

Article

Effetti del Distillato di Legno (acido pirolegnoso) sulla resa e sulla composizione minerale di tre colture di leguminose

Pablo Carril ¹, Elisabetta Bianchi ^{1,2,*}, Costanza Cicchi ³, Andrea Coppi ², Marco Dainelli ²,
Cristina Gonnelli ², Stefano Loppi ^{1,4}, Luigia Pazzagli ³ and Ilaria Colzi ²

¹ Department of Life Sciences, University of Siena, Via Mattioli 3, 53100 Siena, Italy; pablo.carril@unisi.it (P.C.); stefano.loppi@unisi.it (S.L.)

² Department of Biology, University of Florence, Via Micheli 1, 50121 Florence, Italy; andrea.coppi@unifi.it (A.C.); marco.dainelli@unifi.it (M.D.); cristina.gonnelli@unifi.it (C.G.); ilaria.colzi@unifi.it (I.C.)

³ Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences “Mario Serio”, University of Florence, Viale Morgagni 50, 50134 Florence, Italy; costanza.cicchi@stud.unifi.it (C.C.); luigia.pazzagli@unifi.it (L.P.)

⁴ BAT Center—Interuniversity Center for Studies on Bioinspired Agro-Environmental Technology, University of Naples ‘Federico II’, 80055 Naples, Italy

* Correspondence: e.bianchi@unifi.it

Abstract: L'uso eccessivo di fertilizzanti chimici e pesticidi in agricoltura sta aumentando la domanda di nuovi prodotti per migliorare la qualità delle colture in modo più sostenibile. Il distillato di legno (WD, acido pirolegnoso) è un estratto vegetale che può essere applicato con successo in agricoltura grazie alla sua capacità di migliorare la crescita, le dimensioni e il peso delle parti vegetali commestibili. Tuttavia, ci sono poche informazioni sui suoi effetti di promozione della resa delle piante sulle colture di leguminose. Il presente lavoro ha studiato gli effetti del WD sulla resa, sul contenuto proteico e sulla composizione minerale di piante di ceci (*Cicer arietinum* L.), lenticchie (*Lens culinaris* L.) e fagioli (*Phaseolus vulgaris* L.) coltivate in campo. L'applicazione di WD ha mostrato notevoli effetti di promozione della resa soprattutto nelle piante di lenticchie, che hanno aumentato significativamente la biomassa di piante e germogli, il numero e il peso sia dei baccelli che dei semi, nonché il contenuto totale di proteine dei semi. Inoltre, i semi delle piante trattate con WD hanno aumentato in modo differenziato la concentrazione di elementi ad alto valore nutrizionale per la salute umana, inclusi Fe, Ca, Mg e K. Questi risultati suggeriscono che gli effetti del WD tra i legumi testati sono specifici e che il WD potrebbe essere un candidato ottimale per coltivare legumi ad alto rendimento con una migliore qualità nutrizionale del seme.

Parole Chiave: distillato di legno; ceci; lenticchia; fagiolo; qualità del seme; minerali; proteine; resa delle colture



Citation: Carril, P.; Bianchi, E.; Cicchi, C.; Coppi, A.; Dainelli, M.; Gonnelli, C.; Loppi, S.; Pazzagli, L.; Colzi, I. Effects of Wood Distillate (Pyroigneous Acid) on the Yield Parameters and Mineral Composition of Three Leguminous Crops. *Environments* **2023**, *10*, 126. <https://doi.org/10.3390/environments10070126>

Academic Editor: Sergio Ulgiati

Received: 28 May 2023

Revised: 14 July 2023

Accepted: 17 July 2023

Published: 19 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Allevare colture per 8 miliardi di esseri umani senza incidere sulle risorse naturali è una delle maggiori sfide dell'agricoltura attuale [1]. Per tenere il passo con la crescita della popolazione, la produzione agricola si è basata sull'applicazione di fertilizzanti chimici e pesticidi. Tuttavia, il loro uso diffuso ha portato a un rapido degrado delle risorse naturali e all'uso insostenibile del suolo e dell'acqua [2]. Tali problemi ambientali critici richiedono misure alternative per migliorare la produzione agricola senza mettere a rischio la salute umana, gli animali da allevamento e l'ambiente.

In questo contesto, la valorizzazione della biomassa vegetale di scarto sta diventando un approccio promettente per trovare prodotti preziosi e più ecologici per applicazioni agricole [3]. Recentemente l'acido pirolegnoso, noto anche come distillato di legno (WD), è stato inserito nella lista dei prodotti utilizzabili in agricoltura biologica in Italia [4]. Il WD è un sottoprodotto ottenuto dalla distillazione dei gas prodotti durante la pirolisi della biomassa legnosa [5]. È composto da oltre 200 composti idrosolubili, tra cui fenoli, tannini, esteri e acidi acetici,

che sono correlati sia con i suoi effetti di promozione della crescita delle piante che con quelli di difesa [3]. La composizione chimica del WD può variare a seconda del tipo di legno (conifere o latifoglie) e delle specie vegetali utilizzate come materia prima [6]. Di conseguenza, questi fattori determinano anche gli effetti specifici del WD sulle piante [7].

Gli effetti positivi del WD sono stati dimostrati sia nelle colture orticole che in quelle cerealicole. L'applicazione fogliare di WD ha dimostrato di proteggere le piante di lattuga (*Lactuca sativa* L.) dai danni indotti dall'ozono e di influenzare positivamente non solo l'accumulo di biomassa, ma anche il suo contenuto di clorofilla e zucchero [8–10]. Inoltre, gli effetti benefici del WD sono stati collegati all'aumento del contenuto di N e P nel basilico (*Ocimum basilicum* L.) [11], all'aumento del numero di frutti e all'aumento della composizione elementare nel pomodoro [12], all'aumento della crescita, peso e dolcezza nel melone [13], e all'aumento della crescita dei germogli e della resa in grani nel riso (*Oryza sativa* L.) [14]. Per quanto ne sappiamo, solo uno studio ha studiato gli effetti della WD nei legumi [15], e questo studio ha mostrato che le piante di ceci (*Cicer arietinum* L.) irrorate settimanalmente con 0,25% (v/v) di WD derivate dal castagno aumentavano sia il peso che il diametro del seme, così come il potere antiossidante del seme e il contenuto proteico del seme [15].

I legumi sono tra le colture più importanti in agricoltura, rappresentando il 27% della produzione alimentare primaria mondiale [16]. Sono un'ottima fonte di proteine, carboidrati e minerali, come il potassio (K), il calcio (Ca), il magnesio (Mg), il ferro (Fe) e lo zinco (Zn), e stanno guadagnando la preferenza rispetto alle proteine animali per il consumo umano [17,18]. Inoltre, c'è un crescente riconoscimento del contributo dei legumi agli obiettivi critici dell'Obiettivo di Sviluppo Sostenibile 2 stabilito dalla FAO, in particolare per quanto riguarda l'accesso al cibo, i redditi dei piccoli proprietari e un'agricoltura sostenibile e resiliente [19,20]. Tuttavia, l'indisponibilità di un numero adeguato di sementi di alta qualità e la mancanza di stimoli di crescita sostenibili sono i principali vincoli nella coltivazione dei legumi, che spesso non è sufficiente per ottenere una produzione sostenibile, specialmente nei paesi in via di sviluppo [21,22].

Sebbene il WD possa essere un'alternativa promettente per aumentare in modo sostenibile la produzione agricola, il suo effetto su diverse piante di leguminose non è mai stato studiato. Alla luce dei benefici ecologici ed economici dei legumi, questo studio si propone di indagare se il WD abbia effetti positivi sui parametri di resa e sul contenuto nutrizionale di fagioli (*Phaseolus vulgaris* L.), ceci (*C. arietinum* L.) e lenticchie (*Lens culinaris* L.), tre delle leguminose più importanti per il consumo umano a livello mondiale [23,24]. Il presente lavoro amplia le conoscenze scientifiche sui possibili effetti fitostimolatori del WD e sul suo potenziale ruolo nel miglioramento sostenibile della produzione di leguminose.

2. Materiali e Metodi

2.1. Materiale Vegetale, Condizioni di Crescita e Parametri di Resa

I semi di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.), cece (*C. arietinum* L.) e lenticchia (*Lens culinaris* L.) sono stati gentilmente forniti da Del Colle Srl. Castagno (*Castanea sativa* Mill.). Il distillato di legno di Castagno (*Castanea sativa* Mill.) (WD, BioDea®, Arezzo, Italia) è stato scelto per i suoi effetti benefici precedentemente riportati sulle piante di ceci [15]. Il WD fornito dal produttore aveva le seguenti caratteristiche: pH 3.5–4.5; acido acetico 2–2.3% (v/v); densità 1.05 kg L⁻¹; contenuto di polifenolo nel range 22–25 g L⁻¹. La concentrazione dell'elemento in puro WD è stata determinata come descritto nella Sezione 2.3. ed era la seguente: Fe 3.2 0.05 mg L⁻¹, Na 4.9 0.4 mg L⁻¹, K 32.9 0.6 mg L⁻¹, Ca 944.2 5.3 mg L⁻¹, Zn 3.6 0.1 mg L⁻¹, e Mg 6.0 1.0 mg L⁻¹. Pertanto, sulle foglie sono stati spruzzati approssimativamente i seguenti contenuti di elementi nutritivi (mg): Fe 0,0006, Na < 0,001, K 0,006, Ca 0,018, Zn 0,0007 e Mg 0,0003; oppure sono stati utilizzati per la fertirrigazione (mg): Fe 0,001, Na > 0,001, K 0,009, Ca 0,02, Zn 0,001 e Mg 0,0004. I semi di ciascuna specie di leguminose sono stati seminati in appezzamenti separati in un campo coltivato della Del Colle Srl. con sede a Bientina (Pisa, Toscana, Italia). Le piante sono state coltivate in un terreno caratterizzato da 26% di argilla, 37% di sabbia, 3,3% di materia organica, 17 cmol Kg⁻¹ di capacità di scambio cationico e un pH di 7,9. Non sono stati aggiunti fertilizzanti minerali. Ciascun appezzamento (2,5 m 4 m) era composto da sei file a distanza di 50 cm, e sono stati seminati venti semi per fila a distanza di 20 cm (120 piante per ogni specie di leguminosa; densità di semina: 12 semi/m²).

Sono stati applicati circa 100 mL di WD sia per trattamenti fogliari che per fertirrigazione, diluendo preventivamente il WD in acqua di rubinetto allo 0,2% (v/v) per i trattamenti fogliari e allo 0,3% (v/v) per i trattamenti di fertirrigazione, secondo le istruzioni del produttore. Le piante delle prime tre file sono state irrorate settimanalmente con le foglie e fertirrigazione ogni due settimane con WD. Le altre tre file sono state trattate allo stesso modo ma utilizzando solo acqua di rubinetto (controllo). Le piante sono state coltivate per quattro mesi (aprile-luglio 2022), fino a quando non si sono asciugate. Sia le piante intere che i germogli sono stati pesati individualmente e sono stati registrati il numero, il peso medio e il peso totale dei baccelli e dei semi.

2.2. Quantificazione delle proteine

Per la quantificazione delle proteine, dieci semi di ciascuna pianta sono stati selezionati casualmente e raggruppati. Per estrarre e quantificare le proteine, i semi secchi sono stati frantumati con mortaio e pestello e poi macinati con un Ultra Turrax (T 25 Stirrer ULTRA-TURRAX®, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania) a 220 V e 170 W per 20 s, con 5 cicli. Quindi, 0,1 g della polvere fine ottenuta sono stati pesati e aggiunti a 1 mL di una soluzione di estrazione glaciale 10% TCA/acetone, secondo [25]. Le proteine sono state lasciate precipitare per una notte a 20°C e poi i campioni sono stati centrifugati a 13.200 g per 15 minuti a 4°C. Il pellet è stato lavato due volte con acetone freddo e centrifugato nuovamente, quindi il supernatante è stato scartato e il pellet è stato essiccato per rimuovere l'acetone residuo. Le proteine estratte dai campioni sono state risospese in PBS (tampono fosfato salino, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM, Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) e infine sono stati quantificati utilizzando il saggio di Bradford [26]. I risultati sono stati riportati come mg di proteine in 100 mg di semi.

2.3. Determinazione Minerale nei Semi e nel WD

Per la quantificazione degli elementi, dieci semi di ciascuna pianta sono stati selezionati casualmente e raggruppati. I semi sono stati accuratamente lavati con acqua demineralizzata, essiccati a 70°C per due giorni, macinati con mortaio e pestello, e poi nuovamente essiccati. Circa 0,1 g di polvere di semi sono stati mineralizzati con 10 ml di HNO₃ al 69% in un sistema di digestione a microonde (Mars 6, CEM Matthews, NC, USA) con una temperatura massima di 200 °C per 10 minuti [27]. Nel caso di WD, 20 mL di WD puro sono stati mineralizzati con 1,5 mL di HNO₃ al 69% e 1 mL di HCl al 37%, secondo [28]. I campioni sono stati diluiti con un rapporto di diluizione 1/20 con 0,5% LaCl₃ in 1% HNO₃. La concentrazione di micro e macro elementi (K, Ca, Mg, Fe, Zn e Na) è stata misurata mediante spettroscopia di assorbimento atomico (PinAAcle 500, Perkin Elmer) ed espressa in peso secco nel caso dei semi, e in mg/L nel caso di WD. Per verificare l'affidabilità e l'accuratezza del metodo, sono stati utilizzati materiali di riferimento certificati (grado BCR, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich). I recuperi erano entro il 10% e la precisione era >95%.

2.4. Analisi Statistica

I dati si avvicinavano a una distribuzione normale (test di Shapiro-Wilk, $p < 0,05$), e quindi è stato utilizzato un test t di Student per campioni indipendenti per verificare differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le piante trattate con acqua (controllo) e quelli trattati con WD.

3. Risultati

3.1. Parametri di Resa

L'applicazione di WD ha influenzato positivamente tutti i parametri di resa studiati in *L. culinaris*. Sia la biomassa vegetale totale che quella fuori terra in questa specie sono aumentate in modo significativo (3,5 g nelle piante trattate con WD contro 2,15 g nelle piante di controllo) (Figura 1a,b). Inoltre, *L. culinaris* trattato con WD ha mostrato un numero maggiore di entrambi i baccelli (37,4 nel trattamento con WD contro 23,5 nel controllo) e semi (50,6 nel trattamento con WD contro 29,6 nel controllo) per pianta (Figura 1c, f), nonché un aumento del peso totale e medio di entrambi i baccelli (2,4 g nelle piante trattate con WD vs. 0,9 g nel controllo) e del peso medio dei baccelli (0,05 g nelle piante trattate con WD rispetto a 0,03 g nelle piante di controllo) (Figura 1d,e). Inoltre, un aumento del peso totale dei semi (2,11 g in WD-treated vs 0,9 g nel

controllo) del peso medio dei semi (0,04 g nel trattamento con WD rispetto a 0,03 g nel controllo) (Figura 1g, h) per pianta è stato registrato anche in *L. culinaris*. Per quanto riguarda le altre due specie, solo *P. vulgaris* ha mostrato un aumento significativo del numero di baccelli (3,6 nei trattati con WD vs. 2,5 nel controllo)

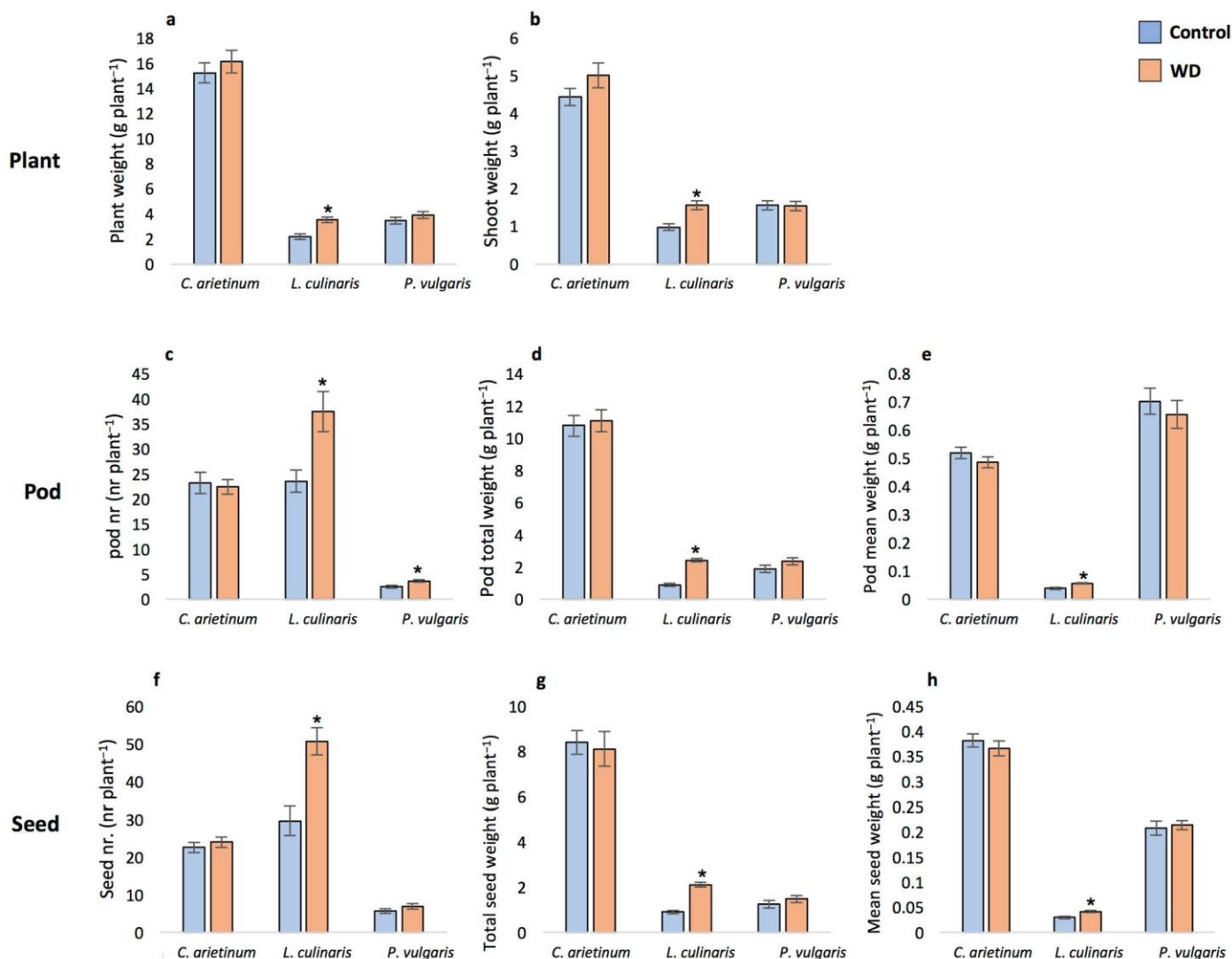


Figura 1. Parametri di resa (media \pm errore standard) di piante di *C. arietinum*, *L. culinaris* e *P. vulgaris* trattate con acqua (controllo) o con distillato di legno allo 0,2% (WD). a) peso fresco della pianta; (b) sparare peso fresco; (c) numero di baccello; (d) peso totale del baccello; (e) peso medio del baccello; (f) numero di seme; (g) peso totale dei semi; (h) peso medio del seme. * = Differenza significativa tra piante di controllo e piante trattate con WD.

3.2. Proteine Totali e Composizione Minerale

I semi di lenticchie delle piante trattate con WD hanno mostrato una concentrazione significativamente più elevata di proteine totali (17% nel trattamento con WD rispetto al 15% nel controllo), mentre non sono stati riscontrati cambiamenti significativi in *C. arietinum* e *P. vulgaris* (Figura 2a).

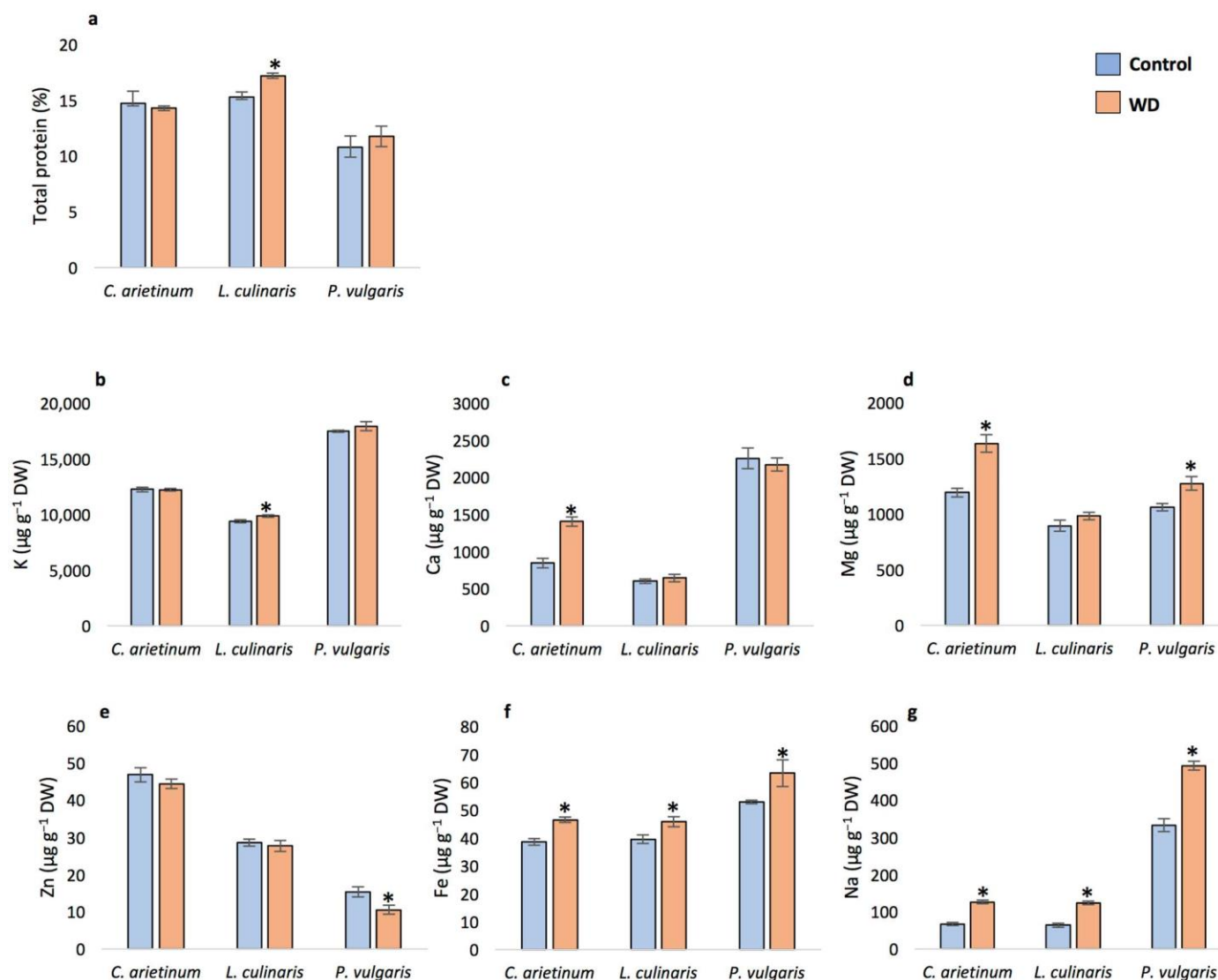


Figura 2. Contenuto totale di proteine e minerali (media \pm errore standard) in *C. arietinum*, *L. culinaris* e *P. vulgaris* trattati con acqua (controllo) o con distillato di legno allo 0,2% (WD). (a) concentrazione proteica totale; (b – g) concentrazione minerale di (b) K, (c) Ca, (d) Mg, (e) Zn, (f) Fe e (g) Na.

* = differenza significativa tra piante di controllo e piante trattate con WD.

Per quanto riguarda la concentrazione degli elementi studiati (Figura 2b-g), il trattamento con WD ha costantemente aumentato i livelli di Fe nei semi di tutte le specie (46,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in trattati con WD vs. 38,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW in controllo per *C. arietinum*, 45,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel trattamento con WD vs. 39,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo per *L. culinaris*; 63,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel trattamento con WD vs.

52,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel controllo per *P. vulgaris*). Anche la quantità di Na è aumentata nelle tre specie (126,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel trattamento con WD contro 67,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel controllo per *C. arietinum*; 124,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel trattamento con WD rispetto a 64 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo per *L. culinaris*; 493 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel trattamento con WD rispetto a 333,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW nel controllo per *P. vulgaris*). Inoltre, WD ha aumentato significativamente la concentrazione nei semi di *C. arietinum* (1634 $\mu\text{g g}^{-1}$ nei trattati con WD rispetto a 1192 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo per Mg e 1405,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ nei trattati con WD rispetto a 845,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo per Ca). Un aumento dei livelli di Mg è stato osservato anche in *P. vulgaris* (1276,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel trattamento con WD vs. 1071,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo). Infine, i livelli di K sono aumentati in modo significativo solo in *L. culinaris* (9866 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel gruppo trattato con WD vs. 9399,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo), mentre la concentrazione di Zn è stata ridotta in *P. vulgaris* trattato con WD (10,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel trattamento con WD rispetto a 15,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ nel controllo).

4. Discussione

Pochi studi si sono concentrati sugli effetti dell'applicazione di WD sulle colture di leguminose coltivate in condizioni di campo [29]. Al contrario, gli esperimenti sul campo che coinvolgono effetti di WD sul campo sono stati eseguiti con altre specie vegetali. Ad esempio, le piante di riso spruzzate con WD diluito 1/100 sia sulle loro foglie che sul terreno hanno dimostrato un aumento dell'altezza della pianta e della produzione del coltivatore [30]. Inoltre, le piante di lattuga, cavolo e cetriolo che sono state irrorate con WD diluito 500 volte hanno accumulato più vitamina C e hanno dimostrato una produttività migliorata [31]. Più recentemente il rif. [32] hanno mostrato che le piante di colza spruzzate fogliare con WD diluito 1/400 volte mostravano un aumento significativo della resa dei semi, dell'indice dell'area fogliare e del numero di baccelli. Per quanto ne sappiamo, questa è la seconda serie di prove riportate per *C. arietinum* e la prima serie di prove riportate per entrambi *L. culinaris* e *P. vulgaris* per quanto riguarda gli effetti positivi della WD sulla crescita e la resa delle piante.

Gli effetti di promozione della resa della WD sono stati osservati principalmente in *L. culinaris*: oltre ad aumentare la biomassa totale di piante e germogli, il trattamento con WD ha quasi raddoppiato il numero di semi per pianta e più che raddoppiato il loro peso medio. Per quanto riguarda *P. vulgaris*, il numero di baccelli è aumentato significativamente nelle piante trattate con WD, ed è stata osservata una tendenza simile sia per il numero che per il peso dei semi, sebbene questa tendenza non fosse statisticamente significativa. L'aumento osservato della resa delle piante mediato da WD è coerente con i precedenti rapporti incentrati sul tabacco [33], nonché sulle colture orticole [9,10,34] e cereali [14]. Al contrario, tutti i parametri di resa di *C. arietinum* erano simili al controllo, coerentemente con [15], sebbene questi autori abbiano osservato un aumento significativo del peso dei semi trattati con WD. Ciò potrebbe essere dovuto alla minore concentrazione di WD utilizzata in questo studio (0,2% vs. 0,25%), nonché alla minore frequenza di applicazione (ogni due settimane rispetto a ogni settimana). I diversi effetti sulla resa riscontrati tra questi tre legumi indicano che gli effetti della WD sono probabilmente specifici della specie e che le concentrazioni testate sono ottimali per migliorare la produttività di *L. culinaris*. A questo proposito, in studi futuri potrebbero essere testate concentrazioni di WD più elevate per *P. vulgaris* e *C. arietinum*. Inoltre, la valutazione dei cambiamenti sia fisiologici che biochimici (ad esempio, contenuto di clorofilla, contenuto di prolina o cambiamenti nel metabolismo ossidativo della pianta) potrebbe aiutare a determinare eventuali risposte legate allo stress alla WD in queste due colture.

Analogamente ai parametri di resa, il trattamento con WD ha aumentato la concentrazione di proteine solubili totali solo nei semi di *L. culinaris*. Una maggiore quantità di proteine dopo l'applicazione di WD è stata osservata anche nelle piante di colza [33]. I risultati attuali sono particolarmente rilevanti dal punto di vista nutrizionale, in quanto le leguminose sono una parte centrale della dieta umana e potrebbero compensare in modo significativo la prevista carenza di proteine animali [18]. Tuttavia, resta da indagare ulteriormente perché anche *C. arietinum* e *P. vulgaris* non hanno risposto. Anche in questo caso, i risultati attuali sono in contrasto con quelli di [15], che ha riscontrato un aumento del contenuto proteico dopo il trattamento fogliare con WD, ma senza alcuna fertirrigazione.

L'applicazione di WD ha anche migliorato la concentrazione di elementi ad alto valore nutritivo, tra cui Fe, Mg, Ca e K. Le carenze di questi nutrienti sono molto diffuse tra le popolazioni e potrebbero essere alleviate attraverso approcci di fortificazione alimentare. In questo contesto, la produzione di semi con un contenuto di Fe più elevato potrebbe contribuire in modo decisivo a ridurre il numero di soggetti affetti da carenza di ferro, che è il micronutriente trattato con maggiore preoccupazione a livello mondiale per quanto riguarda l'alimentazione umana [34,35]. Allo stesso modo, semi di lenticchie migliorati con più K o semi di ceci con più Mg e Ca potrebbero contribuire a ridurre le carenze nutrizionali legate a diabete, ipokaliemia o osteoporosi [36,37]. I semi di *P. vulgaris* trattati con WD hanno mostrato una diminuzione della concentrazione di Zn, mentre questo elemento non è stato influenzato in *C. arietinum* o in *L. culinaris*. Sebbene la concentrazione di Zn in *P. vulgaris* fosse leggermente inferiore rispetto agli intervalli precedentemente riportati (10 µg g⁻¹ vs. 13–33,3 µg g⁻¹ [38,39]), le cause di questa diminuzione nella risposta alla WD rimangono da chiarire ulteriormente indagato. Vale la pena notare che è stato osservato un aumento dei livelli di Na nei semi di piante trattate con WD. La concentrazione di questo elemento sia nelle piante di controllo che in quelle trattate con WD era inferiore ai valori riportati in letteratura nel caso dei semi di cece (67–127 µg g⁻¹ vs. 188–285 µg g⁻¹ DW [40–42]) e lenticchie (64–124 µg g⁻¹ vs. 300–790 µg g⁻¹ DW [43,44]), sebbene fosse superiore a quanto riportato per

P. vulgaris (333–492 $\mu\text{g g}^{-1}$ contro 30–180 $\mu\text{g g}^{-1}$; [38,45]). Tuttavia, la concentrazione di Na nel WD diluito impiegata in questo studio ($\sim 15 \mu\text{g L}^{-1}$) era molto al di sotto del limite di "nessun rischio" di 0,5 g L^{-1} fissato dalla FAO per quanto riguarda le concentrazioni di sale nell'acqua di irrigazione [46]. Per quanto ne sappiamo, rimane sconosciuto come l'applicazione di WD aumenti la concentrazione di elementi come Fe, Mg, Ca o Na nel seme. Una maggiore espressione di geni sensibili all'auxina nelle piante di pomodoro trattate con WD è stata recentemente osservata da [47]. In relazione a ciò, WD potrebbe contenere sostanze simili all'auxina che inducono pompe ATPasi nei tessuti radicali, favorendo così l'ingresso di cationi, come precedentemente mostrato nelle sostanze umiche [48]. Tuttavia, non esiste una base sperimentale che abbia ancora dimostrato questa ipotesi. Pertanto, mentre i risultati iniziali sono incoraggianti, sono necessari ulteriori studi per approfondire i processi influenzati dalla WD che generano tali differenze nella composizione minerale tra le specie testate, come il loro assorbimento nelle radici o la loro allocazione nel seme. Parallelamente, gli studi futuri dovrebbero concentrarsi anche sugli effetti del WD sul microbiota associato alle piante, poiché i microrganismi contribuiscono in modo critico al mantenimento della crescita e della salute delle piante nei sistemi agricoli.

5. Conclusioni

Il presente studio ha mostrato l'effetto positivo del trattamento con WD sulla resa e sulla composizione nutrizionale di tre specie di leguminose. Le piante di lenticchie hanno mostrato un aumento della resa sia in termini di peso/numero di baccelli che di semi, nonché una migliore concentrazione di proteine totali solubili. Inoltre, il trattamento con WD ha migliorato in modo differenziato il contenuto di elementi minerali di alto valore nutrizionale nei semi, come Fe, K, Ca e Mg. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che WD è un candidato ottimale per aumentare in modo sostenibile le fonti di proteine e micronutrienti nella dieta umana generando semi di leguminose ad alto rendimento con una migliore qualità nutrizionale. Dato l'impatto diffuso delle carenze nutrizionali sulla salute generale, dovrebbe essere presa in considerazione la correzione di queste carenze attraverso approcci di fortificazione alimentare basati su WD. Infine, e in linea con la strategia Farm to Fork dell'Unione Europea, questo studio suggerisce che il WD ha un enorme potenziale come nuova alternativa "verde" nella sostituzione dei fertilizzanti chimici.

Author Contributions: Conceptualization: E.B., I.C., A.C., C.G. and S.L.; Methodology: E.B., P.C., I.C., C.G. and S.L.; Formal analysis and investigation: E.B., P.C., C.C., A.C., M.D. and L.P.; Writing—original draft preparation: P.C.; Writing—review and editing: E.B., P.C., I.C., C.C., A.C., M.D., C.G., S.L. and L.P.; Funding acquisition: S.L.; Resources: I.C., C.G. and L.P.; Supervision: I.C. and S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the University of Florence (Fondi di Ateneo 2021) and by the University of Siena (project CLASS "Ceci, distillato di legno, biochar e intelligenza artificiale per un sistema agrifood smart e sostenibile" funded by Regione Toscana and Esperia Srl.).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors want to thank the University of Florence (Fondi di Ateneo 2021) and the University of Siena (Project CLASS "Ceci, distillato di legno, biochar e intelligenza artificiale per un sistema agrifood smart e sostenibile" funded by Regione Toscana and Esperia Srl.) for the funding. The authors are also grateful to Del Colle Srl. enterprise for having kindly provided the legume seeds and the crop fields used for the experiment, as well as to Francesco Barbagli (BioDea and BioEsperia Srl.) for kindly providing the wood distillate. The authors are also grateful to Matteo De Filippis and Prandvera Guri for their contribution in the experimental work. The publication was made with the contribution of the researcher M.D., with a research contract co-funded by the European Union—PON Research and Innovation 2014–2020 in accordance with Article 24, paragraph 3a), of Law No. 240 of 30 December 2010, as amended, and Ministerial Decree No. 1062 of 10 August 2021.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2020: Transforming Food Systems for Affordable Healthy Diets*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2020; Volume 2020.
2. FAO Statistical Yearbook 2022. 2022. Available online: <http://www.fao.org> (accessed on 15 January 2023).
3. Grewal, A.; Abbey, L.; Gunupuru, L.R. Production, prospects and potential application of pyroligneous acid in agriculture. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2018**, *135*, 152–159. [[CrossRef](#)]
4. Italian Ministerial Decree 6793. 18 July 2018. Available online: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2018/09/05/18A05693/sg> (accessed on 20 June 2022).
5. Mathew, S.; Zakaria, Z.A. Pyroligneous acid—The smoky acidic liquid from plant biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Terzopoulou, P.; Kamperidou, V. Chemical characterization of Wood and Bark biomass of the invasive species of Tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle), focusing on its chemical composition horizontal variability assessment. *Wood Mater. Sci. Eng.* **2022**, *17*, 469–477. [[CrossRef](#)]
7. Agoncillo, E.S.; Alcate, V.; Philippines, O.M. Vegetable Seed Germination Enhancement Using Different Levels of Pyroligneous Acid (PA). *Glob. J. Biol. Agric.* **2018**, *2*, 14–18.
8. Vannini, A.; Moratelli, F.; Monaci, F.; Loppi, S. Effects of wood distillate and soy lecithin on the photosynthetic performance and growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *SN Appl. Sci.* **2021**, *3*, 113. [[CrossRef](#)]
9. Vannini, A.; Fedeli, R.; Guarnieri, M.; Loppi, S. Foliar application of wood distillate alleviates ozone-induced damage in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Toxics* **2022**, *10*, 178. [[CrossRef](#)]
10. Fedeli, R.; Vannini, A.; Guarnieri, M.; Monaci, F.; Loppi, S. Bio-based solutions for agriculture: Foliar application of wood distillate alone and in combination with other plant-derived corroborants results in different effects on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Biology* **2022**, *11*, 404. [[CrossRef](#)]
11. Becagli, M.; Santin, M.; Cardelli, R. Co-application of wood distillate and biochar improves soil quality and plant growth in basil (*Ocimum basilicum*). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2022**, *185*, 120–131. [[CrossRef](#)]
12. Ofoe, R.; Qin, D.; Gunupuru, L.R.; Thomas, R.H.; Abbey, L. Effect of pyroligneous acid on the productivity and nutritional quality of greenhouse tomato. *Plants* **2022**, *11*, 1650. [[CrossRef](#)]
13. Zulkarami, B.; Ashrafuzzaman, M.; Husni, M.O.; Ismail, M.R. Effect of pyroligneous acid on growth, yield and quality improvement of rockmelon in soilless culture. *Aust. J. Crop Sci.* **2011**, *5*, 1508–1514.
14. Simma, B.; Polthanee, A.; Goggi, A.S.; Siri, B.; Promkhambut, A.; Caragea, P.C. Wood vinegar seed priming improves yield and suppresses weeds in dryland direct-seeding rice under rainfed production. *Agron. Sustain. Dev.* **2017**, *37*, 1–9. [[CrossRef](#)]
15. Fedeli, R.; Vannini, A.; Celletti, S.; Maresca, V.; Munzi, S.; Cruz, C.; Alexandrov, D.; Guarnieri, M.; Loppi, S. Foliar application of wood distillate boosts plant yield and nutritional parameters of chickpea. *Ann. Appl. Biol.* **2023**, *182*, 57–64. [[CrossRef](#)]
16. Del Borghi, A.; Strazza, C.; Magrassi, F.; Taramasso, A.C.; Gallo, M. Life Cycle Assessment for eco-design of product–package systems in the food industry—The case of legumes. *Sustain. Prod. Consum.* **2018**, *13*, 24–36. [[CrossRef](#)]
17. Venter, C.S.; Van, E.E. More legumes for better overall health. *S. Afr. J. Clin. Nutr.* **2001**, *172*, 280.
18. Śmiglak-Krajewska, M.; Wojciechowska-Solis, J. Consumption preferences of pulses in the diet of polish people: Motives and barriers to replace animal protein with vegetable protein. *Nutrients* **2021**, *13*, 454. [[CrossRef](#)]
19. Considine, M.J.; Siddique, K.H.; Foyer, C.H. Nature’s pulse power: Legumes, food security and climate change. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 1815–1818. [[CrossRef](#)]
20. Calles, T. The international year of pulses: What are they and why are they important. *Agric. Dev.* **2016**, *26*, 40–42.
21. Suter, M.; Connolly, J.; Finn, J.A.; Loges, R.; Kirwan, L.; Sebastià, M.T.; Lüscher, A. Nitrogen yield advantage from grass–legume mixtures is robust over a wide range of legume proportions and environmental conditions. *Glob. Chang. Biol.* **2015**, *21*, 2424–2438. [[CrossRef](#)]
22. Van Loon, M.P.; Deng, N.; Grassini, P.; Edreira, J.I.R.; Wolde-Meskel, E.; Baijuyka, F.; Marou, H.; van Ittersum, M.K. Prospect for increasing grain legume crop production in East Africa. *Eur. J. Agron.* **2018**, *101*, 140–148. [[CrossRef](#)]
23. Sidhu, J.S.; Zafar, T.; Benyathiar, P.; Nasir, M. Production, processing, and nutritional profile of chickpeas and lentils. In *Dry Beans and Pulses: Production, Processing, and Nutrition*; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2022; pp. 383–407. [[CrossRef](#)]
24. Shrestha, S.; van’t Hag, L.; Haritos, V.S.; Dhital, S. Lentil and Mungbean protein isolates: Processing, functional properties, and potential food applications. *Food Hydrocoll.* **2022**, *135*, 108142. [[CrossRef](#)]
25. Branlard, G.; Bancel, E. Protein extraction from cereal seeds. In *Plant Proteomics: Methods and Protocols*; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2007; pp. 15–25. [[CrossRef](#)]
26. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bettarini, I.; Colzi, I.; Coppi, A.; Falsini, S.; Echevarria, G.; Pazzagli, L.; Selvi, F.; Gonnelli, C. Unravelling soil and plant metal relationships in Albanian nickel hyperaccumulators in the genus *Odontarrhena* (syn. *Alyssum* sect. *Odontarrhena*, Brassicaceae). *Plant Soil* **2019**, *440*, 135–149. [[CrossRef](#)]
28. Bianchi, E.; Coppi, A.; Nucci, S.; Antal, A.; Berardi, C.; Coppini, E.; Fibbi, D.; Del Bubba, M.; Gonnelli, C.; Colzi, I. Closing the loop in a constructed wetland for the improvement of metal removal: The use of *Phragmites australis* biomass harvested from the system as biosorbent. *ESPR* **2021**, *28*, 11444–11453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Pangnakorn, U.; Watanasorn, S.; Kuntha, C.; Chuenchooklin, S. Application of wood vinegar to fermented liquid bio-fertilizer for organic agriculture on soybean. *Asian J. Food Agro-Ind.* **2009**, *2*, S189–S196.
30. Rogelio, R.M. Alternative growth enhancers for rice production: Usefulness of wood vinegar (PA) in irrigated rice (PSB rc18). *J. Biol. Agric. Healthc.* **2018**, *8*, 82–98.
31. Mu, J.; Yu, Z.M.; Wu, W.Q.; Wu, Q.L. Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. *For. Ecosyst.* **2006**, *8*, 43–47. [[CrossRef](#)]
32. Zhu, K.; Gu, S.; Liu, J.; Luo, T.; Khan, Z.; Zhang, K.; Hu, L. Wood vinegar as a complex growth regulator promotes the growth, yield, and quality of rapeseed. *Agronomy* **2021**, *11*, 510. [[CrossRef](#)]
33. Mao, K.; Li, S.; Li, B.; Wu, W.; Wei, C.; Yuan, S.; Niu, Y.; Du, H.; Zhang, L. Effect of wood vinegar on growth, yield and quality of upper leaves of flue-cured tobacco of Nanzheng. *Southwest China J. Agric. Sci.* **2019**, *32*, 645–652.
34. Mungkunkamchao, T.; Kesmla, T.; Pimratch, S.; Toomsan, B.; Jothityangkoon, D. Wood vinegar and fermented bioextracts: Natural products to enhance growth and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci. Hort.* **2013**, *154*, 66–72. [[CrossRef](#)]
35. Guzmán-Maldonado, S.H.; Acosta-Gallegos, J.; Paredes-López, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1874–1881. [[CrossRef](#)]
36. Venn, B.J.; Mann, J.I. Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58*, 1443–1461. [[CrossRef](#)]
37. Rebello, C.J.; Greenway, F.L.; Finley, J.W. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obes. Rev.* **2014**, *15*, 392–407. [[CrossRef](#)]
38. Petropoulos, S.A.; Fernandes, Â.; Plexida, S.; Chrysargyris, A.; Tzortzakis, N.; Barreira, J.C.; Barros, L.; Ferreira, I.C. Biostimulants application alleviates water stress effects on yield and chemical composition of greenhouse green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomy* **2020**, *10*, 181. [[CrossRef](#)]
39. Gelin, J.R.; Forster, S.; Grafton, K.F.; McClean, P.E.; Rojas-Cifuentes, G.A. Analysis of seed zinc and other minerals in a recombinant inbred population of navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci.* **2007**, *47*, 1361–1366. [[CrossRef](#)]
40. Ray, H.; Bett, K.; Tar'an, B.; Vandenberg, A.; Thavarajah, D.; Warkentin, T. Mineral micronutrient content of cultivars of field pea, chickpea, common bean, and lentil grown in Saskatchewan, Canada. *Crop Sci.* **2014**, *54*, 1698–1708. [[CrossRef](#)]
41. Ereifej, K.I.; Al-Karaki, G.N.; Hammouri, M.K. Seed chemical composition of improved chickpea cultivars grown under semiarid Mediterranean conditions. *Int. J. Food Prop.* **2001**, *4*, 239–246. [[CrossRef](#)]
42. Daur, I.; Khan, I.A.; Jahangir, M. Nutritional quality of roasted and pressure-cooked chickpea compared to raw (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Sarhad J. Agric.* **2008**, *24*, 117.
43. Zia-Ul-Haq, M.; Ahmad, S.; Shad, M.A.; Iqbal, S.; Qayum, M.; Ahmad, A.; Luthria, D.L.; Amarowicz, R. Compositional studies of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars commonly grown in Pakistan. *Pak. J. Bot.* **2011**, *43*, 1563–1567.
44. Sahi, S.T.; Ghazanfar, M.U.; Afzal, M.; Wakil, W.; Habib, A. Influence of inoculation with *Ascochyta lentis* on mineral contents (Na, Ca, Mg, Zn, Cu and Fe) of susceptible and resistant lines of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Pak. J. Bot.* **2010**, *42*, 375–382.
45. Paredes, M.; Becerra, V.; Tay, J. Inorganic nutritional composition of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes race Chile. *Chil. J. Agric. Res.* **2009**, *69*, 486–495. [[CrossRef](#)]
46. Brouwer, C.; Goffeau, A.; Heibloem, M. Chapter 7: Salty soils. In *Irrigation Water Management: Training Manual No. 1-Introduction to Irrigation*; FAO—Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 1985.
47. Ofoe, R.; Gunupuru, L.R.; Wang-Pruski, G.; Fofana, B.; Thomas, R.H.; Abbey, L. Seed priming with pyroligneous acid mitigates aluminum stress, and promotes tomato seed germination and seedling growth. *Plant Stress* **2022**, *4*, 100083. [[CrossRef](#)]
48. Canellas, L.P.; Teixeira Junior, L.R.L.; Dobbss, L.B.; Silva, C.A.; Medici, L.O.; Zandonadi, D.B.; Façanha, A.R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.* **2008**, *153*, 157–166. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.