



Università degli Studi di Siena

Dipartimento di Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente

Corso di Laurea in Scienze Ambientali e Naturali

EFFETTI ECOFISIOLOGICI DI UN PRODOTTO BIO-BASED DI
APPLICAZIONE AGRICOLA SU UNA SPECIE ORTICOLA (*LACTUCA SATIVA* L.)

Relatore: Chiar.mo Prof. Stefano Loppi

Tesi di Laurea di Filippo Moratelli

Correlatore: Dr. Andrea Vannini

Anno accademico 2019/2020

INDICE

1. RIASSUNTO.....	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUZIONE	
2.1 <i>Il distillato di legno: generalità</i>	6
2.2 <i>Composizione chimica del distillato di legno</i>	6
2.3 <i>Il distillato di legno in agricoltura</i>	7
2.4 <i>La lecitina di soia</i>	7
4. SCOPO DELLA RICERCA.....	9
5. MATERIALI E METODI	
5.1 <i>Preparazione delle piante di canasta</i>	10
5.2 <i>Trattamento</i>	10
5.3 <i>Parametri fisiologici</i>	11
5.4 <i>Analisi statistica dei dati</i>	12
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	14
7. CONCLUSIONI.....	19
8. RINGRAZIAMENTI	20
9. BIBLIOGRAFIA	21

1. RIASSUNTO

Il distillato di legno è un liquido organico dal caratteristico odore acre, ottenuto dalla distillazione di determinati gas prodotti durante la pirolisi della biomassa per la produzione di energia. Grazie all'elevata quantità di composti organici che lo costituiscono (soprattutto polifenoli), questo prodotto sta trovando ampio impiego in agricoltura. Infatti, il distillato sembra apportare visibili migliorie alle coltivazioni, incrementandone la crescita, le attività funzionali, le difese naturali proteggendole da patogeni fungini e batterici. La lecitina di soia è un prodotto ottenuto dall'olio dei semi di soia che presenta particolari caratteristiche chimico-fisiche che la rendono un ottimo emulsionante e tensioattivo. Il suo utilizzo in agricoltura, per quanto poco documentato, sembra migliorare l'assorbimento dei composti a cui viene aggiunta in soluzione.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la potenzialità del distillato di legno, sia singolarmente che in mix con la lecitina di soia, nel migliorare le performance fotosintetiche della lattuga canasta (*Lactuca sativa* L.), utilizzando come indicatori fisiologici il contenuto di clorofilla, l'emissione di fluorescenza clorofilliana (efficienza fotosintetica, F_V/F_M , e l'indice di performance, P. Index) e la riflettanza fogliare (Normalized Difference Vegetation Index, NDVI). A tale scopo 4 fitocelle, ciascuno contenente 6 piantine di lattuga canasta, sono state trattate individualmente con soluzioni di acqua di minerale (controllo), distillato di legno, lecitina di soia al 3%, e un mix di distillato e lecitina di soia al 3%. Le analisi dei parametri fisiologici, condotte immediatamente prima dei trattamenti e dopo 3, 5 e 7 giorni dai trattamenti, hanno mostrato un effetto positivo del distillato di legno sul contenuto di clorofilla, sia utilizzato singolarmente che in combinazione con la lecitina di soia.

2. ABSTRACT

Ecophysiological Effects of a Bio-Based Product of Agricultural Application on a Horticultural Species (*Lactuca sativa* L.)

Pyroligneous acid (PA) is an organic liquid with a characteristic sharp smell, obtained by the distillation of gases produced during the pyrolysis of plant biomass for energy production. Owing to the high number of organic compounds (especially polyphenols), this product is being increasingly used in agriculture. There is empiric evidence that PA makes remarkable improvements to crops, increasing their growth, functional activities and natural defenses, protecting them from fungal and bacterial pathogens. Soy lecithin is a product obtained from soybean oil, and has particular chemical-physical characteristics making it an excellent emulsifier and surfactant. Its use in agriculture, albeit poorly documented, is reported to increase the uptake of other compounds to which it is added.

The aim of this thesis was to evaluate the potential of PA, both singularly and in combination with soy lecithin, in improving the photosynthetic performance of canasta lettuce (*Lactuca sativa* L.) using chlorophyll content, chlorophyll fluorescence emission (photosynthetic efficiency, F_v/F_m , and Performance Index), and leaf reflectance (Normalized Difference Vegetation Index, NDVI) as physiological indicators. To this purpose, four batches of canasta lettuce, each consisting of 6 cell packs, were sprayed either with solutions of mineral water (control), PA, lecithin at 3%, or PA and 3% lecithin. The results of the physiological analysis, measured immediately before the treatments and after 3, 5 and 7 days from the treatments, showed a positive effect of PA, both alone and in combination with soy lecithin.

3. INTRODUZIONE

3.1. Il distillato di legno: generalità

Il distillato di legno (chiamato anche aceto di legno o acido pirolegnoso, con terminologia inglese *Pyroligneous Acid* e *Wood Vinegar*), un liquido organico dal caratteristico colore ambrato e odore acre di affumicato, è un sottoprodotto del processo di pirolisi della biomassa vegetale a scopo energetico.

Il processo di pirolisi, condotta in condizioni anaerobiche o comunque in ambiente con concentrazione di ossigeno notevolmente ridotta (Balat et al. 2009), porta alla formazione di numerosi sottoprodotti, ricchi di sostanze organiche. Tra i numerosi gas che si liberano durante la pirolisi, alcuni non sono utilizzabili e vengono dispersi in atmosfera (CO_2 , CO , H_2O , CH_4 , H_2) mentre altri gas esausti possono essere raffreddati e condensati per ottenere liquidi organici, come il distillato e il catrame di legno. Il processo di condensazione avviene all'interno di specifiche fornaci o reattori pirolitici, che raccolgono separatamente i prodotti ottenuti dalla combustione della biomassa, permettendone il loro raffreddamento e successiva condensazione tramite filtri particolari che raffinano il prodotto (Sindhu & Zainul, 2014).

La quantità e la qualità del distillato prodotto può variare notevolmente a seconda della biomassa con cui viene generato e dalle temperature raggiunte durante la pirolisi. La tipologia della biomassa vegetale pirolizzata può avere effetti su varie caratteristiche chimico-fisiche del distillato, quali il pH, la viscosità, la densità e il contenuto di acidi organici, principalmente a causa delle differenze nelle proporzioni tra lignina, cellulosa ed emicellulosa (Mohan et al., 2006; Zhang et al., 2007), mentre la temperatura di combustione influenza specificatamente il tipo di composti gassosi che vengono liberati durante il processo (Stefanidis et al., 2014). Infatti, per la produzione di distillato sono più adatti i gas emessi durante le fasi intermedie del processo, ovvero durante la degradazione della lignina, a una temperatura di combustione compresa tra i 280°C e i 500°C . A temperature troppo basse viene infatti liberato anche il vapore acqueo presente all'interno della biomassa, mentre con le temperature più elevate, raggiunte verso la fine del processo, i gas emessi contengono un'elevata concentrazione di gas di catrame, prodotto che influenza negativamente la qualità del distillato quando mescolato ad esso.

3.2 Composizione chimica del distillato di legno

Il distillato di legno è una ricca miscela contenente diversi composti, sia organici che inorganici, avente come componente principale l'acido acetico, presente in concentrazioni così elevate da portare l'intero prodotto ad avere un valore di pH solitamente inferiore a 3. In

generale il distillato è un prodotto a base di acqua (80-90%), che conta più di 200 molecole che occupano circa il 10-20 % del prodotto e sono suddivise in acidi organici, alcani, fenoli, alcoli ed esteri (Wei et al. 2010). I fenoli sono responsabili dell'odore pungente di affumicato del prodotto e gli conferiscono pregio da un punto di vista qualitativo, in quanto proprio da queste molecole deriva il forte potere antiossidante e la nota attività antimicrobica del distillato di legno (Loo et al. 2008).

Fare delle generalizzazioni sulla composizione del distillato di legno è praticamente impossibile in quanto le modalità del processo produttivo e il tipo di biomassa utilizzata ne influenzano completamente la composizione chimica. Il Distillato di Legno BioDea utilizzato nella presente ricerca (si veda oltre) è ottenuto da un processo innovativo e brevettato di gassificazione effettuato nell'impianto del gruppo RM Energy Solutions. L'impianto è stato progettato con un accurato studio dei componenti e dei parametri di processo per effettuare una estrazione completa di tutti i fluidi linfatici presenti nella biomassa legnosa, proveniente esclusivamente da zone non antropizzate, per evitare la possibile presenza di contaminanti. Il distillato di legno viene estratto in depressione, in controcorrente di vapore, utilizzando esclusivamente l'acqua fisiologica contenuta nella linfa del legno, a gradienti diversi di temperatura, da 65°C fino alle temperature di ossidoriduzione, con temperatura massima di uscita dal reattore di 75°C. L'estratto legnoso è ulteriormente inviato a un filtro naturale per la rimozione di eventuali residui e viene lasciato decantare per un periodo di almeno tre mesi al fine di ottenere un distillato di legno dal colore ambrato e dalle caratteristiche costanti. Il distillato di legno così ottenuto risulta costituito da oltre 300 molecole organiche, ad alto contenuto di acido acetico, polifenoli, tannini, flavonoidi e da una componente di composti organici volatili (VOC) che rende unico e specifico il prodotto.

3.3 Il distillato di legno in agricoltura

Il grande successo dell'utilizzo del distillato in agricoltura risiede principalmente nella sua peculiare composizione chimica che gli permette di generare un elevato numero di effetti positivi per le coltivazioni, quali aumenti di produttività, incrementi di biomassa e miglioramenti qualitativi. Questo prodotto infatti è in grado di generare incrementi della crescita, grazie al potenziamento dello sviluppo cellulare e all'attivazione enzimatica, nonché protezione dagli agenti patogeni, grazie all'attività antimicrobica, dimostrata su un ampio spettro di ceppi batterici. Inoltre, il distillato, in dipendenza dalla diluizione, presenta sia una spiccata abilità fertilizzante, riuscendo ad aumentare di circa 3 volte il livello di acido fosforico utilizzabile dalle culture, sia pesticida, tanto da riuscire a controllare efficacemente (>90%) numerosi parassiti nocivi per le coltivazioni (Grewal et al. 2018). Tuttavia,

nonostante le numerose evidenze empiriche dell'effetto benefico del distillato sulle culture agrarie, pochissimo è noto a proposito dell'effetto di questo prodotto sul miglioramento delle performance fotosintetiche delle piante.

3.3 La lecitina di soia

Le lecitine sono una particolare classe di composti chimici di origine animale o vegetale formate principalmente da acidi grassi, glicolipidi, fosfolipidi, trigliceridi e altre sostanze (Jolly et al., 2018). Ciascuna molecola di lecitina, a prescindere dalla sua origine, possiede sia una parte idrofila che una lipofila, e per questo, quando aggiunta a miscele composte da acqua e lipidi, riesce a disporsi in maniera particolare tra i due strati che si vengono a formare. Per questo motivo le lecitine sono considerate ottime sostanze emulsionanti e solubilizzanti che permettono a soluzioni particolari di restare miscelate. Grazie a questa caratteristica, le lecitine trovano un vasto impiego in diversi campi, principalmente in quello alimentare dove permettono una maggiore amalgamazione degli ingredienti utilizzati senza alterare il sapore (Szuhaj, 1989).

La lecitina più utilizzata in assoluto è quella estratta dall'olio dei semi di Soia (*Glycine max* (L.) Merr.) soprattutto per il basso costo di produzione. Tra i vari utilizzi che la lecitina di soia può avere in agricoltura esiste quello come tensioattivo ed emulsionante: la particolare caratteristica della molecola della lecitina la fa collocare all'interfaccia tra le fasi acquosa e lipidica di una soluzione, portando quindi ad una maggiore miscibilità delle sostanze che la compongono e, quando usata come trattamento sulle piante, ne migliora di conseguenza l'assorbimento fogliare e la successiva assimilazione. L'aggiunta della lecitina alle soluzioni da nebulizzare sulle colture permette inoltre di rendere il trattamento meno volatile, evitandone o comunque rallentandone la vaporizzazione durante lo spargimento e, successivamente, anche l'evaporazione e la discesa dalle foglie verso il basso (Ghyczy et al., 1987).

4. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi ha avuto lo scopo di valutare eventuali miglioramenti nella performance fotosintetica di piante di lattuga canasta (*Lactuca sativa* L.), una specie orticola molto comune, a seguito di trattamenti con distillato di legno, sia singolarmente che in combinazione con lecitina di soia.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione delle piante di canasta

Quattro giorni prima dell'inizio dell'esperimento sono state acquistate quattro fitocelle in polistirolo espanso sinterizzato (EPS) ciascuna contenente sei giovani piante di lattuga (*Lactuca sativa* L.) della varietà commerciale canasta chiara, ciascuna avente un'altezza di circa 15 cm. Una volta in laboratorio le quattro fitocelle sono state poste ad acclimatare all'interno di una cella climatizzata con parametri ambientali controllati: temperatura di 20°C, umidità relativa (RH) del 60%, illuminazione di $80 \mu\text{M s}^{-1} \text{m}^{-2}$ fotoni PAR e fotoperiodo di 12 ore (Figura 1). Ogni giorno, e per tutta la durata dell'esperimento, ciascuna piantina è stata irrigata con 10 mL di acqua minerale. Inoltre, la posizione delle fitocelle è stata ruotata giornalmente, allo scopo di evitare possibili effetti microclimatici.



Figura 1. Piante di lattuga canasta durante il periodo di acclimatazione.

5.2 Trattamenti

Dopo il periodo di acclimatazione, ciascuna fitocella è stata nebulizzata con 100 mL di soluzione di trattamento, quantitativo ritenuto idoneo per esporre tutte e sei le piantine in maniera completa e uniforme (Figura 2). I quattro trattamenti effettuati, uno per ciascuna fitocella, sono elencati di seguito:

1. **Controllo:** fitocella trattata solamente con 100 mL di acqua minerale;
2. **Lecitina di soia:** fitocella trattata con una soluzione di lecitina di soia al 3%, successivamente diluita 1:500 con acqua minerale;
3. **Distillato di legno:** fitocella trattata con una soluzione di distillato di legno diluito 1:500 con acqua minerale

4. **Lecitina di soia + Distillato di legno:** fitocella trattata con soluzione di distillato di legno più lecitina di soia al 3%, diluiti successivamente 1:500 utilizzando acqua minerale.

Il distillato di legno utilizzato è prodotto dalla Ditta Esperia s.r.l. (Gruppo RM Energy Solutions) e proposto dalla rete di imprese *BioDea*[®], specializzata per l'impiego di prodotti biologici in agricoltura. La concentrazione di applicazione utilizzata (1:500) è stata definita sulla base delle indicazioni del produttore.



Figura 2. Trattamento delle piante di lattuga tramite nebulizzazione spray.

5.3 Parametri fisiologici

La scelta dei parametri fisiologici indagati è stata basata sull'utilizzo di metodologie consolidate in ambito scientifico e agrario per determinare la vitalità delle piante, ma che allo stesso tempo consentissero misurazioni facili e veloci senza arrecare danni alle piante stesse (non distruttivi). Specificatamente, i parametri indagati appartengono tutti alla classe degli indicatori utilizzabili per monitorare la performance fotosintetica delle piante. Per ciascun parametro sono state effettuate 15 misure su ciascuna pianta (unità sperimentale). Per ogni pianta sono state scelte le tre foglie con superficie maggiore, avendo cura di effettuare le misure sulla parte più esterna della foglia evitando le nervature. Le misure dei parametri fisiologici sono state effettuate prima del trattamento (*Tempo 0*) e successivamente dopo 3, 5 e 7 giorni dall'effettuazione dello stesso (*Tempo 3, 5 e 7*).

5.3.1 Contenuto di clorofilla

Questo parametro, espresso come contenuto di clorofilla per metro quadro di superficie (mg/m^2), è stato valutato attraverso l'utilizzo del CCM 300 (Opti-Sciences, Hudson, USA), strumento sviluppato sulla base della proporzionalità diretta tra il rapporto tra la fluorescenza

a 735 nm e quella a 700-710 nm con quello del contenuto di clorofille quantificata analiticamente (Gitelson, 1999).

5.3.2 Emissione di fluorescenza clorofilliana

L'emissione di fluorescenza della clorofilla *a* è stata valutata tramite il valore dell'efficienza fotosintetica (F_V/F_M), ovvero il rapporto fra la fluorescenza massima del Fotosistema II (F_M) e la fluorescenza variabile (F_V), data dalla differenza fra F_M e la fluorescenza basale (F_0), e tramite il Performance Index (PI), indicatore generale e multiparametrico del livello di funzionalità sia del PSI che del PSII. Prima delle analisi le piante sono stati acclimatate al buio per 15 minuti, allo scopo di scaricare i centri di reazione, e successivamente sono stati analizzate apponendo alle foglie delle speciali clip. Le analisi, condotte in condizioni di luce verde per evitare l'eccitazione delle clorofille, sono state effettuate esponendo i campioni per 1 secondo a luce saturante (650 nm, 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) utilizzando un fluorimetro Plant Efficiency Analyzer (HandyPEA, Hansatech Ltd, Norfolk, UK).

5.3.3 Riflettanza fogliare (Normalized Difference Vegetation Index, NDVI)

Questo parametro, definito come il rapporto tra la differenza e la somma della riflettanza spettrale di infrarosso (*NIR*) e luce rossa visibile (*red*), fornisce un'indicazione della capacità delle foglie di assorbire la radiazione fotosinteticamente attiva e quindi di costituire biomassa (Gamon et al., 1995). Le piante assorbono la radiazione solare mediante la radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) nella regione spettrale visibile che poi utilizzano come fonte di energia nel processo di fotosintesi. Le cellule delle foglie si sono evolute a riflettere la radiazione solare nel vicino infrarosso perché il livello di energia per fotone in quel dominio (lunghezze d'onda >700 nm) non è sufficiente per essere utile per sintetizzare molecole organiche. Un forte assorbimento a queste lunghezze d'onda potrebbe solamente provocare il surriscaldamento della pianta ed eventualmente danneggiarne i tessuti. Questo parametro è stato misurato attraverso l'utilizzo del PlantPen NDVI (Photo System Instruments, Czech Republic, 2016).

5.4 Analisi statistica dei dati

I dati raccolti presentavano distribuzione normale e varianza omogenea, prerequisiti per poter effettuare un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie utilizzando trattamento e tempo come fattori. Tuttavia, un certo grado di variabilità nei controlli ai vari tempi ci ha indotto a effettuare i confronti normalizzando i dati sui rispettivi controlli (rapporto tra campione

trattato e il rispettivo controllo). La significatività delle differenze rispetto ai controlli è stata invece testata sui valori assoluti. Tutti i confronti multipli post-hoc sono stati effettuati tramite il test di Tukey con un livello di significatività $p < 0.05$. Le elaborazioni statistiche sono state effettuate tramite il software libero R (R Core Team, 2020).

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle Figure 3-6 sono mostrati i risultati riguardanti contenuto di clorofilla, efficienza fotosintetica, Performance Index e NDVI prima e dopo 3, 5 e 7 giorni dai trattamenti con lecitina di soia, distillato di legno e distillato con l'aggiunta di lecitina.

Efficienza fotosintetica, Performance Index e NDVI non hanno mostrato variazioni né rispetto al controllo e nemmeno tra trattamenti e ai vari tempi, con la sola modestissima eccezione del PI di distillato più lecitina a T5.

Per quanto riguarda invece il contenuto di clorofilla, il trattamento con sola lecitina non è mai diverso dal controllo, mentre gli altri due trattamenti, distillato di legno e distillato con aggiunta di lecitina, hanno evidenziato un incremento significativo del contenuto di clorofilla del 50% rispetto ai valori di controllo sia dopo 3 che dopo 7 giorni. L'aggiunta di lecitina si è dimostrata efficace nel far aumentare il contenuto di clorofilla (+7%) rispetto al solo distillato. Nella letteratura scientifica le informazioni riguardanti gli effetti del distillato di legno sulla performance fotosintetica delle piante sono assai scarse e talvolta risultano molto generiche e poco referenziate (Grewal et al., 2018). Nonostante ciò, i nostri risultati risultano in linea con quelli di Zulkarami et al. (2014), che hanno messo in evidenza incrementi del contenuto di clorofilla dal 10% al 38% e del tasso di fotosintesi dal 6% al 21% in differenti cultivar di riso a seguito di trattamenti fogliari con distillato allo 0.2% (diluizione 1:500 come quella utilizzata nei nostri esperimenti).

Il meccanismo con il quale il distillato è in grado di far aumentare il contenuto di clorofilla non è stato indagato, ma sulla base delle poche informazioni a disposizione è possibile ipotizzare che la causa di questo effetto migliorativo sia da attribuire all'elevato contenuto di polifenoli. Infatti, nonostante esista una regola generale per cui l'incremento del contenuto di clorofille nelle piante, a seguito del processo di crescita, è accompagnato da una parallela diminuzione del contenuto di polifenoli (Giovanelli e Brenna 2007; Prawira-Atmaja et al. 2010), viene invece evidenziato come piante da orticoltura coltivate in pieno campo presentino andamenti contrari, ovvero mostrino incrementi del contenuto di clorofille proporzionali al contenuto di polifenoli (Meyer et al. 2006).

Il maggiore effetto del trattamento con distillato addizionato di lecitina di soia conferma il ruolo importante di questo composto nel favorire l'assorbimento delle sostanze ad essa legate dopo i trattamenti fogliari.

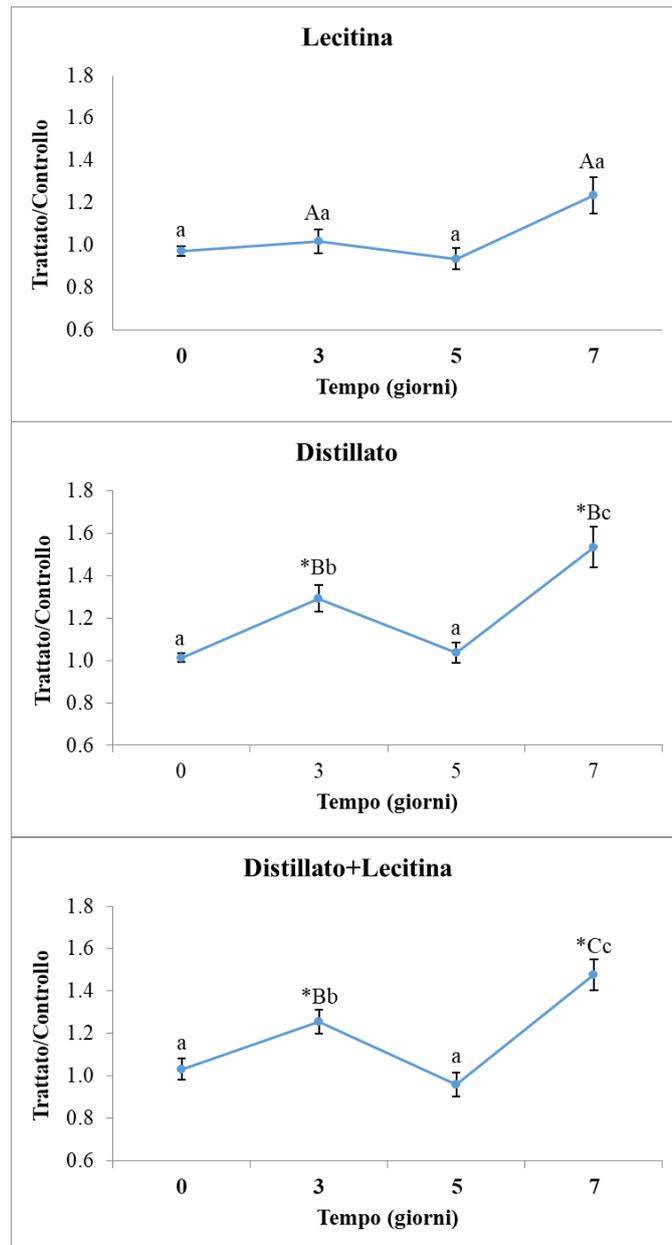


Figure 3. Contenuto di clorofilla (media \pm errore standard) in piante di lattuga canasta prima (0) e dopo 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con lecitina di soia, distillato di legno e distillato con aggiunta di lecitina. Statistica: * = differenze significative tra trattato e rispettivo controllo, lettere minuscole = differenze significative del trattamento nel tempo, lettere maiuscole = differenze fra trattamenti allo stesso tempo.

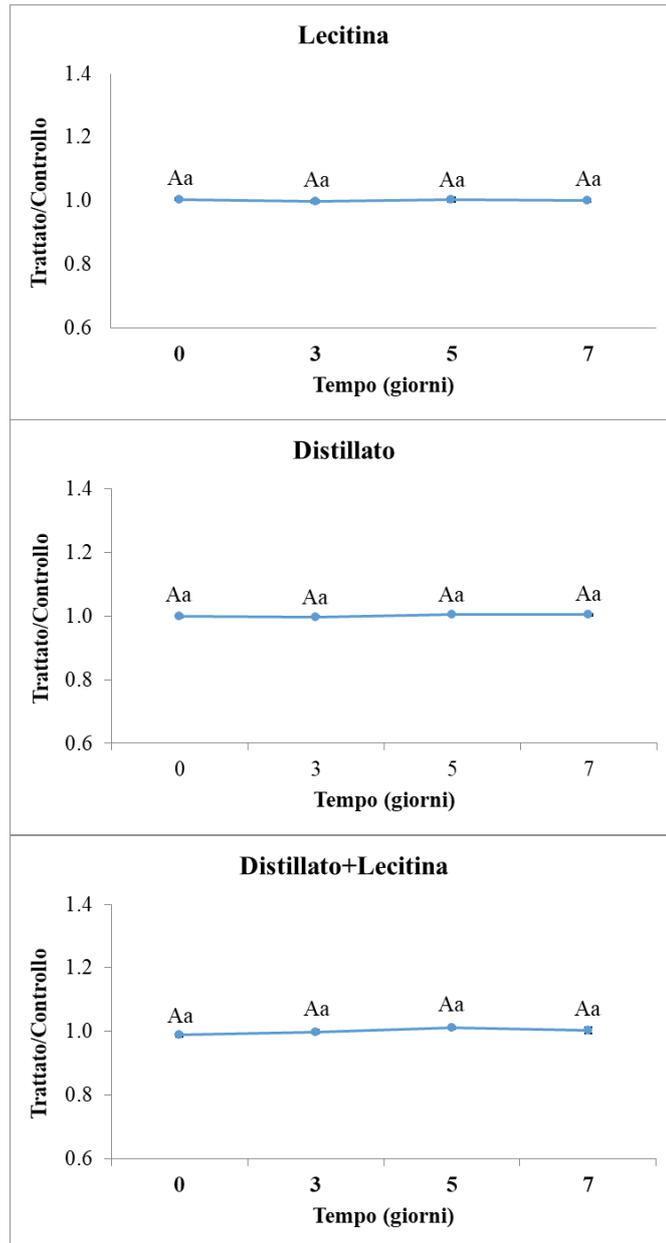


Figure 4. Efficienza fotosintetica (media \pm errore standard) in piante di lattuga canasta prima (0) e dopo 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con lecitina di soia, distillato di legno e distillato con aggiunta di lecitina. Statistica: * = differenze significative tra trattato e rispettivo controllo, lettere minuscole = differenze significative del trattamento nel tempo, lettere maiuscole = differenze fra trattamenti allo stesso tempo.

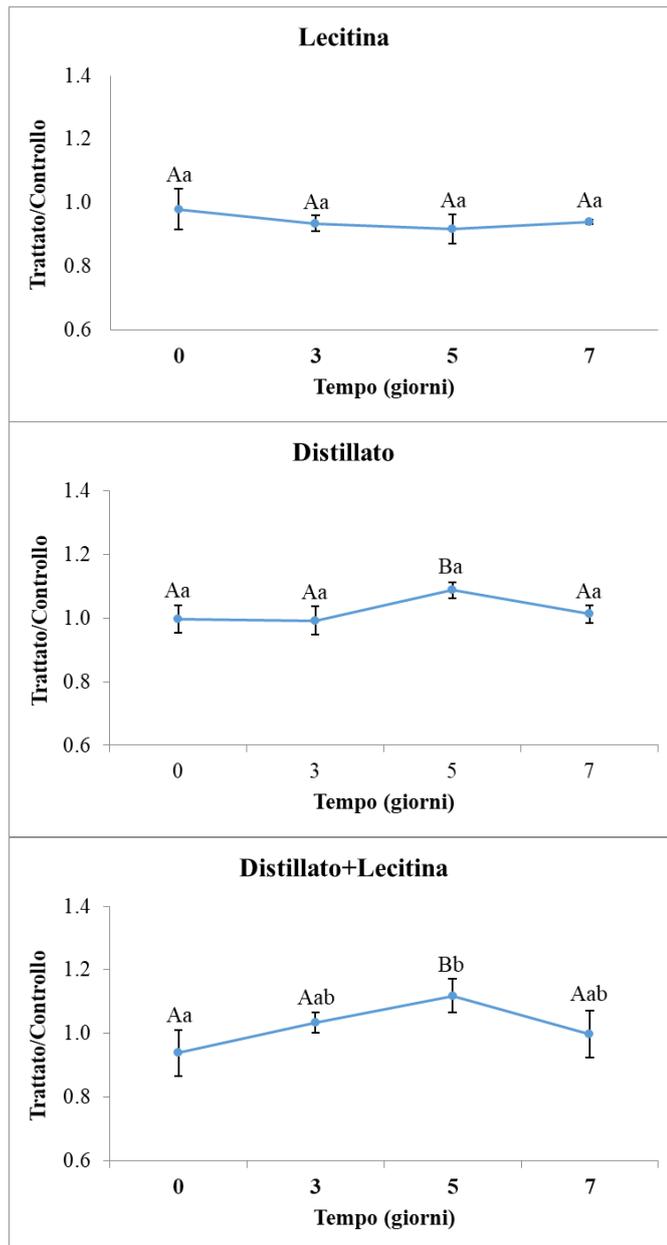


Figure 5. Performance Index (media \pm errore standard) in piante di lattuga canasta prima (0) e dopo 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con lecitina di soia, distillato di legno e distillato con aggiunta di lecitina. Statistica: * = differenze significative tra trattato e rispettivo controllo, lettere minuscole = differenze significative del trattamento nel tempo, lettere maiuscole = differenze fra trattamenti allo stesso tempo.

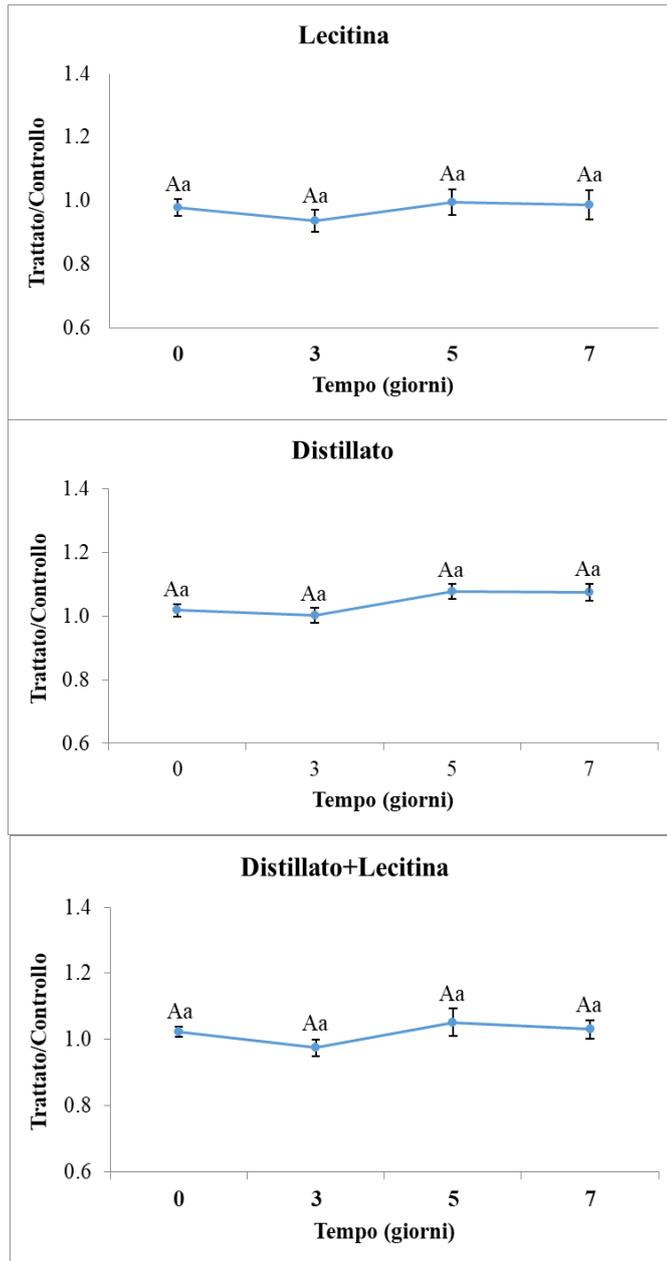


Figure 6. NDVI (media \pm errore standard) in piante di lattuga canasta prima (0) e dopo 3, 5 e 7 giorni dal trattamento con lecitina di soia, distillato di legno e distillato con aggiunta di lecitina. Statistica: * = differenze significative tra trattato e rispettivo controllo, lettere minuscole = differenze significative del trattamento nel tempo, lettere maiuscole = differenze fra trattamenti allo stesso tempo.

7. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi contribuisce alla limitata conoscenza dei parametri fisiologici coinvolti nel miglioramento della performance fotosintetica di piante di interesse orticolo trattate con distillato di legno.

I risultati consentono di concludere che il trattamento fogliare con distillato di legno ha un effetto positivo importante sul contenuto di clorofilla (+50%) in piante di lattuga canasta. L'aggiunta di lecitina di soia fa ulteriormente aumentare (+7%) la quantità di clorofilla. L'effetto è molto rapido, manifestandosi già dopo tre giorni dal trattamento.

Tali risultati sono estremamente interessanti e mostrano come sia possibile prospettare un utilizzo in agricoltura di prodotti bio-based in sostituzione o complementazione di quelli di sintesi.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Francesco Barbagli del Gruppo RM Solutions e di rete *BioDea*[®] per avere fornito il distillato di legno e per la preziosa collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- Balat, Mustafa; Balat, Mehmet; Kirtay, Elif; Balat, Havva. “Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems” in *Energy Conversion and Management*, Vol. 50, Issue 12, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2011. 3147-3157.
- Gamon, John; Field, Christopher; Goulden, Michael; Griffin, Kevin; Hartley, Anne; Joel, Geeske; Penuelas, Josep; Valentini, Riccardo. “Relationships Between NDVI, Canopy Structure, and Photosynthesis in Three Californian Vegetation Types” in *Ecological Applications*, Vol. 5, Issue 1, Ecological Society of America, Washington, D.C., 1995. 28-41.
- Ghyczy, Milos; Imberge, Paul-Robert; Wendel, Armin. “Phospholipid Composition and their use in Plant Protection Spray Mixtures”, United States Patent, 1987.
- Giovanelli, Gabriella, Brenna, Oreste V. “Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties” in *European Food Research and Technology*, Vol. 225, Springer Verlag, 2007. 145–150.
- Gitelson, Anatoly A.; Buschmann, Claus; Lichtenthaler, Hartmut K. “The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants” in *Remote Sensing of Environment*, Vol. 69, Issue 3, Elsevier Ltd, Amsterdam, NL, 1999. 296-302.
- Grewal, Arshdeep; Abbey, Lord; Gunupuru, Lokanadha Rao. “Production, prospects and potential application of pyroligneous acid in agriculture” in *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Vol. 135, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2018. 152-159.
- Loo, A. & Kassim, Jain & Ibrahim, Darah. (2008). “Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*” in *Food Chemistry*, Vol. 107, Issue 3, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2008. 1151-1160.
- Marchand, Patrice; Jolly, Malia; Vidal, Rodolphe. “Lecithins: A Food Additive Valuable for Antifungal Crop Protection” in *International Journal of Economic Plants*, Vol. 5, Issue 3, Puspa Publishing House, Kolkata, India, 2018. 104-107.
- Meyer, S.; Cerovic, Z.; Goulas, Yves.; Montpied, Pierre.; Demotes-Mainard, Sabine.; Bidel, Luc.; Moya, Ismaël.; Dreyer, Erwin.. “Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: A signature of the carbon-nitrogen balance within leaves?” in *Plant, cell & environment*, Vol. 29, Issue 7, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 2006. 1338-48.

- Mohan, Dinesh; Pittman, Jr., Charles U.; Steele, Philip H. “Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review” in *Energy & Fuels*, Vol. 20, Issue 3, American Chemical Society, Washington, D.C., 2006. 848-889.
- Prawira-Atmaja, M Iqbal; Shabri; Khomaini, H.; Maulana, Hilman; Harianto, S.; Rohdiana, Dadan. “Changes in chlorophyll and polyphenols content in *Camellia sinensis* var. *sinensis* at different stage of leaf maturity” in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol. 131, IOP Publishing, Bristol, UK, 2018.
- R Core Team. “R: A language and environment for statistical computing.” R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. URL <http://www.R-project.org/>
- Sadakichi, Kishimoto; Hirowaka, Tsuyoshi. “Wood Vinegar and Biochar in Agriculture: How to Improve Crop Quality While Reducing Dependence on Agricultural Chemicals”, 2015.
- Sindhu, Mathew; Zainul, Akmar Zakaria. “Pyroligneous acid - the smoky acidic liquid from plant biomass” in *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 99, Issue 2, Springer Verlag, 2015. 611-622.
- Stefanidis, Stylianos; Kalogiannis, Konstantinos; Iliopoulou, Eleni; Michailof, Chrysoula; Pilavachi, Petros; Lappas, Angelos. “A study of lignocellulosic biomass pyrolysis via the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin” in *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2013.
- Szember, A. “Influence on plant growth of the breakdown of organic phosphorus compounds by micro-organisms” in *Plant and Soil*, Vol. 13, Springer Verlag, 1960. 147–158.
- Szuhaj, Bernard F., *Lecithins: Sources, Manufacture & Uses*, American Oil Chemists’ Society, Chicago, IL, 1989.
- Wei, Qin; Ma, Xihan; Dong, Juane. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. in *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Vol. 87, Issue 1, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2010. 24-28.
- Zhang, Qiab; Chang, Jiea; Wang Tiejuna; Xu Yinga. “Review of biomass pyrolysis oil properties and upgrading research” in *Energy Conversion and Management*, Vol. 48, Issue 1, Elsevier Ltd., Amsterdam, NL, 2006. 87-92.
- Zulkarami, Berahim; Ashrafuzzaman, Md; Husni Mohamad Omar, Razi Ismail, Mohd. “Effect of pyroligneous acid on growth, yield and quality improvement of rockmelon

in soilless culture” in *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 5, No. 12, Southern Cross Publishing, Brisbane, QLD, 2011. 1508-1514.