-2-esenale, questo risulta essere presente in tutte le classi d'uso, la classe amaro appare quella con il box più ampio e con la mediana maggiore, rispetto ai rimanenti gruppi commerciali e ancor meno rispetto a neomex. Il toluene, invece, è maggiormente presente in neomex e aroma, mentre il gruppo amaro possiede la mediana più bassa. Il composto unk 18,007, ovvero il secondo per importanza percentuale nei germogli, è stato riscontrato anche nei coni ma in quantità minori di quelle precedenti. In questo caso il gruppo neomex possiede la mediana maggiore, mentre per tutte le altre classi prossima a zero. C'è da evidenziare che nelle che nelle classi amaro, doppio e aroma sono stati riscontrati i valori massimi (outlier); quest'ultimo gruppo con una distribuzione anomala, con tre outlier ravvicinati posti all'estremo superiore. Il trans-1,4-esadiene sembra essere un DIV tipico di questo tessuto, poiché non è stato riscontrato nell'aroma volatile dei germogli; in particolare appare prodotto unicamente dal gruppo neomex, mentre solamente da una cultivar per

ciascuna classe commerciale. L'esanale è emesso in quantità alte e variabili dal gruppo neomex mentre più contenute per gli altri gruppi, e sebbene queste tre classi presentino boxplot di dimensione diversa, le linee mediane si trovano in posizioni vicine. Infine, l'isobutil alcol si trova principalmente nel gruppo amaro, mentre gli altri gruppi presentano solamente alcuni individui (outlier). Inoltre, sono da fare alcune considerazioni sui valori della cultivar Crusader poiché i coni appaiono emettere alti livelli di GLV e toluene (DIV), e al contempo valori minimi nei principali terpeni. Tale esito va approfondito, dato che potrebbe essere stato indotto dalla presenza di coni non del tutto maturi, anche se nella fase di raccolta e campionamento si era proceduto con un'attenta selezione degli stessi. Nel complesso, ad eccezione del 2-esenale, si può affermare che i coni del gruppo neomex emettono quantità maggiori di DIV, rispetto ad alcune, o tutte, le tre classi commerciali. Questa risultanza potrebbe indicare un'ulteriore chiave di identificazione di questo gruppo. Va comunque ricordato che, le differenze tra le concentrazioni di questi composti, nei due tessuti, saranno trattate nello specifico nel Capitolo 4.9.

<i>Composto</i>	<i>Media</i>	<i>CV</i>	<i>Quota</i>	<i>Cumulativo</i>	<i>N</i>
			<i>%</i>	<i>%</i>	
β -Mircene	580,04	0,83	68,06	68,06	47
α -Umulene	59,90	1,18	7,03	75,09	45
β -Cariofillene	38,02	0,81	4,46	79,55	47
trans- β -Ocimene	20,88	1,86	2,45	82,00	42
(E)-2-Esenale	9,47	0,65	1,11	83,11	48
trans- β -Farnesene	7,00	3,08	0,82	83,94	22
β -Fellandrene	6,80	0,86	0,80	84,73	39
β -Citronellene	6,42	0,74	0,75	85,49	34
Toluene	5,68	0,64	0,67	86,15	45
R(+)-Limonene	4,86	1,47	0,57	86,72	43
Lanceolo	4,51	1,75	0,53	87,25	14
unk 48,161	3,85	5,73	0,45	87,70	14
unk 40,47	3,51	1,03	0,41	88,12	38
β -Selinene	3,22	2,02	0,38	88,49	36
β -Pinene	3,06	1,73	0,36	88,85	21
unk 18,007	2,94	1,59	0,35	89,20	20
DAME	2,84	1,14	0,33	89,53	24
Linalolo	2,83	0,98	0,33	89,86	39

Tabella 3 Principali composti volatili presenti nei coni freschi di 47 cultivar di luppolo. Per ogni analita è riportato nome, media, coefficiente di variabilità, quota percentuale, quota cumulativa e la numerosità. Quest'ultima colonna non rappresenta il numero di cultivar che hanno composto la media (sempre 47), bensì il numero di cultivar che hanno prodotto il composto in quantità maggiore di zero. DAME = estere metilico acido docosaetanoico.

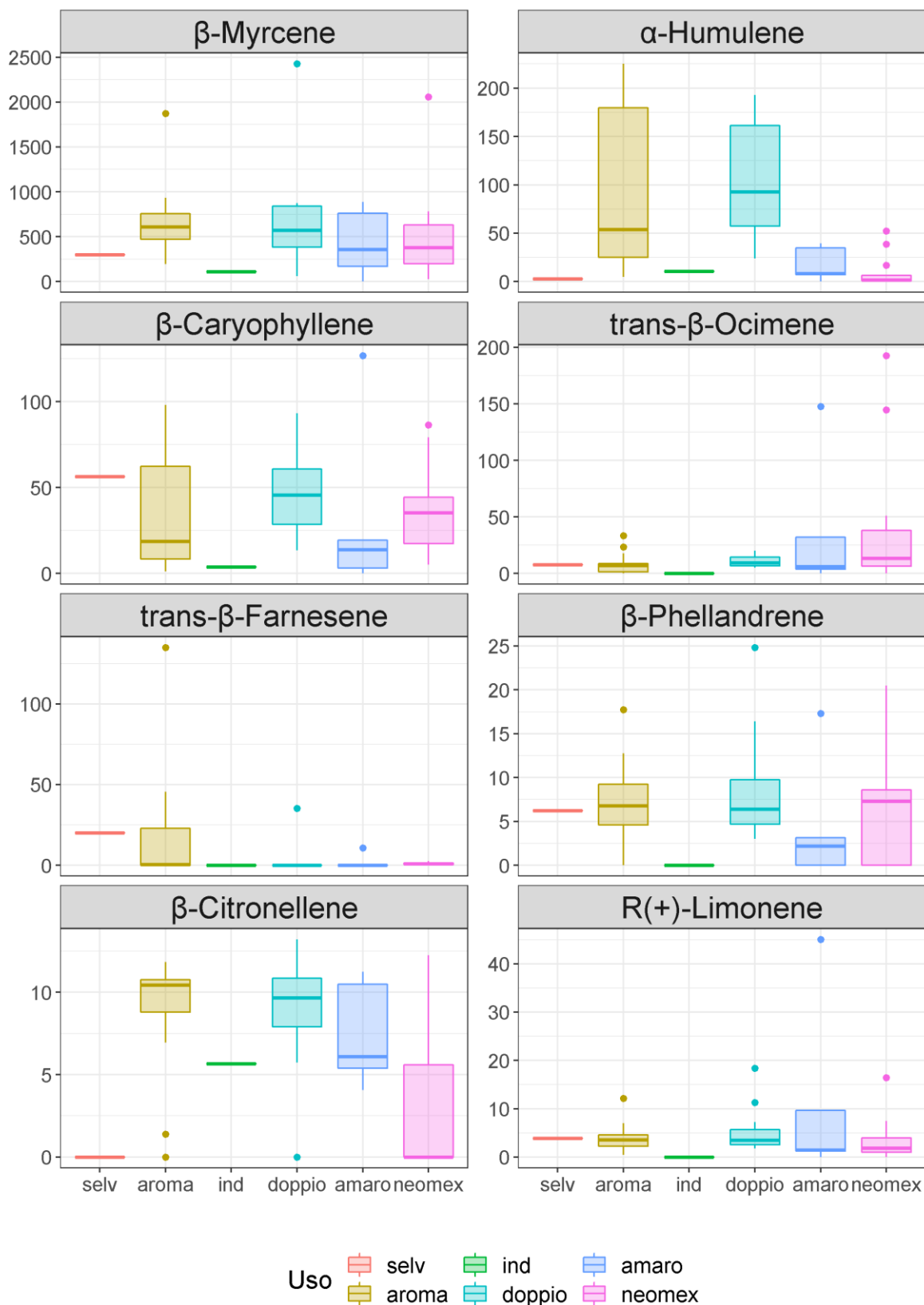


Figura 16 Nei riquadri sono riportati i maggiori terpeni per abbondanza presenti nei coni di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse il gruppo di appartenenza. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" rappresenta un individuo a parte (Crusader) e "selv" l'individuo selvatico. Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier)

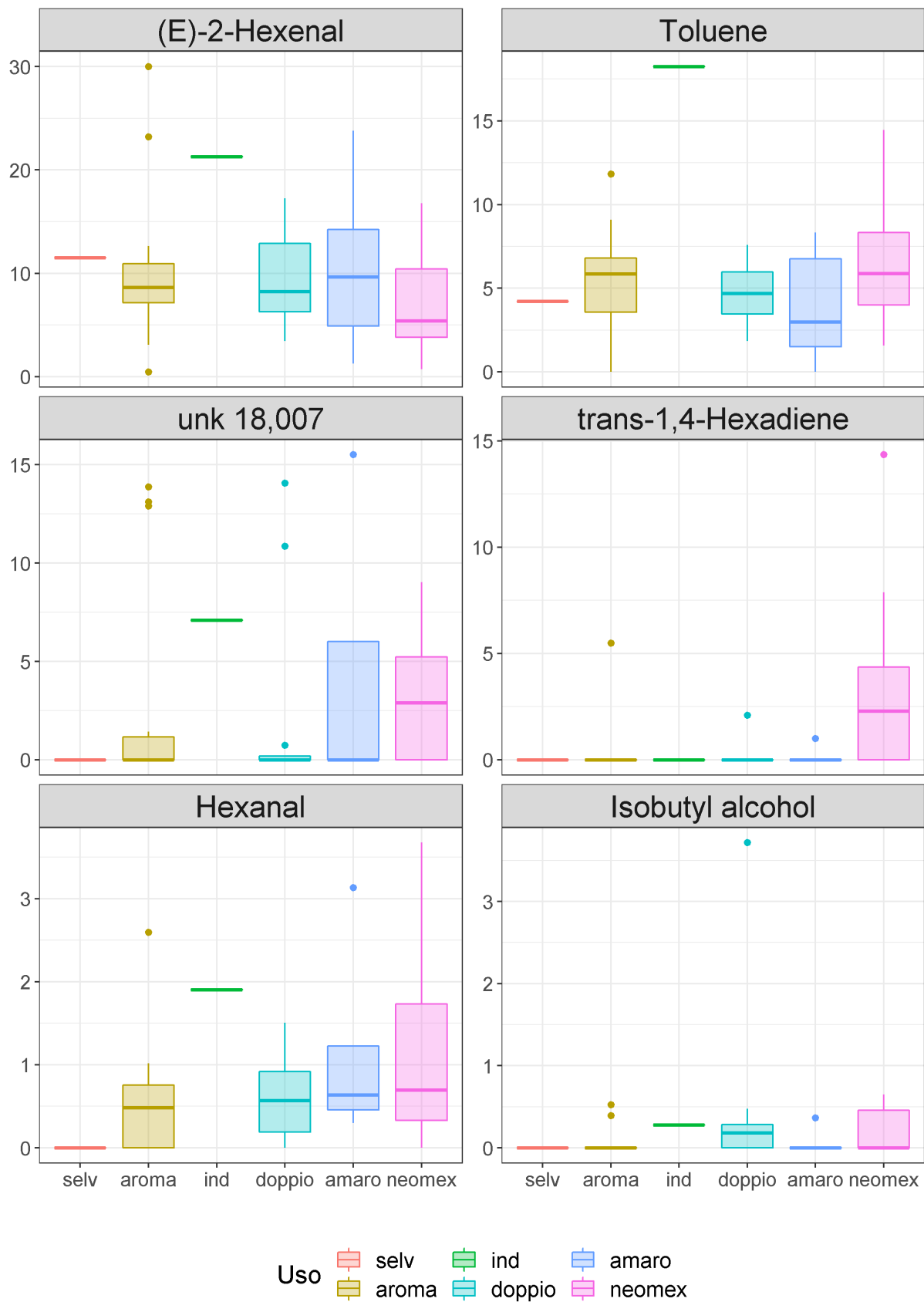


Figura 17 Nei riquadri sono riportati i maggiori DIV presenti nei coni di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse il gruppo di appartenenza. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" rappresenta un individuo a parte (Crusader) e "selv" l'individuo selvatico. Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier)

4.6 Correlazioni tra composti volatili nei coni

La determinazione delle correlazioni tra composti volatili nei germogli ha permesso di comprendere meglio i meccanismi e i maggiori composti coinvolti negli aromi volatili emessi dagli stessi. Risulta quindi importante ed utile determinare le correlazioni anche nei coni, per confermare o smentire quanto affermato per i germogli. Per determinare le correlazioni tra composti volatili presenti nei coni, si è agito in modo analogo dei germogli, calcolando per ciascuna coppia di composti il coefficiente di correlazione di Pearson e la relativa significatività. Le correlazioni sono mostrate nel correlogramma in Figura 18. Per la consultazione degli effettivi valori di correlazione e significatività si rimanda alla tabella in Allegato 3.

Rispetto a quanto osservato precedentemente per i germogli (Figura 13), in questo tessuto è presente un maggior numero di terpeni e correlazioni significative (174 con $p < 0,05$). Questa situazione può essere ricondotta all'elevata quantità di tricomi ghiandolari che ricoprono i tessuti interni del fiore femminile, coinvolti nella biosintesi di terpeni, oltre che a quella di acidi amari e prenilflavonoidi. In generale si nota in figura che la porzione superiore della matrice, compresa tra le prime cinque righe, risulta in prevalenza correlata negativamente con il resto delle colonne. In particolare, tra i primi composti eluiti, figura il toluene. Questo composto aromatico non è stato riscontrato nei germogli in frequenze tali da considerarlo nel calcolo delle correlazioni. Nei coni, invece, condivide prevalentemente correlazioni negative, in particolare con i terpeni e nello specifico con β -pinene ($r = -0,51$; $p < 0,05$), β -mircene ($r = -0,52$; $p < 0,001$), R(+)-limonene ($r = -0,56$; $p < 0,001$), β -felandrene ($r = -0,56$; $p < 0,001$), β -cariofillene ($r = -0,41$; $p < 0,01$) e β -selinene ($r = -0,38$; $p < 0,05$). Le uniche due correlazioni positive risultano essere con due molecole con peso molecolare simile, ovvero i GLV esanale ($r = 0,56$; $p < 0,001$) e (E)-2-esenale ($r = 0,49$; $p < 0,001$). L'esanale evidenzia una sola correlazione positiva con il (E)-2-esenale, mentre le altre negative con i terpeni β -pinene ($r = -0,58$; $p < 0,05$), β -mircene ($r = -0,57$; $p < 0,001$), β -felandrene ($r = -0,52$; $p < 0,01$), linalolo ($r = -0,41$; $p < 0,05$), β -cariofillene ($r = -0,4$; $p < 0,05$). Infine, il 2-esenale, presenta un minor numero di correlazioni significative rispetto ai composti precedenti, ed oltre a quelli già citati (toluene, esanale), risulta correlato negativamente con i terpeni β -mircene ($r = -0,34$; $p < 0,05$), R(+)-limonene ($r = -0,33$; $p < 0,05$), β -Phellandrene ($r = -0,36$; $p < 0,05$) e β -cariofillene ($r = -0,37$; $p < 0,05$). Da queste prime informazioni, appare chiaro che i tre DIV siano mediamente presenti in maggiori quantità quando determinati terpeni, come mircene o cariofillene, presentano i valori minimi (correlazioni negative). Questo

risultato può essere osservato anche nel correlogramma dei germogli, nello specifico tra le correlazioni negative esano-ocimene ed esano-cariofillene.

Considerato che i GLV sono prodotti istantaneamente, a differenza dei terpeni, e che fungono per le piante sia da segnale chimico oltre che protettivo (Ninkuu et al., 2021), si può ipotizzare un rapporto di biosintesi compensativa tra i due, ovvero che, quando un cono subisce uno stress come la recisione del tessuto della pianta, se questo presenta alti valori in terpeni produrrà, di conseguenza, una minore quantità di GLV (correlazione negativa). Questo processo può essere osservato e trova conferma anche individualmente, nel caso dei coni della cultivar Crusader, considerati precedentemente come immaturi. Questa cultivar, in Figura 16, evidenzia mediamente i valori più bassi in tutti i maggiori terpeni, ed al contempo anche i più alti nei maggiori GLV (Figura 17). Riguardo le associazioni significative tra terpeni, non sono state evidenziate correlazioni (significativamente) negative tra composti appartenenti alla stessa classe. Il primo terpene per ordine di eluizione è il monoterpene β -citronellene che è risultato correlato positivamente con β -pinene e DAME (metil estere dell'acido docosapentanoico). Il β -pinene, a sua volta, è risultato correlato con i monoterpene β -mircene ($r=0,63$; $p<0,01$), R(+)-limonene ($r=0,66$; $p<0,001$), β -felandrene ($r=0,66$; $p<0,001$) e con il sesquiterpene α -umulene ($r=0,69$; $p<0,01$). Il pinene risulta quindi essere correlato significativamente sia con monoterpene che sesquiterpene. Il mircene, il maggiore componente dell'aroma volatile dei coni, presenta diverse correlazioni con altri monoterpene quali pinene, R(+)-limonene ($r=0,52$; $p<0,001$) ed soprattutto con il monoterpene β -felandrene ($r=0,87$; $p<0,001$) (Figura 19 B). Da quanto più sopra esposto, appare interessante considerare la presenza di relazioni nella biosintesi di mircene e felandrene, ma non sempre le informazioni sono univoche. Secondo Wang et al. (2008), oltre al mircene non risultano esserci ulteriori prodotti di sintesi da parte della HIMTS2.

Formighieri e Mellis (2014) affermano che alcune felandrene sintasi specifiche, isolate da diverse piante, possano produrre oltre al terpene principale anche mircene ed altri terpeni, in diverse proporzioni. Wang et al. riportano la presenza di altre due monoterpene sintasi (HIMTS1, HIMTS3) per le quali non sono ancora stati determinati i prodotti di sintesi.

Il limonene, oltre alle correlazioni sopracitate, così come il mircene, risulta avere una forte correlazione con il β -felandrene ($r=0,95$; $p<0,001$) (la più alta riscontrata) (Figura 19 A) e meno elevata con linalolo ($r=0,59$; $p<0,001$). In questo caso, considerata la scala di valori simili tra i due composti, così come avviene per umulene e cariofillene, si potrebbe ipotizzare la possibile condivisione di uno stesso enzima. Il monoterpene trans- β -ocimene risulta avere solamente correlazioni con i sesquiterpene β -selinene ($r=0,49$; $p<0,01$) e β -cariofillene ($r=0,49$; $p<0,01$). Riguardo questo terpene (ocimene) Dudareva et al. (2003) riportano nella pianta bocca di leone una

sintasi specifica (ama0a23). Anche il monoterpene linalolo evidenzia diverse correlazioni con i sesquiterpeni β -elemene ($r=0,53$; $p<0,05$), β -cariofillene ($r=0,39$; $p<0,01$) e α -umulene ($r=0,51$; $p<0,001$). Riguardo gli ultimi sesquiterpeni, l' α -copaene possiede solo due correlazioni con perillaldeide ($r=0,55$; $p<0,05$) e α -umulene ($r=0,49$; $p<0,01$); così come il β -elemene ne condivide due con trans- β -farnesene ($r=0,61$; $p<0,05$) e β -selinene ($r=0,67$; $p<0,01$). Anche in questo tessuto, il β -cariofillene si riconferma essere correlato con α -umulene ($r=0,43$; $p<0,01$), e risulta esserlo in particolare modo con β -selinene ($r=0,56$; $p<0,001$). Il β -farnesene risulta correlato con α -umulene ($r=0,53$; $p<0,05$) e β -selinene ($r=0,54$; $p<0,05$).

In generale quindi, in questo tessuto molti terpeni appaiono correlati positivamente, e ciò può far presagire una possibile sinergia tra le diverse le terpene-sintasi. Non tutti i monoterpene sono risultati essere correlati significativamente, e ciò conferma la presenza di più monoterpene sintasi (HIMST1, HIMST2, HIMTS3) riportate da Wang et al. (2008). Inoltre, il fellandrene è coinvolto in due correlazioni molto forti con limonene e mircene (Figura 19).

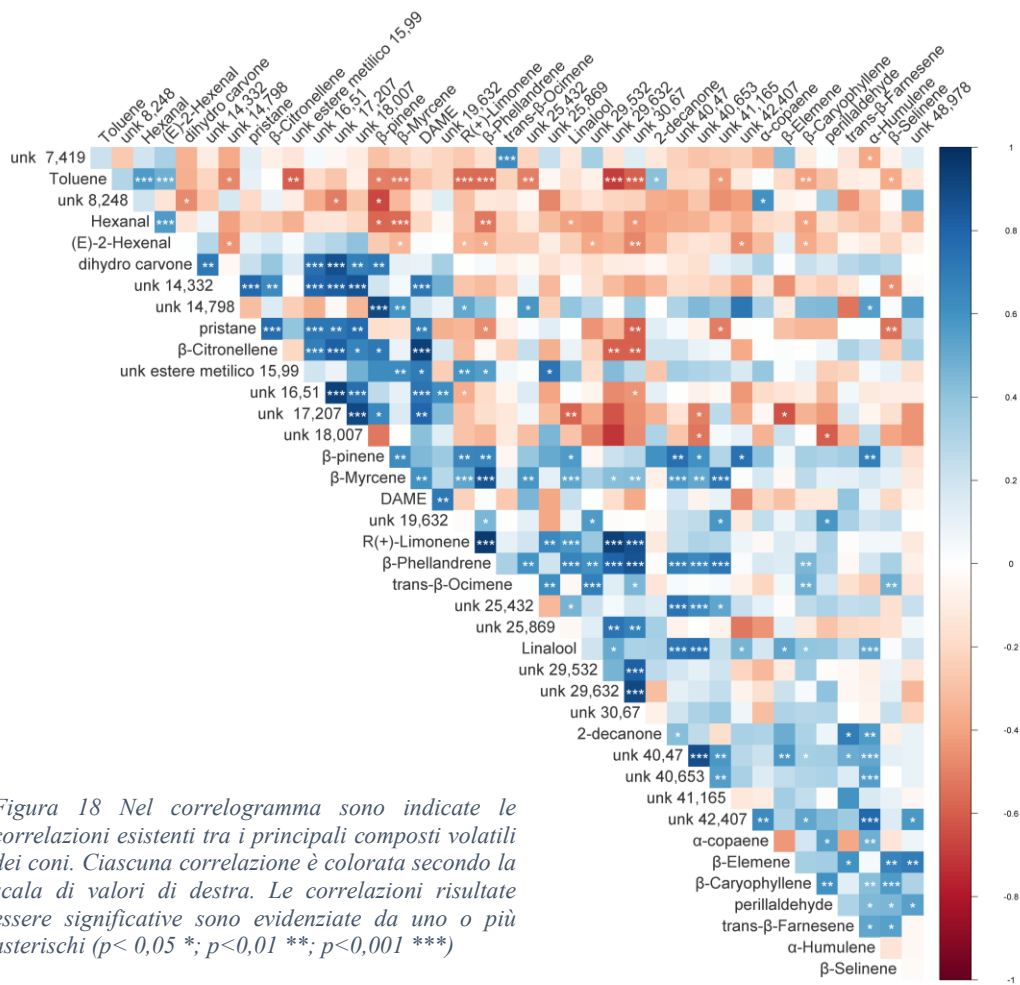


Figura 18 Nel correlogramma sono indicate le correlazioni esistenti tra i principali composti volatili dei coni. Ciascuna correlazione è colorata secondo la scala di valori di destra. Le correlazioni risultate essere significative sono evidenziate da uno o più asterischi ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***)

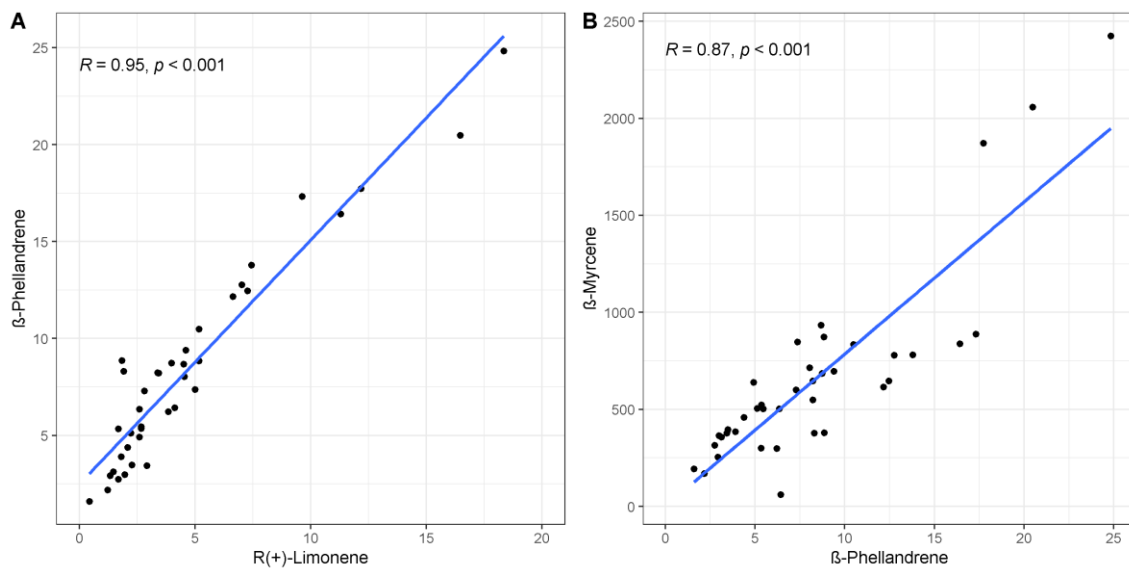


Figura 19 A) Correlazione significativa ($p < 0,001$) tra i monoterpeni R(+)-limonene e β -fellandrene. B) Correlazione significativa ($p < 0,001$) tra i monoterpeni β -fellandrene e β -mircene.

4.7 Analisi delle componenti principali dei coni

Dopo aver osservato importanti differenze nel profilo volatile dei germogli, risulta interessante osservare la nuova distribuzione delle cultivar e delle variabili (composti) nello spazio cartesiano PC1 e PC2. Analogamente a quanto fatto per i germogli, in Figura 20 sono indicati i composti (Variables) e le cultivar (Individuals). Le variabili presentano colori e lunghezze diversi in base al contributo che essi apportano sulla varianza totale dei dati. In questa analisi la PC1 (Dim1) descrive il 96% della variabilità totale del set di dati, mentre PC2 (Dim2) circa il 2%. Sommati, gli assi descrivono il 98% della variabilità totale osservata nei diversi aromi volatili. In questo tessuto il mircene, riscontrato come il maggiore composto dell'aroma volatile, è anche la variabile che possiede maggiore varianza e permette di discriminare gli individui lungo l'asse PC1. Le frecce di α -umulene e β -cariofillene appaiono sia correlate con l'asse negativo PC2 (direzione frecce) che tra di loro, poiché l'angolo tra esse è molto stretto.

Nella porzione opposta, in PC2, è indicato il β -ocimene. La direzione ortogonale delle frecce appartenenti ad umulene ed ocimene, rispetto al mircene, indica in entrambi i casi che non vi è una correlazione fra di esse. Questo può essere ulteriormente confermato dall'assenza di correlazioni significative tra questi nel correlogramma (Figura 18). Invece, i due sesquiterpeni umulene e cariofillene puntano nella direzione opposta a quella del monoterpene trans- β -ocimene, indicando una possibile correlazione negativa. Ciò però, non è stato osservato nella matrice di correlazione, poiché l'ocimene condivide una correlazione positiva con il cariofillene (significativa) mentre con l'umulene risulta negativa ma non significativa.

Se si osserva il grafico rappresentante le cultivar (Figura 20 Individuals), si possono notare differenze ed analogie rispetto a quanto riscontrato precedentemente per i germogli. Dalla figura, si notano i neomessicani confinati nel quadrante superiore (PC2 positivo), fatta eccezione per N 83. I coni di questo gruppo sembrano essere generalmente caratterizzati da un alto contenuto in β -ocimene e basso nei due principali sesquiterpeni; risulta molto variabile il contenuto di mircene (vedi N 161). Inoltre, si nota che, nella porzione di spazio compresa tra l'intero asse PC1 e l'asse negativo PC2, ad eccezione di N 83, sono presenti solamente cultivar appartenenti alle classi aroma e doppio, aventi anche centroidi vicini. Questo conferma quanto affermato precedentemente nei boxplot sull'attitudine delle cultivar da aroma e doppio uso a soddisfare le esigenze in oli essenziali, in questo caso in α -umulene e β -cariofillene. Diversamente, il centroide del gruppo amaro si colloca molto vicino a quello dei neomessicani, e questo può indicare aromi volatili generalmente simili. In maniera opposta invece, le classi aroma e doppio sono distribuite in tutto lo spazio ma con centroidi vicini. La posizione di questi due gruppi nello spazio fornisce un'importante visione sulla variabilità degli aromi

volatili, evidenziando cultivar maggiormente cariche di mircene come Centennial, Olympic ed N161, oppure in cariofillene ed umulene come Ultra, Mittelfruh e Mount Hood.

In conclusione, alcuni gruppi si sono confermati possedere determinate caratteristiche entro varietà (*neomexicanus*), variabilità più ristrette come per il gruppo amaro (punti vicini), e più ampie in doppio e aroma (punti distanti).

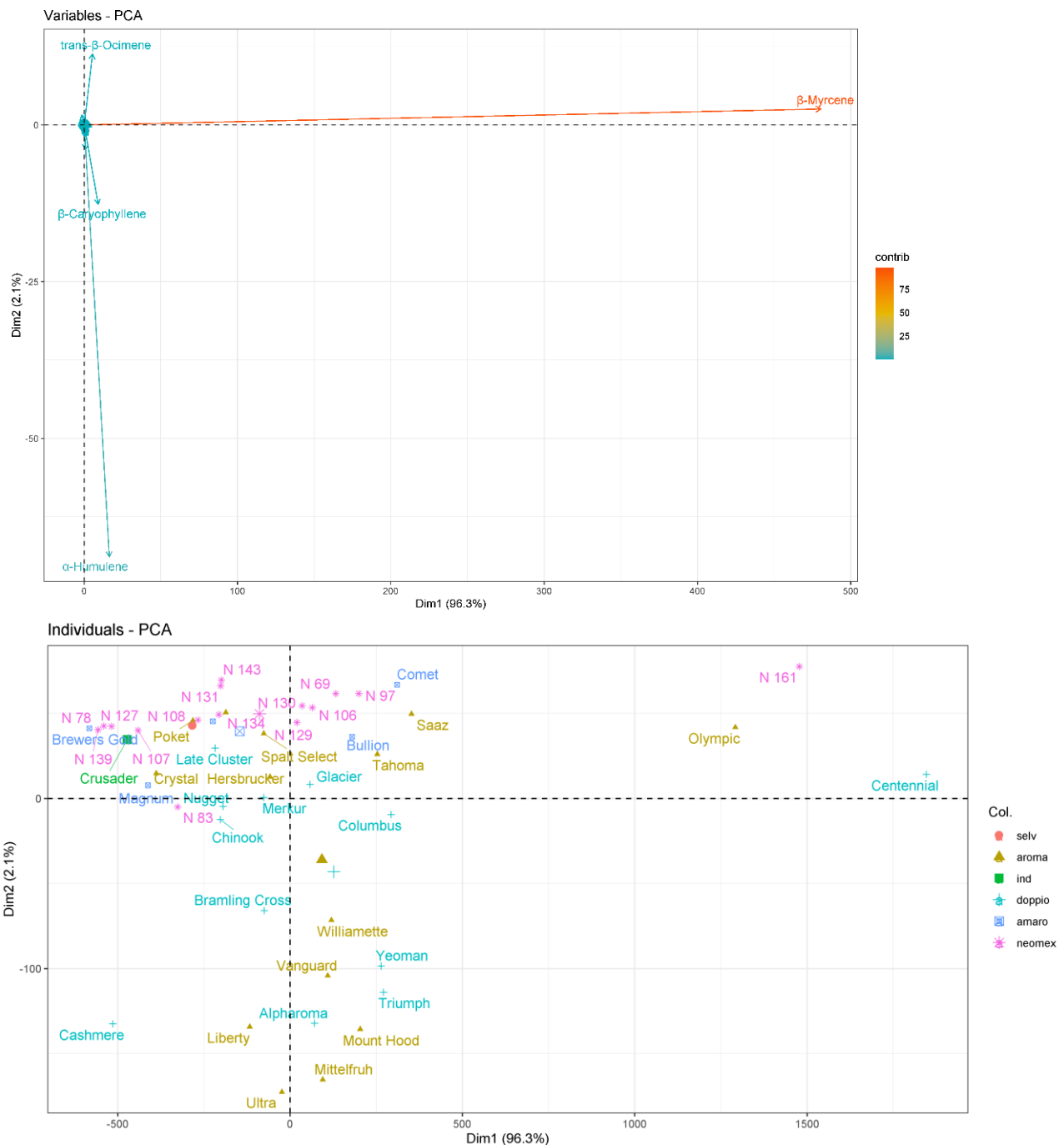


Figura 20 Nelle figure sono rappresentate le variabili (composti) che contribuiscono in misura maggiore a discriminare gli individui (cultivar). Per ciascuna PC sono riportati tra parentesi gli autovalori, che indicano la percentuale di varianza totale spiegata da ciascuna di esse; la loro somma indica la bontà della rappresentazione dei dati lungo gli assi, ed ammonta a circa il 98%. Variables) Le frecce di diversa lunghezza e colore indicano il contributo che ciascun composto volatile apporta alla varianza totale dei dati. Individuals) Nel grafico sono riportate le proiezioni di ciascuna cultivar, colorate in base al gruppo di appartenenza come in indicato in legenda (Col.).

4.8 Analisi gerarchica dei coni

Analogamente a quanto fatto per i germogli, anche per i coni è riportato in Figura 21 il dendrogramma ottenuto dall'analisi gerarchica delle cultivar secondo la distanza euclidea. Globalmente, si nota come la distanza tra le prime cultivar sia molto bassa, ed aumenti procedendo verso il basso. Come si può notare, le cultivar N161, Olympic e Centennial presentano distanze simili tra loro, ma completamente distaccate dal resto delle cultivar; per questo motivo possono essere considerate degli outlier. Questo risultato è stato osservato anche nella PCA, in particolare agli estremi destri della PC1. Escluso quindi il gruppo di outlier, e seguendo la successiva divisione del braccio inferiore, questo identifica due cluster principali, che a loro volta si dispongono in quattro minori. Se si osservano questi quattro cluster si nota che gli individui neomessicani sono distribuiti a coppie, o singolarmente, nei primi tre. L'ultimo invece, identificato dal binomio Columbus-Williamette, risulta essere composto unicamente da cultivar da aroma o doppio uso. Quindi, quanto osservato rispecchia ciò che è rappresentato dai risultati della PCA, con particolare riferimento alle cultivar poste sull'asse negativo PC2 (Figura 20), caratterizzate da una precisa destinazione d'uso (solo aroma o doppio) e da un alto contenuto in umulene e cariofillene.

Osservando le prime cultivar in alto nel dendrogramma, risulta interessante la distanza ravvicinata tra gli aromi volatili di Eastwell Golding e Bramling Cross: esse sono di provenienza inglese ma con destinazioni d'uso diverse (aroma e doppio uso, rispettivamente). Inoltre, risulta curioso notare come Crusader non si discosti dal resto delle cultivar (outlier), pur presentando valori anomali per quanto riguarda terpeni e GLV. In generale quindi, in entrambe le analisi gerarchiche, effettuate sugli aromi volatili di germogli e coni, i neomessicani sono risultati molto simili tra loro, più di quanto osservato per le varietà *lupulus*. Tra questi però, sono state rilevate delle cultivar che presentano dei livelli anomali nei principali composti (alti), tanto da essere isolate dal resto dei dati, sia nella PCA che nell'analisi gerarchica. Tra queste tre cultivar è da evidenziare N161 che, pur appartenendo alla varietà *neomexicanus*, ha ottenuto punteggi simili alle due cultivar commerciali Olympic e Centennial. Questo indica che non sempre le piante *neomexicanus* sono confinate nel proprio cluster, e possono presentarsi individui molto diversi da quelli osservati nel resto dei dati.

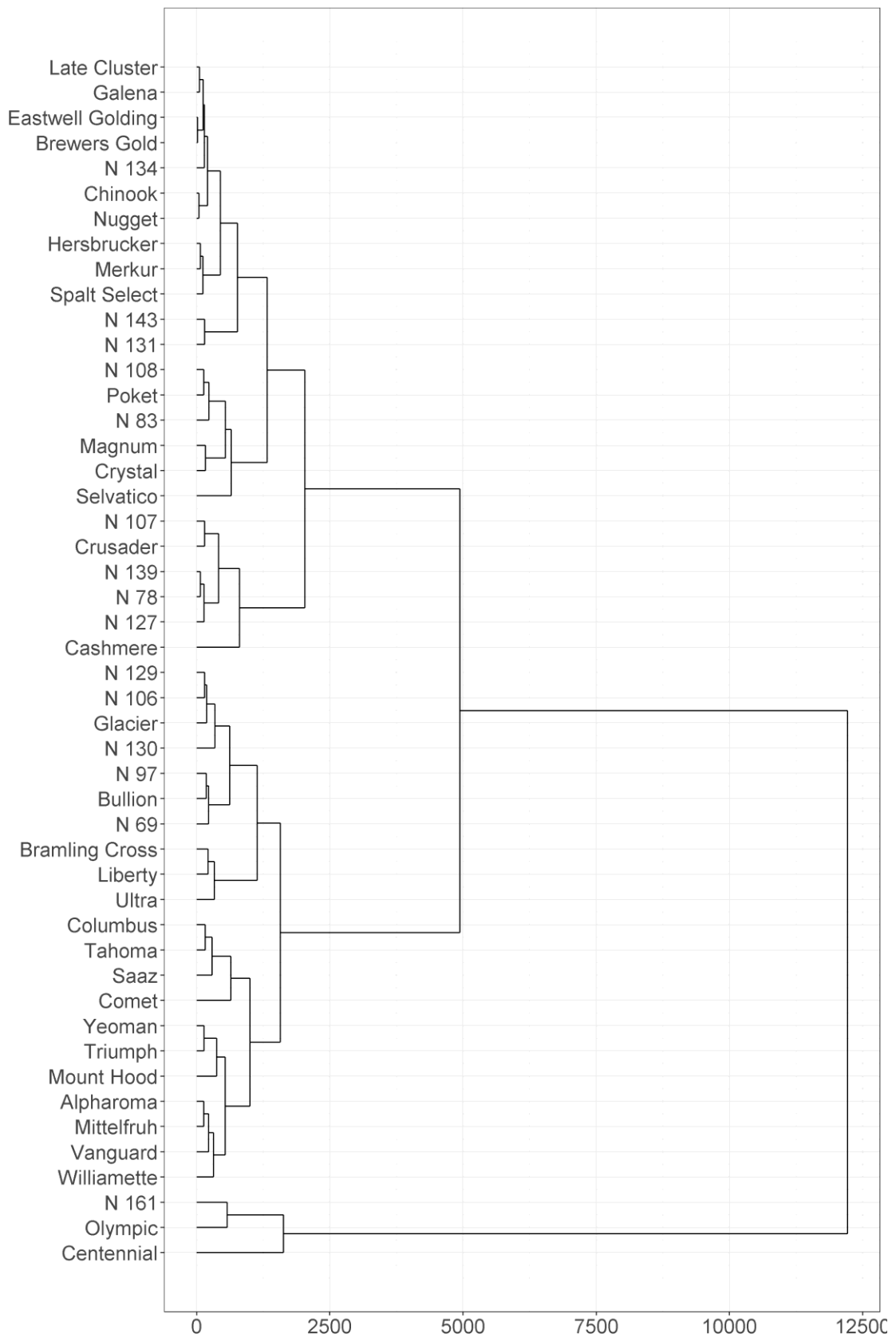


Figura 21 Dendrogramma. Sono rappresentate differenze e similarità tra gli aromi volatili provenienti dai coni di 48 cultivar di luppolo(47+selvatico). Sull'asse delle ascisse è indicata la distanza euclidea mentre ciascun "braccio" (da destra) indica distanza euclidea relativa a ciascuna coppia o cluster di cultivar.

4.9 Relazioni tra coni e germogli

In questo capitolo saranno ripresi i composti più importanti trattati nei capitoli precedenti, e saranno rappresentate graficamente le principali differenze, o similarità, tra germogli e coni. Analogamente a quanto compiuto in precedenza, i composti sono stati rappresentati con dei boxplot, secondo la classe di utilizzo e il tessuto analizzato. In Figura 22 sono mostrati i principali terpeni mentre in Figura 23 i maggiori DIV. Riguardo i primi citati, i terpeni, tutte le classi d'uso hanno dimostrato di possedere quantità maggiori nei coni rispetto ai germogli. Tutto ciò appare scontato, se si pensa che i coni maturi presentano alte quantità di tricomi ghiandolari al loro interno, e quindi, presumibilmente, anche di oli essenziali. Osservando però l'individuo Crusader (linea verde) (Figura 22), la situazione appare diversa, poiché, rispetto a quanto riscontrato nei coni, questa presenta valori maggiori di α -umulene e β -cariofillene nei germogli. Questo può essere spiegato dalla presenza di un'elevata quantità di tricomi ghiandolari sulla pagina inferiore delle foglie giovani, mentre i bassi valori nei coni possono essere ricondotti all'assenza delle strutture di sintesi, dovuto quindi, all'immaturità dei tessuti fiorali raccolti. Per questi motivi l'aroma volatile di Crusader necessiterà in futuro di maggiori approfondimenti.

Considerati i tre principali terpeni (mircene, cariofillene, umulene), si nota che i gruppi aroma e doppio possiedono boxplot molto ampi, e presentano sempre, in entrambi i tessuti, i livelli maggiori (outlier o mediane). Il β -farnesene ha dimostrato di essere tipico di determinate cultivar, in particolare quelle appartenenti alla destinazione d'utilizzo aroma. Questo è stato riscontrato nei coni e nei germogli di due cultivar con diverso utilizzo: Galena (amaro) e Bramling Cross (doppio). Tra i valori più alti registrati, sia nei germogli che nei coni, figurano le cultivar Vanguard (aroma), Saaz (aroma), Williamette (aroma) e Bramling Cross (doppio).

Riguardo i DIV invece, questi appaiono prodotti in scale comparabili tra i due tessuti, sebbene i germogli siano quelli con i valori mediani più alti per (E)-2-esenale ed esanale. Il toluene invece, appare l'unico composto ad essere prodotto in maggiori quantità nei coni e meno nei germogli.

Da queste informazioni risulta interessante capire se le differenze notate tra i livelli medi dei diversi composti nei coni, siano del tutto indipendenti da quelle riscontrate nei germogli, o se in realtà esistono connessioni tali da influenzare il contenuto nei due tessuti. Per determinare le correlazioni tra i composti volatili emessi dai germogli in primavera e coni maturi in settembre, si è calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson e la relativa significatività. I risultati sono mostrati unicamente in Figura 24 mentre i dati in forma tabulata non sono disponibili. In questo caso la matrice presenta una forma rettangolare poiché i coni emettono un maggior numero di composti volatili condivisi tra cultivar; 45 righe in cui vengono rappresentati i composti nei coni e 28 colonne dove appaiono i

composti dei germogli. Inoltre, il correlogramma non risulta “tagliato” (forma di triangolo) perché in questo caso la disposizione dei composti, su righe e colonne, non è speculare (lunghezze e composti diversi). Come fatto per i correlogrammi precedenti, saranno commentate solamente le correlazioni significative tra composti identificati. Le seguenti correlazioni assumono valori positivi se ad un alto contenuto nei germogli corrisponde un proporzionale aumento nei coni, mentre al contrario, risultano negative. In totale sono state calcolate 1260 correlazioni tra i composti presenti nelle due porzioni di pianta, delle quali 82 sono risultate significative. Tra i conosciuti invece, risultano interessanti le correlazioni che presenta il trans- β -ocimene dei germogli. Esso presenta una correlazione altamente significativa ($p < 0,001$) con il trans- β -ocimene rilevato nei coni; ciò può significare che le cultivar che presentano germogli ricchi di questo monoterpene, probabilmente lo saranno anche nei coni. Inoltre, questo composto nei germogli, risulta correlato anche con altri due sesquiterpeni nei coni, ovvero β -cariofillene ($p < 0,05$) e β -selinene ($p < 0,01$). Il β -cariofillene presente nei germogli è risultato essere correlato positivamente con il β -cariofillene nei coni ($p < 0,01$). L'isovaleraldeide dei germogli risulta essere correlata negativamente con diversi composti nei coni, tra cui β -farnesene ($p < 0,01$) e α -umulene ($p < 0,001$). L'esano nei germogli condivide una correlazione positiva con il mircene nei coni ($p < 0,05$), mentre negativa con β -cariofillene ($p < 0,05$) e perillaldeide ($p < 0,05$).

Per concludere quindi, la quantificazione delle correlazioni tra i composti nei due tessuti ha permesso di identificare alcuni meccanismi di regolazione conservati fra cultivar e varietà differenti, fra queste la più evidente è quella con il trans- β -ocimene. Differentemente da quanto osservato singolarmente nei due tessuti, non sono state osservate correlazioni significative tra α -umulene e β -cariofillene. I dati riportati necessitano di ulteriori conferme, ma bisogna considerare la concreta possibilità che queste possano aiutare nell'ambito della selezione genetica, poiché, se veritiere, consentono di individuare le piante superiori (ad es. β -ocimene o β -farnesene) ancora in stadi precoci di crescita.

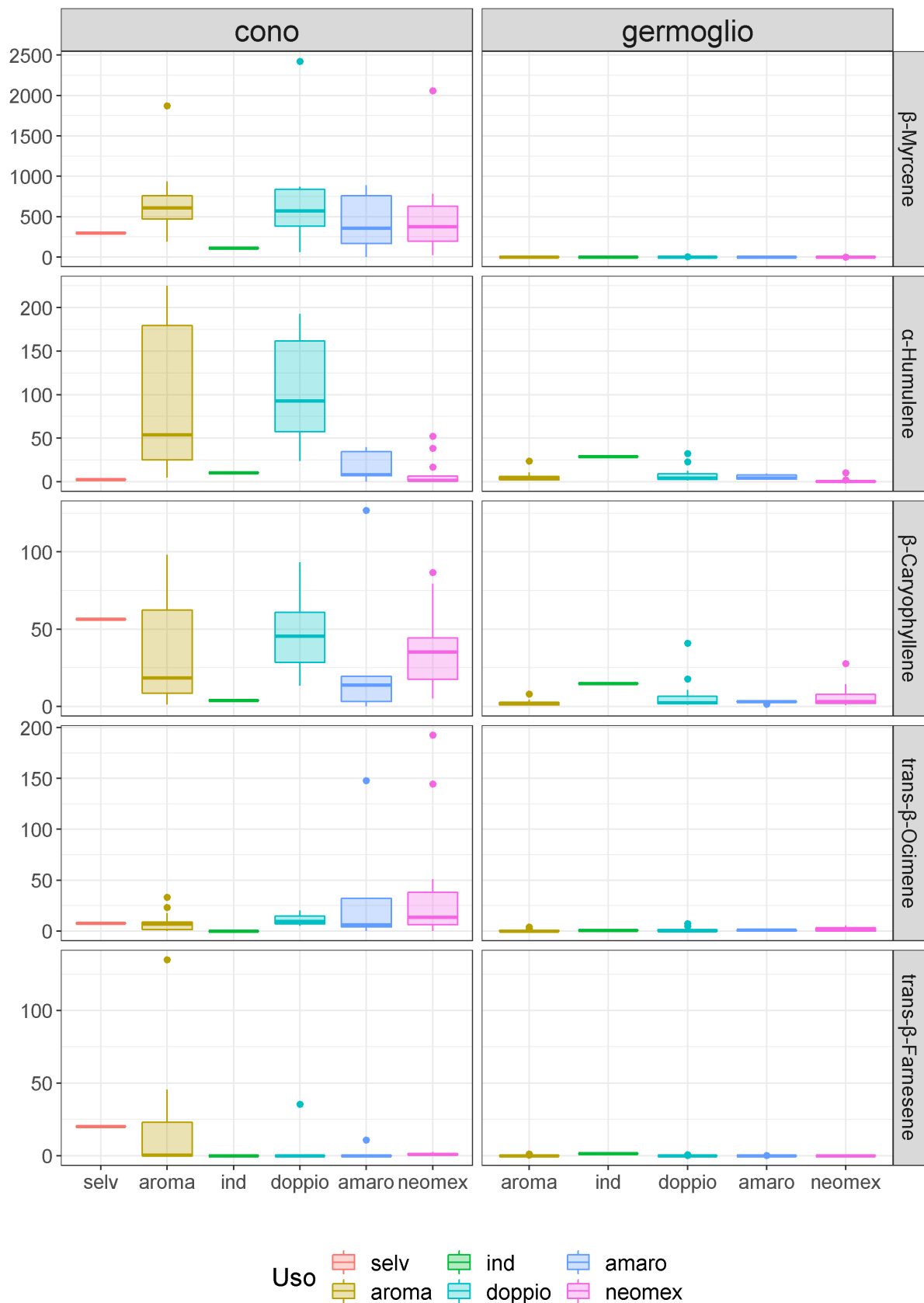


Figura 22 Nei riquadri sono riportati i cinque maggiori terpeni presenti in coni e germogli di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse inferiore il gruppo di appartenenza, mentre sull'asse superiore dalla porzione di pianta considerata. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" rappresenta un individuo a parte (Crusader) e "selv" l'individuo selvatico. Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier)

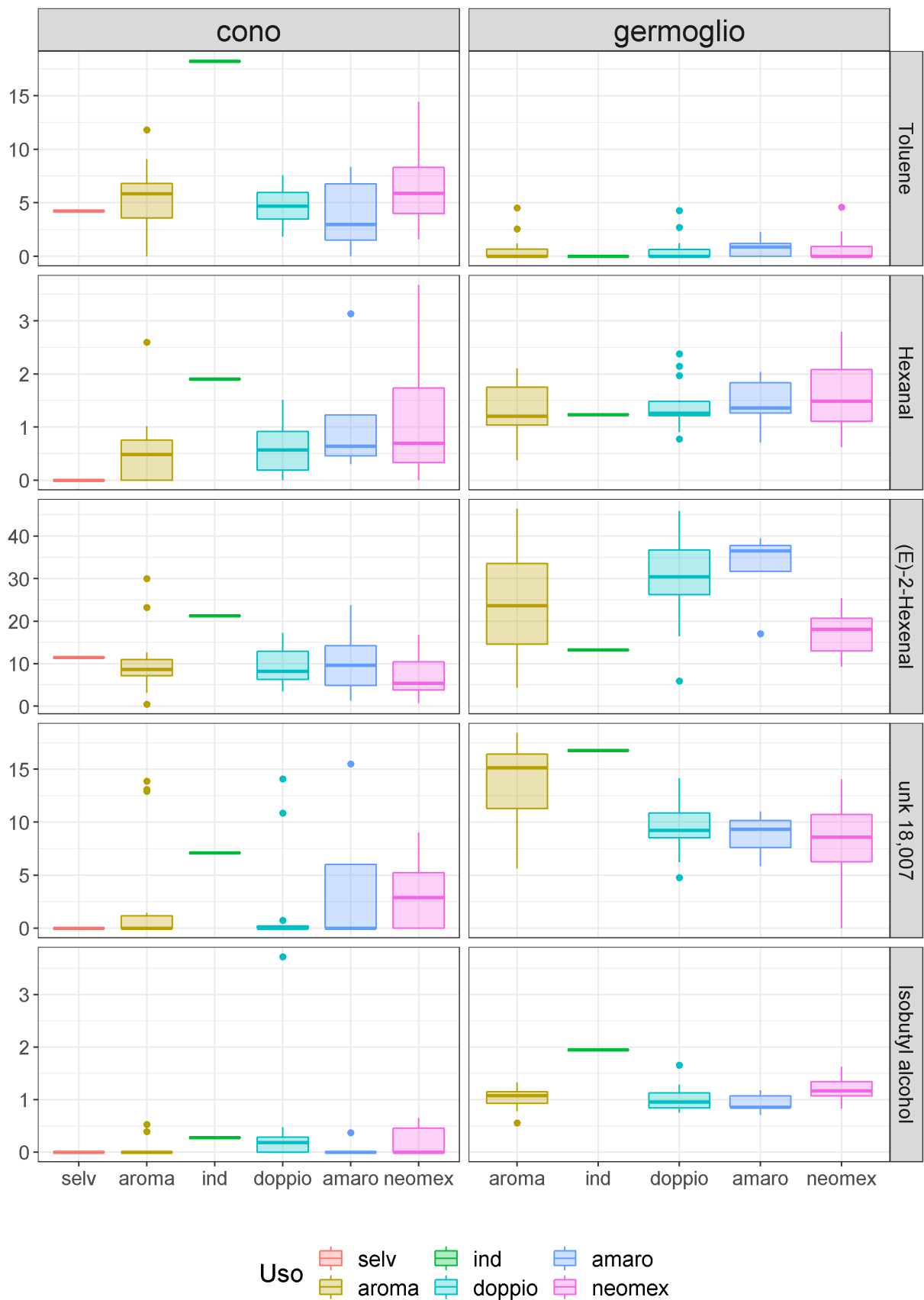


Figura 23 Nei riquadri sono riportati i cinque maggiori DIV presenti in coni e germogli di 47 cultivar di luppolo. Per ciascun composto è riportata la scala dei valori delle aree pesate, mentre sull'asse delle ascisse inferiore il gruppo di appartenenza, mentre sull'asse superiore dalla porzione di pianta considerata. I gruppi sono divisi in amaro, aroma, doppio e neomex (neomexicanus) mentre "ind" "rappresenta un individuo a parte (Crusader)" e "selv" l'individuo selvatico. Per ciascun gruppo, quando possibile, è indicata la mediana (linea), il primo e il terzo quartile (box), i valori massimi e minimi (baffi), e i dati anomali (outlier)

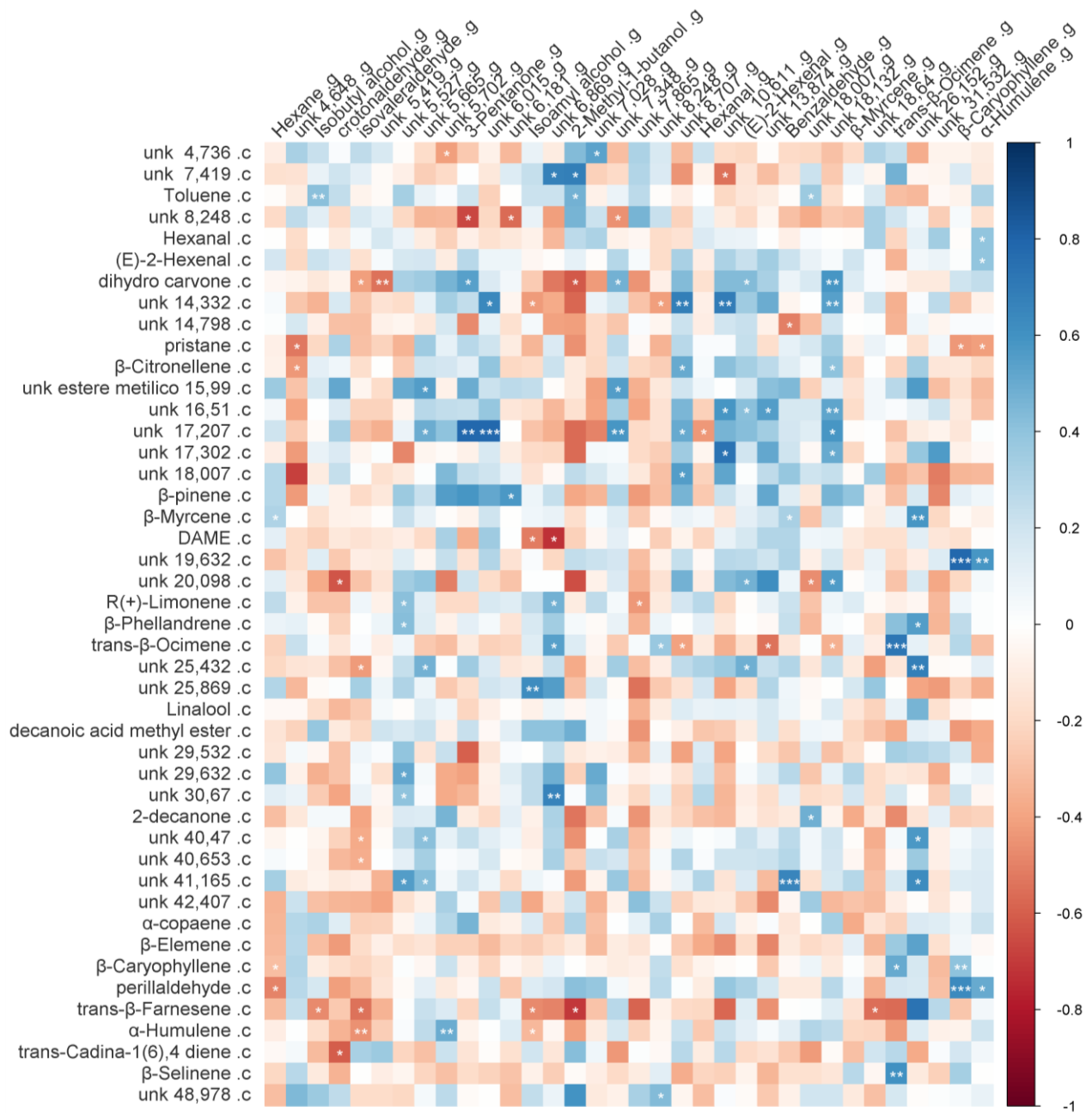


Figura 24 Correlogramma tra i composti volatili presenti nei germogli ("g" - colonne) e nei coni ("c" - righe). Le correlazioni risultate essere significative sono evidenziate da uno o più asterischi ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

5. Conclusioni

Gli esiti conseguiti indicano che, per quanto attiene i germogli primaverili, sono stati identificati 33 composti volatili su 133 totali, dei quali il maggiore risulta essere il GLV (E)-2-esenale. Nei germogli prevalgono in maggiore misura i DIV ed altri composti, attualmente indefiniti, anche se presenti in quantità non trascurabile. I terpeni presenti in maggiore quantità nell'aroma volatile dei germogli sono risultati essere i sesquiterpeni α -umulene e β -cariofillene (rapporto 1:1).

Nei coni sono stati riconosciuti 81 composti su 252 totali, di cui il principale risulta essere il monoterpene β -mircene, seguito da α -umulene e β -cariofillene. In futuro, saranno necessari ulteriori approfondimenti per determinare la natura chimica dei composti sconosciuti, rilevati nelle due porzioni di pianta considerate. Tra questi, particolare riguardo dovrà essere posto su unk 18,007, essendo il secondo composto volatile per abbondanza nei germogli, ed emesso in quantità simili dai coni.

Per quanto attiene la caratterizzazione dei diversi gruppi, rispetto alle varietà *lupulus*, i germogli e i coni di varietà *neomexicanus* sono risultati produrre maggiori quantità di trans- β -ocimene e possedere un rapporto umulene/cariofillene inferiore ad uno. I coni delle varietà da doppio utilizzo e aroma sono risultati essere caratterizzati da un maggiore contenuto in β -mircene e α -umulene. Il β -farnesene è risultato prodotto in entrambe le porzioni della pianta e, tranne due eccezioni, solamente da determinate cultivar da aroma. In questo studio è stata osservata la presenza di toluene non solo nella quasi totalità dei coni, ma anche in quantità limitata nei germogli di alcune cultivar. Sebbene possa apparire inusuale che una pianta produca toluene, è stata osservata la presenza di tale composto anche in due specie vegetali (Heiden et al., 1999).

Le correlazioni significative esistenti tra i diversi composti hanno permesso di tracciare una rappresentazione grafica delle diverse cultivar secondo una probabile e intricata rete di vie biosintetiche ed enzimi coinvolti nella creazione dell'aroma volatile, coinvolgendo sia la singola porzione esaminata della pianta che entrambe. I livelli di α -umulene e β -cariofillene appaiono correlati significativamente all'interno di coni e germogli, mentre non lo sono se si considerano i livelli fra tessuti. Trans- β -ocimene e β -cariofillene sono gli unici terpeni dei germogli risultati essere correlati significativamente con i livelli prodotti nei coni.

I risultati di questo lavoro consentono di fornire una caratterizzazione delle cultivar esaminate, in particolare per quanto attiene i livelli di composti volatili che ne permettono una migliore utilizzazione nella preparazione della birra. L'analisi effettuata sui germogli ha consentito di fornire dati utili a diverse finalità. Uno degli aspetti più importanti riguarda la presenza di correlazioni tra

germogli e infiorescenze per quanto attiene alcuni composti (trans- β -ocimene e β -cariofillene) in quanto tali relazioni trovano un riscontro pratico nel velocizzare le tempistiche di selezione durante programmi di miglioramento genetico, permettendo di individuare gli individui con determinate caratteristiche già in stadi fenologici precoci. Inoltre, i risultati ottenuti mediante l'analisi delle componenti principali, unita all'analisi gerarchica, hanno permesso di distinguere le cultivar in funzione degli aromi volatili prodotti nelle diverse porzioni della pianta. Nel miglioramento genetico varietale, ed in particolare modo nel luppolo, è essenziale la scelta di parentali diversi per migliorare la ricombinazione genetica nella progenie F1. Un ulteriore risultato emerso nel presente studio riguarda la caratterizzazione dei germogli dal punto di vista degli aromi volatili prodotti, che può consentire una valorizzazione delle diverse cultivar in utilizzi diversi da quelli destinati ai birrifici, quali alcune preparazioni culinarie tipiche.

Bibliografia

1. Champagne, A. e Boutry, M. (2017). A comprehensive proteome map of glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.) female cones: Identification of biosynthetic pathways of the major terpenoid-related compounds and possible transport proteins. *Proteomics*, 17(8). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600411>
2. Dabbous-wach, A., Rodolfi, M., Paolini, J., Costa, J., & Ganino, T. (2021). Characterization of wild corsican hops and assessment of the performances of german hops in corsican environmental conditions through a multidisciplinary approach. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/app11093756>
3. De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E. e De Keukeleire, D. (2003). Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4436–4441. <https://doi.org/10.1021/jf034263z>
4. Dudareva, N., Martin, D., Kish C. M., Kolosova N., Gorenstein, N., Fäldt, J., Miller, B. e Bohlmann, J. (2003). (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant cell*, 15(5), 1227–1241. <https://doi.org/10.1105/tpc.011015>
5. Edwardson, J.R. (1952) Hops—Their botany, history, production and utilization. *Econ Bot* 6, 160–175. <https://doi.org/10.1007/BF02984875>
6. Formighieri, C., & Melis, A. (2014). Carbon partitioning to the terpenoid biosynthetic pathway enables heterologous β -phellandrene production in *Escherichia coli* cultures. *Archives of microbiology*, 196(12), 853–861. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1024-9>
7. Heiden, A. C., Kobel, K., Komenda, M., Koppmann, R., Shao, M. e Wildt, J. I. (1999). Toluene emissions from plants. *Geophysical Research Letters*, vol. 26, no. 9, 1283-1286
8. Justin K., Edmond S., Ally M., & Xin, H. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377–392.
9. Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. e He, X. (2014) Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
10. Knobloch, K., H. Paulini, C. Eley, J. E. Eley, E. Ziegler, H. Brandauer, K. Michaelis, and o. Vostrowski (1982). On the essential oil components from *Humulus lupulus* L. var. *neomexicanus* nels. & Cockerell. I. Con- tribution. *Zeitschrift für naturforschung* 37 c:565–569.

11. Kováts, E. (1958), Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. HCA, 41: 1915-1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>
12. Ligor, M., Stankevičius, M., Wenda-Piesik, A., Obelevičius, K., Ragažinskienė, O., Stanius, Z., Maruška, A. e Buszewski, B. (2014). Comparative Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Evaluation of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils and Extracts Obtained Using Different Sample Preparation Methods. *Food Anal. Methods* 7, 1433–1442. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9767-5>
13. Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.002>
14. Meents, A. K. e Mithöfer, A. (2020). Plant–Plant Communication: Is There a Role for Volatile Damage-Associated Molecular Patterns? *Frontiers in Plant Science*, 11(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583275>
15. Mockute, D., Bernotiene, G., Nivinskiene, O. e Butkiene, R. (2008) Variability of Volatiles of Wild Hops (*Humulus lupulus* L.) Growing in Eastern Lithuania, *Journal of Essential Oil Research*, 20:2, 96-101, DOI: 10.1080/10412905.2008.9699963
16. Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M. S. S., Seigner, E., Lutz, A., & Svoboda, P. (2006). Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity*, 97(1), 66–74. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800839>
17. Neve, R. A. (1991). Hops. Chapman and Hall: London
18. Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T. e Zeng, H. (2021). Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
19. Robbauer, G., Buhr, L., Hack, H., Hauptmann, S., Klose, R., Meier, U., Staub, R. e Weber, E. (1995). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala mit Abbildungen Phenological growth stages of the hop (*Humulus lupulus* L.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd*, 47(10), 249–253.
20. Roberts, D.D., Kronstad W.E. e Haunold A. 1980. Genetic Variability and Association of Maturity, Yield, and Quality Characteristics of Female Hops 1. *Crop Science*, 20(4), 523–527. <https://doi.org/10.2135/cropsci1980.0011183x002000040026x>
21. Rossetto, R., Zampieri, G. e Rossi, D. (2021) La produzione artigianale di birra in Veneto. Agenzia veneta per l'innovazione nel settore primario. <https://www.venetoagricoltura.org/wp-content/uploads/2021/08/Report-microbirrifici-VENETO-def.pdf>

22. Rossini, F., Virga, G., Loreti, P., Provenzano, M. E., Danieli P. e Ruggeri, R. (2020). Beyond beer: Hop shoot production and nutritional composition under mediterranean climatic conditions. *Agronomy*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy10101547>
23. Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. A. e Schuurink, R. C. (2013). Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17781–17811. <https://doi.org/10.3390/ijms140917781>
24. Sharpe, B. F. R., Laws, D. R. J. e Brewer, N. (1981). THE ESSENTIAL OIL OF HOPS. *87(April)*, 96–107.
25. Small, E. (1978). A Numerical and Nomenclatural Analysis of Morpho-Geographic Taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*, 3(1), 37–76. URL: <http://www.jstor.org/stable/2418532>
26. Stevens, J. F. e Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry*, 65(10), 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
27. ul Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: Biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 727–739. <https://doi.org/10.1111/pbi.12368>
28. Vidmar, M., Abram, V., Čeh, B., Demšar, L. e Ulrih, N. P. (2019). White hop shoot production in Slovenia: Total phenolic, microelement and pesticide residue content in five commercial cultivars. *Food Technology and Biotechnology*, 57(4), 525–534. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6269>
29. Wang, G., Tian, L., Aziz, N., Broun, P., Dai, X., He, J., King, A., Zhao, P. X. e Dixon, R. A. (2008). Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiology*, 148(3), 1254–1266. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125187>
30. Zhang, G., Zhang, N., Yang, A., Huang, J., Ren, X., Xian, M. e Zou, H. (2021). Hop bitter acids: resources, biosynthesis, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4343–4356. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11329-4>

Librerie R

1. De Vries, A. e Ripley, B. D. (2020). ggdendro: Create Dendrograms and Tree Diagrams Using 'ggplot2'. R package version 0.1.22. <https://CRAN.R-project.org/package=ggdendro>
2. Grosjean, P. e Ibanez, F. (2018). pastecs: Package for Analysis of Space-Time Ecological Series. R package version 1.3.21. <https://CRAN.R-project.org/package=pastecs>
3. Harrell, F. E. Jr (2021). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.6-0. <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
4. Kassambara, A. (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
5. Kassambara, A. e Mundt, F. (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
6. Pedersen, T. L. (2021). ggforce: Accelerating 'ggplot2'. R package version 0.3.3. <https://CRAN.R-project.org/package=ggforce>
7. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
8. RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
9. Wei, T. e Simko, V. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>
10. Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. Journal of Statistical Software, 40(1), 1-29. <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>
11. Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
12. Wickham, H. (2021). tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.1.4. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>
13. Wickham, H., François, R., Henry, L. e Müller, K. (2021). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>

Sitografia

Beer Maverik. All Types of Hops: Aroma, Noble, Bittering & Dual Purpose (2021) Data ultima consultazione: 30/01/2022. <https://beermaverick.com/types-of-hops-aroma-noble-bittering-dual-purpose/#:~:text=Dual%2Dpurpose%20hops%20can%20be,qualities%20to%20the%20finished%20beer>

Commissione Europea (2021). Data ultima consultazione 06/02/22 https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/hops_en#:~:text=Hops%20are%20grown%20in%2014,the%20Czechia%2C%20Poland%20and%20Slovenia

Wolfram Alpha (2022). <https://www.wolframalpha.com>

Allegati

Allegato 1

ALLEGATO I

PARAMETRI DI LAVORO

=====

Agilent 7890B

=====

Oven	
Equilibration Time	1 min
Max Temperature	320 degrees C
Slow Fan	Disabled
Oven Program	On
60 °C for 1 min	
then 2 °C/min to 100 °C for 7 min	
then 4 °C/min to 250 °C for 4.5 min	
Run Time	70 min
1 min (Post Run)	60 °C

Sample Overlap
Sample overlap is not enabled

Front SS Inlet H2	
Mode	Splitless
Heater	On 270 °C
Pressure	On 9.2396 psi
Total Flow	On 30 mL/min
Septum Purge Flow	On 3 mL/min
Septum Purge Flow Mode	Switched
Gas Saver	On 15 mL/min After 1 min
Purge Flow to Split Vent	25 mL/min at 1 min

Column #1
J&W 123-5566: 5032.76076
DB-5ms
325 °C: 60 m x 320 µm x 0.5 µm
In: Front SS Inlet H2
Out: Other

(Initial)	60 °C
Pressure	9.2396 psi
Flow	2 mL/min
Average Velocity	34.793 cm/sec
Holdup Time	2.8741 min
Flow Program	On
2 mL/min for 0 min	
Run Time	70 min
1 min (Post Run)	2 mL/min

Column #2

325 °C: 5 m x 250 µm x 0.25 µm
In: Front SS Inlet H2
Out: Front Detector FID

(Initial)	60 °C
Pressure	1.2951 psi
Flow	1 mL/min
Average Velocity	36.462 cm/sec
Holdup Time	0.22855 min
Flow Program	Off
1 mL/min for 0 min	
Run Time	70 min
1 min (Post Run)	1 mL/min

Front Detector FID	
Heater	Off
H2 Flow	Off
Air Flow	Off
Makeup Flow	Off
Const Col + Makeup	Off
Flame	Off
Electrometer	On

Signals	
Front Signal	Save On 50 Hz
Front Inlet Pressure #1: Actual	Save On 50 Hz
Column Flow #1: Actual	Save On 50 Hz
Column Temperature #1: Actual	Save On 50 Hz

Allegato 2

CORRELAZIONI GERMOGLI

Composto 1	Composto 2	r	p	n
Isoamyl alcohol	(E)-2-Hexenal	-0,31	3,65E-02	47
isovaleraldehyde	(E)-2-Hexenal	-0,47	9,06E-04	46
unk 10,611	(E)-2-Hexenal	0,82	4,23E-08	29
unk 7,348	(E)-2-Hexenal	0,49	4,63E-04	47
unk 4,648	(E)-2-Hexenal	-0,39	3,92E-02	28
unk 5,665	(E)-2-Hexenal	0,52	2,03E-04	47
unk 6,015	(E)-2-Hexenal	0,49	5,60E-03	31
unk 6,181	(E)-2-Hexenal	-0,33	4,21E-02	38
unk 7,865	(E)-2-Hexenal	-0,49	7,62E-03	29
unk 8,248	(E)-2-Hexenal	-0,39	8,30E-03	44
unk 8,707	(E)-2-Hexenal	0,75	1,13E-06	31
Isobutyl alcohol	3-Pentanone	0,51	8,06E-03	26
unk 5,527	3-Pentanone	0,57	2,67E-03	25
unk 5,665	3-Pentanone	0,71	4,21E-05	26
unk 7,348	Benzaldehyde	0,53	1,09E-04	47
unk 5,527	Benzaldehyde	0,49	2,57E-03	36
unk 5,665	Benzaldehyde	0,36	1,17E-02	47
Isobutyl alcohol	crotonaldehyde	0,64	1,22E-04	30
crotonaldehyde	Isoamyl alcohol	0,47	8,71E-03	30
Isobutyl alcohol	Isoamyl alcohol	0,75	1,16E-09	47
isovaleraldehyde	Isoamyl alcohol	0,34	2,01E-02	46
Hexane	isovaleraldehyde	0,29	4,87E-02	46
Benzaldehyde	trans- β -Ocimene	-0,41	4,80E-02	24
Hexane	trans- β -Ocimene	-0,41	4,58E-02	24
unk 7,348	trans- β -Ocimene	-0,46	2,48E-02	24
unk 18,132	trans- β -Ocimene	-0,59	6,11E-03	20
unk 5,665	trans- β -Ocimene	-0,47	2,12E-02	24
unk 8,707	trans- β -Ocimene	-0,56	2,51E-02	16
unk 4,648	unk 10,611	-0,45	4,44E-02	20
unk 5,665	unk 10,611	0,46	1,27E-02	29
unk 6,015	unk 10,611	0,44	2,53E-02	26
unk 8,707	unk 10,611	0,87	3,46E-09	27
crotonaldehyde	unk 31,532	0,67	4,84E-03	16
isovaleraldehyde	unk 5,419	0,67	9,44E-06	35
3-Pentanone	unk 7,348	0,76	7,26E-06	26
isovaleraldehyde	unk 7,348	-0,40	6,53E-03	46
unk 5,419	unk 7,348	-0,38	2,31E-02	36
unk 5,527	unk 7,348	0,57	2,64E-04	36
unk 5,665	unk 7,348	0,84	8,48E-14	47
unk 6,181	unk 7,348	0,32	4,83E-02	38
unk 6,181	unk 18,007	0,44	6,18E-03	37
unk 8,248	unk 18,007	0,33	3,29E-02	43
(E)-2-Hexenal	unk 18,132	0,76	6,90E-09	41
isovaleraldehyde	unk 18,132	-0,42	7,65E-03	40

unk 10,611	unk 18,132	0,70	1,97E-05	29
unk 7,348	unk 18,132	0,36	2,19E-02	41
unk 4,648	unk 18,132	-0,44	2,56E-02	26
unk 5,665	unk 18,132	0,44	4,24E-03	41
unk 6,181	unk 18,132	-0,37	2,96E-02	34
unk 7,865	unk 18,132	-0,51	1,12E-02	24
unk 8,248	unk 18,132	-0,43	7,15E-03	38
unk 8,707	unk 18,132	0,69	3,99E-05	29
Hexane	unk 18,64	0,36	3,68E-02	34
unk 8,248	unk 18,64	-0,37	3,79E-02	32
Isobutyl alcohol	unk 5,527	0,40	1,58E-02	36
unk 5,419	unk 5,527	-0,40	3,68E-02	28
isovaleraldehyde	unk 5,665	-0,43	3,08E-03	46
unk 5,527	unk 5,665	0,55	5,57E-04	36
Hexane	unk 6,181	0,37	2,16E-02	38
Isoamyl alcohol	unk 6,869	0,77	1,06E-05	24
Isobutyl alcohol	unk 6,869	0,46	2,34E-02	24
unk 5,419	unk 7,028	0,59	6,69E-03	20
unk 7,348	unk 7,865	-0,48	8,42E-03	29
unk 5,665	unk 7,865	-0,43	2,08E-02	29
unk 4,648	unk 8,248	0,92	9,54E-12	27
unk 7,865	unk 8,248	0,48	8,24E-03	29
unk 4,648	unk 8,707	-0,50	2,42E-02	20
unk 8,248	unk 8,707	-0,40	3,27E-02	29
unk 18,64	α -Humulene	-0,41	2,43E-02	30
unk 5,527	α -Humulene	0,36	3,68E-02	33
β -Caryophyllene	α -Humulene	0,58	3,99E-05	43
Hexane	β -Caryophyllene	-0,32	3,07E-02	47
unk 6,869	β -Myrcene	0,56	5,18E-03	23

Allegato 3

CORRELAZIONI CONI

Composto 1	Composto 2	r	p	n
(E)-2-Hexenal	unk 30,67	-0,49	3,28E-03	34
(E)-2-Hexenal	unk 42,407	-0,45	3,93E-02	21
(E)-2-Hexenal	unk 14,798	-0,44	4,00E-02	22
(E)-2-Hexenal	unk 29,532	-0,38	4,96E-02	27
(E)-2-Hexenal	β -Caryophyllene	-0,37	1,04E-02	47
(E)-2-Hexenal	β -Phellandrene	-0,36	2,59E-02	39
(E)-2-Hexenal	β -Myrcene	-0,34	1,94E-02	47
(E)-2-Hexenal	R(+)-Limonene	-0,33	2,98E-02	43
2-decanone	unk 40,47	0,43	2,87E-02	26
2-decanone	α -Humulene	0,56	2,64E-03	26
2-decanone	trans- β -Farnesene	0,69	1,77E-02	11
DAME	unk 19,632	0,71	4,37E-03	14
dihydro carvone	unk 18,007	0,68	7,14E-03	14
dihydro carvone	β -pinene	0,71	6,49E-03	13
dihydro carvone	unk 14,332	0,72	1,22E-03	17
dihydro carvone	unk 16,51	0,75	1,25E-04	20
dihydro carvone	unk 17,207	0,88	1,88E-06	18
Hexanal	β -pinene	-0,58	2,37E-02	15
Hexanal	β -Myrcene	-0,57	2,41E-04	37
Hexanal	β -Phellandrene	-0,52	3,79E-03	29
Hexanal	unk 30,67	-0,44	2,36E-02	26
Hexanal	Linalool	-0,41	2,61E-02	30
Hexanal	β -Caryophyllene	-0,40	1,29E-02	37
Hexanal	(E)-2-Hexenal	0,57	2,19E-04	38
Linalool	β -Caryophyllene	0,39	1,30E-02	39
Linalool	unk 42,407	0,46	3,90E-02	20
Linalool	unk 29,632	0,51	1,39E-02	23
Linalool	α -Humulene	0,51	8,34E-04	39
Linalool	β -Elemene	0,53	1,12E-02	22
Linalool	unk 40,47	0,73	1,23E-06	34
Linalool	unk 40,653	0,75	3,95E-07	34
perillaldehyde	α -Humulene	0,44	2,29E-02	26
perillaldehyde	β -Selinene	0,45	4,00E-02	21
perillaldehyde	unk 48,978	0,54	2,41E-02	17
pristane	unk 30,67	-0,60	2,70E-03	23
pristane	β -Selinene	-0,54	7,32E-03	23
pristane	unk 41,165	-0,52	3,34E-02	17
pristane	β -Phellandrene	-0,46	1,69E-02	26
pristane	DAME	0,69	4,75E-03	15
pristane	unk 17,207	0,73	2,06E-03	15
pristane	unk 16,51	0,73	7,95E-05	23
pristane	β -Citronellene	0,76	2,45E-05	23
pristane	unk 18,007	0,78	1,77E-03	13
R(+)-Limonene	Linalool	0,59	8,53E-05	39

R(+)-Limonene	unk 25,869	0,65	1,95E-03	20
R(+)-Limonene	unk 30,67	0,88	7,41E-12	34
R(+)-Limonene	unk 29,632	0,94	4,75E-12	25
R(+)-Limonene	β -Phellandrene	0,95	0,00E+00	39
Toluene	unk 29,632	-0,70	2,32E-04	23
Toluene	unk 15,99	-0,60	8,59E-03	18
Toluene	unk 30,67	-0,60	3,81E-04	31
Toluene	R(+)-Limonene	-0,56	1,67E-04	40
Toluene	β -Phellandrene	-0,56	3,07E-04	37
Toluene	β -Myrcene	-0,52	3,33E-04	44
Toluene	unk 25,432	-0,51	9,53E-03	25
Toluene	β -pinene	-0,51	1,95E-02	21
Toluene	unk 14,798	-0,49	2,18E-02	22
Toluene	unk 41,165	-0,43	4,23E-02	23
Toluene	β -Caryophyllene	-0,41	5,76E-03	44
Toluene	β -Selinene	-0,38	2,86E-02	34
Toluene	2-decanone	0,41	4,57E-02	24
Toluene	(E)-2-Hexenal	0,49	6,45E-04	45
Toluene	Hexanal	0,56	3,54E-04	36
trans- β -Farnesene	α -Humulene	0,53	1,21E-02	22
trans- β -Farnesene	β -Selinene	0,54	3,61E-02	15
trans- β -Ocimene	unk 30,67	0,45	1,06E-02	31
trans- β -Ocimene	β -Caryophyllene	0,49	1,11E-03	42
trans- β -Ocimene	β -Selinene	0,49	4,79E-03	32
trans- β -Ocimene	unk 25,869	0,62	6,11E-03	18
trans- β -Ocimene	unk 29,532	0,68	1,72E-04	25
unk 17,207	β -Elemene	-0,63	2,00E-02	13
unk 17,207	Linalool	-0,59	8,33E-03	19
unk 17,207	unk 40,653	-0,51	4,43E-02	16
unk 17,207	β -pinene	0,65	3,09E-02	11
unk 17,207	DAME	0,80	1,05E-03	13
unk 17,207	unk 18,007	0,91	2,98E-06	15
unk 7,419	α -Humulene	-0,39	3,56E-02	30
unk 7,419	trans- β -Ocimene	0,63	3,22E-04	28
unk 14,332	β -Selinene	-0,46	3,39E-02	21
unk 14,332	β -Citronellene	0,64	4,34E-03	18
unk 14,332	DAME	0,72	6,78E-04	18
unk 14,332	pristane	0,78	7,72E-05	19
unk 14,332	unk 16,51	0,79	2,58E-06	25
unk 14,332	unk 17,207	0,83	3,89E-05	17
unk 14,332	unk 18,007	0,86	1,58E-04	13
unk 14,798	R(+)-Limonene	0,51	2,42E-02	19
unk 14,798	α -Humulene	0,55	1,18E-02	20
unk 14,798	unk 25,432	0,58	2,87E-02	14
unk 14,798	β -Myrcene	0,60	4,20E-03	21
unk 14,798	β -pinene	0,90	1,38E-04	11
unk 16,51	unk 30,67	-0,45	2,14E-02	26

unk 16,51	R(+)-Limonene	-0,37	4,16E-02	31
unk 16,51	unk 19,632	0,62	6,31E-03	18
unk 16,51	DAME	0,74	3,01E-04	19
unk 16,51	unk 18,007	0,75	3,33E-04	18
unk 16,51	unk 17,207	0,93	6,31E-10	21
unk 18,007	perillaldehyde	-0,61	4,80E-02	11
unk 18,007	unk 40,653	-0,53	4,95E-02	14
unk 19,632	β -Phellandrene	0,46	3,27E-02	22
unk 19,632	unk 29,532	0,57	1,76E-02	17
unk 19,632	perillaldehyde	0,58	2,96E-02	14
unk 19,632	unk 41,165	0,59	1,35E-02	17
unk 25,432	Linalool	0,47	1,59E-02	26
unk 25,432	unk 41,165	0,53	1,98E-02	19
unk 25,432	unk 40,653	0,63	3,94E-04	27
unk 25,432	unk 40,47	0,73	1,38E-05	27
unk 25,869	unk 30,67	0,68	5,72E-03	15
unk 25,869	unk 29,632	0,74	9,95E-03	11
unk 29,532	unk 30,67	0,82	1,02E-06	24
unk 29,632	unk 30,67	0,90	3,70E-09	23
unk 40,47	β -Caryophyllene	0,33	3,99E-02	38
unk 40,47	trans- β -Farnesene	0,50	4,86E-02	16
unk 40,47	α -Humulene	0,52	9,10E-04	38
unk 40,47	unk 41,165	0,57	2,77E-03	25
unk 40,47	β -Elemene	0,58	9,54E-03	19
unk 40,47	unk 40,653	0,89	7,67E-13	36
unk 40,653	unk 41,165	0,55	4,29E-03	25
unk 40,653	α -Humulene	0,55	4,03E-04	37
unk 42,407	β -Caryophyllene	0,53	1,41E-02	21
unk 42,407	unk 48,978	0,57	2,65E-02	15
unk 42,407	α -copaene	0,63	8,53E-03	16
unk 42,407	α -Humulene	0,79	2,13E-05	21
unk 8,248	β -pinene	-0,67	2,55E-02	11
unk 8,248	unk 17,207	-0,52	3,36E-02	17
unk 8,248	dihydro carvone	-0,47	4,89E-02	18
unk 8,248	α -copaene	0,61	1,59E-02	15
unk 15,99	β -Phellandrene	0,56	1,58E-02	18
unk 15,99	R(+)-Limonene	0,60	6,69E-03	19
unk 15,99	β -Myrcene	0,63	3,17E-03	20
unk 15,99	DAME	0,70	1,07E-02	12
unk 15,99	unk 25,869	0,74	2,28E-02	9
α -copaene	α -Humulene	0,49	7,54E-03	29
α -copaene	perillaldehyde	0,55	1,26E-02	20
β -Caryophyllene	α -Humulene	0,43	3,30E-03	45
β -Caryophyllene	β -Selinene	0,56	3,71E-04	36
β -Caryophyllene	perillaldehyde	0,60	1,11E-03	26
β -Citronellene	unk 29,632	-0,60	8,89E-03	18
β -Citronellene	unk 30,67	-0,59	1,76E-03	25

β-Citronellene	unk 18,007	0,66	2,71E-02	11
β-Citronellene	unk 16,51	0,69	1,52E-04	25
β-Citronellene	β-pinene	0,71	1,40E-02	11
β-Citronellene	unk 17,207	0,82	3,31E-04	14
β-Citronellene	DAME	0,93	1,49E-08	18
β-Elemene	trans-β-Farnesene	0,61	4,76E-02	11
β-Elemene	β-Selinene	0,67	2,42E-03	18
β-Elemene	unk 48,978	0,69	4,05E-03	15
β-Myrcene	unk 29,632	0,43	3,38E-02	25
β-Myrcene	unk 30,67	0,44	9,73E-03	34
β-Myrcene	unk 40,653	0,51	1,14E-03	37
β-Myrcene	R(+)-Limonene	0,52	3,32E-04	43
β-Myrcene	Linalool	0,52	6,08E-04	39
β-Myrcene	unk 40,47	0,58	1,51E-04	38
β-Myrcene	unk 25,432	0,59	1,04E-03	28
β-Myrcene	DAME	0,60	1,84E-03	24
β-Myrcene	unk 41,165	0,73	4,12E-05	25
β-Myrcene	β-Phellandrene	0,87	1,18E-12	39
β-Phellandrene	β-Caryophyllene	0,46	3,42E-03	39
β-Phellandrene	unk 25,432	0,59	2,32E-03	24
β-Phellandrene	unk 29,532	0,61	1,25E-03	25
β-Phellandrene	unk 40,653	0,65	5,05E-05	33
β-Phellandrene	Linalool	0,67	8,87E-06	36
β-Phellandrene	unk 40,47	0,69	5,49E-06	35
β-Phellandrene	unk 41,165	0,73	8,83E-05	23
β-Phellandrene	unk 29,632	0,81	1,86E-06	24
β-Phellandrene	unk 30,67	0,86	3,77E-10	31
β-pinene	Linalool	0,57	1,76E-02	17
β-pinene	unk 40,653	0,61	2,17E-02	14
β-pinene	β-Myrcene	0,63	3,20E-03	20
β-pinene	R(+)-Limonene	0,66	2,92E-03	18
β-pinene	β-Phellandrene	0,66	5,16E-03	16
β-pinene	α-Humulene	0,69	1,21E-03	19
β-pinene	unk 42,407	0,74	3,50E-02	8
β-pinene	unk 40,47	0,76	1,76E-03	14