

**Tytuł badań: Wpływ biostymulatora Agro ECA Protect stosowanego nalistnie w ograniczaniu stresu wywołanego zbyt wysoką temperaturą u sałaty**

**Title of the study: The effect of the foliar application of the biostimulant Agro ECA Protect on mitigating stress caused by high temperature in lettuce**

## **1. Cel badań / Aim of the study**

Celem badania jest określenie skuteczności działania biostymulatora Agro Eca Protect, stosowanego nalistnie, w ograniczaniu skutków stresu wywołanego wysoką temperaturą u sałaty. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach szklarniowych oraz w fitotronie.

The aim of the study is to determine the effectiveness of the biostimulator Agro Eca Protect, applied foliarly, in reducing the effects of high-temperature stress in lettuce. The experiment was carried out under greenhouse conditions and in a phytotron.

## **2. Metody i sposób prowadzenia badań / Material and methods**

### **2.1. Materiał roślinny i uprawa roślin / Plant material and cultivation**

Badania prowadzono na roślinach sałaty głowiastej (*Lactuca sativa* L.) odmiany 'Synopsis'. Otrzymaną od zleceniodawcy rozsadę w dniu 31.07.2025 przesadzono do 1,5 L doniczek wypełnionych mieszaniną substratu torfowego i perlitu (3:1). Wykorzystano substrat torfowy o charakterystyce: pH 5,6 - 6,4, EC 1,5 mS/cm oraz perlit o frakcji 1 - 6 mm. Rośliny rosły w warunkach szklarniowych przez okres kilku dni, po czym zostały przeniesione do komór fitotronowych (temperatura 21/18°C, fotoperiod 17/7 h). Właściwe doświadczenie rozpoczęto w dniu 12.08.2025 gdy rośliny wykształciły 3 - 4 liście o blaszce umożliwiającej przeprowadzenie pomiarów fizjologicznych.

The study was conducted on lettuce plants (*Lactuca sativa* L.), cultivar 'Synopsis'. Seedlings provided by the client were transplanted on July 31, 2025, into 1.5 L pots filled with a mixture of peat substrate and perlite (3:1). The peat substrate was characterized by pH 5.6–6.4 and EC 1.5 mS/cm, while the perlite fraction size ranged from 1 to 6 mm. The plants grew under greenhouse conditions for several days and were then transferred to phytotron chambers (temperature 21/18°C, photoperiod 17/7 h). The main experiment began on August 12, 2025, when the plants had developed 3–4 leaves with a lamina suitable for physiological measurements.

### **2.2. Schemat doświadczenia / Experimental design**

*Kombinacje doświadczenia. Experimental combinations:*

1. Rośliny niepoddane działaniu podwyższonej temperatury (warunki optymalne), nietraktowane preparatem.

Plants not exposed to elevated temperature (optimal conditions), not treated with the biostimulant.

2. Rośliny niepoddane działaniu podwyższonej temperatury (warunki optymalne), traktowane preparatem.

Plants not exposed to elevated temperature (optimal conditions), treated with the biostimulant.

3. Rośliny poddane działaniu podwyższonej temperatury (warunki stresu), nietraktowane preparatem.

Plants exposed to elevated temperature (stress conditions), not treated with the biostimulant.

4. Rośliny poddane działaniu podwyższonej temperatury (warunki stresu), traktowane preparatem.

Plants exposed to elevated temperature (stress conditions), treated with the biostimulant.

Każda kombinacja obejmowała min. 8 roślin.

Each combination included minimum 8 plants.

*Warunki wzrostu roślin. Plant growth conditions:*

- Warunki optymalne: 21°C przez 17 h (symulacja warunków dnia), 18°C przez okres 7 h (symulacja nocy). Natężenie napromieniowania (PAR) wynosiło średnio 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , wilgotność względna powietrza 60 – 80%.

Optimal conditions: 21°C for 17 h (day simulation) and 18°C for 7 h (night simulation). The average photosynthetically active radiation (PAR) intensity was 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , and relative air humidity ranged from 60 to 80%.

- Warunki stresu podwyższonej temperatury: 32°C przez 17 h (symulacja warunków dnia), 18°C przez okres 7 h (symulacja nocy). Pozostałe parametry jak dla warunków optymalnych.

High-temperature stress conditions: 32°C for 17 h (day simulation) and 18°C for 7 h (night simulation). Other parameters were identical to those under optimal conditions.

*Sposób aplikacji biostymulatora. Biostimulator application method:*

Biostymulator Agro Eca Protect (AEP) był używany w formie oprysku o stężeniu 2,5%. Rośliny nietraktowane preparatem były opryskiwane wodą.

The biostimulator Agro ECE Protect (AEP) was applied as a foliar spray at a concentration of 2.5%. Control plants (untreated) were sprayed with water.

*Szczegółowy schemat doświadczenia. Detailed experimental procedure:*

1. Pierwsza aplikacja preparatu AEP (w formie oprysku).

First application of AEP (foliar spray).

2. Po tygodniu druga aplikacja preparatu AEP.

Second application of AEP after one week.

3. Po dobie od drugiego oprysku rośliny z grupy stresowanej zostały poddane działaniu stresu związanego z wysoką temperaturą przez dwie doby.

Twenty-four hours after the second spray, plants in the stress group were exposed to high-temperature stress for two days.

4. Analiza fizjologiczna roślin – pierwszy termin pomiarów (natężenie fotosyntezy oraz transpiracji).

Physiological analysis – first measurement (photosynthesis and transpiration rate).

5. Trzeci oprysk preparatem AEP.

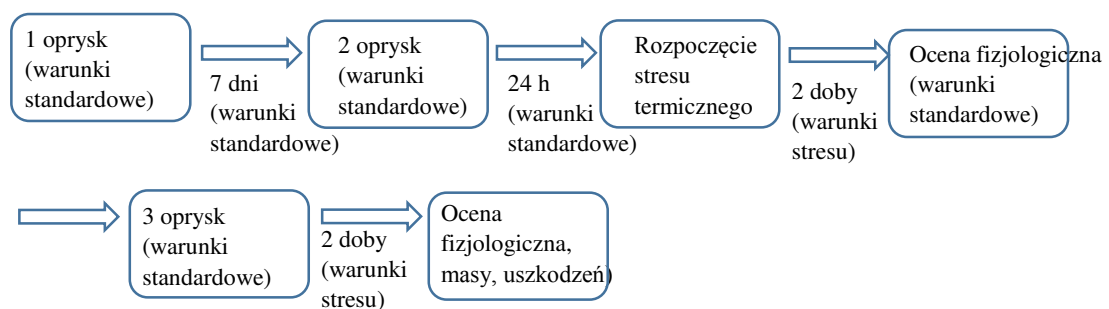
Third application of AEP.

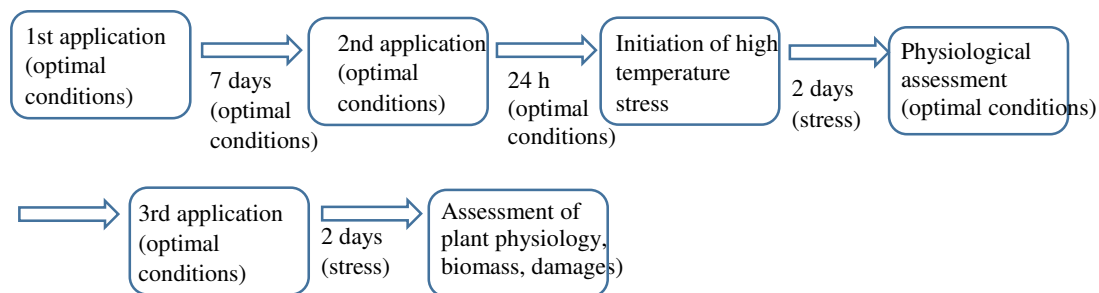
6. Ponowne oddziaływanie wysokiej temperatury według schematu z punktu 3 przez okres dwóch dób.

Re-exposure to high-temperature stress according to the scheme described in point 3, for two days.

7. Ocena fizjologiczna roślin (drugi termin pomiarów), stanu uszkodzenia roślin, masy roślin, analiza zawartości makro i mikroelementów w liściach roślin.

Final assessment: physiological measurements (second term), evaluation of plant damage, determination of plant biomass, and analysis of macro- and micronutrient content in leaves.





*Pomiary i obserwacje. Measurements and observations:*

1. Pomiary natężenia wymiany gazowej roślin (fotosynteza, transpiracja) prowadzono za pomocą analizatora LCpro (ADC BioScientific, UK) na 8 liściach z każdej kombinacji doświadczalnej. Parametry wewnątrz komory liściowej ustawiono tak, aby symulowały warunki panujące podczas wzrostu roślin.

Gas exchange measurements (photosynthesis and transpiration) were performed using an LCpro gas exchange analyzer (ADC BioScientific, UK) on eight leaves from each experimental combination. The parameters inside the leaf chamber were adjusted to simulate the environmental conditions during plant growth.

2. Masa roślin. Po zakończeniu oddziaływania stresu zmierzono świeżą i suchą masę roślin (część nadziemną). Suchą masę uzyskano susząc rośliny w temperaturze 60°C do uzyskania stabilnego wyniku.

Plant biomass. After the stress treatment, fresh and dry plant mass were measured (above-ground part). Dry mass was determined after drying the plants at 60°C until a constant weight was obtained.

3. Uszkodzenia roślin oceniono wizualnie porównując stan roślin z poszczególnych kombinacji. Wynik wyrażono w procentach (0% - brak uszkodzeń, 100% - całkowite zniszczenie roślin).

Plant damage assessment was carried out visually by comparing the condition of plants from individual combinations. The results were expressed as percentages (0% – no damage, 100% – complete plant destruction).

4. Analiza zawartości pierwiastków w liściach roślin. Analiza została wykonana po wysuszeniu i zmieleniu roślin. Wykonano jedną średnią próbę z 8 roślin w każdej kombinacji. Oznaczanie zawartości fosforu (P), potasu (K), wapnia (Ca), magnezu (Mg), siarki (S), chloru (Cl), manganu (Mn), żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn), kremu (Si) zostało wykonane metodą fluorescencji rentgenowskiej (XRF). Oznaczanie zawartości azotu (N) zostało wykonane metodą spektroskopii w środkowej podczerwieni (MIR).

Analysis of nutrient content in plant leaves. The analysis was performed after drying and grinding the plant material. A single composite sample was prepared from eight plants for each treatment combination. The contents of phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulfur (S), chlorine (Cl), manganese (Mn), iron (Fe), copper (Cu), silicon (Si), and zinc (Zn) were determined using X-ray fluorescence (XRF). Nitrogen (N) content was determined using mid-infrared spectroscopy (MIR).

Wyniki masy roślin i analiz fizjologicznych zostały opracowane statystycznie przy wykorzystaniu analizy wariancji. Średnie w tabelach i na wykresach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa  $\alpha = 0,05$  według testu Duncana.

The results of biomass and physiological analyses were statistically processed using analysis of variance. Means in tables and figures marked with the same letters do not differ significantly at the probability level of  $\alpha = 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

### 3. Wyniki. Results.

**Pierwszy termin pomiarów** (po drugim oprysku i dwóch dobach oddziaływania stresu)

**First measurement term** (after the second foliar application and two days of exposure to heat stress)

Tab. 1. Natężenie wymiany gazowej sałaty.

Table 1. Leaf gas exchange of lettuce plants.

|  | Warunki optymalne<br>Optimal conditions |                                    | Stres termiczny<br>Stress conditions |                     |
|--|---|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
|  | Agro Eca<br>Protect                     | kontrola (woda)<br>control (water) | Agro Eca<br>Protect                  | Kontrola<br>control |
| Natężenie fotosyntezy<br>Photosynthetic rate<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | 4,61 b                                  | 2,63 ab                            | 4,25 ab                              | 2,39 a              |
| Natężenie transpiracji<br>Transpiration rate<br>( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )    | 1,70 ab                                 | 1,24 a                             | 2,27 c                               | 1,82 bc             |

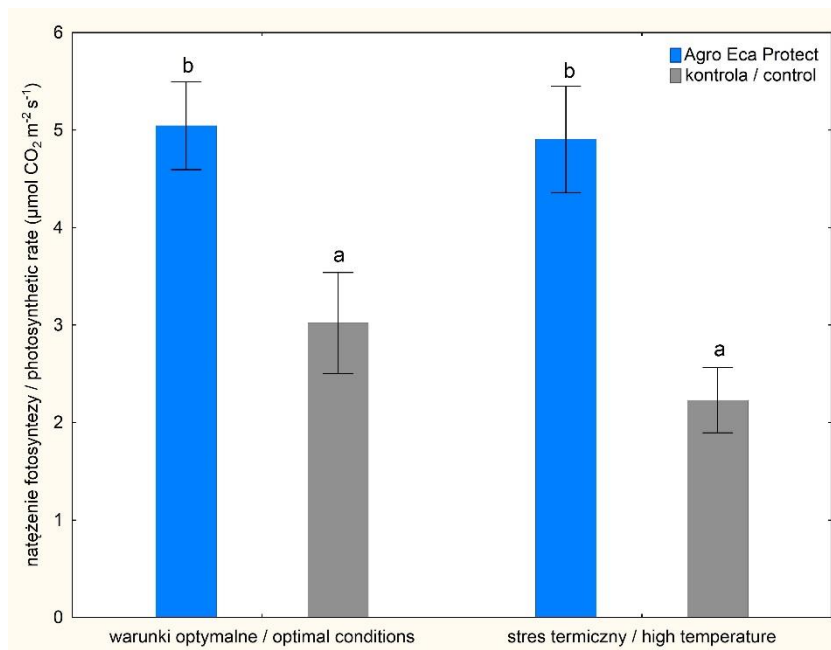
\* - średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa  $\alpha = 0,05$  według testu Duncana. Means within rows followed by the same letters do not differ significantly at the probability level of  $\alpha = 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

Po dwóch dniach oddziaływania stresu wysokiej temperatury nie zaobserwowano istotnych różnic w natężeniu wymiany gazowej roślin. Widoczny jest trend wskazujący na wyższe wartości fotosyntezy i transpiracji roślin traktowanych preparatem zarówno w warunkach optymalnych jak i stresowych.

After two days of exposure to high-temperature stress, no significant differences in plant gas exchange were observed. However, a trend was noted toward higher photosynthetic and transpiration rates in plants treated with the preparation, both under optimal and stress conditions.

**Drugi termin pomiarów** (po trzecim oprysku i sumarycznie czterech dobach oddziaływania stresu).

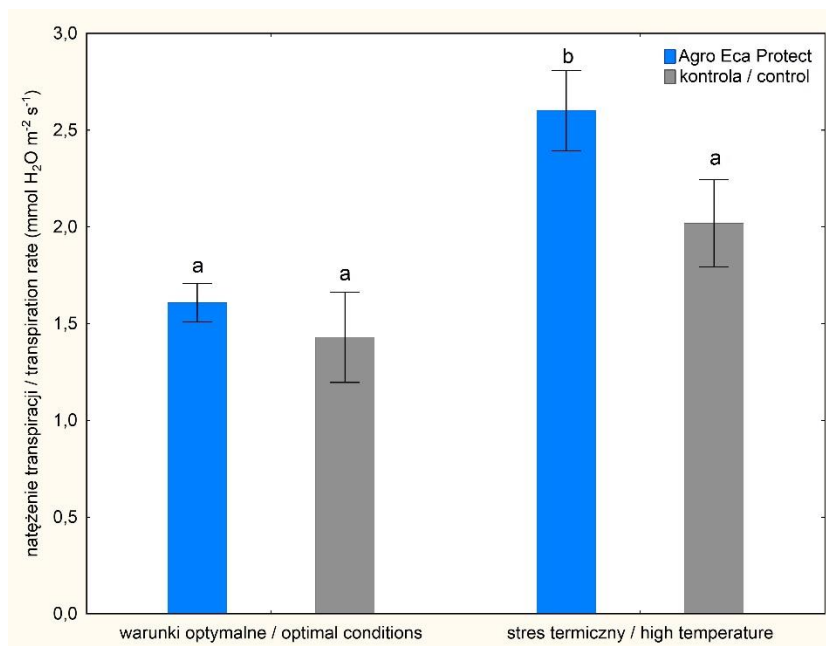
**Second measurement term** (after the third foliar application and four days of exposure to heat stress).



Rys. 1. Natężenie fotosyntezy roślin sałaty ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Fig. 1. Photosynthetic rate of lettuce plants ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

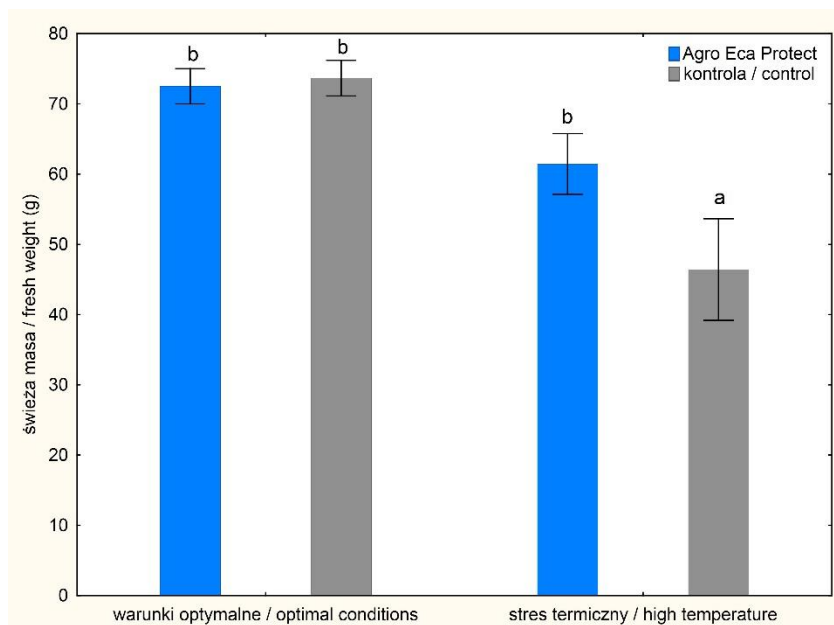
Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa  $\alpha = 0,05$  według testu Duncana. Means followed by the same letters do not differ significantly at  $\alpha = 0.05$  according to Duncan's multiple range test.



Rys. 2. Natężenie transpiracji roślin sałaty (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).  
 Fig. 2. Transpiration rate of lettuce plants (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Po czterech dniach oddziaływania stresu wysokiej temperatury stwierdzono wyższe (istotnie statystycznie) wartości natężenia fotosyntezy i transpiracji w przypadku roślin traktowanych biostymulatorem w stosunku do kontroli. W warunkach optymalnych stwierdzono wyższe natężenie fotosyntezy (różnice istotne statystycznie) w przypadku roślin traktowanych biostymulatorem.

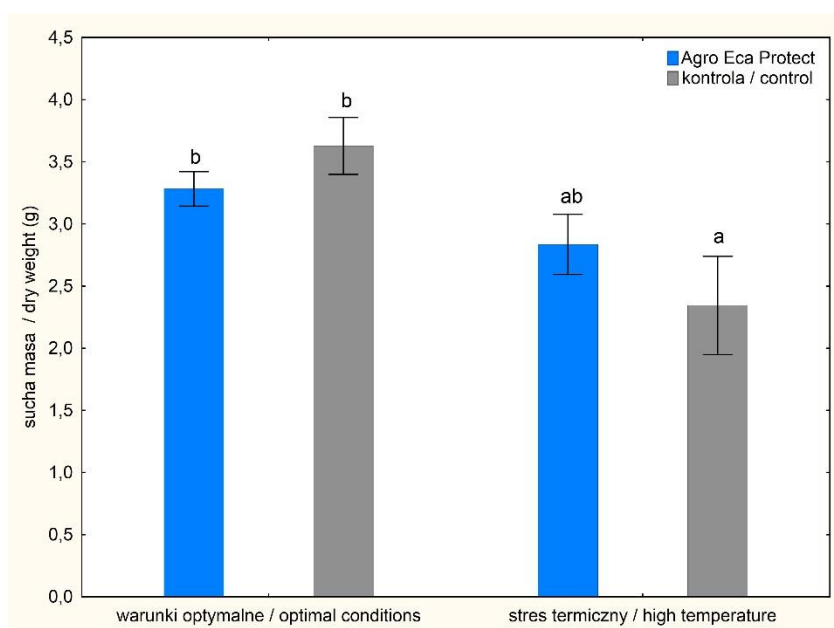
After four days of exposure to high-temperature stress, significantly higher photosynthetic and transpiration rates were recorded in plants treated with the biostimulant compared to the control. Under optimal conditions, significantly higher photosynthetic rates were also observed in plants treated with the biostimulant.



Rys. 3. Świeża masa roślin sałaty (g).

Fig. 3. Fresh weight of lettuce plants (g).

Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa  $\alpha = 0,05$  według testu Duncana, ni.- różnice nieistotne statystycznie. Means followed by the same letters do not differ significantly at the probability level of  $\alpha = 0.05$  according to Duncan's multiple range test; ns – differences not statistically significant.



Rys. 4. Sucha masa roślin sałaty (g).

Fig. 4. Dry weight of lettuce plants (g).

Po 12 dniach od rozpoczęcia doświadczenia wykonano ocenę zarówno świeżej, jak i po wysuszeniu – suchej masy roślin sałaty.

W przypadku świeżej masy roślin stwierdzono ponad 30% wyższą masę u roślin traktowanych biostymulatorem w porównaniu z kontrolą, a różnice te były istotne statystycznie. Ponadto, w warunkach stresu zaobserwowano około 20% wyższą suchą masę roślin sałaty traktowanych preparatem w stosunku do kontroli, jednak w tym przypadku różnice nie były statystycznie istotne.

After 12 days from the start of the experiment, the fresh weight of the lettuce plants and, after drying, the dry weight of the plants were evaluated.

In the case of fresh weight, the plants treated with the biostimulant showed more than a 30% higher mass compared to the control (statistically significant differences). Under stress conditions, the dry weight of lettuce plants treated with the biostimulant was about 20% higher than that of the control. However, the differences were not statistically significant.

Tab. 2. Obserwowane uszkodzenia roślin (ocena wizualna, %).

Table 2. Visual assessment of plant damage.

| Warunki optymalne<br>Optimal conditions |                     | Stres termiczny<br>Stress conditions |                     |
|---|---------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Agro Eca<br>Protect                     | Kontrola<br>control | Agro Eca<br>Protect                  | Kontrola<br>control |
| 0                                       | 0                   | 15-20%                               | 30-40%              |

Obserwowano mniejsze uszkodzeniu u roślin (w warunkach stresu) traktowanych biopreparatem.

Lower damage was observed in plants subjected to stress conditions that were treated with the biostimulant.

Tab. 3. Zawartość pierwiastków w liściach sałaty.  
Table 3. Chemical composition of lettuce leaves.

Stres termiczny / High temperature conditions

| Pierwiastek<br>Nutrient | AEP  | Kontrola<br>Control | AEP  | Kontrola<br>Control |
|-------------------------|------|---------------------|------|---------------------|
| N                       | 4,71 | 4,61                | 102% | 100%                |
| P                       | 0,89 | 0,82                | 108% | 100%                |
| K                       | 4,26 | 3,74                | 114% | 100%                |
| Ca                      | 1,64 | 1,50                | 109% | 100%                |
| Mg                      | 0,43 | 0,41                | 105% | 100%                |
| S                       | 0,36 | 0,33                | 109% | 100%                |
| Mn                      | 152  | 171                 | 89%  | 100%                |
| Fe                      | 250  | 254                 | 98%  | 100%                |
| Cu                      | 13   | 12                  | 108% | 100%                |
| Zn                      | 106  | 102                 | 104% | 100%                |
| Si                      | 0,36 | 0,26                | 138% | 100%                |
| Cl                      | 1,29 | 1,06                | 122% | 100%                |

Warunki optymalne / Optimal conditions

| Pierwiastek<br>Nutrient | AEP  | Kontrola<br>Control | AEP  | Kontrola<br>Control |
|-------------------------|------|---------------------|------|---------------------|
| N                       | 5,10 | 4,34                | 117% | 100%                |
| P                       | 0,95 | 0,89                | 106% | 100%                |
| K                       | 4,19 | 4,24                | 99%  | 100%                |
| Ca                      | 1,59 | 1,84                | 86%  | 100%                |
| Mg                      | 0,43 | 0,48                | 90%  | 100%                |
| S                       | 0,35 | 0,33                | 106% | 100%                |
| Mn                      | 115  | 146                 | 79%  | 100%                |
| Fe                      | 222  | 223                 | 99%  | 100%                |
| Cu                      | 12   | 9                   | 133% | 100%                |
| Zn                      | 92   | 78                  | 118% | 100%                |
| Si                      | 0,19 | 0,15                | 127% | 100%                |
| Cl                      | 1,10 | 1,07                | 103% | 100%                |

Z uwagi na wykonanie jednej analizy z wszystkich roślin w kombinacji, nie prowadzono oceny statystycznej wyników. Porównując wartości bezwzględne można zaobserwować w warunkach stresu tendencję wskazującą na lepsze wykorzystanie K (o ok. 14%) z podłoża przez rośliny traktowane biostymulatorem w porównaniu do kontroli. W przypadku warunków optymalnych widoczna jest tendencja wskazująca na lepsze wykorzystanie N, Cu, Zn z podłoża przez rośliny traktowane preparatem. Zarówno w warunkach stresowych jak i optymalnych można zaobserwować tendencję wskazującą na wyższe zawartości Si w tkankach roślin

(powyżej 25%). Podwyższona zawartość Si prawdopodobnie wynika z obecności tego pierwiastka w składzie produktu.

Due to the fact that a single analysis was performed using all plants within each treatment combination, no statistical evaluation of the results was conducted. When comparing absolute values, under stress conditions a tendency can be observed indicating better utilization of K (by approximately 14%) from the substrate by plants treated with the biostimulant compared to the control. Under optimal conditions, there is a tendency indicating better utilization of N, Cu, and Zn from the substrate by plants treated with the preparation. In both stress and optimal conditions, a tendency toward higher Si content (above 25%) can be observed. The increased content of Si is most likely due to the presence of this element in the product.

Tab. 4. Analiza natężenia transpiracji roślin ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) w warunkach optymalnych. Średnia z 4 gatunków: kapusta, ogórek gruntowy, sałata, truskawka).

Table 4. Analysis of plant transpiration rate ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) under optimal conditions. Mean value calculated for four species: cabbage, cucumber, lettuce, and strawberry.

|                  | Czas po aplikacji preparatu (h)<br>Time after biostimulant application (h) |        |        |
|------------------|--|--------|--------|
|                  | 3 h  | 24 h   | 48 h   |
| Agro Eca Protect | 4,53 b   | 1,32 b | 2,04 a |
| Woda / Water     | 3,48 a   | 0,94 a | 1,85 a |

Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie prawdopodobieństwa  $\alpha = 0,05$  według testu Duncana. Means followed by the same letters do not differ significantly at the probability level of  $\alpha = 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

Rośliny traktowane biostymulatorem charakteryzowały się wyższymi wartościami natężenia transpiracji po 3 i 24 h od przeprowadzenia oprysku. Po 48 h od aplikacji preparatu obserwowano podobny trend, chociaż występujące różnice nie były statystycznie istotne. Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że największy wpływ biostymulatora na zwiększenie natężenia transpiracji (otwieranie aparatów szparkowych) występuje w pierwszej dobie po aplikacji. Po 48 godzinach efekt był nadal zauważalny, choć już słabszy.

Plants treated with the biostimulant exhibited higher transpiration rates at 3 and 24 hours after foliar application. A similar trend was observed 48 hours after application, although the differences were not statistically significant. Based on the analyses, it can be concluded that the greatest effect of the biostimulant on increasing transpiration (stomatal opening) occurs within the first 24 hours after application. After 48 hours, the effect was still noticeable, although weaker.

#### **4. Podsumowanie**

1. Biostymulator stosowany dolistnie ograniczał negatywne skutki podwyższonej temperatury, co potwierdzają wyższe wartości natężenia fotosyntezy oraz transpiracji u roślin traktowanych preparatem w stosunku do kontroli. Efektem tego jest wyższy przyrost biomasy roślin traktowanych biostymulatorem (w porównaniu do kontroli).
2. Wyniki badań sugerują pozytywny wpływ preparatu na lepsze wykorzystanie K podłoża w warunkach stresowych.
3. Wyniki badań wskazują, że działanie Agro ECA Protect w ograniczaniu skutków stresu wywołwanego wysoką temperaturą wynika ze stymulowania otwierania aparatów szparkowych. Dzięki temu zwiększa się natężenie transpiracji, co pozwala utrzymać niższą temperaturę liści i ogranicza uszkodzenia roślin (pod warunkiem dostępności wody). Obserwowane wyższe natężenie fotosyntezy umożliwia utrzymanie optymalnej kondycji roślin oraz korzystnie wpływa na ich wzrost w warunkach stresu termicznego.
4. Wyniki badań wskazują, że największy wpływ na otwieranie aparatów szparkowych (zwiększenie natężenia wymiany gazowej liści) utrzymuje się do 2 dni po zastosowaniu Agro ECA Protect.

#### **Summary**

1. The foliar-applied biostimulant mitigated the negative effects of elevated temperature, as evidenced by higher photosynthetic rates in treated plants compared to the control. As a result, an increased fresh biomass was observed in the plants treated with the biostimulant relative to the control.
2. The research results also suggest a positive effect of the preparation on the more efficient uptake of potassium (K) from the substrate under stress conditions.
3. The results of the study indicate that the action of Agro ECA Protect in mitigating the effects of heat stress is due to the stimulation of stomatal opening. This increases transpiration, which helps maintain lower leaf temperatures and reduces plant damage, provided that water is adequately available. The observed higher photosynthetic rate allows the plants to maintain optimal condition and positively influences their growth under heat stress conditions.
4. The results of the study indicate that the greatest effect on stomatal opening (increasing gas exchange) persists for up to 2 days after the application of Agro ECA Protect.

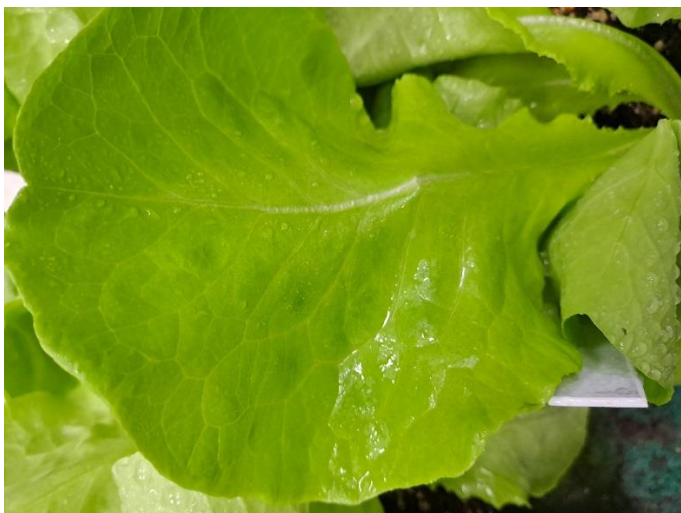
## 5. Zdjęcia / Photographs



Rozsada sałaty. Planting material.



Sałata podczas uprawy. Plant cultivation.



Aplikacja preparatu. Foliar application.



Rośliny sałaty po zakończeniu doświadczenia: od lewej warunki optymalne - roślina traktowana preparatem, warunki optymalne - roślina kontrolna, warunki stresu - roślina traktowana preparatem, warunki stresu - roślina kontrolna.

Lettuce plants at the end of the experiment (from left to right): treated plant under optimal conditions, control under optimal conditions, treated plant under stress conditions, control under stress conditions.



Rośliny sałaty poddane działaniu stresu po zakończeniu doświadczenia: od lewej roślina traktowana preparatem, roślina kontrolna.  
Lettuce plants under stress at the end of the experiment (left: treated with biostimulant; right: control).

**Wykonawca / Performer:**

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3  
96-100 Skierniewice

Prof. dr hab. Waldemar Treder

Dr Krzysztof Klamkowski