



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

## Valutazione dell'effetto dello stress idrico sulla canapa: analisi delle variazioni dei metaboliti secondari

Relatore

Prof. Stefano Bona

Correlatrici

Dott.ssa Maddalena Cappello Fusaro

Dott.ssa Irene Lucchetta

Laureando

Marco Perin

Matricola

2044332

Anno accademico 2023-2024



## Sommario

<b>Riassunto</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>9</b>
1.1 <i>Canapa: storia e diffusione</i> .....	9
1.2 <i>Cannabis sativa L.: botanica</i> .....	9
1.2.1 Popolazioni selvatiche .....	10
1.2.2 Varietà da fibra .....	10
1.2.3 Varietà da infiorescenza .....	10
1.2.4 Varietà da seme .....	11
1.2.5 Altri usi .....	11
1.3 <i>Metaboliti secondari</i> .....	12
1.3.1 Stress idrico e metaboliti secondari .....	14
<b>2. Scopo della ricerca</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>17</b>
3.1 <i>Analisi gascromatografica</i> .....	23
3.2 <i>Analisi statistica</i> .....	23
<b>4. Risultati</b> .....	<b>25</b>
4.1 <i>Cannabinoidi</i> .....	25
4.1.1 Cannabidiolo .....	25
4.1.2 Cannabinolo .....	26
4.1.3 $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo .....	28
4.2 <i>Classi di terpeni</i> .....	29
4.2.1 Acidi carbossilici .....	29
4.2.2 Alcoli .....	29
4.2.3 Aldeidi .....	31
4.2.4 Chetoni .....	32
4.2.5 Cicloalcheni .....	33
4.2.6 Esteri .....	33
4.2.7 Idrocarburi aromatici .....	34
4.2.8 Monoterpeni .....	35
4.2.9 Monoterpenoidi .....	36
4.2.10 Sesquiterpeni .....	37
4.2.11 Sesquiterpenoidi .....	38
4.2.12 Solfuri .....	40
<b>5. Discussione</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Conclusioni</b> .....	<b>43</b>
<b>7. Bibliografia</b> .....	<b>45</b>



## Riassunto

La prova in oggetto ha come scopo analizzare come e quanto varia la composizione dei metaboliti secondari nelle infiorescenze di *Cannabis sativa* L. in risposta a stress idrici di varia intensità e applicati in diverse fasi di sviluppo della pianta. Per questa prova sono state usate 120 piante di due varietà di canapa a basso contenuto di  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC). Delle 60 piante di ogni varietà, la metà ha subito uno stress idrico in fase vegetativa mentre l'altra metà durante la fioritura. Lo stress idrico è stato di diverse intensità: moderato e severo con le piante che hanno per 10 giorni ricevuto quotidianamente la quantità di soluzione nutritiva che serviva a raggiungere il 60% e il 30% rispettivamente dell'acqua che il substrato di coltivazione poteva al massimo trattenere. Per ogni trattamento alcune piante sono state destinate al controllo ricevendo soluzione nutritiva per raggiungere il 90% dell'acqua trattenibile dal substrato. Le infiorescenze sono poi state raccolte ed essiccate. Dall'analisi di queste è emerso che, oltre ad un'importante differenza varietale, lo stress idrico severo porta ad una significativa riduzione del contenuto in cannabidiolo (CBD) delle infiorescenze. Anche il confronto tra lo stress idrico nelle diverse fasi fenologiche ha evidenziato una significativa riduzione di CBD e monoterpeni (tra le principali classi di molecole responsabili dell'odore e del sapore delle infiorescenze) nelle piante stressate durante la fioritura. Inoltre anche le altre classi di terpeni variano significativamente (in positivo e in negativo) nelle infiorescenze delle piante sottoposte alle diverse intensità di stress idrico applicato in fioritura e in fase vegetativa. Questa prova ha quindi evidenziato come *Cannabis sativa* L. sia sensibile a stress idrici severi e in fasi avanzate dello sviluppo, sottolineando che una adeguata irrigazione sia fondamentale per preservare il contenuto di metaboliti secondari, fondamentali per l'uso medico o ricreativo delle sue infiorescenze.



## Abstract

The aim of this trial was to analyse how and to what extent the composition of secondary metabolites in the inflorescences of *Cannabis sativa* L. varies in response to water stress of differing intensities, applied at different stages of plant development. For this trial, 120 plants from two low  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) hemp varieties were used. Of the 60 plants of each variety, half were subjected to water stress during the vegetative stage, while the other half during flowering. The water stress applied was of varying intensity: moderate and severe, with the plants receiving, for 10 days, a daily amount of nutrient solution to reach 60% and 30%, respectively, of the maximum water retention capacity of the cultivation substrate. For each treatment, some plants were allocated as controls and received a nutrient solution to reach 90% of the substrate's maximum water retention capacity. The inflorescences were then harvested and dried. The analysis of these showed that, in addition to significant varietal differences, severe water stress led to a significant reduction in cannabidiol (CBD) content in the inflorescences. A comparison of water stress at different phenological stages also highlighted a significant reduction in CBD and monoterpenes (among the main classes of molecules responsible for the smell and flavour of the inflorescences) in plants stressed during flowering. Additionally, other classes of terpenes also varied significantly (both positively and negatively) in the inflorescences of plants subjected to different intensities of water stress during flowering and the vegetative phase. This trial thus highlights how *Cannabis sativa* L. is sensitive to severe water stress, especially in the later stages of development, underscoring that adequate irrigation is essential to preserve the secondary metabolite content, which is crucial for the medical or recreational use of its inflorescences.





# 1. Introduzione

## 1.1 Canapa: storia e diffusione

La canapa (*Cannabis sativa* L.) è una pianta coltivata fin dall'antichità per i suoi molteplici usi. Le prime prove della sua coltivazione risalgono a 6000 anni fa (Fleming, et al., 1998) anche se alcuni resti archeologici fanno ipotizzare un suo uso già nel 10.000 A.C. (Kung, 1959). La canapa è probabilmente originaria dell'Asia centro-occidentale (Li, 1974) ma le difficoltà nel riconoscere il polline fossile da quello di *Humulus lupulus* L. (Fleming, et al., 1998) e il fatto che le popolazioni spontanee derivano dall'inselvaticamento di varietà coltivate rendono difficile definire un preciso areale d'origine della specie (Shultes, 1970).

Da almeno un millennio in Eurasia c'è stata una netta separazione tra canapa destinata alla produzione di fibra (in Europa e nell'Asia del nord) e canapa ad alto tenore di sostanze psicoattive (Africa e Asia meridionale). Un effetto di questa separazione nord-sud dei genotipi è stato quello di un differente adattamento al fotoperiodo (le varietà da fibra sono longidurne e fioriscono molto precocemente rispetto alle altre) e alla comparsa di caratteri morfo-fisiologici molto diversi (Chandra, et al., 2017). In base a questi *C. sativa* L. può essere suddivisa in popolazioni selvatiche, varietà da fibra, da infiorescenza e da seme.

## 1.2 *Cannabis sativa* L.: botanica

*Cannabis sativa* L. è l'unica specie del genere *Cannabis* (famiglia *Cannabaceae*) e si divide in due sottospecie: *C. sativa* L. subsp. *sativa* e *C. sativa* L. subsp. *indica*. È una pianta diploide ( $2n=20$ ) e dioica anche se, soprattutto in alcune varietà coltivate per la produzione di fibra o acheni, non è infrequente l'ermafroditismo. Il sesso maschile è eterogametico (XY) tuttavia l'espressione del sesso è notevolmente influenzata da fattori ambientali e si conoscono varietà monoiche XX, XY e YY (Baldoni, et al., 2001). Il dioicismo di *C. sativa* L. sembra che si sia evoluto nel progenitore monoico dei generi *Cannabis* e *Humulus* (Barcaccia, et al., 2020). La canapa è una pianta annuale a ciclo primaverile-estivo con radice fittonante e fusto eretto alto fino a 4-5 metri, più o meno ramificato e con nodi poco evidenti. Le foglie hanno lunghi piccioli, alterne o opposte con la prima coppia di foglie vere intere ed ellittiche, le successive palmato-sette. Le foglioline sono in un numero che va da 3 a 11, lanceolate con margine seghettato e apice acuminato. I fiori maschili sono riuniti in pannocchie ascellari, quelli femminili appaiati all'ascella di brattee foliacee. Il frutto è un achenio di colore bruno mazzato e contiene circa un 30% di olio. La canapa ha un accrescimento molto rapido e inizia a fiorire circa due mesi dopo la germinazione. Le piante maschili sono più esili

e fioriscono alcuni giorni prima di quelle femminili (Baldoni, et al., 2001). Tuttavia, visto l'alta variabilità delle caratteristiche morfologiche che si riscontra in *C. sativa* L. è opportuno distinguere la specie in popolazioni selvatiche e varietà da fibra, infiorescenza e seme.

### **1.2.1 Popolazioni selvatiche**

Popolazioni di *C. sativa* L. che crescono spontaneamente sono comuni in più parti del mondo. Recenti studi molecolari hanno evidenziato però che queste non derivano direttamente da quelle primitive (progenitrici della canapa coltivata) ma dall'incrocio tra varietà sfuggite al controllo dell'uomo. Per adattarsi all'ambiente non più condizionato dall'uomo hanno cambiato alcune loro caratteristiche morfo-fisiologiche (Chandra, et al., 2017). Le piante selvatiche rispetto a quelle coltivate tendono ad avere un fusto centrale molto più legnoso e ramificato e foglioline più strette (Small, 2015). I loro acheni sono più piccoli, maggiormente ricoperti da macchie scure e con una zona d'abscissione attiva che li fa cadere a maturità. In queste popolazioni l'ermafroditismo è molto raro (Chandra, et al., 2017).

### **1.2.2 Varietà da fibra**

La canapa è stata un'importantissima fonte di fibra per la produzione tessile e di corde usate soprattutto per la navigazione. Ad oggi il suo utilizzo si è notevolmente ridotto soprattutto a causa della sostituzione con materiali sintetici che sono molto più economici e versatili. La sua coltivazione resta comunque abbastanza diffusa in Cina che ne è il principale produttore e dove rappresenta un'importante coltura da millenni (Clarke, et al., 2013). In Europa la canapa si è diffusa a partire dal 500 d. C. ed è restata un'importante coltura fino al ventesimo secolo (Small, 1979). Nel corso dei secoli la canapa da fibra (*C. sativa* L. subsp. *sativa*) è stata selezionata per avere grandi dimensioni (fino a 6m), un fusto poco ramificato con internodi molto ampi, un sistema vascolare con prevalenza di floema rispetto allo xilema e una bassa produzione di seme. Inoltre si utilizzano prevalentemente varietà monoiche per avere più uniformità nelle dimensioni e nell'epoca di maturazione (Chandra, et al., 2017).

### **1.2.3 Varietà da infiorescenza**

La *C. sativa* L. sottospecie *indica* è caratterizzata da un alto contenuto in cannabinoidi nelle infiorescenze, tale da conferirne un effetto psicoattivo. L'uso di canapa in riti sciamanici è stato riscontrato già nell'antica Cina dove sembra che le sue proprietà psicotrope siano conosciute da almeno cinque millenni (Touw, 1981). Jang, et al. (2006) hanno confermato la presenza in una tomba cinese di 2700 anni fa di cannabis apparentemente con alti livelli di THC, suggerendone un fine ritualistico. Le infiorescenze di canapa sono state utilizzate per la preparazione di medicinali

nelle più importanti civiltà del mondo antico come in Egitto, Grecia, India, nell'impero Islamico e Romano. Gli Assiri sembra che le utilizzassero anche per scopi ricreativi. L'uso di cannabis per scopi medici, religiosi, ritualistici e ricreativi si è diffuso notevolmente nell'ultimo millennio in molte parti del mondo, soprattutto nell'Asia meridionale. In India e Afghanistan è inoltre diventato strettamente associato alla religione. Nelle regioni temperate di America ed Eurasia il suo uso come droga ha iniziato a diffondersi solo nel diciannovesimo secolo ma non si è diffuso particolarmente prima del ventunesimo secolo. Dopo la seconda guerra mondiale l'uso di cannabis subì un brusco declino soprattutto in occidente a causa di un forte proibizionismo e all'avvento di molti nuovi farmaci. Oggi in molti paesi occidentali la cannabis per uso medico e in alcuni casi anche ricreativo sta tornando in auge grazie alle evidenze scientifiche che provano la sua efficacia nel trattamento di molte malattie e disturbi e grazie ad una più favorevole percezione da parte dell'opinione pubblica che spingono gli stati a decriminalizzarla (Chandra, et al., 2017). In Italia attualmente si può coltivare canapa solo di varietà autorizzate che garantiscono un contenuto massimo di THC dello 0,2% anche se è tollerato un massimo dello 0,6%, valore oltre il quale la pianta può avere un debole effetto psicoattivo (Ministero dell'Interno). Gli usi autorizzati dal Ministero dell'Interno sono vari (semilavorati quali fibra, canapulo, polveri, cippato, alimenti, cosmetici, prodotti per il florovivaismo, ecc) anche se negli ultimi anni in Italia si coltiva *Cannabis sativa* L. per produrre infiorescenze con alto contenuto in cannabidiolo (CBD) ma con THC entro i limiti di legge (la cosiddetta "cannabis light").

#### **1.2.4 Varietà da seme**

L'utilizzo della canapa a fini alimentari è sempre stato secondario rispetto alla produzione di fibra e infiorescenza ma negli ultimi decenni sta incrementando. Questo perché gli acheni sono ricchi di olio composto per l'80% e più da grassi polinsaturi con un rapporto tra acido linolenico (omega-6) e linoleico (omega-3) favorevole alla salute. Inoltre contengono una buona quantità di proteine con ottimo profilo amminoacidico, minerali, vitamine e fibra (Goyal, 2021). Storicamente gli acheni per l'alimentazione umana e del bestiame erano raccolti da piante di canapa da fibra o da infiorescenza e per questo non sono state costituite varietà specifiche per la produzione di seme. Negli ultimi anni si stanno selezionando però genotipi di bassa statura e con infiorescenze compatte e ramificate che producono più acheni e con harvest index più alto (Chandra, et al., 2017).

#### **1.2.5 Altri usi**

Oltre agli usi già citati nei capitoli precedenti negli ultimi anni sta prendendo sempre più piede l'utilizzo della canapa nell'edilizia dove le sue fibre sono utilizzate per la produzione del

calcestruzzo di canapa, della lana di canapa e dei pannelli isolanti. Questi materiali, oltre che ad essere ottimi isolanti termici, consentono di ridurre il grande impatto ambientale che ha l'edilizia poiché la loro produzione consente di assorbire più CO<sub>2</sub> di quanta ne viene emessa. *Cannabis sativa* L. può essere inoltre utilizzata per la produzione di carta, come sostituto della plastica in moltissimi settori (ad esempio negli imballaggi, nell'industria automobilistica, ferroviaria, ...), nella cosmesi, nel settore sanitario e alimentare. La coltivazione della canapa ha poi molti vantaggi ambientali ed agronomici come lo stoccaggio di anidride carbonica, l'inserimento nella rotazione colturale con effetti sulle malattie e sulle erbe infestanti, la prevenzione dell'erosione del suolo, un aumento della biodiversità e uno scarso o nullo utilizzo di pesticidi durante la sua coltivazione (Commissione europea) (Commissione europea).

### 1.3 Metaboliti secondari

I metaboliti secondari sono composti che derivano da vie metaboliche che utilizzano prodotti intermedi del metabolismo primario e possono accumularsi nelle cellule a causa di un'inibizione enzimatica e/o da un'imperfezione biochimica. Questi non sono essenziali per sviluppo o per la riproduzione della pianta ma, in alcuni casi, possono migliorare la fitness dell'individuo che ne accumula una certa quantità. I metaboliti secondari sono sintetizzati in un organo ben preciso ma possono accumularsi in un organo diverso da quello deputato alla loro sintesi. Inoltre, a parte la via metabolica costitutiva, che porterebbe alla formazione di quantità fisiologiche di metaboliti secondari, ne esisterebbe una indotta da stimoli esterni che sembra portare alla formazione di quantità molto alte di queste sostanze (Capasso, et al., 2011).

*Cannabis sativa* L. produce diversi metaboliti secondari. Di questi i terpeni e cannabinoidi hanno una grande rilevanza per l'aroma e per le proprietà medicinali/ricreative. Queste due classi di molecole si trovano quasi esclusivamente nei tricomi ghiandolari che ricoprono le brattee dei fiori femminili e le piccole foglie unifogliate che crescono lungo l'infiorescenza femminile. Un numero molto maggiore di questi tricomi si trova nelle infiorescenze che non sono state fecondate. Anche il genotipo della pianta influenza molto il loro numero di tricomi e quindi anche la quantità di cannabinoidi e terpeni presenti nelle infiorescenze. Il rapporto tra questi metaboliti secondari varia molto a seconda della varietà, della popolazione e della sottospecie (Chandra, et al., 2017). In *Cannabis sativa* L. per terpeni generalmente s'intendono tutte quelle molecole che conferiscono odore e sapore alla pianta. Le principali classi di questi composti sono: monoterpeni, monoterpenoidi, sesquiterpeni, sesquiterpenoidi, acidi carbossilici, alcoli, aldeidi, chetoni, cicloalcheni, esteri, idrocarburi aromatici e solfuri. Di questi però solo alcuni incidono

significativamente nel determinare l'odore e il sapore della canapa e il loro rapporto può variare molto tra le diverse varietà. I cannabinoidi sono meroterpenoidi, composti formati da unità isopreniche e non isopreniche; sono contenuti in quantità apprezzabili solo in *Cannabis sativa* L. In questa classe di molecole le più importanti sono l'acido  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolico (THCA) e l'acido cannabidiolico (CBDA). Questi cannabinoidi, una volta decarbossilati, agiscono sul sistema nervoso centrale legandosi a recettori specifici. Dopo la scoperta di questi recettori sono stati isolati almeno due endocannabinoidi (cioè cannabinoidi di produzione endogena) che agiscono come neuromodulatori o neurotrasmettitori (Capasso, et al., 2011). Il THC ( $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo) deriva dalla decarbossilazione dovuta principalmente al calore del THCA ed è il composto psicotropo della canapa e sulla base dei suoi effetti clinici viene considerato una sostanza allucinogena (Chandra, et al., 2017). Tuttavia i suoi effetti sul cervello sembrano differire dagli altri allucinogeni e anche se assunto molto frequentemente sembra non creare una profonda dipendenza fisica. L'assunzione del THC ha come effetto più consistente il cambiamento dell'umore, più specificamente causa senso di benessere, euforia, aumento della stima in se stessi e rilassamento. Spesso causa anche alterazioni della percezione sensoriale come ad esempio del tempo e delle distanze. Nella comunità scientifica ci sono pareri contrastanti ma in molti ritengono che una ripetuta e autoindotta intossicazione da THC possa risultare pericolosa sia per la manifestazione di disturbi psichiatrici, sia perché può ritardarne il tentativo di un trattamento appropriato. Durante gli anni chi ha studiato gli effetti dell'assunzione di canapa ha concluso però che non ci sono significativi rischi individuali e sociali associati al suo utilizzo (Capasso, et al., 2011). Tra i cannabinoidi non psicotropi il più interessante è il cannabidiolo (CBD). Esso deriva dalla decarbossilazione del CBDA che è presente nella canapa in concentrazioni molto variabili a seconda del genotipo (lo stesso vale anche per il resto dei cannabinoidi). Il CBD, come gli altri cannabinoidi secondari e i terpeni, modifica l'effetto del THC e viene usato per migliorare il profilo farmacologico e la sicurezza del THC, riducendone anche gli effetti indesiderati come la tachicardia (Capasso, et al., 2011). Inoltre ci sono possibili promettenti applicazioni cliniche del cannabidiolo come per il trattamento dell'ipereccitabilità neuronale, della nausea e del vomito (per esempio in pazienti sottoposti a chemioterapia), delle convulsioni e dell'epilessia. Tuttavia i meccanismi d'azione di questa molecola ad oggi non sono stati completamente chiariti. Con più conferme sperimentali sono le possibili applicazioni terapeutiche del THC anche se le ultime evidenze scientifiche stanno dando sempre più importanza in questo all'insieme dei vari cannabinoidi. Estratti titolati di canapa possono infatti essere usati per il trattamento della sclerosi multipla, dei tumori, del dolore, della schizofrenia e dell'anoressia. Parte delle evidenze scientifiche che attribuiscono a *Cannabis sativa* L. queste ed altre proprietà sono però state fatte con test in vitro o

su animali e per questo sono necessarie ulteriori conferme per poter far sì che i farmaci derivati da questa pianta possano essere utilizzati su più ampia scala (Chandra, et al., 2017).

### **1.3.1 Stress idrico e metaboliti secondari**

Le condizioni climatiche possono anche influire sulla disponibilità dei precursori che servono alla biosintesi dei metaboliti secondari. Per questo la carenza d'acqua solo in alcuni casi può favorire il contenuto in principi attivi (che sono metaboliti secondari) di una pianta; più in generale ha un effetto negativo. Sono diverse le piante medicinali (*Digitalis purpurea* L., *Atropa belladonna* L., *Mentha x piperita*, ecc) che in condizioni di stress idrico rallentano notevolmente la produzione di metaboliti secondari. Anche l'accumulo di oli essenziali è inibito in condizioni di siccità. Questo perché le piante tendono ad ossidare i componenti dell'olio producendo sostanze che influiscono sull'equilibrio osmotico della cellula riducendo la traspirazione (Capasso, et al., 2011).

## 2. Scopo della ricerca

La ricerca ha voluto determinare come l'applicazione di diversi livelli di stress idrico, classificati come controllo, moderato e severo, in due fasi critiche dello sviluppo della pianta — la fase finale dell'accrescimento vegetativo e il periodo di fioritura — influenzi la composizione dei metaboliti secondari nelle infiorescenze di *Cannabis sativa* L. L'obiettivo è stato quello di esplorare in modo approfondito le variazioni nella produzione di composti aromatici e nei principali cannabinoidi (CBD, THC e CBN) in risposta alle differenti condizioni idriche.

Le analisi condotte sulle componenti aromatiche miravano a identificare le modificazioni del profilo terpenico, che gioca un ruolo chiave nel determinare l'aroma e le proprietà organolettiche della pianta. Parallelamente, l'attenzione si è concentrata sui cannabinoidi principali, considerando le potenziali variazioni nei livelli di CBD, THC e CBN, sia in termini di quantità che di rapporto tra i composti, elementi fondamentali per comprendere gli effetti fisiologici e terapeutici della pianta.

Questa ricerca, attraverso l'integrazione di dati sulle componenti aromatiche e cannabinoidi, intende fornire una comprensione più completa dell'effetto dello stress idrico sulla qualità complessiva della *Cannabis sativa* L., con potenziali implicazioni per l'industria farmaceutica e agronomica, considerando anche le possibili strategie di gestione dello stress idrico per ottimizzare la produzione e la qualità del prodotto finale.





### 3. Materiali e metodi

La prova ha avuto inizio il 06 dicembre 2023 quando sono state piantate 120 talee radicate in cubetti di lana di roccia di *C. sativa* L. provenienti da piante madre femmine in vasi forati da 4,5 L contenenti 2 Kg di substrato composto dal 50% in volume di torba e 50% in volume di sabbia.

Tabella 1 – Caratteristiche della torba utilizzata

pH in H <sub>2</sub> O	6,0
Concimazione	Idrosolubile NKP + microelementi + cessione programmata
Conducibilità elettrica	0,35 dS/m
Struttura	Fine
Densità apparente secca	150 Kg/m <sup>3</sup>
Porosità	91% v/v
Argilla	Presente
Dotazione nutritiva	12 mesi

Sul fondo di ogni vaso è stato messo un feltro per impedire al substrato di uscire dai fori per lo sgrondo dell'acqua. La metà delle talee è della varietà Fenomoon (successivamente indicata come varietà A) e l'altra metà della varietà Harlequin (successivamente indicata come varietà B). Le piante sono state disposte seguendo uno schema sperimentale di tipo split-plot, con due repliche (block 1 e 2), ognuna con 30 piante della varietà A e 30 della varietà B. In entrambe le repliche ogni varietà è stata divisa in due gruppi: uno destinato allo stress idrico durante la fase vegetativa (15 piante) e l'altro destinato allo stress idrico durante la fioritura (15 piante). Ognuno dei gruppi da 15 piante è poi stato diviso in 3: 5 piante per il controllo, 5 piante per lo stress moderato e 5 piante per lo stress severo.

Tabella 2 - Elenco trattamenti in fase vegetativa

Plot	Block	Variety	Treatment	Time	Number of plants
1AC_V	1	A	Control	Vegetative	5
1AM_V	1	A	Moderate	Vegetative	5
1AS_V	1	A	Severe	Vegetative	5
1BC_V	1	B	Control	Vegetative	5
1BM_V	1	B	Moderate	Vegetative	5
1BS_V	1	B	Severe	Vegetative	5
2AC_V	2	A	Control	Vegetative	5
2AM_V	2	A	Moderate	Vegetative	5
2AS_V	2	A	Severe	Vegetative	5
2BC_V	2	B	Control	Vegetative	5
2BM_V	2	B	Moderate	Vegetative	5
2BS_V	2	B	Severe	Vegetative	5

Tabella 3 - Elenco trattamenti in fioritura

Plot	Block	Variety	Treatment	Time	Number of plants
1AC_F	1	A	Control	Flowering	5
1AM_F	1	A	Moderate	Flowering	5
1AS_F	1	A	Severe	Flowering	5
1BC_F	1	B	Control	Flowering	5
1BM_F	1	B	Moderate	Flowering	5
1BS_F	1	B	Severe	Flowering	5
2AC_F	2	A	Control	Flowering	5
2AM_F	2	A	Moderate	Flowering	5
2AS_F	2	A	Severe	Flowering	5
2BC_F	2	B	Control	Flowering	5
2BM_F	2	B	Moderate	Flowering	5
2BS_F	2	B	Severe	Flowering	5

Tavolo 1										
1.1BC_ _V	1.2BC_ _V	1.3BC_ _V	1.4BC_ _V	1.5BC_ _V		1.1AC_ _V	1.2AC_ _V	1.3AC_ _V	1.4AC_ _V	1.5AC_ _V
1.1BM_ _V	1.2BM_ _V	1.3BM_ _V	1.4BM_ _V	1.5BM_ _V		1.1AS_ _V	1.2AS_ _V	1.3AS_ _V	1.4AS_ _V	1.5AS_ _V
1.1BS_ _V	1.2BS_ _V	1.3BS_ _V	1.4BS_ _V	1.5BS_ _V		1.1AM_ _V	1.2AM_ _V	1.3AM_ _V	1.4AM_ _V	1.5AM_ _V
1.1BC_ _F	1.2BC_ _F	1.3BC_ _F	1.4BC_ _F	1.5BC_ _F		1.1AC_ _F	1.2AC_ _F	1.3AC_ _F	1.4AC_ _F	1.5AC_ _F
1.1BM_ _F	1.2BM_ _F	1.3BM_ _F	1.4BM_ _F	1.5BM_ _F		1.1AM_ _F	1.2AM_ _F	1.3AM_ _F	1.4AM_ _F	1.5AM_ _F
1.1BS_ _F	1.2BS_ _F	1.3BS_ _F	1.4BS_ _F	1.5BS_ _F		1.1AS_ _F	1.2AS_ _F	1.3AS_ _F	1.4AS_ _F	1.5AS_ _F
Tavolo 2										
2.1AS_ _F	2.2AS_ _F	2.3AS_ _F	2.4AS_ _F	2.5AS_ _F		2.1BM_ _F	2.2BM_ _F	2.3BM_ _F	2.4BM_ _F	2.5BM_ _F
2.1AM_ _F	2.2AM_ _F	2.3AM_ _F	2.4AM_ _F	2.5AM_ _F		2.1BC_ _F	2.2BC_ _F	2.3BC_ _F	2.4BC_ _F	2.5BC_ _F
2.1AC_ _F	2.2AC_ _F	2.3AC_ _F	2.4AC_ _F	2.5AC_ _F		2.1BS_ _F	2.2BS_ _F	2.3BS_ _F	2.4BS_ _F	2.5BS_ _F
2.1AM_ _V	2.2AM_ _V	2.3AM_ _V	2.4AM_ _V	2.5AM_ _V		2.1BS_ _V	2.2BS_ _V	2.3BS_ _V	2.4BS_ _V	2.5BS_ _V
2.1AS_ _V	2.2AS_ _V	2.3AS_ _V	2.4AS_ _V	2.5AS_ _V		2.1BM_ _V	2.2BM_ _V	2.3BM_ _V	2.4BM_ _V	2.5BM_ _V
2.1AC_ _V	2.2AC_ _V	2.3AC_ _V	2.4AC_ _V	2.5AC_ _V		2.1BC_ _V	2.2BC_ _V	2.3BC_ _V	2.4BC_ _V	2.5BC_ _V

Figura 1 - schema sperimentale

Le piante sono state coltivate in condizioni uniformi in serra riscaldata a 20°C, con un fotoperiodo di 18 ore di luce e 6 di buio, e irrigate con acqua per i primi 8 giorni. Dopodiché le piante hanno ricevuto sempre soluzione nutritiva fino la fine della prova. Le specifiche dei fertilizzanti utilizzati per fare la soluzione nutritiva sono illustrate nella Tabella 1.

Tabella 4 – Composizione dei fertilizzanti utilizzati in fioritura e durante la fase vegetativa

<b>Fertilizzante liquido</b>	<b>Composizione miscela</b>	
	<b>Componente</b>	<b>Contenuto (peso su peso)</b>
<b>Canna vega A - fase vegetativa</b>	Nitrato di calcio	10 - 20%
	Nitrato di potassio	5 - 10%
	Nitrato di ammonio	10 - 16%
	Nitrato di magnesio	0,1 - 1%
<b>Canna vega B - fase vegetativa</b>	Solfato di potassio	5 - 10%
	Acido fosforico 59%	1 - 5%
	Nitrato di potassio	1 - 5%
	Acido nitrico 38%	0,1 - 1%
<b>Canna vega A - fase fioritura</b>	Nitrato di potassio	10 - 20%
	Nitrato di calcio	10 - 20%
	Nitrato di ammonio	1 - 5%
<b>Canna vega B - fase fioritura</b>	Solfato di potassio	1 - <3%
	Acido nitrico 38%	0,1 - 2%

Dall'8° al 39° giorno dal trapianto (*days after transplanting* - DAT), le piante sono state irrigate con soluzione nutritiva (EC 0,8S/cm, pH 5,7).

Dal 39° DAT (13 gennaio) le piante destinate allo stress idrico in fase vegetativa (trattamento \_V) sono state irrigate a saturazione e, dopo aver atteso che tutta l'acqua non trattenuta dal substrato fosse percolata, sono state pesate. Successivamente sono stati pesati tre vasi pieni di solo substrato secco e, analogamente con quanto fatto con i vasi contenenti le piante della prova, saturati d'acqua e pesati dopo che l'acqua di percolazione ha cessato di uscire dai fori. La differenza di peso dei vasi senza piante alla capacità di campo (CC) e di quelli con il terreno secco, pari a 460g, è stata usata per stimare l'acqua che il substrato dei vasi in prova avrebbe potuto trattenere. In questo modo si è definito il peso che ogni giorno i vasi dovevano raggiungere sottraendo dal peso di ogni vaso alla capacità di campo (in grammi)  $460 \cdot 0,1$  per le piante di controllo,  $460 \cdot 0,4$  per le piante del trattamento in stress moderato e  $460 \cdot 0,7$  per le piante del trattamento in stress severo. Successivamente le piante del trattamento \_V sono state pesate quotidianamente alla stessa ora, le 14,30, e quando queste avevano un peso inferiore al peso da raggiungere gli veniva reintegrata la soluzione nutritiva (EC  $0,8 \mu\text{S}/\text{cm}$  e pH 5,7) mancante per raggiungere il peso target. In questo modo l'acqua persa per evapotraspirazione durante la giornata veniva reintegrata e il substrato rimaneva con il grado d'umidità prestabilita (90% dell'acqua trattenibile dal substrato per la tesi di controllo, 60% per quella dello stress moderato e 30% per lo stress severo). Lo stress idrico è durato 10 giorni dal momento in cui il vaso ha raggiunto il peso prefissato. Siccome le varie piante raggiungevano questo peso in tempi diversi lo stress non è iniziato e finito contemporaneamente per tutte le piante. Man mano che per ogni vaso lo stress idrico finiva le piante venivano pesate, portate alla capacità di campo e irrigate come le piante del trattamento \_F (90 mL di soluzione nutritiva al giorno con EC  $0,8 \mu\text{S}/\text{cm}$  e pH 5,7).

Dal giorno 5 febbraio (tre giorni dopo che le ultime piante a finire lo stress idrico sono state portate alla capacità di campo) tutte le piante hanno ricevuto soluzione nutritiva specifica per la fase di fioritura con EC  $1,6 \mu\text{S}/\text{cm}$  e pH 5,8.

Al 63° DAT, il 7 febbraio 2024, è stato cambiato il fotoperiodo da 18/6 ore di luce/buio a 12/12 per indurre le piante alla fioritura.

L'11 marzo, dopo due settimane dall'inizio della fioritura, le piante del trattamento \_F sono state portate alla capacità di campo e pesate. Successivamente, analogamente con quanto fatto per il trattamento \_V, i vasi sono stati irrigati con la soluzione nutritiva necessaria a mantenere il contenuto d'acqua al 90% di tutta quella che il substrato sarebbe riuscito a trattenere per il controllo, 60% per lo stress idrico moderato e 30% per lo stress idrico severo. Dopo 10 giorni in cui l'umidità del substrato è stata mantenuta al valore prestabilito i vasi sono stati portati alla capacità di campo e irrigati come le piante del trattamento \_V. Dai primi giorni di marzo durante le ore più

calde della giornata spesso la temperatura aumentava rispetto ai 20°C mantenuti dal sistema di riscaldamento della serra comunque senza mai superare i 27°C.

I giorni 3 e 4 aprile, dopo che tutte le piante del trattamento \_F hanno finito il periodo di stress idrico, si è proceduto con la raccolta delle infiorescenze che sono state essiccate a 30°C e poi pesate. Le piante private dell'infiorescenza non sono più state irrigate attendendo che morissero per carenza d'acqua (valutazione soggettiva considerando le piante "morte" quando l'avvizzimento sarebbe stato tale da impedirgli di vivere anche se si sarebbe ripreso ad irrigare) e pesate. Questo peso è stato usato per stimare il coefficiente d'avvizzimento (CA) di ogni vaso. Sia la parte aerea che l'apparato radicale di ogni pianta sono stati essiccati e pesati.

Le infiorescenze essiccate sono state pesate, macinate e analizzate in laboratorio: analisi gascromatografica (GC) per i terpeni e cannabinoidi.

### **3.1 Analisi gascromatografica**

La gascromatografia gas-solido (GSC) è una tecnica di separazione cromatografica in cui si utilizza una fase mobile gassosa capace di fluire attraverso una colonna in cui è posta una fase stazionaria solida che può essere più o meno affine ai composti presenti nel campione da analizzare. Il campione è disciolto in un solvente (fase mobile) e scaldato per rendere la miscela allo stato gassoso. Il gas viene prelevato con una apposita siringa, immesso nella colonna e spinto attraverso essa da un gas inerte, elio (He) in questo caso. In base alla loro affinità con la fase solida i vari metaboliti ci metteranno un tempo diverso ad attraversare la colonna ed usciranno separati dall'estremità di questa. Qui un rivelatore segnala il passaggio dei diversi metaboliti separati dal campione in analisi ad un sistema di elaborazione dei segnali con lo scopo di produrre un gascromatogramma per permettere determinazioni qualitative e quantitative. In questo caso è stato utilizzato come rivelatore uno spettrometro di massa eseguendo quindi una GC-MS (Massarenti, et al., 2023).

### **3.2 Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il software Statgraphics. Per determinare se esistessero differenze significative tra le differenti tesi. Sono stati eseguiti i seguenti test:

- **Analisi della Varianza (ANOVA):** Questo test è stato utilizzato per confrontare le medie dei diversi fattori considerati, al fine di rilevare eventuali differenze statisticamente significative

- Test di Confronto Multiplo di Tukey (Tukey's HSD): In seguito all'ANOVA, è stato applicato questo test post-hoc per identificare esattamente quali coppie di fattori presentassero differenze significative.

Questi strumenti statistici hanno permesso di valutare in modo rigoroso le differenze tra i fattori studiati e di fornire una base solida per le conclusioni del lavoro.



## 4. Risultati

I risultati dell'analisi dei metaboliti secondari sono espressi come percentuale della molecola o della classe di molecole analizzate rispetto al totale dei composti rilevati dal gascromatografo.

### 4.1 Cannabinoidi

#### 4.1.1 Cannabidiolo

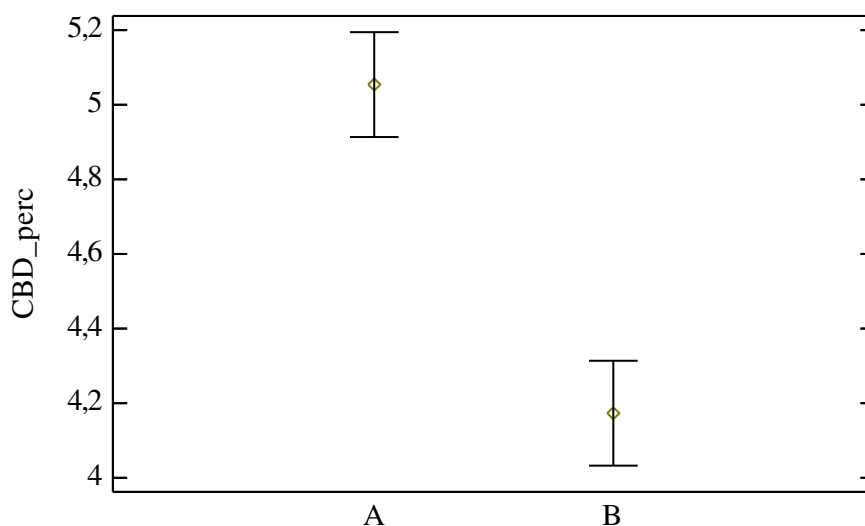


Figura 1 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabidiolo (CBD) tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 5,05% di CBD nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 4,17% della varietà B (Fig. 1).

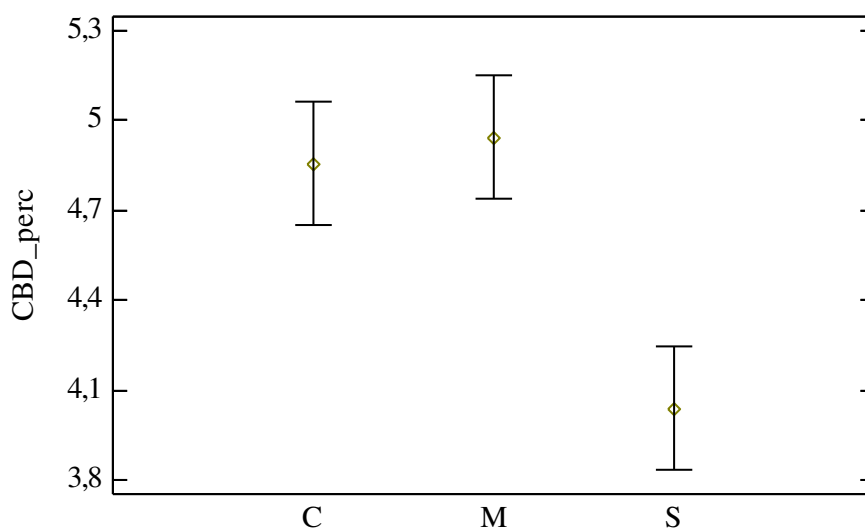


Figura 2 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabidiolo (CBD) tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Le infiorescenze delle piante del controllo e di quelle sottoposte a stress idrico moderato non mostrano differenze significative nel contenuto in CBD (4,86% e 4,94%); differenze che sono invece significative rispetto al trattamento in stress severo che ha infiorescenze con una quantità nettamente inferiore di questo composto (4,04%).

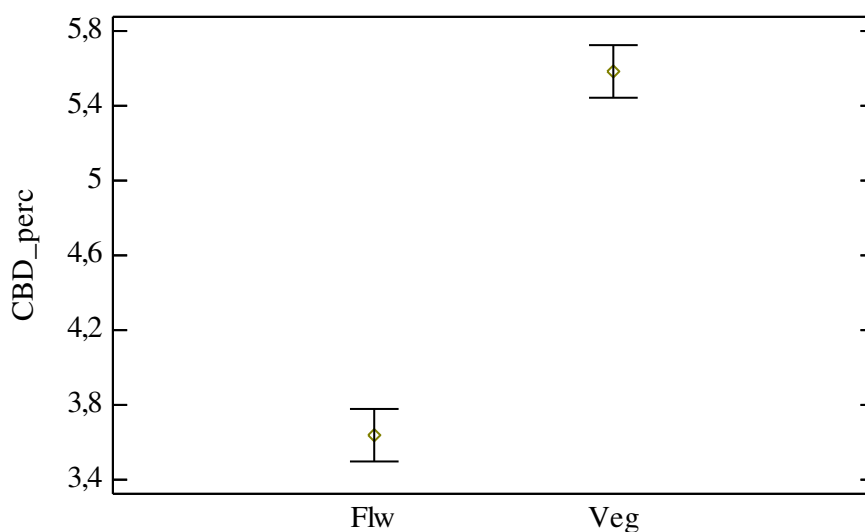


Figura 3 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabidiolo (CBD) tra lo stress idrico in fioritura (Flw) e durante la fase vegetativa (Veg), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in CBD nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media il 3,64%, significativamente più basso rispetto al 5,59% del trattamento in fase vegetativa.

#### 4.1.2 Cannabinolo

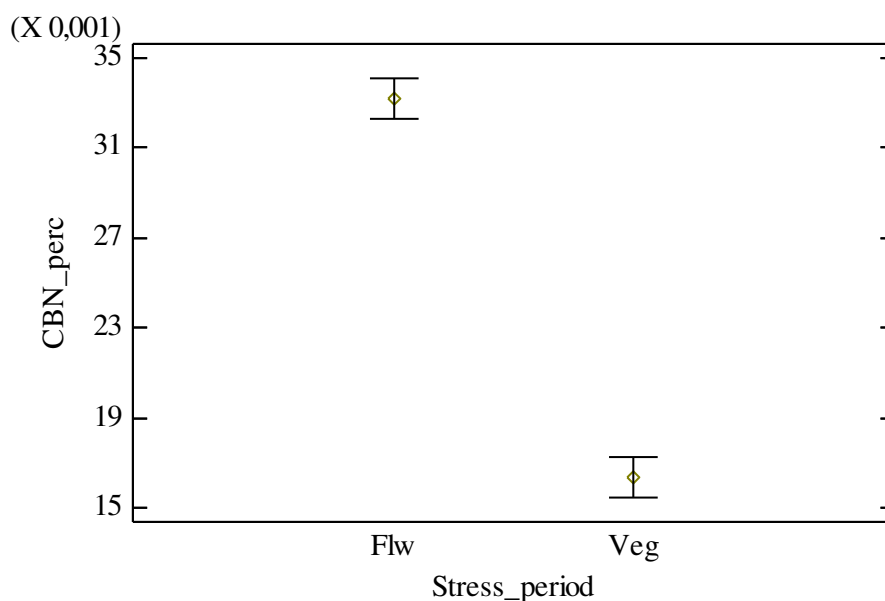


Figura 4 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabinolo (CBN) tra lo stress idrico in fioritura (Flw) e durante la fase vegetativa (Veg), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Le piante sottoposte a stress idrico durante la fioritura hanno infiorescenze con un contenuto in CBN significativamente maggiore rispetto a quelle che hanno subito lo stress idrico durante la fase vegetativa (0,033% rispetto a 0,016%).

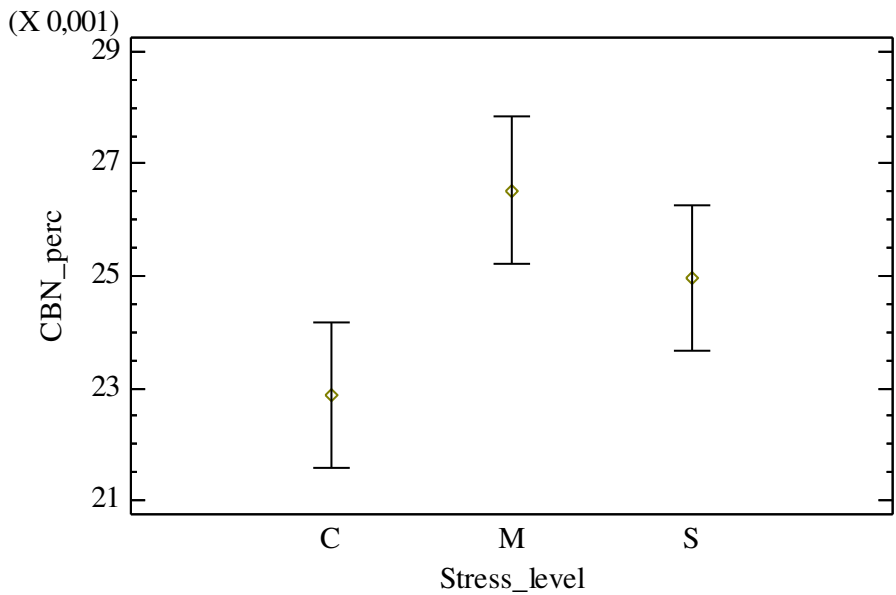


Figura 5 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabinolo (CBN) tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

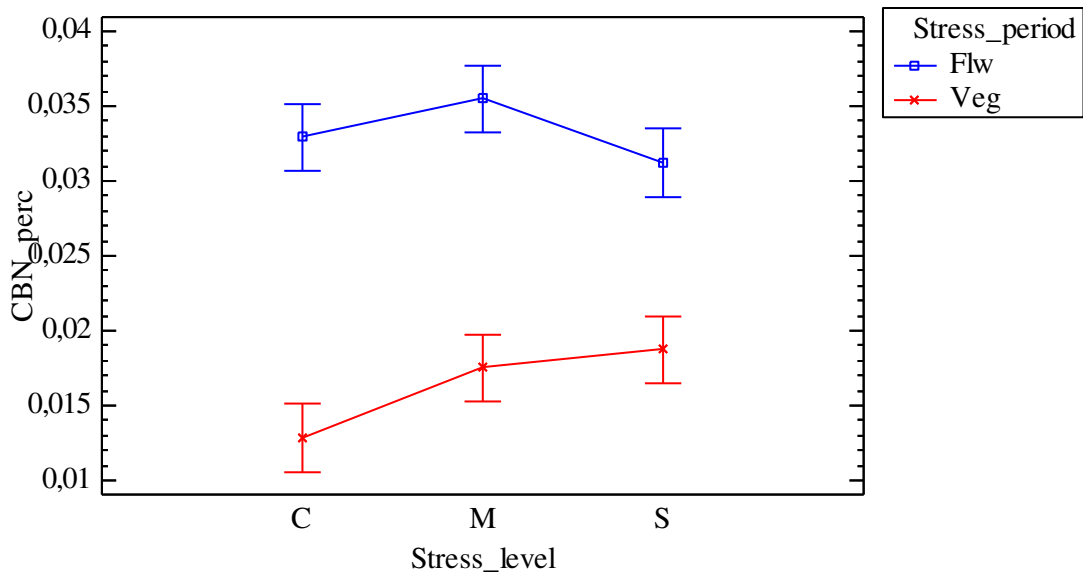


Figura 6 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cannabinolo (CBN) tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S) del trattamento in fioritura (Flw) e di quello durante la fase vegetativa (Veg), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Confrontando il contenuto in cannabinolo delle infiorescenze emerge una differenza significativa solo tra il controllo (0,023%) e il trattamento in stress idrico moderato (0,027%)(Fig. 5). Le

infiorescenze delle piante sottoposte a stress idrico severo risultano avere mediamente lo 0,025% in CBN, non significativamente differente dal controllo e dallo stress idrico moderato suggerendo una scarsa influenza dello stress idrico sulla produzione di questo cannabinoide secondario che si trova in scarse quantità nelle infiorescenze di *Cannabis sativa* L. o di una difficoltà nella sua quantificazione. Si può notare però una tendenza all'aumento del cannabinoide nelle infiorescenze all'aumentare della severità dello stress in fase vegetativa.

#### 4.1.3 $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo

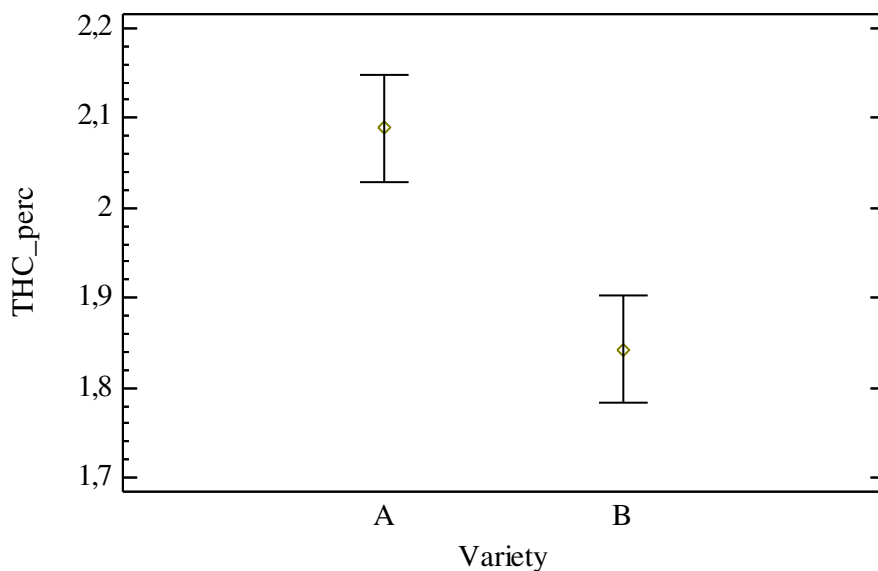


Figura 7 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 2,09% di THC nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 1,84% della varietà B (Fig. 7).

## 4.2 Classi di terpeni

### 4.2.1 Acidi carbossilici

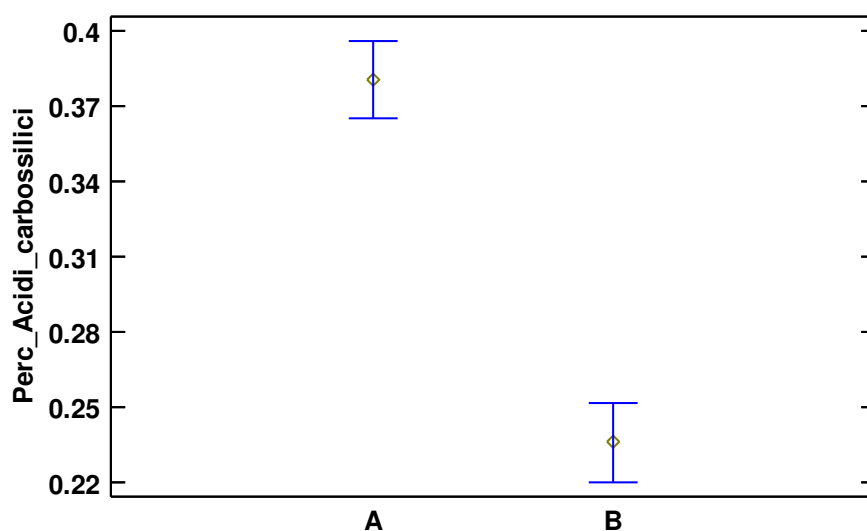


Figura 8 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in acidi carbossilici tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,380% di acidi carbossilici nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 0,236% della varietà B (Fig. 8).

### 4.2.2 Alcoli

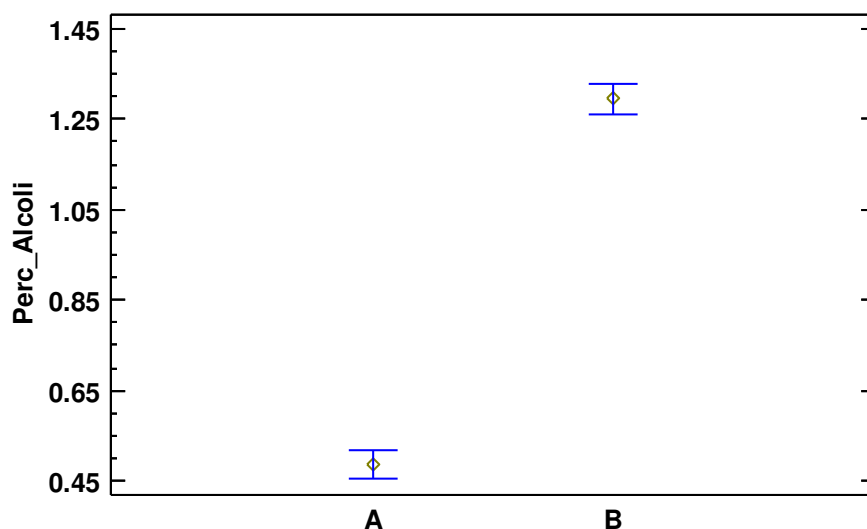


Figura 9 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in alcoli tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,487% di alcoli nelle infiorescenze, significativamente più bassa rispetto alla media di 1,29% della varietà B (Fig. 9).

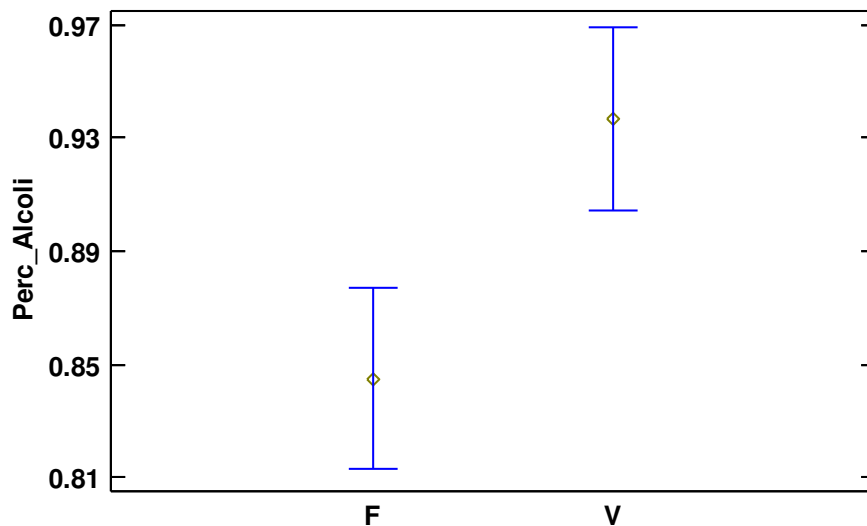


Figura 10 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in alcoli tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in alcoli nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media lo 0,845%, significativamente più basso rispetto allo 0,937% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 10).

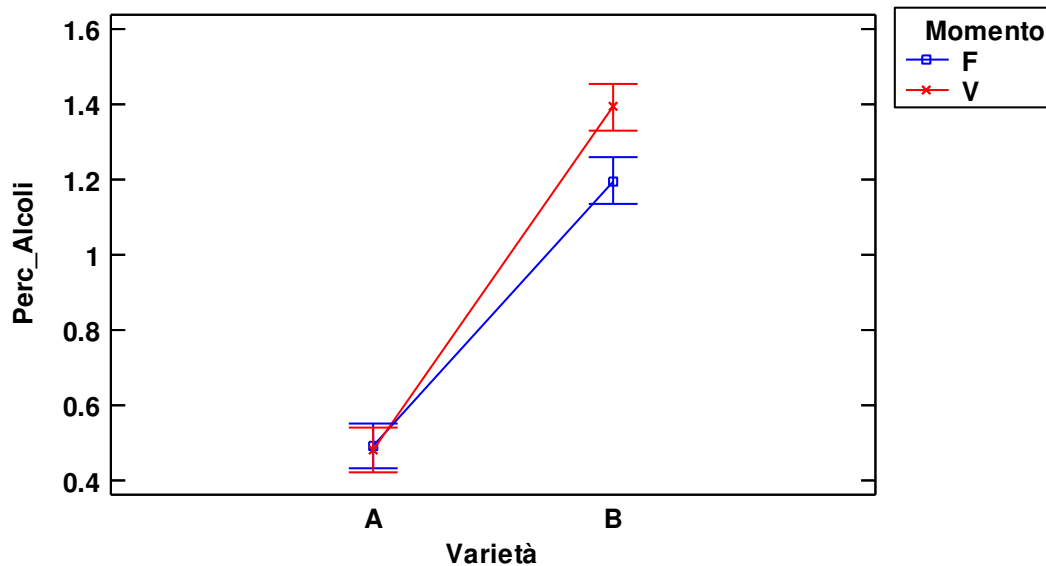


Figura 11 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in alcoli tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin) del trattamento in stress idrico in fioritura (F) e in fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Quando la varietà B è sottoposta a stress idrico durante la fioritura il contenuto di alcoli nelle infiorescenze è 1,20%, significativamente più basso rispetto a quando lo stress idrico avviene in fase vegetativa (1,39%). Nella varietà A invece il momento in cui avviene lo stress idrico non incide significativamente nel contenuto in alcoli.

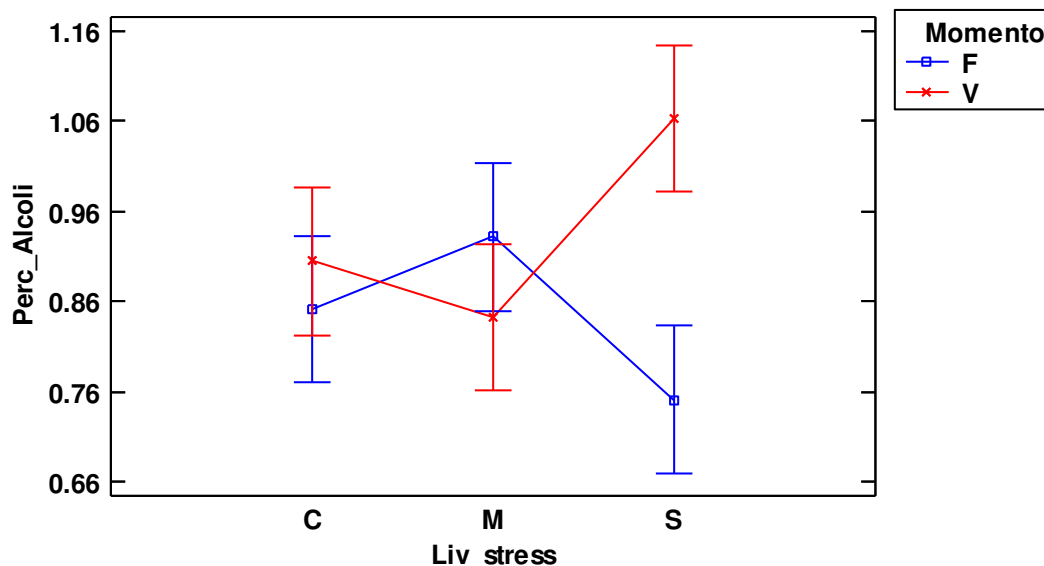


Figura 12 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in alcoli tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S) del trattamento in fioritura (F) e di quello durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Le piante che subiscono stress idrico severo durante la fioritura hanno significativamente meno alcoli nelle infiorescenze rispetto a quando lo stress severo avviene durante la fase vegetativa (dall'1,06% allo 0,751%). Per il controllo e lo stress idrico moderato la differenza tra i valori riscontrati in fioritura e in fase vegetativa non è significativa.

#### 4.2.3 Aldeidi

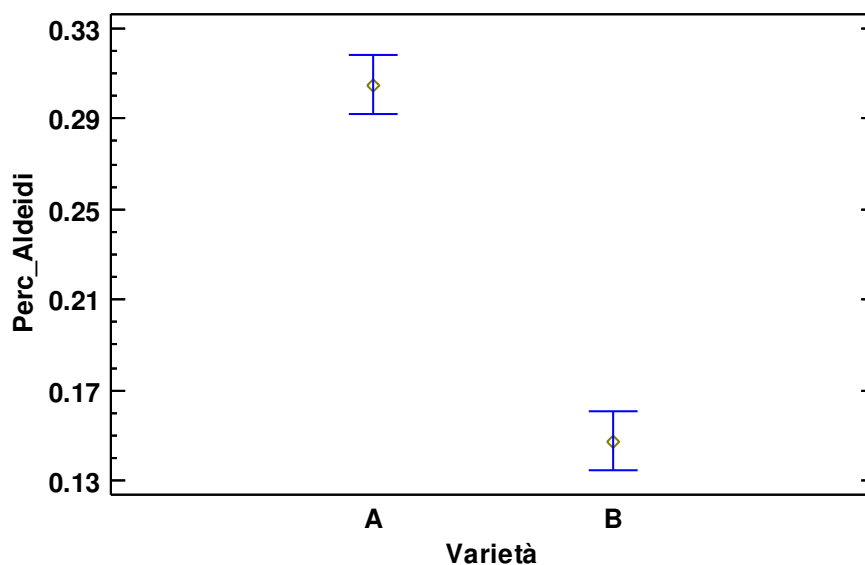


Figura 12 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in aldeidi tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,305% di aldeidi nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 0,148% della varietà B (Fig. 12).

#### 4.2.4 Chetoni

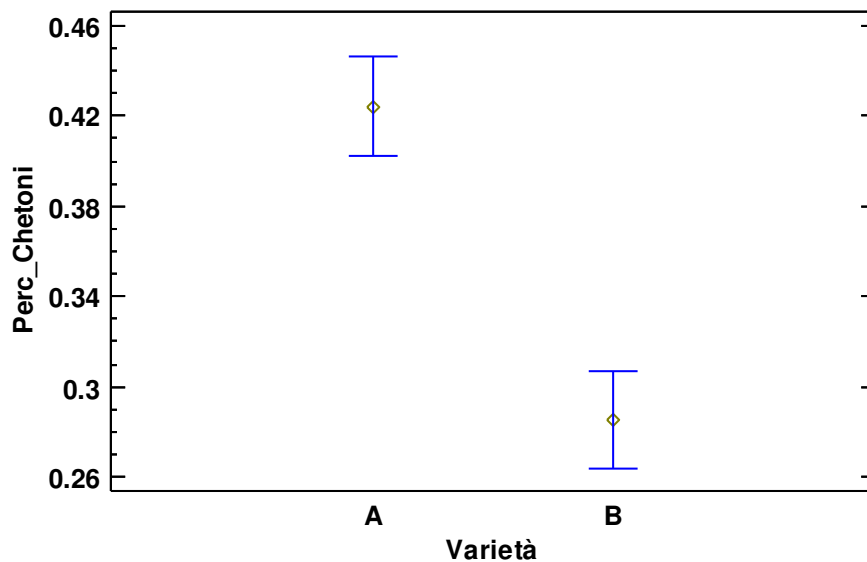


Figura 13 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in chetoni tra le varietà A (Fenomon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,424% di chetoni nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 0,286% della varietà B (Fig. 13).

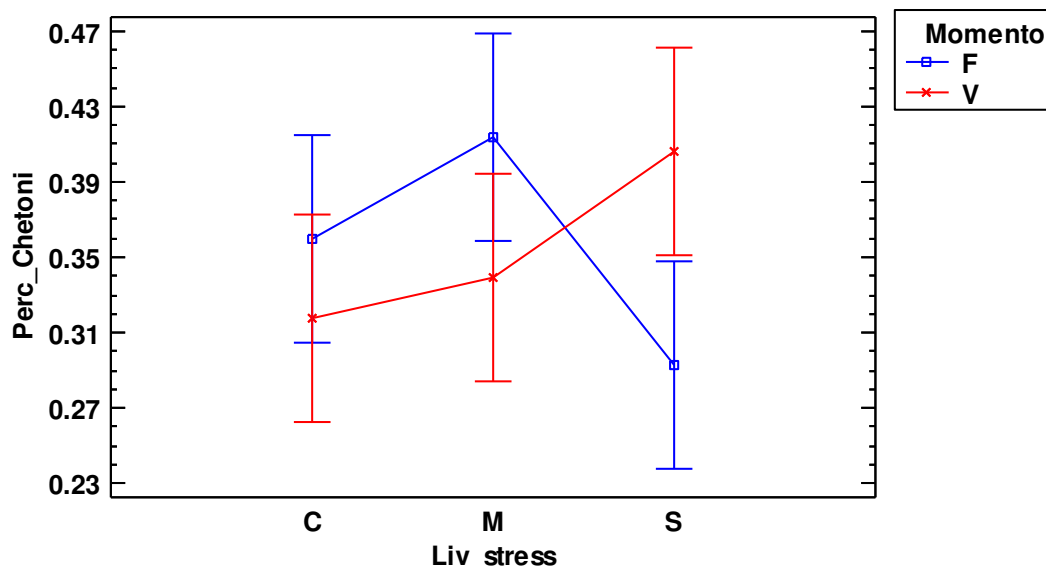


Figura 14 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in chetoni tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S) del trattamento in fioritura (F) e di quello durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Lo stress idrico severo causa una significativa riduzione dei chetoni nelle infiorescenze soltanto se avviene durante la fioritura (dallo 0,406% allo 0,293%) mentre per il controllo e lo stress idrico moderato la differenza tra i valori riscontrati in fioritura e in fase vegetativa non è significativa.



#### 4.2.5 Cicloalcheni

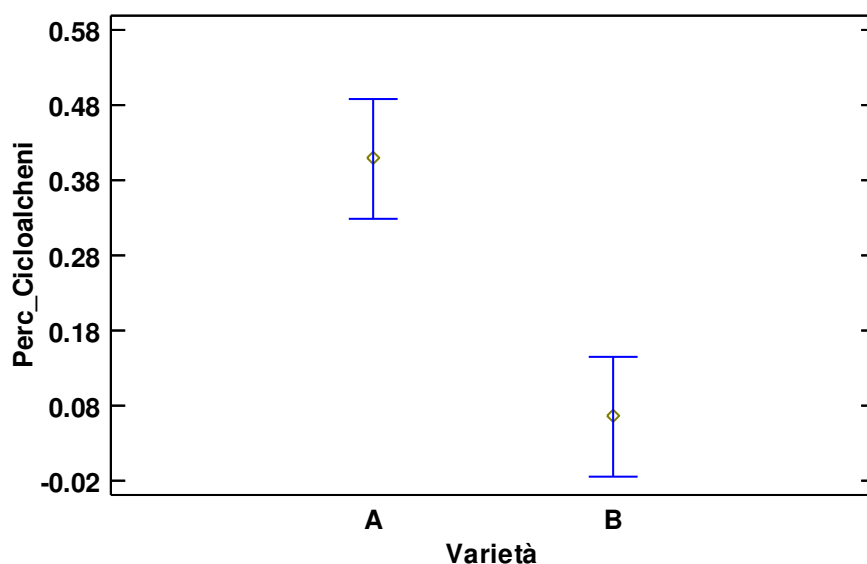


Figura 15 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in cicloalcheni tra le varietà A (Fenoomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,409% di cicloalcheni nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 0,066% della varietà B (Fig. 15).

#### 4.2.6 Esteri

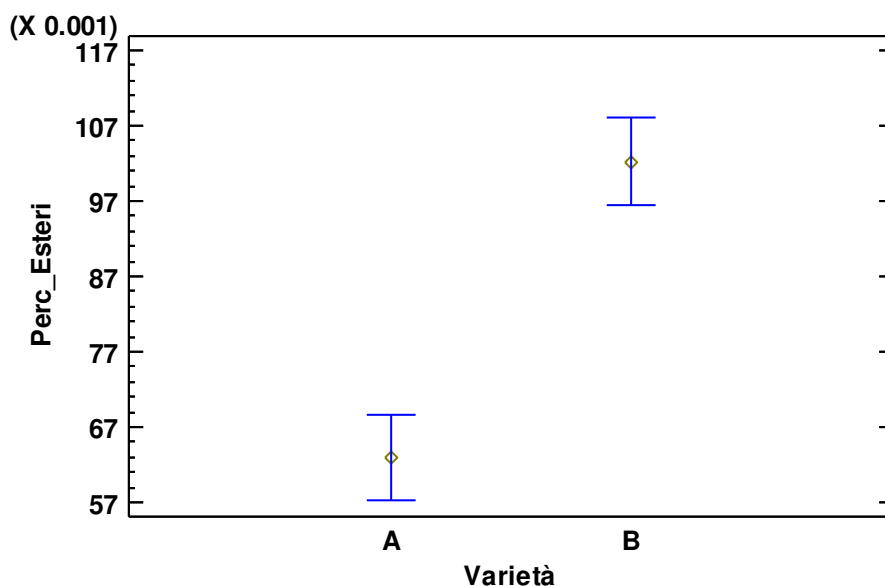


Figura 16 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in esteri tra le varietà A (Fenoomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,063% di esteri nelle infiorescenze, significativamente più bassa rispetto alla media di 0,102% della varietà B (Fig. 16).

#### 4.2.7 Idrocarburi aromatici

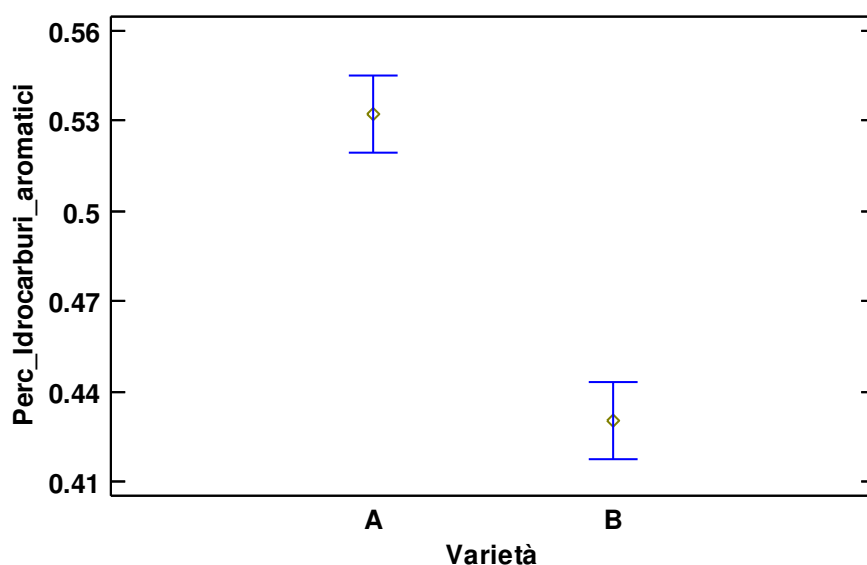


Figura 17 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in idrocarburi aromatici tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 0,532% di idrocarburi aromatici nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media di 0,430% della varietà B (Fig. 17).

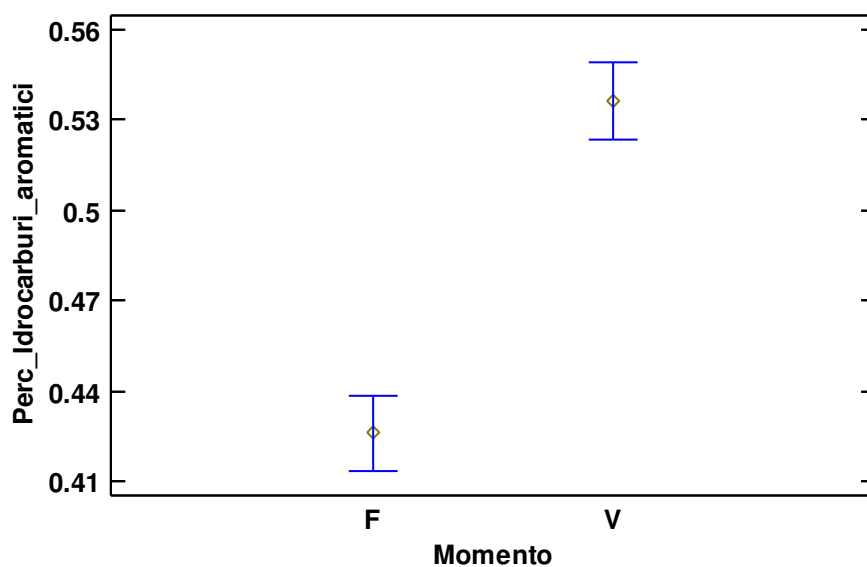


Figura 18 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in idrocarburi aromatici tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in idrocarburi aromatici nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media lo 0,426%, significativamente più basso rispetto allo 0,536% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 18).

## 4.2.8 Monoterpeni

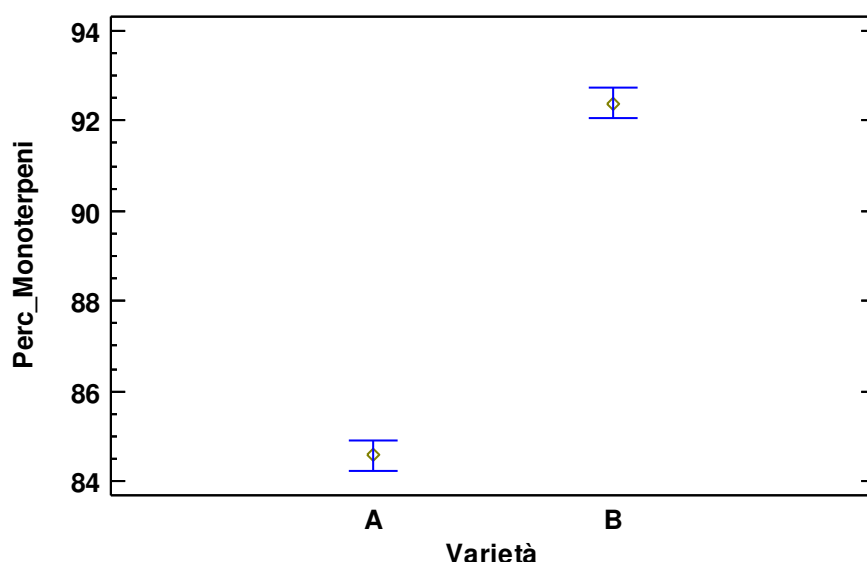


Figura 19 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in monoterpeni tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media di 84,6% di monoterpeni nelle infiorescenze, significativamente più bassa rispetto alla media di 92,4% della varietà B (Fig. 19).

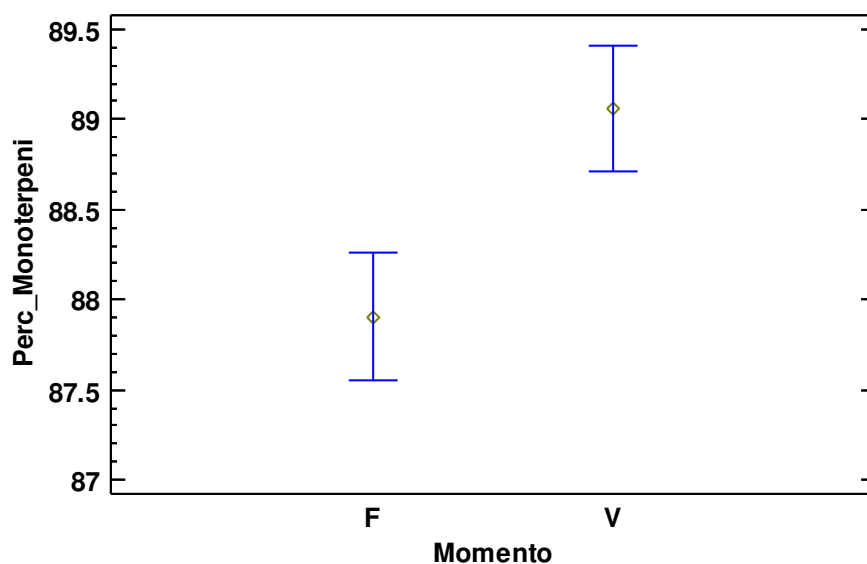


Figura 20 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in monoterpeni tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in monoterpeni nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media l'87,9%, significativamente più basso rispetto al 89,1% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 20).

## 4.2.9 Monoterpenoidi

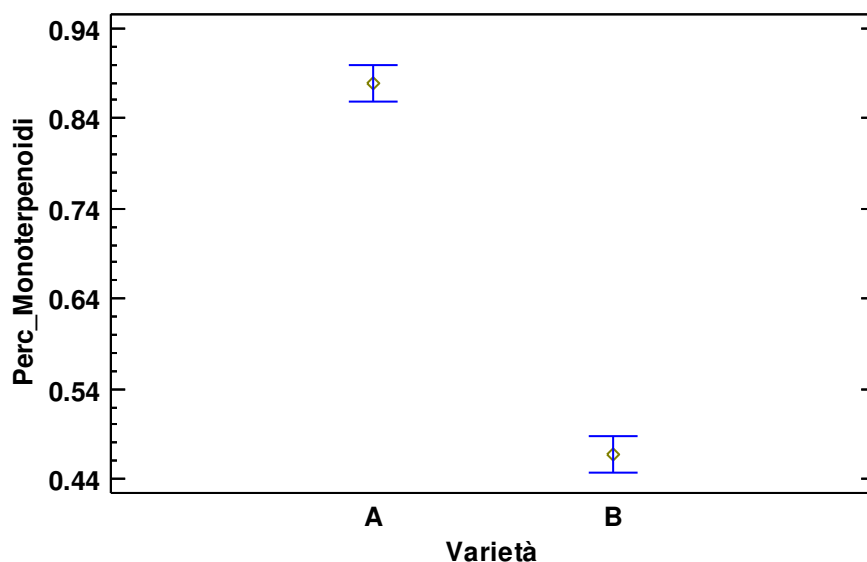


Figura 21 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in monoterpenoidi tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media dello 0,879% di monoterpenoidi nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media dello 0,467% della varietà B (Fig. 21).

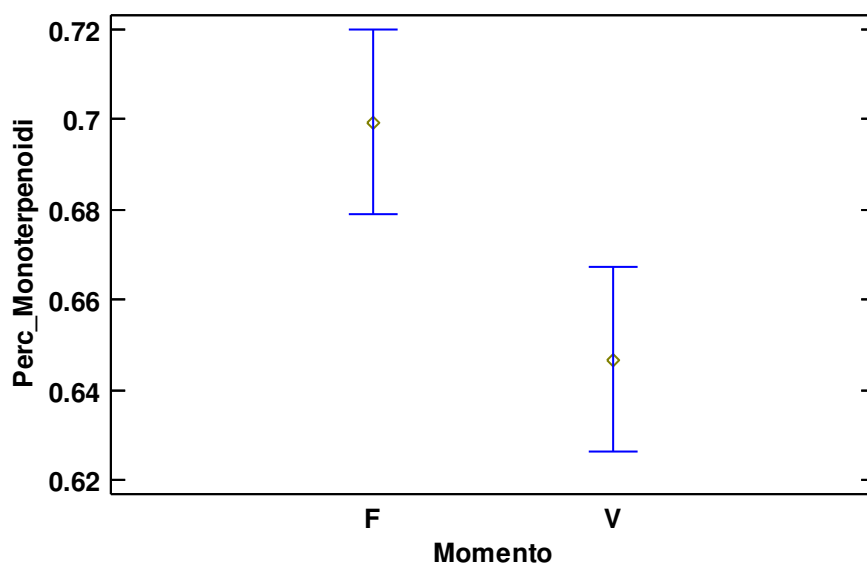


Figura 22 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in monoterpenoidi tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in monoterpenoidi nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media lo 0,699%, significativamente più alto rispetto allo 0,647% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 22).

#### 4.2.10 Sesquiterpeni

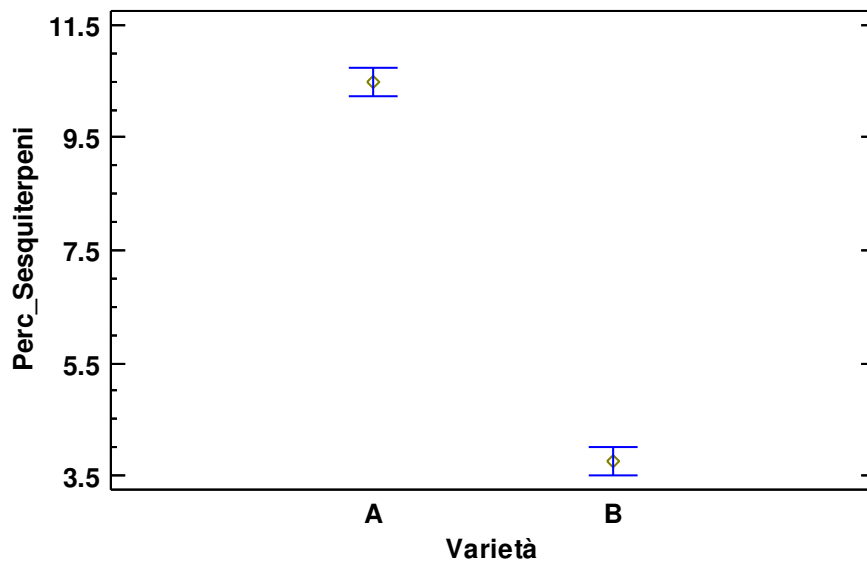


Figura 23 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpeni tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media del 10,5% di sesquiterpeni nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media del 3,76% della varietà B (Fig. 23).

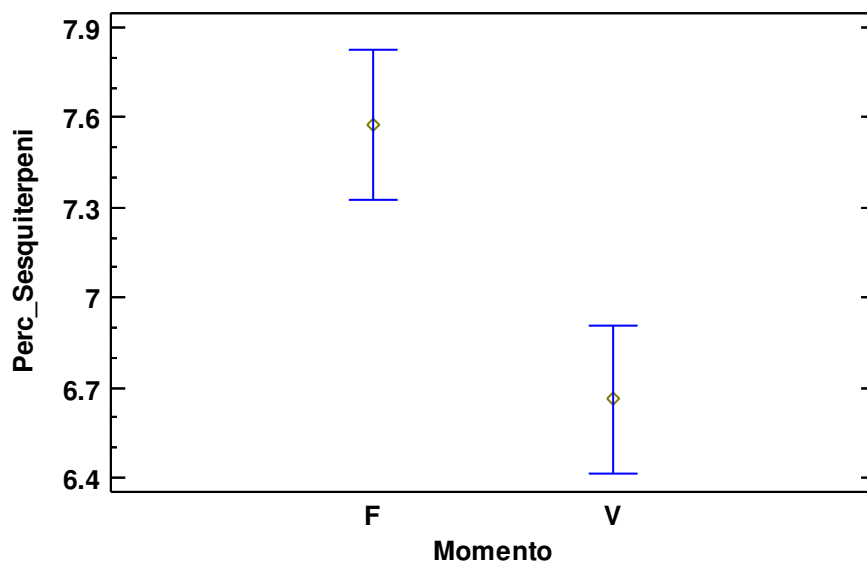


Figura 24 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpeni tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in sesquiterpeni nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media il 7,57%, significativamente più alto rispetto al 6,66% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 24).

#### 4.2.11 Sesquiterpenoidi

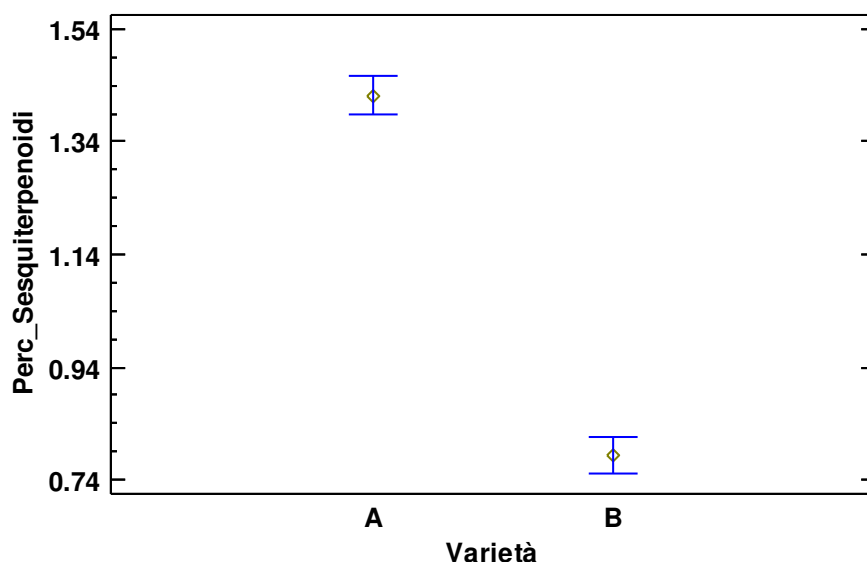


Figura 25 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpenoidi tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

La varietà A ha una media dell'1,42% di sesquiterpenoidi nelle infiorescenze, significativamente più alta rispetto alla media dello 0,783% della varietà B (Fig. 25).

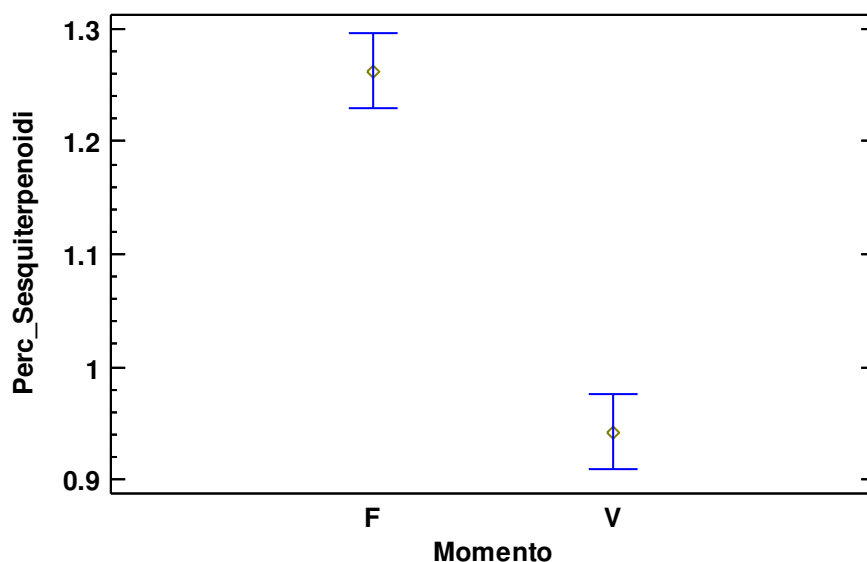


Figura 26 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpenoidi tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in sesquiterpenoidi nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media l'1,26%, significativamente più alto rispetto allo 0,942% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 26).

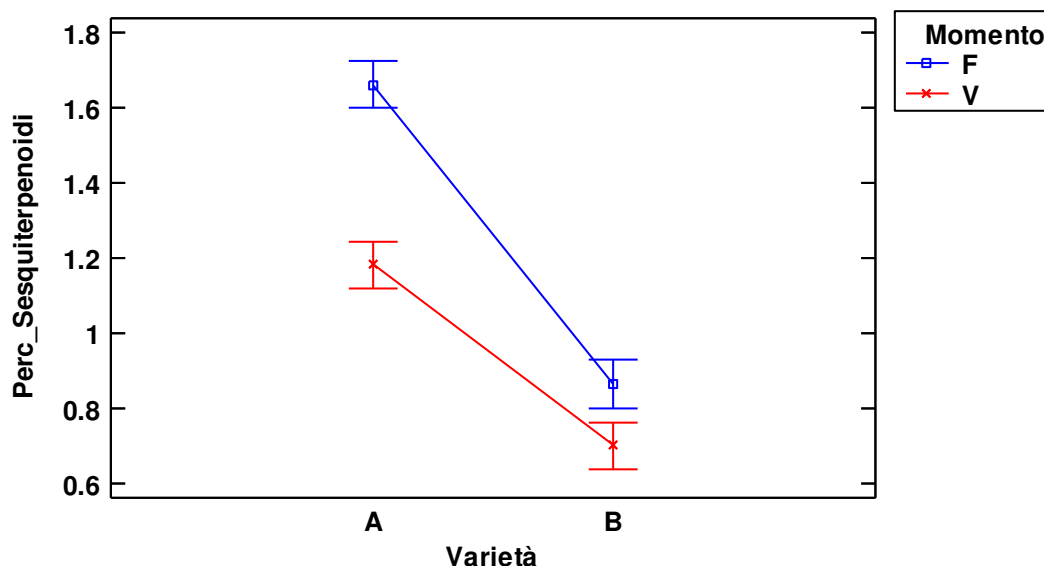


Figura 27 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpenoidi tra le varietà A (Fenomoon) e B (Harlequin) del trattamento in stress idrico in fioritura (F) e in fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Dall'interazione tra varietà e momenti di stress (Fig. 27), è possibile osservare un andamento simile per il contenuto di sesquiterpenoidi nelle due varietà. Questa classe di terpeni risulta significativamente più bassa in entrambe le varietà quando lo stress è applicato durante la fase vegetativa. Per la varietà A, si passa infatti da un valore medio di 1,66 nella fase fiorale a 1,18 nella fase vegetativa, evidenziando una riduzione del 29%. Analogamente, per la varietà B, i valori medi mostrano una diminuzione da 0,87 nella fase fiorale a 0,70 nella fase vegetativa, con una riduzione del 19%.

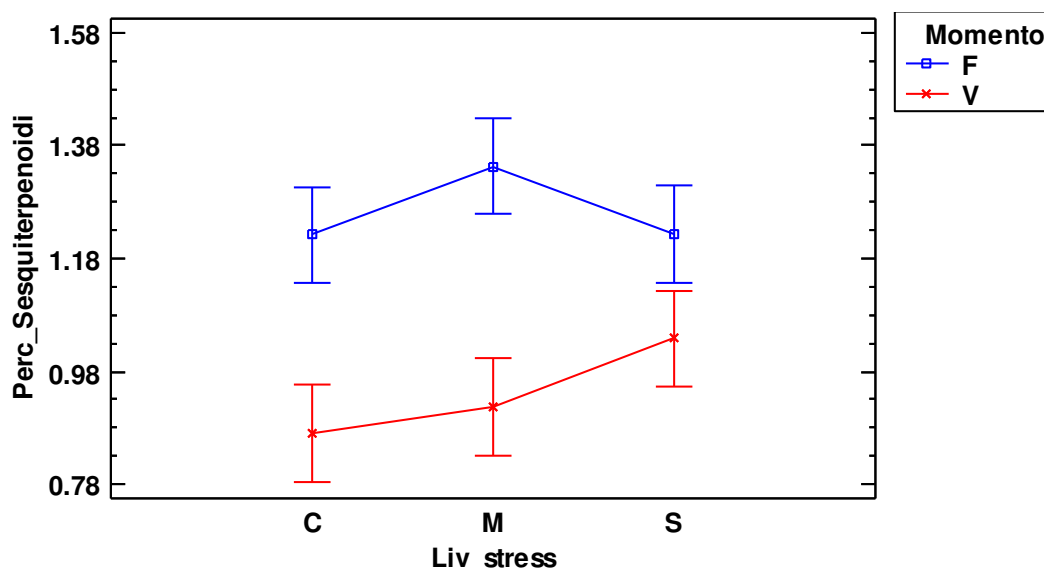


Figura 28 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in sesquiterpenoidi tra il controllo (C), il trattamento in stress idrico moderato (M) e il trattamento in stress idrico severo (S) del trattamento in fioritura (F) e di quello durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Se lo stress idrico avviene durante la fase vegetativa la quantità di sesquiterpenoidi sembra aumentare all'aumentare del livello di stress (0,871% per il controllo, 0,917% per lo stress moderato e 1,04% per lo stress severo), invece lo stress in fioritura causa effetti significativi sulla produzione di questi metaboliti secondari.

#### 4.2.12 Solfuri

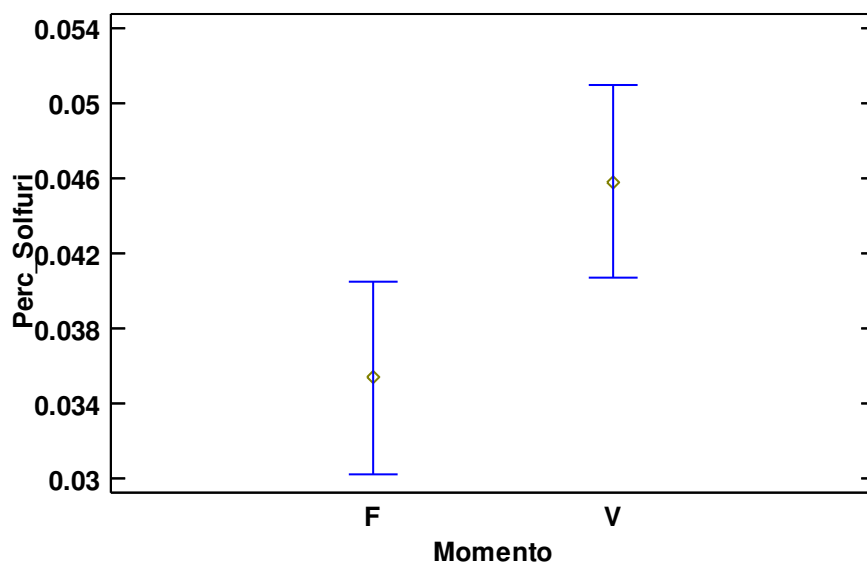


Figura 29 - Confronto tra le medie in percentuale del contenuto in solfuri tra lo stress idrico in fioritura (F) e durante la fase vegetativa (V), con intervalli di confidenza al 95% calcolati utilizzando il test HSD di Tukey

Il contenuto in solfuri nelle infiorescenze provenienti dalle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura è in media lo 0,035%, significativamente più basso rispetto allo 0,46% del trattamento in fase vegetativa (Fig. 29).



## 5. Discussione

L'analisi dei metaboliti secondari ha evidenziato significative differenze tra le varietà. Infatti il contenuto in cannabidiolo (CBD) e in  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) è significativamente più alto in Fenomoon (varietà A) rispetto ad Harlequin (varietà B). Questo fatto può essere spiegato anche da un peso delle infiorescenze significativamente inferiore nella varietà A (16,5 g) rispetto alla B (17,7 g). Non tutte delle varie classi di molecole aromatiche (terpeni) seguono però la stessa tendenza: alcune, come acidi carbossilici, aldeidi, chetoni, cicloalcheni, idrocarburi aromatici, monoterpenoidi, sesquiterpeni e sesquiterpenoidi, si trovano in quantità significativamente maggiori nella varietà A rispetto alla B, altre, come alcoli, esteri e monoterpeni, sono minori in A rispetto a B. Questo fa ipotizzare che il diverso profilo aromatico delle due varietà sia indipendente dal peso dell'infiorescenza.

La fase in cui le piante sono state sottoposte a stress idrico ha influito nella produzione di alcuni metaboliti secondari. Quantità significativamente minori di cannabidiolo (CBD) sono state infatti rilevate nelle infiorescenze delle piante che hanno subito lo stress idrico durante la fioritura. Questo potrebbe essere spiegato da un'inibizione della biosintesi di questo composto che sembra essere tardiva rispetto agli altri cannabinoidi. Anche il profilo aromatico delle infiorescenze cambia se lo stress idrico avviene in fase vegetativa o in fioritura. In questo caso i monoterpeni (la classe di molecole più importante nel determinare odore e sapore) sono significativamente minori quando lo stress avviene in fioritura. Anche altri terpeni come alcoli, idrocarburi aromatici e solfuri seguono lo stesso andamento dei monoterpeni mentre monoterpenoidi, sesquiterpeni e sesquiterpenoidi si trovano in quantità significativamente maggiori nelle piante che hanno subito lo stress idrico in fioritura. Alcoli e chetoni si trovano in quantità significativamente inferiori nelle infiorescenze che hanno subito stress idrico severo in fioritura rispetto a piante con lo stesso livello di stress ma in fase vegetativa. Inoltre nella varietà A la quantità di alcoli nelle infiorescenze non varia significativamente da piante stressate in fase vegetativa e in fioritura, mentre la differenza è significativa per la varietà B, con valori significativamente più bassi nelle piante stressate in fioritura facendo ipotizzare una maggior sensibilità di questa varietà a stress idrici tardivi.

Il confronto tra i metaboliti secondari prodotti dalle piante che hanno subito diversi livelli di stress idrico ha evidenziato una significativa riduzione di cannabidiolo (CBD) nelle infiorescenze delle piante in stress severo rispetto alle piante del controllo e dello stress moderato che non presentano differenze significative tra loro. Il cannabinolo (CBN) e i sesquiterpenoidi prodotti dalle piante stressate durante la fase vegetativa tendono ad aumentare all'aumentare del livello di stress anche se non ci sono differenze significative tra il controllo e le piante stressate. Se lo stress avviene in

fioritura il contenuto in CBN e sesquiterpenoidi delle infiorescenze invece non varia significativamente tra i diversi livelli di stress.

## 6. Conclusioni

Questa prova ha evidenziato che, oltre alle caratteristiche varietali, il contenuto di metaboliti secondari nelle infiorescenze di *Cannabis sativa* L. può variare significativamente anche in base alle condizioni ambientali. In particolare se lo stress idrico è severo (cioè le piante ricevono solo il 30% dell'acqua trattenibile dal terreno per 10 giorni) il contenuto in cannabidiolo (CBD) delle infiorescenze cala significativamente. Questo fatto può avere importanti risvolti pratici visto che il CBD è, insieme al THC, la sostanza attiva più importante della canapa ad uso medico e ricreativo e quindi, per preservare il suo contenuto nelle infiorescenze, è importante che le piante non subiscano stress idrici particolarmente intensi. Inoltre il CBD diminuisce di più se lo stress idrico avviene in fioritura che è la fase in cui la maggior parte dei cannabinoidi viene sintetizzata. Anche la quantità di terpeni varia a seconda dell'intensità e del momento del ciclo colturale in cui avviene lo stress idrico. Quando *Cannabis sativa* L. subisce stress idrici di diversa intensità o in fasi fenologiche diverse però la variazione del contenuto nelle varie classi di queste molecole non è uniforme anzi, la pianta risponde in maniera molto diversa aumentandone significativamente la biosintesi di alcune, di altre diminuendola significativamente e altre facendola restare pressoché invariata. Questo porta ad una variazione dell'odore e del sapore delle infiorescenze della canapa che ha subito stress idrico durante la coltivazione nonché da una possibile modifica dell'effetto delle principali sostanze attive in essa contenute visto che alcuni terpeni sembrano modificare l'effetto di tali molecole. La prova ha inoltre evidenziato che le due varietà (Fenomoon ed Harlequin) possono non rispondere ugualmente allo stress idrico nella biosintesi di alcoli nelle infiorescenze.

Questo lavoro apre tutta una serie di prospettive rispetto alla produzione in campo di queste due varietà che possono rispondere in maniera differenziata in condizioni altalenanti di rifornimento idrico tipiche del pieno campo.



## 7. Bibliografia

- Baldoni Remigio e Giardini Luigi** Coltivazioni erbacee [Libro]. - Bologna : Patron Editore, 2001.
- Barcaccia G. [et al.]** Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars [Rivista] // *frontiers in Plant Science*. - 2020.
- Capasso F., De Pasquale R. e Grandolini G.** Farmacognosia [Libro] / a cura di Capasso F.. - Milano : Springer, 2011.
- Chandra S., Lata H. e ElSohly M. A.** Cannabis sativa L.- Botany and Biotechnology [Libro]. - [s.l.] : Springer, 2017.
- Clarke R.C. e Merlin M.D.** Cannabis: evolution and ethnobotany [Libro]. - Los Angeles : University of California Press, 2013.
- Commissione europea** Canapa - Commissione europea [Online] // [agriculture.ec.europa.eu](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp_it). - [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp\\_it](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp_it).
- Fleming M.P. e Clarke R.C.** Physical evidence for the antiquity of Cannabis sativa L. [Rivista] // *JHA*. - 1998.
- Goyal Ankit, Tanwar, Beenu** Oilseeds: health attributes and food applications [Libro]. - [s.l.] : Springer, 2021.
- Jang H-E [et al.]** A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China [Rivista] // *J Ethnopharmacol*. - 2006.
- Kung C.T.** Archaeology in China [Libro]. - [s.l.] : University of Toronto Press, 1959. - Vol. 1.
- Li H. L.** The origin and use of cannabis in eastern Asia: linguistic-cultural implications [Rivista] // *Econ Bot*. - 1974.
- Massarenti Giulia, Cappello Fusaro Maddalena e Bona Stefano** Valutazione della distribuzione dei terpenoidi in Cannabis sativa L.. - Padova : [s.n.], 2023. - Tesi di laurea triennale - Università degli Studi di Padova.
- Ministero dell'Interno** La canapa agroindustriale [Online] // Direzione centrale per i servizi antidroga. - <https://antidroga.interno.gov.it/temi/informazione-sulle-droghe/trends-e-fenomeni/canapa-agroindustriale/>.
- Shultes R.E.** The botany and chemistry of Cannabis [Libro]. - London : J & A Churchill, 1970. - p. 11-38.
- Small E.** Evolution and classification of Cannabis sativa (marijuana, hemp) in relation to human utilization [Rivista] // *The Botanical Review*. - 2015. - Vol. 81. - p. 189-294.
- Small E.** The species problem in Cannabis: science and semantics [Libro]. - Toronto : Corpus, 1979. - Vol. 2.
- Touw M.** The religious and medical uses of cannabis in China, India and Tibet [Rivista] // *Journal of Psychoactive Drugs*. - 1981. - Vol. 13. - p. 23-34.