

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI,
RISORSE NATURALI e AMBIENTE**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE**

**Risposta allo stress salino di *Amaranthus
retroflexus* in diverse fasi fenologiche**

Relatore: Prof. Roberta Masin

Correlatore: Dott.ssa Aurora Ghirardelli

Laureanda: Eleonora Peron
1201888

Anno Accademico 2021/2022

Indice

Abstract	1
1. Introduzione	3
2. Materiali e metodi	5
2.1 Prove di crescita su agar	5
2.1.1 Preparazione dell'agar	5
2.1.2 Sterilizzazione dei semi e semina	5
2.1.3 Prove di crescita	6
2.2 Prova di crescita in serra	7
2.2.1 Preparazione dei vasi	7
2.2.2 Semina e cura delle piante	7
2.2.3 Campionamento finale	8
2.2.4 Quantificazione di sodio e potassio	9
2.2.5 Quantificazione del contenuto di proteine grezze	9
2.2.6 Analisi statistiche	9
3. Risultati	11
3.1 Crescita su agar	11
3.2 Altezze nella prova di serra	14
3.3 SPAD nella prova di serra	16
3.4 Biomassa fresca nella prova di serra	17
3.5 Biomassa secca nella prova di serra	20
3.6 Contenuto di sodio, potassio e proteine grezze	21
4. Discussione	25
5. Conclusioni	27
Bibliografia	29

Abstract

Lo studio è stato condotto con lo scopo di osservare come la crescita di *Amaranthus retroflexus* sia influenzata dallo stress salino. Questa specie è una delle più diffuse piante infestanti delle colture estive e scarsi studi sono stati svolti sulla sua risposta in ambienti salini.. Sono state condotte sia prove di crescita, su un substrato d'agar a diversi livelli di salinità, sia prove in serra con irrigazione salina. A fine prova sono state pesate le piante intere e il solo apparato radicale, entrambe come peso fresco e come peso secco. Svolgendo le prove di crescita su agar a varie temperature si è potuto osservare che l'amaranto risulta sensibile alla salinità a basse temperature, mentre a temperature più elevate la tolleranza sembra essere maggiore. Si è osservato anche il suo comportamento in competizione con la soia ma non si sono riscontrate particolari differenze nella crescita della pianta. In conclusione, la presente ricerca conferma che *A. retroflexus* è mediamente tollerante allo stress salino. L'analisi della tolleranza alla salinità delle piante infestanti permette di meglio interpretare la competizione tra colture e malerbe. Grazie a studi di questo tipo su diverse malerbe sarà possibile prevedere quali specie avranno maggiori possibilità di diffusione e saranno più competitive nel caso dell'aggravarsi del processo di salinizzazione del terreno.

1. Introduzione

La salinizzazione dei terreni risulta essere uno dei maggiori problemi per la coltivazione agricola e affligge circa il 20% delle terre coltivate con un indice di espansione del 10% annuo [1]. Questa problematica risulta particolarmente accentuata a causa dell'elevata evapotraspirazione e della scarsa lisciviazione nelle zone aride e semi aride [2] tuttavia i suoi effetti si fanno ampiamente sentire anche nelle aree del Mediterraneo [3].

L'aumento della salinità dei suoli è legato principalmente ai cambiamenti climatici e a errati metodi di irrigazione che portano, soprattutto nelle zone temperate [4], alla sempre più diffusa salinizzazione secondaria, ossia quella dovuta all'attività dell'uomo come per esempio l'uso di acque saline per irrigare i suoli con conseguente diminuzione della conducibilità idraulica, degradazione della struttura e formazione di croste sulla superficie [3].

Gli effetti maggiori si hanno quando il sale si accumula nella zona radicale, in particolare tra un'irrigazione e l'altra quando il suo contenuto è maggiore a causa dell'evapotraspirazione, perché porta a una difficoltà da parte delle piante di prelevare l'acqua essendo presente un maggiore potenziale osmotico [5]. In conseguenza a ciò si avrà poi anche un aumento dell'umidità del terreno dovuto alla maggiore presenza d'acqua in esso [6].

Le problematiche legate alla salinità non sono però limitate alla difficoltà di prelevare l'acqua ma vanno a colpire diversi aspetti metabolici portando a diversi cambiamenti anatomici e morfologici come, per esempio, a una diminuzione della crescita della pianta [7] con una minore altezza, un minore numero di foglie e una minore lunghezza delle radici [6]. Si va infatti incontro a tossicità ionica, che risulta dannosa soprattutto nella fase della germinazione, [6] e a carenza di macronutrienti come per esempio la mancanza dello ione calcio che può comportare un'interruzione dell'integrità di membrana [8]; inoltre eccessi di alcuni elementi creano diverse problematiche infatti un eccesso di cloro, per esempio, porta a un blocco nella crescita delle radici e alla comparsa di foglie secche, mentre il sodio porta a disidratazione, un minor turgore e a morte cellulare dovuta alla diminuzione della sintesi proteica e ad alterate attività ormonali [5]. Proprio il cloruro di sodio risulta essere uno dei sali più problematici, oltre ad essere uno dei più diffusi, in quanto va a creare una carenza di nutrienti entrando in competizione con essi e sintomi di tossicità nella pianta legati alle specie reattive dell'ossigeno ROS come O_2^- , H_2O_2 e OH^\cdot . Sono queste specie alla base della morte cellulare e ciò vuol dire che per resistere ad elevate salinità una pianta deve anche produrre un alto numero di enzimi antiossidanti in grado di catalizzare i ROS [9]. Il sale porta inoltre ad una minore attività fotosintetica, il che spiega in parte la minore crescita delle piante [6], con diminuzione del tasso di fissazione della CO_2 fotosintetica e con una parziale chiusura degli stomi.

La salinità inoltre porta a problemi per la germinazione infatti, a causa dell'alterazione dell'equilibrio degli ormoni e dei nutrienti [10], essa viene ritardata e in alcuni casi addirittura inibita [11]. Durante le fasi successive invece la tossicità del sodio che si accumula nelle foglie porta a una minore crescita a causa del blocco delle attività enzimatiche [12].

In generale si può dire che piante con una scarsa germinazione hanno una minore riduzione del peso fresco e secco, il contrario si ha invece in piante con buoni tassi di germinazione [13].

Spesso le fasi più delicate sono quella riproduttiva, la germinazione e i primi stadi di crescita, ma ciò può variare da specie a specie. Si può avere anche un'influenza da parte della temperatura il cui aumento porta ad un aumento della germinazione fino al superamento dell'optimum oltre il quale si ha un maggiore effetto del sale che porta ad una minore germinazione [14,15]

Un ulteriore problema per le colture sono le malerbe in quanto particolarmente resistenti e adattabili a condizioni avverse. Un'infestante che risulta particolarmente problematica nelle zone aride [16] e che ultimamente è sempre più diffusa anche nelle zone semiaride come l'area mediterranea [6] è *Amaranthus retroflexus* L. Si tratta di una malerba dicotiledone annuale che cresce in estate [16], infatti germina più facilmente ad alte temperature (da 25/15°C a 35/25°C) [17]. È originaria degli Stati Uniti centrali e orientali ed è altamente invasiva di colture a filari come cotone, mais, sorgo, soia, barbabietola da zucchero e girasole, ma risulta problematica anche per diverse colture orticole.

Questa specie è in grado di tollerare diversi stress abiotici grazie al suo apparato radicale a fittoni in grado di andare ad elevate profondità e ad un esteso apparato radicale laterale, alla maggiore efficienza nell'uso dell'acqua, all'accumulo di soluti e all'espressione di geni legati allo stress. Nonostante ciò non risulta indifferente allo stress salino che nella pianta porta ad una diminuzione della biomassa sia nella parte radicale che nei germogli ed a una minore germinazione [18]

In questo studio si è deciso di approfondire il comportamento di *A. retroflexus* data la scarsità di studi legati a questa specie in relazione alla salinità, nonostante si tratti di un'infestante così temibile. Lo scopo di questa ricerca è dunque quello di determinare la risposta a livelli di salinità crescenti e temperature diverse durante la fase di germinazione e nelle prime fasi di crescita, che sono tra gli stadi più sensibili. Si vuole poi studiare anche la crescita su suolo nelle fasi successive sia dell'amaranto cresciuto da solo sia in competizione con una coltura come avviene in ambito agricolo.

2. Materiali e metodi

2.1 Prove di crescita su agar

2.1.1 Preparazione dell'agar

Per la preparazione del substrato di agar si è proceduto preparando delle soluzioni madre di macronutrienti pesando i diversi sali secondo le seguenti quantità: nitrato d'ammonio NH_4NO_3 16,5 g/L; nitrato di potassio KNO_3 19 g/L; cloruro di calcio idrato $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 g/L; solfato di magnesio idrato $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g/L; diidrogenato di potassio KH_2PO_4 1,7 g/L. Si sono prelevati quindi 20 mL da ogni soluzione e sono stati trasferiti in un becher da 800 mL.

In seguito sono stati preparati due stocks, uno di ferro e uno di micronutrienti, pesando: FeNaEDTA 3,67 g/L; solfato manganoso MnSO_4 1,69 g/L; solfato di zinco idrato $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,86 g/L; acido borico H_3BO_3 0,62 g/L; ioduro di potassio KI 0,083 g/L; molibdato di sodio idrato $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/L; solfato rameico idrato $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g/L; cloruro di cobalto idrato $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g/L. Da entrambe le bottiglie appena preparate sono stati prelevati 4 mL da inserire nel cilindro graduato precedentemente riempito con le soluzioni di macronutrienti, quindi sono stati portati a volume (800 mL) con acqua deionizzata.

Una volta che ferro, macronutrienti e micronutrienti si sono ben dissolti in soluzione, è stata mantenuta in agitazione per mezzo di un'ancoretta magnetica ed è stato aggiunto cloruro di sodio NaCl puro fino al raggiungimento della conducibilità elettrica desiderata misurata mediante un conduttivimetro portatile (HI 98331 Soil, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA).

Si è andati dunque a controllare il pH della soluzione per assicurarsi che fosse compreso tra 5,5 e 5,8 in modo da evitare che il substrato rimanesse liquido una volta raffreddato; se necessario si andrà ad aggiustare il pH. Versare quindi 200 mL di medium liquido in contenitori autoclavabili e aggiungere 1,7 g di agargel per scatola. Ripetere l'operazione per preparare le diverse concentrazioni saline e il controllo (0, 4, 8, 12, 16 dS/m) per poi sottoporre i contenitori ad un ciclo di autoclave (121 °C per 20 minuti) in modo da permetterne la solidificazione dell'agar.

2.1.2 Sterilizzazione dei semi e semina

Sono stati trasferiti i semi in un cilindro da 10-15 mL ed è stato eseguito un lavaggio con etanolo 75% per 30 secondi; in seguito è stato rimosso l'etanolo e si è ripetuto un secondo lavaggio con ipoclorito di sodio al 20% per 10 minuti. Rimosso anche l'ipoclorito si è proceduti con quattro lavaggi di 10 minuti l'uno con acqua deionizzata, precedentemente sterilizzata; nel caso si stiano trattando scatole con soluzione salina, l'ultimo lavaggio deve essere effettuato con la soluzione salina corrispondente. Tale procedura deve essere eseguita in cappa a flusso laminare.

Una volta terminato l'ultimo lavaggio è stata rimossa l'acqua e con l'ausilio di una pinzetta sterile sono stati trasferiti 50 semi per ogni contenitore con l'agar disponendoli in file ordinate (Figura 1).

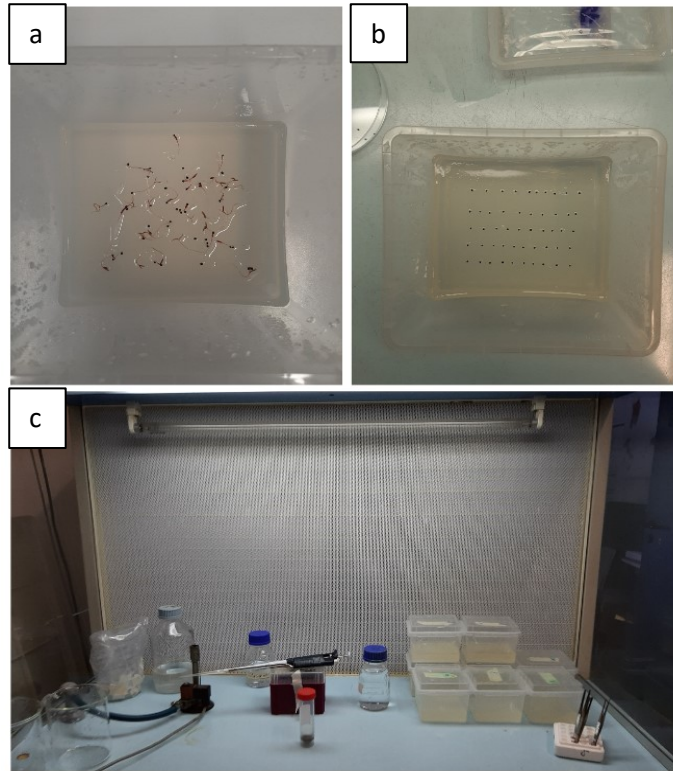


Figura 1 - (a) Vaschetta con i semi di *Amarantus retroflexus* germinati. (b) vaschetta con i semi di *Amaranthus retroflexus*. (c) Semina sotto cappa.

2.1.3 Prove di crescita

Le prove di crescita sono state effettuate in germinatoio con temperatura costante e con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio. I valori di temperatura selezionati sono stati 12, 15, 18 e 24 °C con livelli di salinità 0 (come controllo) 4, 8, 12 e 16 dS/m.

La prova è stata effettuata sull'infestante *A. retroflexus* che è stata sottoposta a tutte le combinazioni di temperature e le salinità scelte, con quattro repliche per ciascuna combinazione di fattori, con un totale di 80 scatole, 16 per ogni grado di salinità.

Una volta terminato il periodo di cinque settimane si è proceduti al controllo della quantità di semi germinati e, per quelli cresciuti, è stata effettuata una misurazione della lunghezza dell'apparato radicale e della parte area. Tale misurazione è stata effettuata mediante l'uso di calibro (Tesa Technology, Renens, Svizzera) dotato di connettore bluetooth da collegare al computer per avere un trasferimento automatico del dato in tabella.

2.2 Prova di crescita in serra

2.2.1 Preparazione dei vasi

Per la preparazione dei vasi si è iniziato con la preparazione di un impasto composto per il 55 % di sabbia, per il 35 % di torba e per il restante 10% di perlite. È stato mescolato con cura assicurandosi di rompere le zolle che si sono formate; una volta che è stata ottenuta una miscela omogenea è stata trasferita in 24 vasi da 40 cm di diametro con capacità di 50 L assicurandosi che la quantità di terriccio risultasse pressoché uguale in ognuno.

I vasi sono stati poi disposti in sei file accoppiate a due a due, per un totale di tre blocchi; in ogni blocco una fila è stata trattata con la soluzione salina e la seconda fungeva da controllo, con un corridoio fra le coppie per consentire il passaggio per l'abbeveramento (Figura 2).

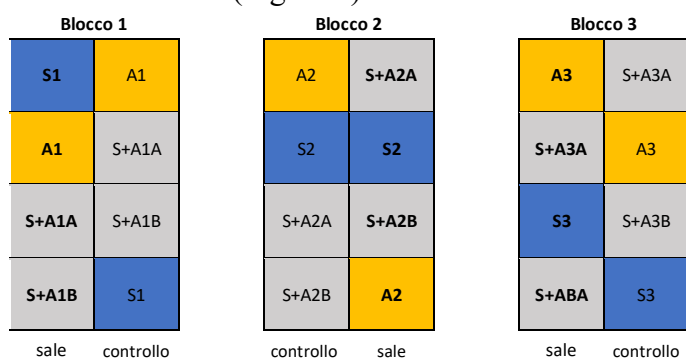


Figura 2 - Schema sperimentale per la prova di serra. A = *Amaranthus retroflexus*; S = soia.

Infine è stato saturato il terreno per prepararlo alla semina e sono state affisse delle etichette per identificare i vasi dello schema sperimentale.

Tale operazione è stata eseguita il giorno 29 marzo 2022 presso le serre dell'azienda agraria sperimentale Lucio Toniolo dell'Università di Padova.

2.2.2 Semina e cura delle piante

La prova è stata effettuata su *A. retroflexus* in competizione con soia (*Glycine max* L.): per ogni fila è stato preparato un vaso con solo amaranto, uno con sola soia e due con entrambe le specie.

Prima di iniziare la semina di *A. retroflexus* ci si è assicurati che il terreno fosse umido procedendo con un'abbeverata. Si sono poi presi circa 50 semi e si è cosparsa l'area di ciascun vaso in modo da coprirlo il più uniformemente possibile. I semi sono stati quindi coperti delicatamente con un po' di terra e abbeverati una volta ogni due giorni, o se necessario anche con più frequenza. L'operazione è stata compiuta il 30 marzo 2022.

Una volta che i primi germogli di Amaranto sono emersi si è proceduto con la semina della soia: 18 semi per i vasi con solo soia e 9 per quelli con l'accoppiata soia-amaranto. Sono stati scavati dei buchi distanti fra loro e profondi circa 3 centimetri ad è stato inserito il seme per poi coprirlo con del terreno. L'operazione è stata eseguita il 9 aprile 2022.

Inizialmente tutte le file sono state abbeverate con acqua non salina fino all'emergenza dei primi germogli. È stata quindi preparata una soluzione di sale da cucina (NaCl) con conducibilità pari a 4 dS/m con la quale si è proceduto all'innaffiatura in egual volume dei vasi sottoposti al trattamento salino, mentre per i vasi di controllo si è continuata ad usare acqua normale.

L'inizio dell'irrigazione salina è stato il 26 aprile 2022. Nel corso della prova si è proceduto allo sfoltimento del numero di piante in modo da ottenere alla fine: tre piante di soia e 6 di amaranto nei vasi con la competizione, sei piante nei vasi di sola soia e 6 piante nei vasi di solo amaranto (Figura 3). Periodicamente si è proceduto anche con la misurazione dello SPAD mediante sensore SPAD 502 Plus (Spectrum Technologies, Aurora, Illinois, USA).



Figura 3 - Immagine della prova di serra con Amaranthus retroflexus e soia.

2.2.3 Campionamento finale

Al termine della prova si è proceduto con il recupero delle piante e la pulizia delle radici. Sono stati rovesciati i vasi su una griglia ad è stata lavata la terra con l'ausilio di un getto d'acqua. In seguito è stata effettuata l'asciugatura delle piante in modo che l'acqua non influisse durante la pesata. Sono stati quindi pesati l'apparato radicale e la parte aerea di ciascuna pianta di *A. retroflexus*.

L'operazione è stata svolta il 9 giugno 2022.

Una volta eseguita la pesatura si sono poste le piante in sacchetti da inserire in essiccatoio a 65 °C per 48 ore in modo da ripetere l'operazione della pesatura in maniera identica con la sostanza secca.

2.2.4 Quantificazione di sodio e potassio

L'operazione di quantificazione di Na e K nelle foglie è stata condotta dopo una procedura di digestione acida dentro vials sigillate di Teflon da 100 mL. Per ogni campione, 500mg di sostanza secca della pianta sono stati dissolti in 7 mL di HNO₃ 67% e 2 mL di H₂O₂ in un microonde (Milestone ETHOS EASY 1600 W, Bergamo,

Italia). I campioni mineralizzati sono poi stati diluiti in 25 mL di acqua ultrapura e ogni elemento è stato quantificato con spettroscopia ad emissione atomica al plasma accoppiato induttivamente (SPECTRO ARCOS, SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germania). Gli standard di calibrazione sono stati eseguiti con etanolo assoluto all'1% (Prolabo VWR International PBI S.r.l. Milano, Italia). Gli elementi da determinare (Na e K) sono stati prelevati da soluzioni standard dei singoli elementi (Inorganic Ventures, Christiansburg, VA, USA). Il range di concentrazione delle soluzioni di calibrazione è fra 0 e 100 mg/L sia per Na che per K. I dati sono espressi come milligrammi su kilo (ppm) di sostanza secca. Le analisi sono state svolte presso i laboratori del dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova.

2.2.5 Quantificazione del contenuto di proteine grezze

Il contenuto di proteine grezze nelle foglie è stato quantificato con un analizzatore automatico Kjeldahl (Kjeltec 8400, FOSS, Hilleroed, Danimarca) usando il metodo di digestione a blocchi con un catalizzatore di rame e vapore distillato in acido borico. Il contenuto di proteine è stato calcolato con la formula:

$$\text{Proteine (mg/100g sostanza secca)} = \text{Azoto} \times 6.25$$

Le analisi sono state svolte presso i laboratori del dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova.

2.2.6 Analisi statistiche

Sui dati di crescita su agar (lunghezze di stelo e radici) è stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) fattoriale utilizzando il software statistico R 4.2.0 (2022). Le differenze tra le medie sono state analizzate con test LSD di Fisher ($\alpha = 0.05$). L'omogeneità delle varianze è stata verificata mediante il test di Bartlett. Sui dati di *A. retroflexus* della prova di serra è stata eseguita l'ANOVA a blocchi randomizzati per valutare le differenze tra i trattamenti (salinità e competizione con la soia), utilizzando il software statistico R 4.2.0 (2022). Le differenze tra le medie sono state analizzate con test di Tuckey a $p < 0.05$. L'omogeneità delle varianze è stata verificata mediante il test di Bartlett.

3. Risultati

3.1 Crescita su agar

L'analisi dei dati di crescita dopo cinque settimane di incubazione mostra l'effetto significativo di entrambi i fattori salinità e temperatura, e della loro interazione, sulla crescita delle piante. Ciò vuol dire che i valori medi della lunghezza di radice e parte aerea differiscono fra loro dal punto di vista statistico sia a temperature diverse sia a livelli di salinità diversi, e che l'effetto della salinità è diverso a temperature diverse (Tabella 1).

Tabella 1 – Effetto del livello di salinità, della temperatura e della loro interazione sulla lunghezza delle radici e parti aeree di Amaranthus retroflexus. Temp = temperatura, Sal = salinità, Temp x Sal = interazione temperatura x salinità.

	Stelo	Radice
	p-value	p-value
Temp	0.000	0.000
Sal	0.000	0.000
Temp x Sal	0.000	0.000

Infatti, la percentuale di crescita in generale decresce all'aumentare del livello di salinità, ma lo sviluppo avviene in maniera diversa a temperature diverse (Figura 4).

La crescita dello stelo risulta avere valori pari o maggiori a quelli del controllo per livelli di salinità più bassi (4, 8 e 12 dS/m) con andamento decrescente all'aumento della salinità. Alla temperatura di 15°C e, pure se in misura molto minore, anche alla temperatura di 18°C, si registra invece un'inversione con un picco di crescita delle lunghezze a 12 dS/m per poi ritornare a scendere a valori di salinità maggiori.

In generale, alle temperature più elevate di 18 e 24°C le differenze ai diversi livelli di salinità risultano minime, molto più marcate invece alla temperatura di 15°C.

La crescita delle radici risulta avere un comportamento simile. In questo caso si notano dei valori maggiori rispetto al controllo delle lunghezze a 15 e 24°C. Inoltre si ha sempre un picco della crescita fra gli 8 e i 12 dS/m che risulta essere più accentuata a 15 e 24°C, mentre è appena percettibile a 18°C. In questo caso si hanno differenze di lunghezza meno marcate (fatta eccezione per il picco di crescita visto precedentemente) per le temperature più alte, mentre per i valori a 15°C si ha una diminuzione fra i 4 e i 16 dS/m di più del 50%.

A 12°C non germina nessun seme. Per questo motivo tale temperatura non è inserita nei grafici.

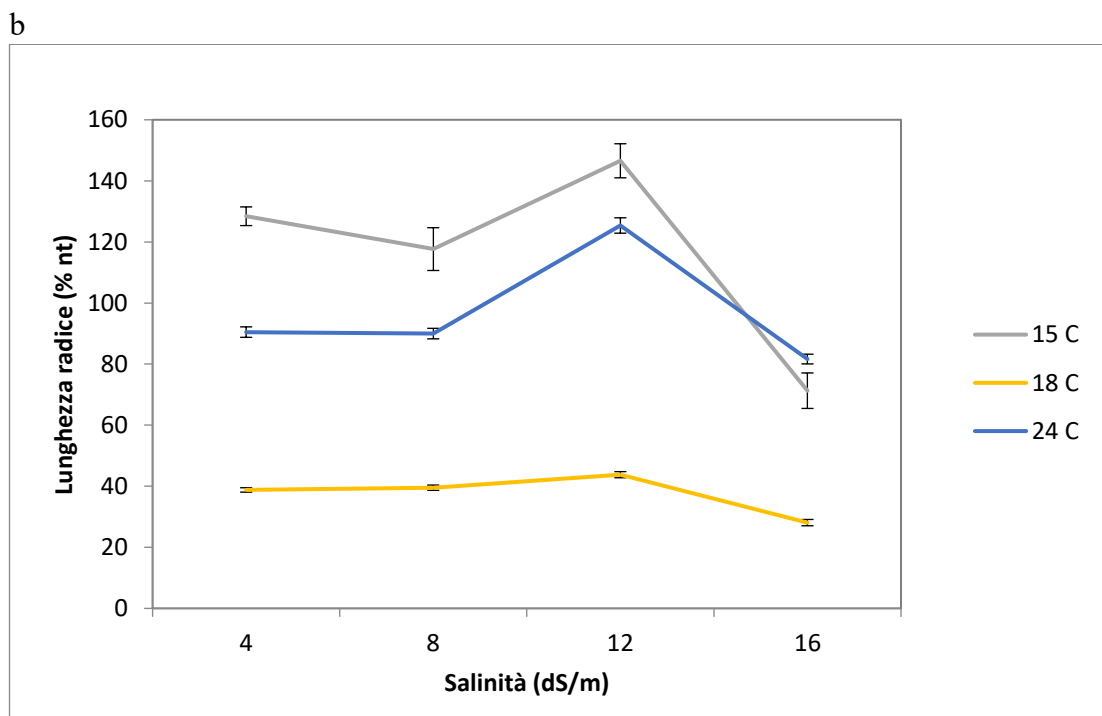
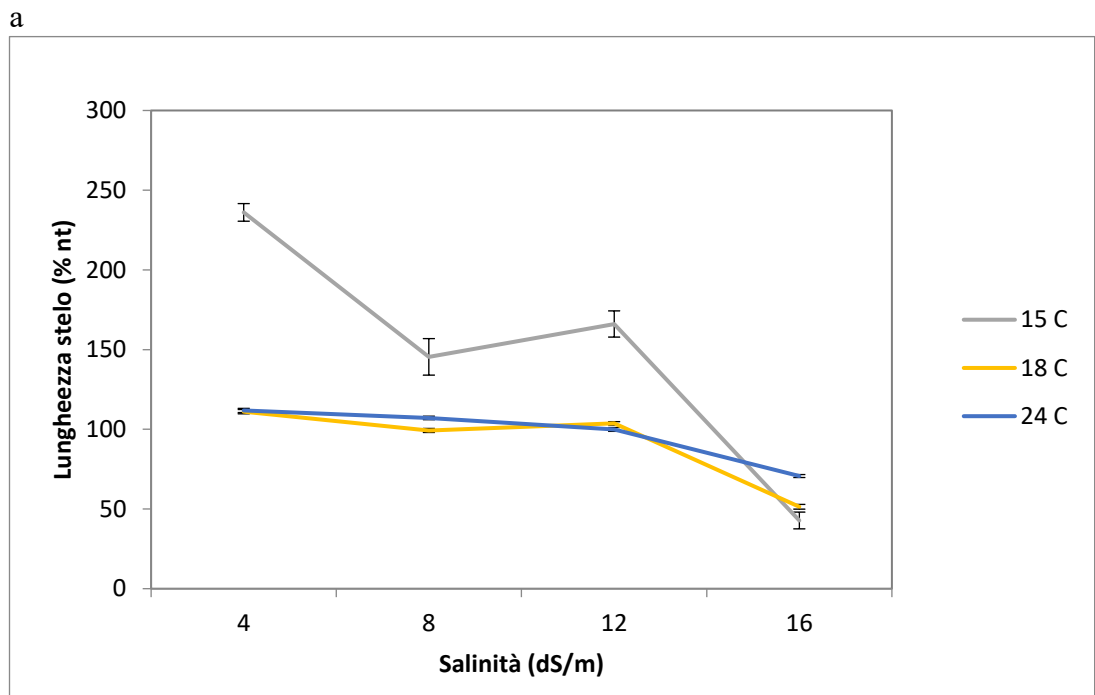


Figura 4 – Grafici di interazione tra salinità e temperatura che rappresentano la crescita percentuale rispetto al controllo (valore 100) dello stelo (a) e della radice (b) di *Amaranthus retroflexus*. Le barre indicano l'errore standard. %nt = percentuale sul non trattato

	12 °C			15 °C			18 °C			24 °C		
	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione
	0 dS/m	0.00	0.00	0	10.74	8.98	22	33.14	6.43	92	35.66	6.83
4 dS/m	0.00	0.00	0	25.36	5.96	51	36.80	6.30	98	39.88	6.63	100
8 dS/m	0.00	0.00	0	15.62	8.34	23	32.90	5.48	85	38.20	5.57	100
12 dS/m	0.00	0.00	0	17.84	7.27	34	34.37	4.71	89	35.63	5.90	95
16 dS/m	0.00	0.00	0	4.60	3.40	18	17.04	6.17	80	25.20	4.66	99

Tabella 2 – Valori medi di lunghezza, deviazione standard e percentuale di germinazione dello stelo di *A. retroflexus* a diversi livelli di salinità e di temperatura. Dev. st = deviazione standard

	12 °C			15 °C			18 °C			24 °C		
	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione	Lunghezza (cm)	Dev. st	% germinazione
	0 dS/m	0.00	0.00	0	9.28	5.16	22	12.75	3.72	92	13.97	3.70
4 dS/m	0.00	0.00	0	11.92	2.85	51	12.86	3.29	98	12.64	3.37	100
8 dS/m	0.00	0.00	0	10.92	4.41	23	13.10	3.76	85	12.57	3.40	100
12 dS/m	0.00	0.00	0	13.61	4.27	34	14.51	4.43	89	17.51	4.83	95
16 dS/m	0.00	0.00	0	6.62	3.23	18	9.30	4.34	80	11.40	3.14	99

Tabella 3 – Valori medi di lunghezza, deviazione standard e percentuale di germinazione della radice di *A. retroflexus* a diversi livelli di salinità e di temperatura. Dev. st = deviazione standard

Nelle tabelle 2 e 3 si osserva meglio l'assenza di germinazione a 12°C, mentre a temperature più elevate (da 15 a 24°C) la percentuale di germinazione ha valori simili a quelli del controllo e sempre superiori all'80% a 18 e 24 °C.

3.2 Altezze nella prova di serra

Per eseguire l'ANOVA i dati delle altezze sono stati sottoposti alla trasformazione in radice quadrata e confrontati in questa forma. Ciò ha evidenziato che non si ha differenza statistica fra *A. retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nelle piante di controllo; in maniera simile, non si nota una differenza significativa fra le piante sottoposte al trattamento salino cresciute in presenza o in assenza di competizione con la soia. Si ha invece una differenza statistica fra le piante cresciute col sale in vasi di solo amaranto e le piante di controllo, con o senza la soia: l'amaranto sottoposto a stress salino ha un'altezza minore rispetto a quello in condizioni di controllo (Figura 5).

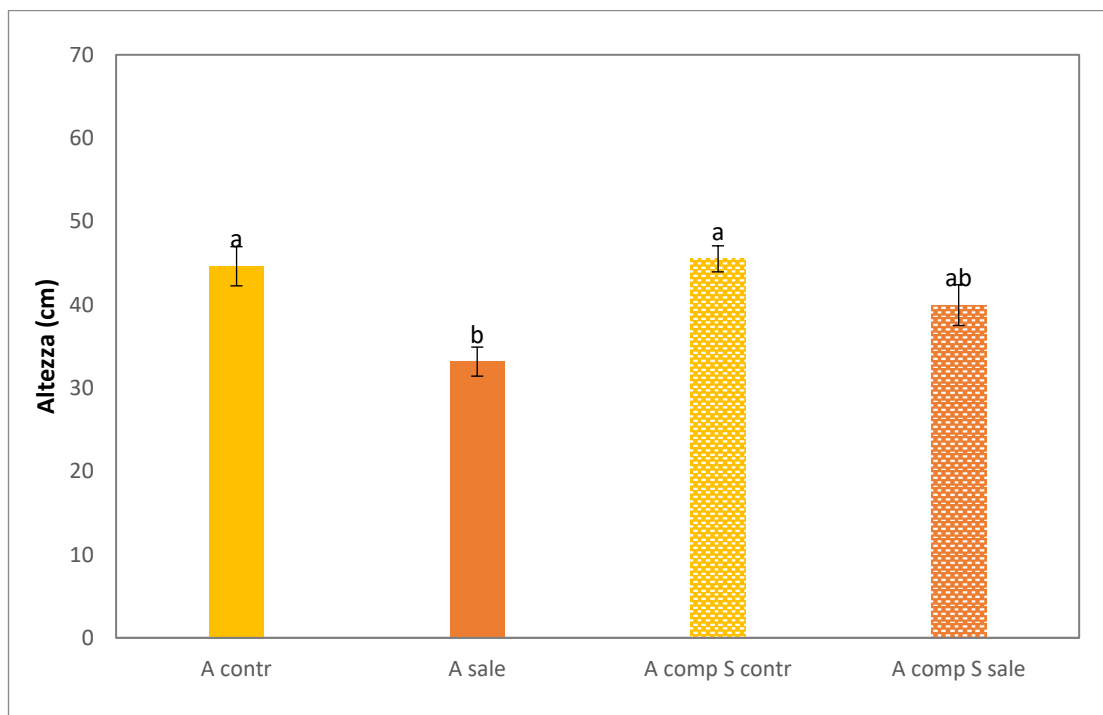


Figura 5 – Altezza media delle piante di *Amaranthus retroflexus* cresciute da sole e in competizione con la soia nelle situazioni di controllo e di trattamento salino alla fine della prova. Le differenze significative sono riferite ai dati sottoposti a trasformazione quadratica. Nel grafico i valori delle medie sono stati riportati tal quali. Le barre rappresentano l'errore standard. Contr = controllo, comp = competizione, A = amaranto, S = soia

In figura 6 è possibile osservare l'andamento della crescita di *A. retroflexus* con il passare del tempo. Tutti i trattamenti vanno incontro a un aumento delle altezze, mai

nota una differenza sempre maggiore fra le piante sottoposte al trattamento salino cresciute in competizione e quelle in monocoltura, differenza molto meno marcata al punto di partenza, rappresentante la prima settimana dopo l'inizio del trattamento salino. Tale differenza è invece quasi impercettibile nelle piante di controllo.

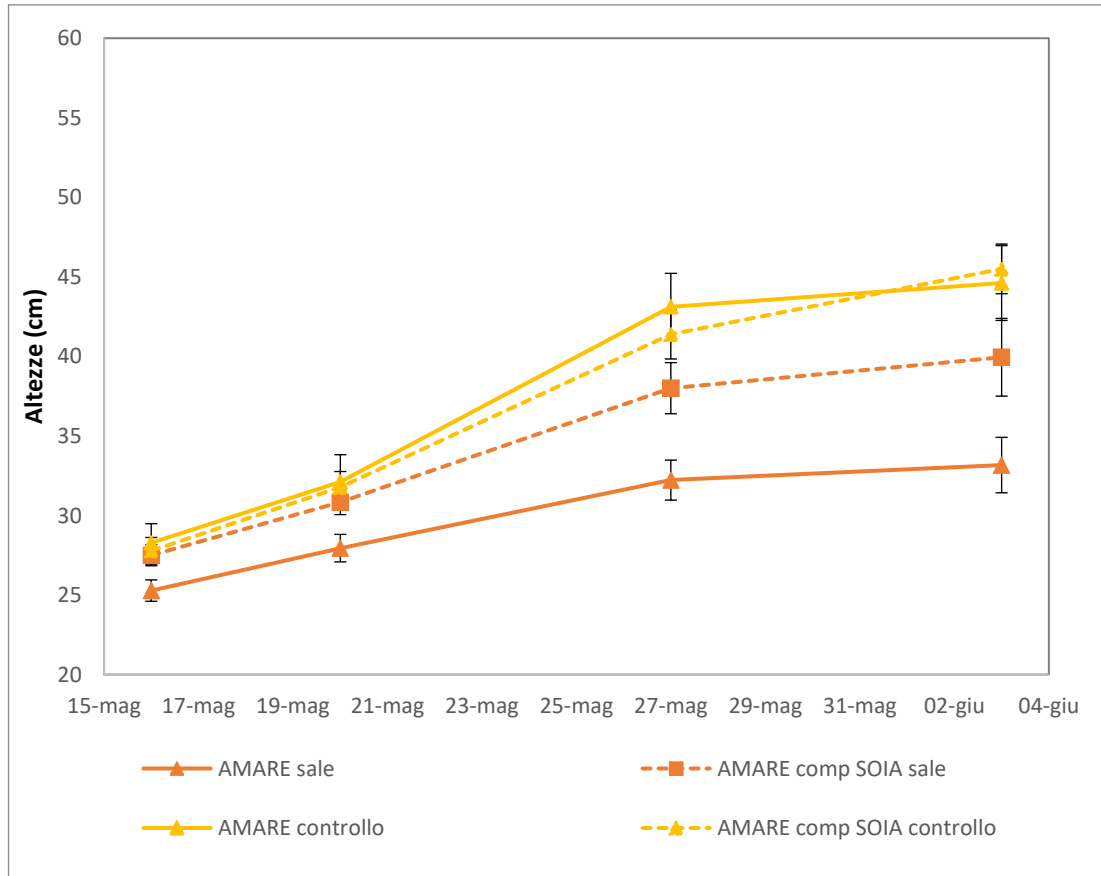


Figura 6 – Crescita in altezza delle piante di *A. retroflexus* con il passare del tempo dall'inizio della prova, in monocoltura e in competizione con la soia, nelle situazioni di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard per ogni media. Comp = competizione, Amare = amaranto

3.3 SPAD nella prova di serra

Osservando i risultati dello SPAD (Figura 7) si nota che vi è differenza statistica fra l'amaranto sottoposto al trattamento salino e quello di controllo; i valori delle piante sotto stress salino infatti sono significativamente inferiori a quelli che non subiscono tale stress. Come osservato nelle precedenti misure delle altezze, non vi è una differenza statistica fra piante sottoposte a competizione e non, sia per quanto riguarda i vasi di controllo, sia per quelli trattati con irrigazione salina.

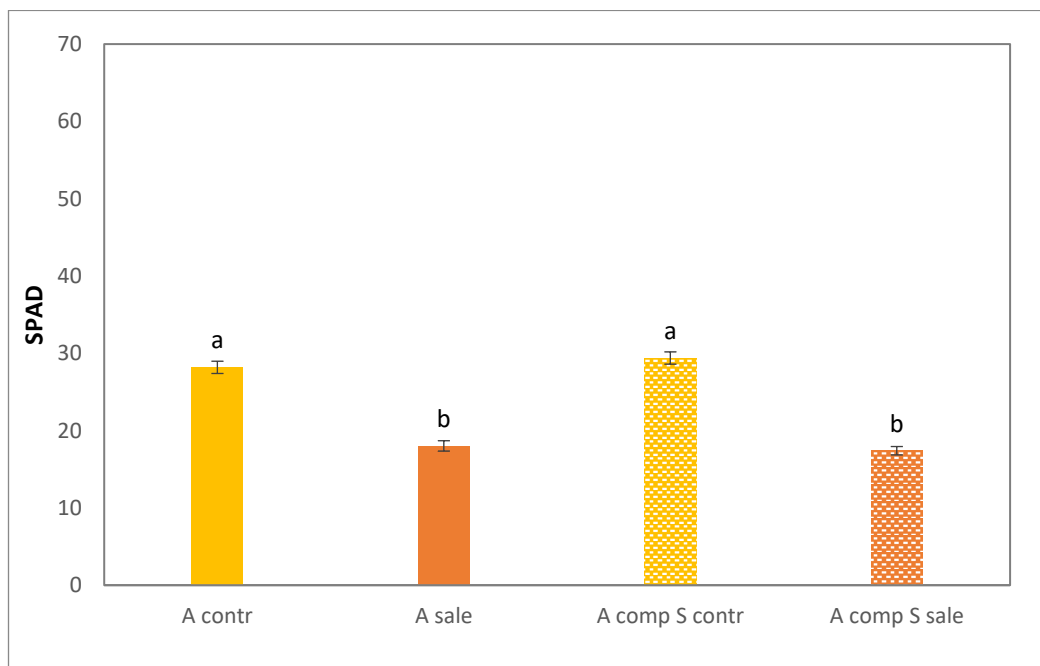


Figura 7 – Valori di SPAD delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino al termine della prova. Le barre rappresentano l'errore standard. Contr = controllo, comp = competizione, A = amaranto, S = soia

In figura 8 si analizza l'andamento nel tempo dei valori dello SPAD e si osserva un aumento sempre maggiore della differenza fra la situazione di controllo e quella delle piante sottoposte a trattamento salino, che inizialmente era minimo. Per quanto riguarda le piante sottoposte a trattamento salino, si può osservare un abbassamento dei valori di SPAD nelle fasi finali della prova.

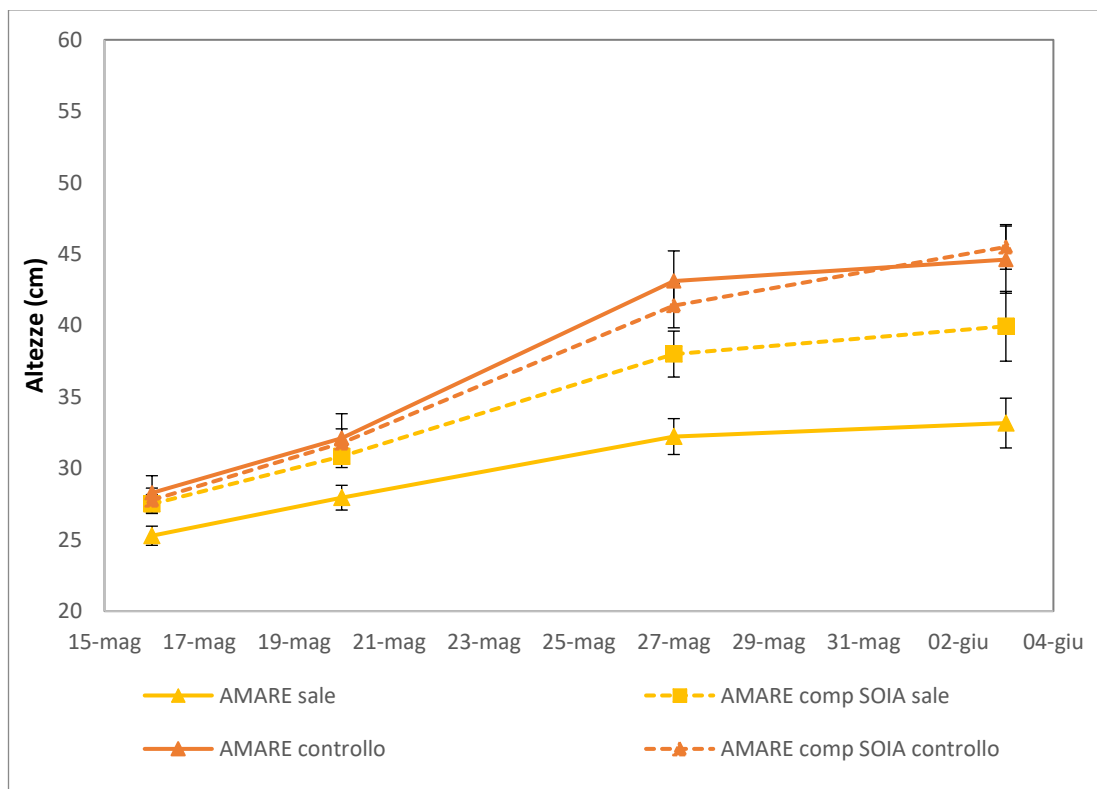


Figura 8 – Andamento dei valori di SPAD delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. Comp = competizione, Amare = amaranto

3.4 Biomassa fresca nella prova di serra

Osservando i valori delle pesate (Figura 9) si nota che la biomassa fresca totale del controllo, con o senza competizione, non presenta differenze significative rispetto a quella delle piante sottoposte alla combinazione di stress salino e competizione. L'unica differenza significativa è quella tra l'amaranto con e senza trattamento salino in monocoltura.

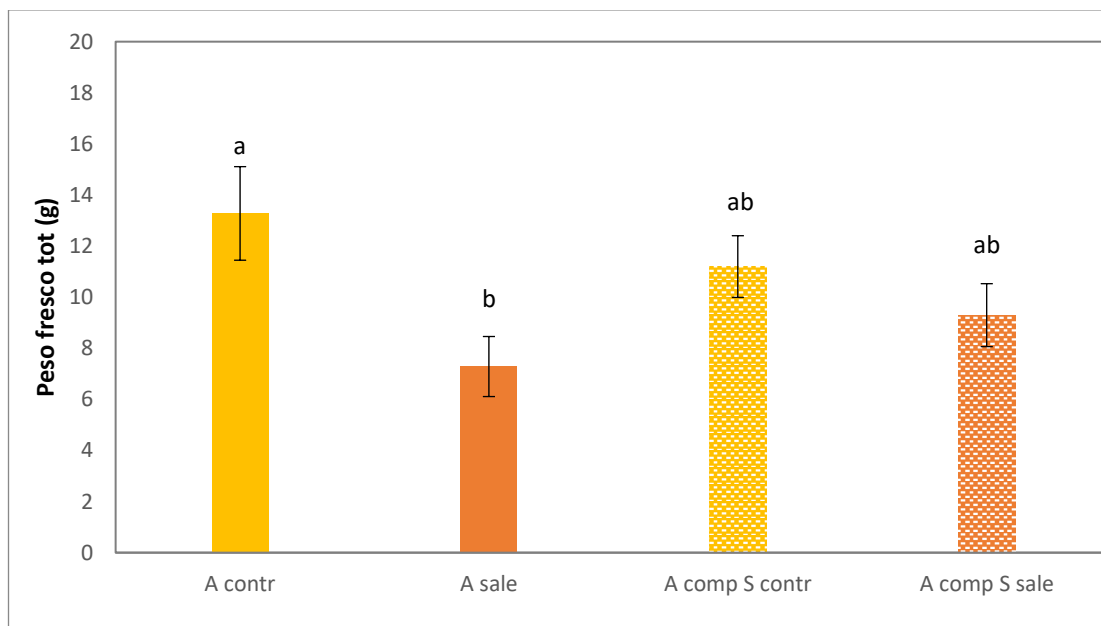


Figura 9 – Valori di biomassa fresca totale delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nelle situazioni di controllo e di trattamento salino. Le barre indicano l'errore standard. Contr = controllo, comp = competizione, A = amaranto, S = soia

Si possono però notare risultati diversi se si confronta la biomassa fresca delle radici con quella della parte aerea (Figura 10).

Nelle radici non si riscontra nessuna differenza nel confronto fra controllo e trattamento salino, né nella competizione né nella monocoltura.

L'aumento quindi riguarda la parte aerea, dove si conferma un valore nella monocoltura di controllo molto maggiore rispetto a quella sottoposta a stress salino, mentre non ci sono differenze significative tra il controllo, con e senza competizione e la combinazione di trattamento salino e competizione.

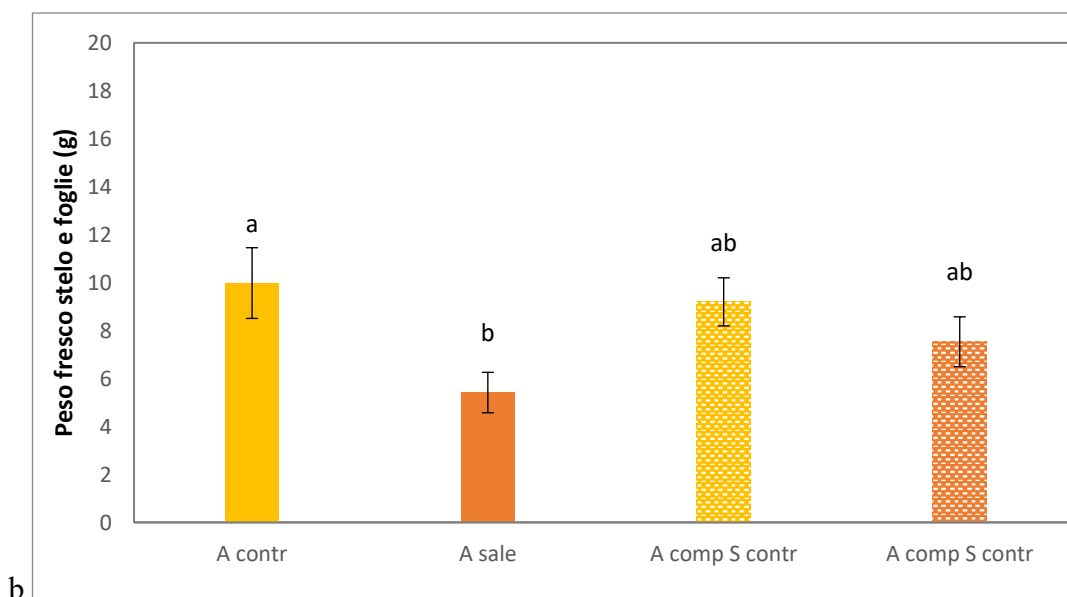
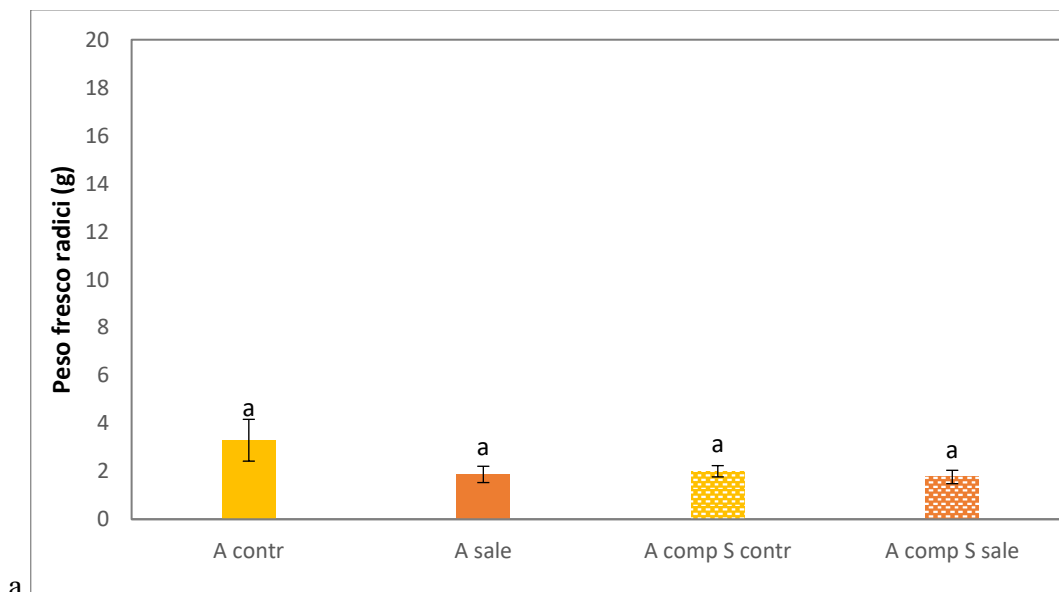


Figura 10 – Valori della biomassa fresca dell'apparato radicale (a) e della parte aerea (b) delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nelle situazioni di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. A = amaranto, S =soia, contr = controllo, comp = competizione

3.5 Biomassa secca nella prova di serra

Un rapporto diverso si ha invece fra le masse della sostanza secca. In figura 11 si può notare che nella biomassa secca totale non si hanno differenze fra la competizione e la monocoltura né nel controllo né nel sale. Si osservano invece valori minori della biomassa nel trattamento salino rispetto al controllo, con e senza competizione con la soia.

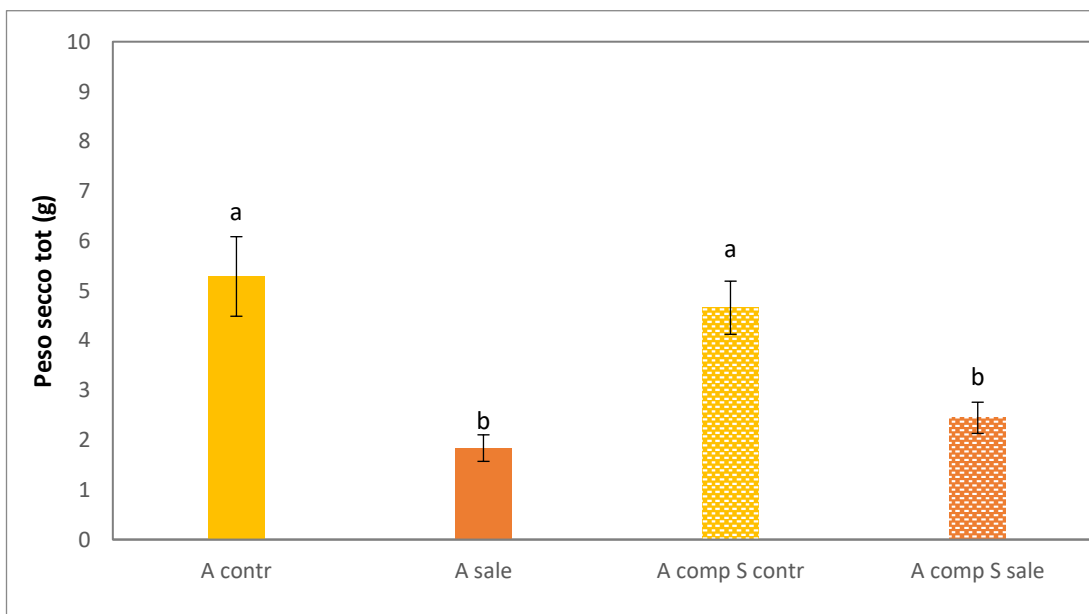


Figura 11 – Valori della biomassa secca totale delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. Nel grafico i valori sono riportati tal quali, ma per eseguire l'ANOVA sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica. A =amaranto, S = soia, contr = controllo, comp = competizione

Simile l'andamento delle singole parti (apparato radicale e parte aerea, figure 12a e 12b).

Anche qui le biomasse secche di radice e parte aerea presentano valori minori quando sottoposte al trattamento salino rispetto alla situazione di controllo, mentre non si notano differenze statistiche fra monocoltura e competizione.

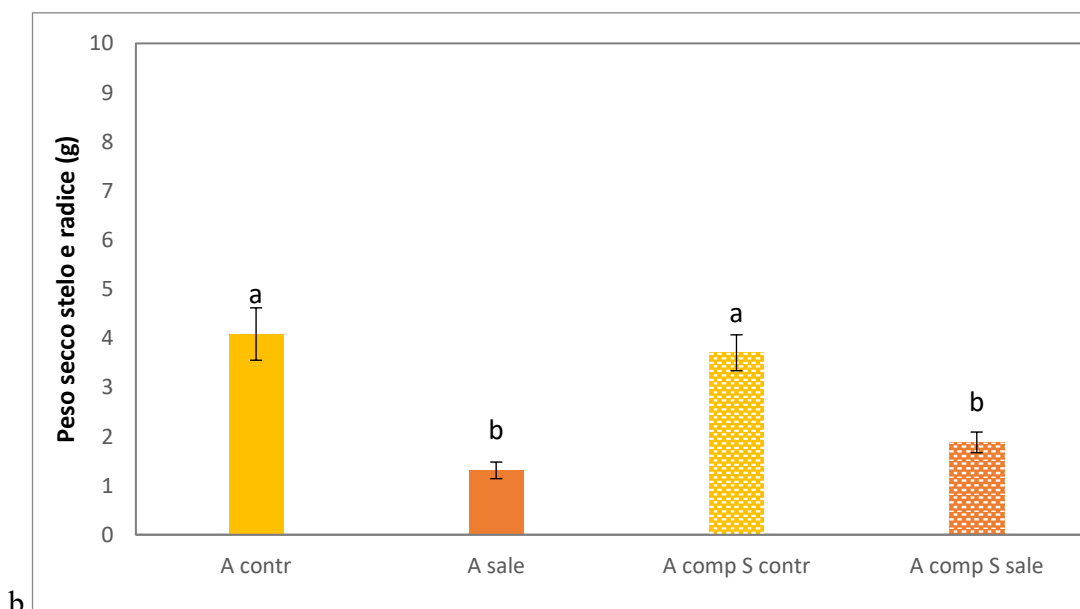
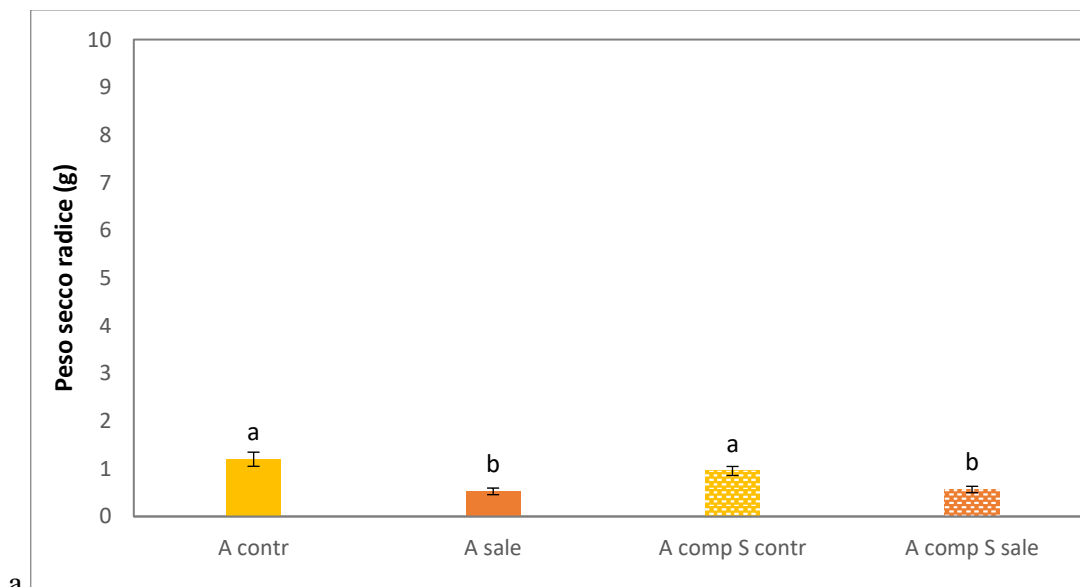


Figura 12 – Valori della biomassa secca della radice (a) e della parte aerea (b) delle piante di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. Nel grafico i valori sono riportati tal quali, ma per eseguire l'ANOVA sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica. A = amaranto, S = soia, contr = controllo, comp = competizione

3.6 Contenuto di sodio, potassio e proteine grezze

I valori delle analisi mostrano un aumento significativo della concentrazione di sodio nelle foglie delle piante sottoposte a trattamento salino rispetto a quelle del controllo.

Non si nota invece alcuna differenza fra le piante sottoposte alla competizione e quelle cresciute da sole (Figura 13).

Nel caso del potassio (Figura 14) invece non si nota alcuna differenza né fra piante cresciute con o senza sale, né fra competizione e non.

Il contenuto di proteine grezze (Figura 15) invece ha un andamento simile a quello del sodio con una differenza statistica fra controllo e sale con i valori di quest'ultimo che sono di molto maggiori. Anche in questo caso non si nota una differenza significativa fra competizione e non.

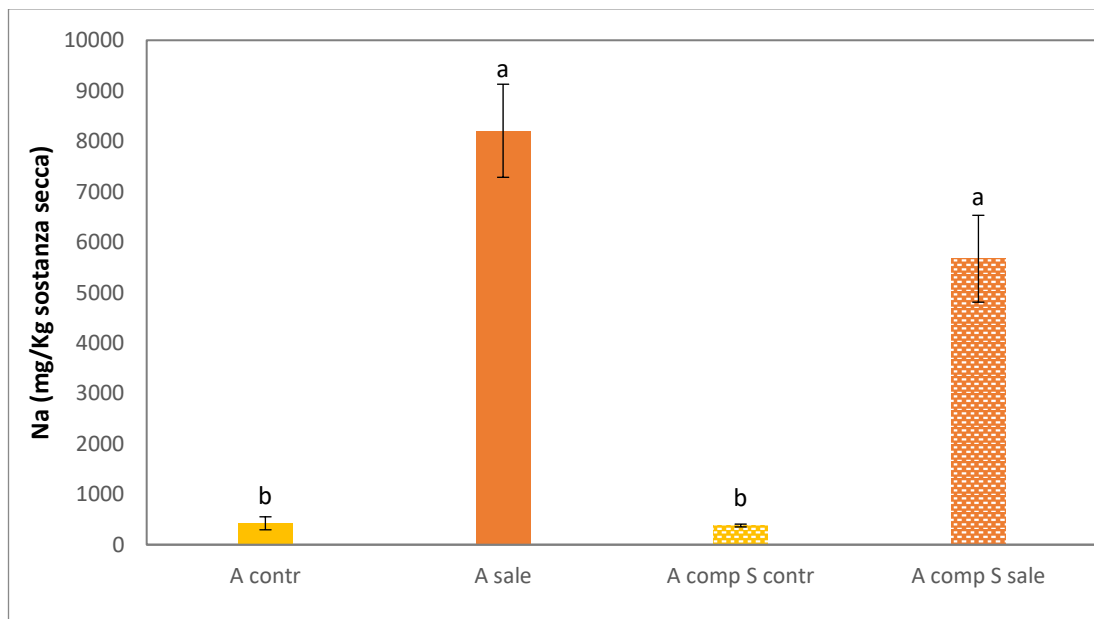


Figura 13 – Valori della concentrazione di Na delle foglie di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. A = amaranto, S = soia, contr = controllo, comp = competizione

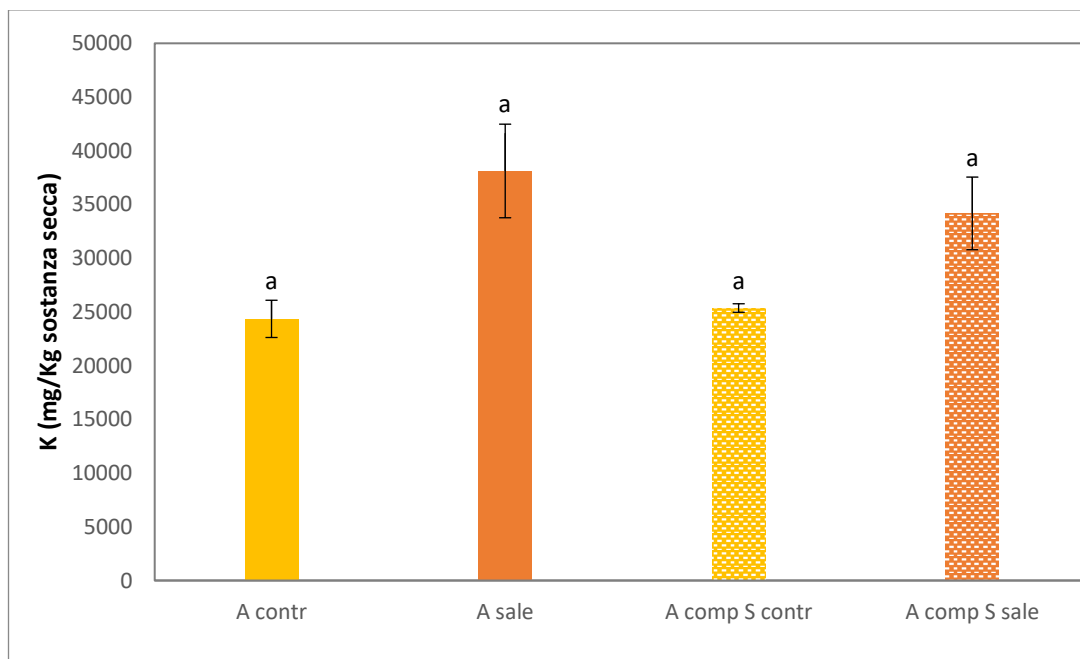


Figura 14 – Valori della concentrazione di K delle foglie di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. A = amaranto, S = soia, contr = controllo, comp = competizione

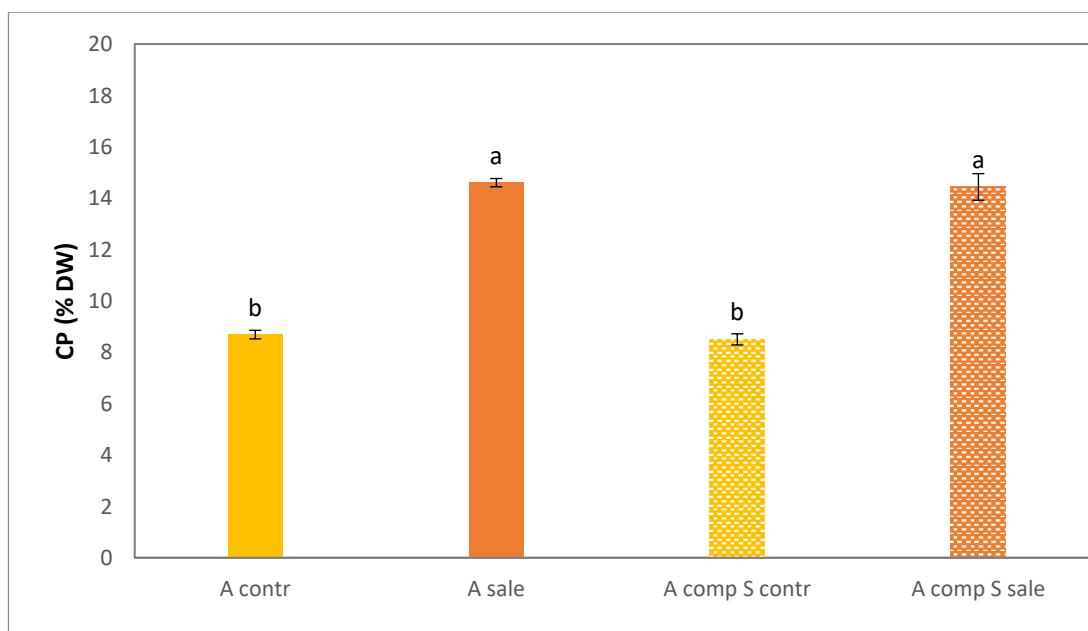


Figura 15 – Contenuto di proteine grezze (PG) delle foglie di *Amaranthus retroflexus* in monocoltura e in competizione con la soia nella situazione di controllo e di trattamento salino. Le barre rappresentano l'errore standard. A = amaranto, S = soia, contr = controllo, comp = competizione, PS = peso secco

4. Discussione

Questo studio risulta essere uno dei primi ad osservare l'interazione fra temperatura e salinità nella crescita di *A. retroflexus*. Nonostante ciò sia valutato di frequente nelle colture [19, 20], è invece meno studiato nelle specie infestanti, incluso l'amaranto, dove temperatura e salinità sono stati finora trattati prevalentemente in maniera separata [21].

Nelle prove di crescita su agar, in particolare, si mette in evidenza un aumento della germinazione di *A. retroflexus* in seguito all'aumento delle temperature e l'assenza di germinazione a 12 °C e ciò va a correlarsi col fatto che si tratta di una specie macroterma. Si può poi notare una crescita maggiore, rispetto al controllo, a bassi livelli di salinità e ciò è conosciuto come effetto ormetico [22]. Tale effetto si è osservato anche in altri studi che prendevano in considerazione altre infestanti, come *Echinochloa crus-galli* e *Portulaca oleracea* [23]. Questa crescita superiore rispetto al controllo si trova particolarmente accentuata nello stelo mentre è meno evidente nelle radici; si può ipotizzare che questo sia dovuto al fatto che la parte aerea cresce lontana dal substrato salino, mentre le radici ne sono direttamente a contatto.

Per *A. retroflexus* la situazione peggiore si evidenzia a basse temperature ed alti livelli di salinità, evidenziando che si tratta quindi di una specie mediamente tollerante allo stress salino come osservato in precedenza da Sharma et al. [6].

Lo studio conferma inoltre che i primi stadi di crescita sono per *A. retroflexus* tra le fasi più delicate in risposta allo stress salino, come osservato in molte specie vegetali [24], ma in questo caso anche la temperatura rappresenta un fattore determinante.

Per quanto riguarda la fase di crescita della prova di serra, nelle altezze non si osserva alcuna differenza fra le piante di *A. retroflexus* cresciute in monocoltura e quelle cresciute in competizione, e nel caso dello stress salino le piante in competizione con la soia hanno addirittura altezze maggiori rispetto alle piante cresciute in monocoltura. Ciò può essere dovuto al fatto che la soia ha uno sviluppo più rapido e quindi un vantaggio nell'esposizione alla luce diretta, pertanto l'amaranto è portato a crescere più rapidamente per poter essere competitivo con la soia. Si conferma comunque una certa sensibilità al sale dato che le altezze dell'amaranto sottoposto al trattamento salino in monocoltura sono minori rispetto a quelle non trattate.

Un andamento simile a quello visto nell'altezza si ha nello SPAD, utilizzato qui come indice di quantificazione del contenuto di clorofilla [24], e anche in questo caso si riscontrano valori minori nelle piante sottoposte a trattamento salino rispetto a quelle di controllo. Ciò significa che lo stress salino porta ad un rallentamento nella produzione di clorofilla, in accordo con Omami e Hammes [25], che hanno evidenziato una diminuzione della fotosintesi in molte specie del genere *Amaranthus* a concentrazioni di 100mM di NaCl.

L'analisi della biomassa fresca mostra che solo l'amaranto sottoposto a trattamento salino in monocoltura presenta una riduzione della crescita rispetto al controllo, differenza che invece non sussiste nel caso della competizione con la soia. Tali differenze sono però riscontrabili unicamente nella parte aerea e non nell'apparato

radicale. Nella fase di crescita, come evidenziato anche da Khan et al. [17] in piante di *A. retroflexus* sottoposte a stress salino, il peso fresco della radice non viene influenzata dalla salinità e quindi il suo sviluppo non rallenta mantenendosi costante. Osservando invece la biomassa secca (totale, delle radici e della parte aerea) si può notare una riduzione della massa nell'amaranto sottoposto a stress salino anche in competizione con la soia; ciò dimostra una maggiore ritenzione idrica nelle piante sottoposte a stress salino sia nella parte aerea che nelle radici. Anche questi risultati riconfermano che questa specie è comunque suscettibile agli effetti della salinità.

Nelle foglie di amaranto sottoposto a trattamento salino si nota un aumento dei livelli di sodio, legato alla tossicità ionica di quest'ultimo. Il contenuto di potassio invece non subisce alcun aumento e ciò significa che non si ha alcuna strategia di riequilibrio Na/K. Non si verifica però neanche una perdita di K e, dato che è comune una diminuzione dei livelli di potassio per piante sotto forte stress salino [26], significa che lo stress subito dall'amaranto non è uno stress forte in termini di tossicità ionica. Osservando i valori delle proteine grezze si nota un aumento della loro quantità sotto stress salino, come avvenuto per il sodio. Si può ipotizzare che ciò sia dovuto a un'elevata attività metabolica in risposta allo stress salino.

5. Conclusioni

La presente ricerca mostra che *A. retroflexus* presenta una certa sensibilità allo stress salino, anche se essa risulta non essere particolarmente accentuata.

La specie mostra di essere più sensibile nelle prime fasi di crescita: si ha infatti una minore germinazione a livelli di salinità più alti. La temperatura si rivela però un importante fattore, in grado di influenzare lo stress salino; ciò è confermato dal fatto che all'aumentare della temperatura aumenta anche la percentuale di germinazione.

Al contrario la competizione pare non influenzare in maniera significativa le prestazioni di crescita dell'amaranto. Non si notano infatti particolari differenze fra le piante in monocoltura e quelle cresciute con la soia, mentre presentano valori che differiscono fra loro le piante del controllo e quelle del trattamento salino. Queste ultime mostrano una minore altezza e un minor contenuto di clorofilla oltre ad una maggiore ritenzione idrica. Tutto ciò ci permette di concludere che *A. retroflexus* è sensibile allo stress salino, ma non alla competizione con la soia.

La specie ha invece dimostrato di essere una pericolosa infestante per la soia dato che ha mantenuto la stessa biomassa nella monocoltura e nella competizione, sviluppandosi maggiormente in altezza in quest'ultimo caso.

L'analisi della tolleranza alla salinità delle infestanti, in questo caso di *A. retroflexus*, permette di meglio interpretare la competizione tra colture e malerbe. Con questo approccio si potranno effettuare delle previsioni su quali specie diverrebbero maggiormente diffuse nel caso dell'aggravarsi del processo di salinizzazione del terreno.

Studi come questo forniscono delle basi di conoscenza utili per trovare nuovi tipi di colture adatte alla nuova condizione pedo-climatica.

Si potrebbero identificare i tratti che in specie resistenti permettono la tolleranza dello stress e spingere l'evoluzione di tali tratti in colture redditizie. In alternativa si potrebbero impiegare specie al momento non da reddito per scopi alimentari, per il foraggio o per altri usi commerciali.

Bibliografia

1. Shrivastava, P.; Kumar, R., "Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation", *Saudi J. Biol. Sci.*, **2015**, 22, 123-131
2. Mengel, K.; Kirkby, E.A., "Principles of plant nutrition", *International Potash Institute, Berna*, **1982**
3. Dazzi, C., "Saline waters and soil quality", *Ital. J. Agron*, **2006**, 3, 467-474
4. Cirillo, V.; Masin, R.; Maggio, A.; Zanin, G., "Crop-weed interaction in saline environments", *European Journal of Agronomy*, **2018**, 99, 51-61
5. Warrence, N.J.; Bauder, J.W.; Pearson, K.E., "Basics of salinity and sodicity effects on soil physical properties", *Departement of Land Resources and Environmental Sciences, Montana State University-Bozeman*, **2002**
6. Sharma, A.; Qayyum, Z.A.; Neagu, M.B., "Effect of water stress and salinity stress on growth in Amaranth (*Amaranthus retroflexus*)", *Nepalese Journal of Agricultural Sciences*, **2021**, 20, 70-77
7. Seeman, J.R.; Critchley, C., "Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris L.*" *Planta*, **1985**, 164, 151-162
8. Lynch, J.; Cramer, G.R.; Lauchli, A., "Salinity reduces membrane associated calcium in corn root protoplasts", *Plant Physiol*, **1987**, 83, 390-394
9. Sriniegn, K.; Saisavoey, T.; Karnchanatat, A., "Effect of salinity stress on antioxidative enzyme activities in tomato cultured in vitro", *Pak. J. of Botany*, **2015**, 20, 1-10
10. Bilkis, A.; Islam, M.R.; Hafiz, M.H.R.; Hasan, M.A., "Effect of NaCl induced salinity on some physiological and agronomic traits of wheat", *Pak. J. Bot.*, **2016**, 48, 455-460
11. Lukupitiya, E.; Agrawal, M.; Ahamed, T.; Mustafa, N.; Ahmed, B.; Vathani, A.; Opatha, K.; Jaiswal, B.; Singh, S.; Seneviratne, G.; et al., "Evaluation of best management practices with greenhouse gas benefits for salt-affected paddy soils in South Asia", *APN Sci. Bull.*, **2020**, 10
12. Wu, H.; Zhang, X.; Giraldo, J.P.; Shabala, S., "It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress", *Plant Soil*, **2018**, 431, 1-17
13. Quesada, V.; García-Martínez, S.; Piqueras, P.; Ponce, M.R.; Micol, J.L., "Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*" *Plant Physiol*, **2002**, 130, 951-963
14. Ahi, S.M.; Powers, W.L., "Salt tolerance of plants at various temperatures", *Plant Physiol*, **1938**, 13, 767-789
15. Mujeeb-ur-Rahman; Kayani, S.A.; Gul, S., "Combined effects of temperature and salinity stress on Corn C.V Sunahry", *Pakistan J. Biol. Sci.*, **2000**, 3, 1459-1463
16. Horak, M.J.; Loughin, T.M., "Growth analysis of four *Amaranthus* species", *Weed Science*, **2017**, 48, 347-355
17. Khan, A.M.; Mobli, A.; Werth, J.A.; Chauhan, B.S., "Germination and seed persistence of *Amaranthus retroflexus* and *Amaranthus viridis*: two emerging

- weeds in Australian cotton and other summer crops”, *PLoS ONE*, **2022**, 17, e0263798
18. Bhargava, A.; Srivastava, S., “Response of *Amaranthus* sp. To salinity stress” In *Emerging research in alternative crops*, Hirick, A.; Choukr-Allah, R.; Ragab, R. (Eds.), Springer Nature, Cham, **2020**, 245-263
 19. Ramin, A.A., “Effects of salinity and temperature on germination and seedling establishment of sweet basil (*Ocimum Badilicum* L.)”, *Journal of Herbs, Species and Medicinal Plants*, **2006**, 11, 81-90
 20. Al-Shoaibi, A.A., “Combined effects of salinity and temperature on germination, growth and gas exchange in two cultivars of *Sorghum bicolor*”, *Journal of Taibah University for Science*, **2020**, 14, 812-822
 21. Hao, J.H.; Lv, S.S.; Bhattacharya, S.; Fu, J.G., “Germination response of four alien congeneric *amaranthus* species to environmental factors”, *PLoS ONE*, **2017**, 12, e 0170297
 22. Calabrese, E.J., “Hormetic mechanisms”, *Critical reviews in toxicology*, **2013**, 23, 580-606
 23. Fogliatto, S.; Patrucco, L.; Milan, M.; Vidotto, F., “Sensitivity to salinity at the emergence and seedling stages of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*), weedy rice (*Oryza sativa*), and rice with different tolerance to ALS-Inhibiting Herbicides”, *Weed Science*, **2021**, 69, 39-51
 24. Lauchli, A.; Grattan, S.R., “Plant growth and development under salinity stress.” In *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerance crops*, Jenks, M.A.; Hasegawa, P.M.; Jain S.M. (Eds.), Springer, Dordrecht, **2007**, 1-32
 25. Omami, E.N.; Hammes, P.S., “Ameliorative effects of calcium on growth and mineral uptake of salt-stressed amaranth”, *South African Journal of Plant and Soil*, **2006**, 23, 197-202
 26. Wu, H.; Zhang, P.; Chen, G.; Pan, L.; Li, J.; Dong, L., “Environmental factors on seed germination and seedling emergence of *Phleum paniculatum* Huds”, *Chilean Journal of Agricultural Research*, **2018**, 78, 370-377