

## Effect of two flooding levels on growth and physiological parameters in peach rootstock 'Nemared'

## Efecto de dos niveles de inundación sobre el crecimiento y parámetros fisiológicos en portainjertos de durazno 'Nemared'

Victor Hugo Ziegler<sup>1\*</sup>; Antonio Marcelo Weibel<sup>2</sup>; Pedro Insausti<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Cátedra de Fruticultura, Facultad de Agronomía.  
Av. San Martín 4453, CPA 1417 DSE, Buenos Aires, ARGENTINA.

<sup>2</sup>EEA Junín INTA, Isidoro Bousquet s/n, La Colonia, Junín 5573, Mendoza, ARGENTINA.

<sup>3</sup>Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas  
Vinculadas a la Agricultura, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, ARGENTINA.

\*Corresponding author: [vziegler@agro.uba.ar](mailto:vziegler@agro.uba.ar)

### Abstract

While peach tree is very sensitive to waterlogging, there are no works on the effect of the flooding over only part of its root system. The objective of this work was to investigate physiological and growth responses of 'Nemared' rootstock to partial flooding of roots. Treatments were performed for 6-days: control trees, half-flooded, and fully-flooded. Both flooding treatments negatively affected the vegetative growth, stomatal conductance, chlorophyll content and leaf water potential. The response observed in the half-flooded treatment was intermediate between the control and fully-flooded treatment. The fastest response of stomatal conductance to soil flooding, before differences among treatments in leaf water potential were perceived, suggested that there should be a stomatal closure mechanism that responds to a signal that arises from flooded roots. The importance of this work, lies in showing the negative effects of unnoticed and partial floods, frequently occurring in peach trees.

**Keywords:** tree fruit, groundwater, partial flooding, peach rootstock, abiotic stress.

### Resumen

Si bien el duraznero es muy sensible al anegamiento, no existen trabajos sobre el efecto de la inundación en una sola parte de su sistema radicular. El objetivo de este trabajo fue investigar las respuestas fisiológicas y de crecimiento del portainjertos 'Nemared' a la inundación parcial de sus raíces. Se establecieron tres tratamientos durante 6 días: árboles testigo, semi-inundados y totalmente inundados. Ambos tratamientos de inundación afectaron negativamente al crecimiento vegetativo, la conductancia estomática, el contenido de clorofila y el potencial hídrico foliar. La respuesta observada en el tratamiento semi-inundado fue intermedia entre el testigo y el totalmente inundado. La respuesta más rápida de la conductancia estomática a la inundación del suelo, antes de percibir diferencias entre los tratamientos en el potencial hídrico foliar, sugirió la existencia de un mecanismo de cierre estomático, el cual responde a una señal que proviene de las raíces inundadas. La importancia de este trabajo radica en mostrar los efectos negativos de las inundaciones parciales e inadvertidas que ocurren frecuentemente en los durazneros.

**Palabras clave:** árbol frutal, agua subterránea, inundación parcial, portainjertos de duraznero, estrés abiótico.



## Introduction

Floods are usually caused, among other factors, by excessive rainfall, rise of water table and poor irrigation management (Ganskopp, 1986; Stromberg, 2001) and their frequency and intensity are highly variable and unpredictable (Loreti, van Veen, & Perat, 2016). Lately, due to global climate change, frequency and intensity have increased (Sasidharan & Voeselek, 2015) exposing intolerant crops, many of which are fruit species, to radical anoxia.

In arid and semi-arid regions, characterized by low annual rainfall and high evapotranspiration, its groundwater that supplies perennial plants with their most important source of water (Naumburg, Mata-González, Hunter, McLendon, & Martin, 2005). The level of groundwater is dynamic, and its temporal variation is caused by several processes, including recharge, drainage and use of water resources (Ganskopp, 1986; Stromberg, 2001). This variation in groundwater level can cause contrasting effects. The decrease in level can generate water deficit in plants (Naumburg et al., 2005). On the contrary, its rise increases water availability for plants but it can also submerge the active roots and cause depletion of soil O<sub>2</sub>, generating radical anoxia (Kozlowski, 1997; Armstrong & Drew, 2002). However, the flooding process can be gradual and affect only a part of the radical system.

Most tree fruit species, including *Prunus* genus, are propagated from grafting of the productive variety, on rootstocks belonging to the same or other species (Webster, 2001; Gillen & Bliss, 2005). The influence of rootstocks on cultivars is significant, since they are responsible for absorption of water and nutrients (Layne, 1987), and can determine, to some extent, the tolerance of fruit trees to different types of environmental stresses such as drought, salinity, low temperatures and hypoxia (Isaakidis, Sotiropoulos, Almaliotis, Therios, & Stylianidis, 2004; Domingo, Pérez-Pastor, & Ruiz-Sánchez, 2002; Pimentel et al., 2014).

There are different degrees of susceptibility to flooding among peach rootstocks (Ranney, 1994; Martinazzo, Perbon, Farias, Bianchi, & Bacarin, 2011; Amador, Sancho, Bielsa, Gomez-Aparisi, & Rubio-Cabetas, 2012; Iacona et al., 2013; Ziegler, Ploschuk, Weibel, & Insausti, 2017) being 'Nemared' (*Prunus persica* (L.) Batsch) a susceptible specie. This rootstock is one of the most used peach rootstocks because it is resistant to root-knot nematode and is compatible with peach, nectarine and plum (Ramming & Tanner, 1983). As is the case in other species that are not very tolerant to flooding, radical hypoxia affects the growth of grafted peaches on intolerant rootstock and physiological parameters related to this (Iacona et al., 2013) like water potential ( $\Psi_w$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), and leaf chlorophyll

## Introducción

Las inundaciones suelen ser causadas, entre otros factores, por precipitaciones excesivas, elevación del nivel freático y mal manejo del riego (Ganskopp, 1986; Stromberg, 2001), y su frecuencia e intensidad son muy variables e impredecibles (Loreti, van Veen, & Perat, 2016). Recientemente, debido al cambio climático global, su frecuencia e intensidad han aumentado (Sasidharan & Voeselek, 2015), lo cual expone a los cultivos intolerantes, como las especies frutales, a la asfixia radicular.

En regiones áridas y semiáridas, caracterizadas por escasas precipitaciones anuales y una elevada evapotranspiración, las aguas subterráneas son la fuente más importante de agua para las plantas perennes (Naumburg, Mata-González, Hunter, McLendon, & Martin, 2005). El nivel de las aguas subterráneas es dinámico, y su variación temporal se debe a varios procesos, como la recarga, el drenaje y el uso de recursos hídricos (Ganskopp, 1986; Stromberg, 2001). Dicha variación del nivel de las aguas subterráneas puede provocar efectos contrastantes. Por un lado, el descenso del nivel puede generar déficit hídrico en las plantas (Naumburg et al., 2005); en cambio, su ascenso aumenta la disponibilidad de agua para las plantas, pero también puede sumergir a las raíces activas y provocar el agotamiento del O<sub>2</sub> del suelo, lo cual genera asfixia radicular (Kozlowski, 1997; Armstrong & Drew, 2002). No obstante, el proceso de inundación puede ser gradual y afectar sólo a una parte del sistema radicular.

La mayoría de las especies frutales arbóreas, incluido el género *Prunus*, se propagan a partir del injerto de la variedad productiva, sobre portainjertos pertenecientes a la misma u otra especie (Webster, 2001; Gillen & Bliss, 2005). La influencia de los portainjertos sobre los cultivares es trascendental, ya que son los responsables de la absorción de agua y nutrientes (Layne, 1987), y pueden determinar, en cierta medida, la tolerancia de los árboles frutales a diferentes tipos de estrés ambiental, como sequía, salinidad, bajas temperaturas e hipoxia (Isaakidis, Sotiropoulos, Almaliotis, Therios, & Stylianidis, 2004; Domingo, Pérez-Pastor, & Ruiz-Sánchez, 2002; Pimentel et al., 2014).

Existen diferentes grados de susceptibilidad a la inundación entre los portainjertos del duraznero (Ranney, 1994; Martinazzo, Perbon, Farias, Bianchi, & Bacarin, 2011; Amador, Sancho, Bielsa, Gomez-Aparisi, & Rubio-Cabetas, 2012; Iacona et al., 2013; Ziegler, Ploschuk, Weibel, & Insausti, 2017), y 'Nemared' (*Prunus persica* (L.) Batsch) es una especie susceptible. Este portainjerto es uno de los más utilizados en durazno, ya que es resistente al nematodo agallador y es compatible con el duraznero, el nectarino y el ciruelo (Ramming & Tanner, 1983). Al igual que ocurre en otras especies

content (Domingo et al., 2002; Martinazzo et al., 2011; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014; Ziegler et al., 2017).

Given the genesis of soil flooding, when this event occurs, it may affect only a part of the radical system. Therefore, the most superficial part of the rhizosphere could be oxygenated. Thus, considering complete or partial (up to the half) flooding of the radical system, this question arises: does flooding stress differentially affect vegetative growth of 'Nemared' peach rootstock plants, and some physiological variables associated with water and carbon balance, under each flooding condition? There is a large amount of information about the negative effects of stress caused by total flooding of roots in peach plants (Domingo et al., 2002; Martinazzo et al., 2011; Pistelli et al., 2012; Iacona et al., 2013; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014; Ziegler et al., 2017). However, there is no information about the effects of a partial flood, half of the radical system, on peach rootstocks. Therefore, the objective of this work was to investigate the physiological and growth response of 'Nemared' rootstock when this covers up to half of the radical system as contrasted with total flood.

## Materials and methods

### Plant material and experimental design

The experiment was carried out in an open field at the Agricultural Experiment Station EEA INTA Junín, in the province of Mendoza (Argentina) during January of 2015. Six-month-old rootstock cv. 'Nemared' (*Prunus persica* [L.] Batsch) was used due to its high susceptibility to total soil flooding (Ziegler et al., 2017). They were obtained through sexual reproduction (Ramming & Tanner, 1983). The rootstocks were transplanted from the nursery row to the pots in July, during winter rest, in open field covered by plastic anti-hail mesh. They grew in plastic pots for six months before starting the different treatments, with the aim of ensuring that the roots occupy the entire volume of the pot.

The selected plants were homogeneous as regards dimensions (height, stem diameter and number of stems) and were placed in 40 L pots containing a mixture of perlite, peat and grape marc (30:35:35, v/v) as substrate. Pots were randomly distributed on the ground using a completely randomized design and they were irrigated regularly. In addition, water-soluble fertilizer containing NPK 15-10-15 with micronutrients chelated in EDTA (Mg-S, B, Cu, Fe, Mn, Zn and Mo) (2-30-0.01-0.02-0.05-0.05-0.02-0.001) was applied once a week during the growing period.

At the beginning of the experiment, plants were 150 cm high (measured on trunk), and the roots occupied the

poco tolerantes a la inundación, la hipoxia radicular afecta al crecimiento de los durazneros injertados sobre portainjertos intolerantes, así como a parámetros fisiológicos relacionados con éste (Iacona et al., 2013), como el potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y el contenido de clorofila foliar (Domingo et al., 2002; Martinazzo et al., 2011; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014; Ziegler et al., 2017).

Dado el origen de la inundación del suelo, cuando ocurre puede afectar sólo una parte del sistema radicular. Por lo tanto, la parte más superficial de la rizosfera podría permanecer oxigenada. Así, considerando la inundación completa o parcial (hasta la mitad) del sistema radicular, surge la pregunta de si el estrés por inundación afecta diferencialmente al crecimiento vegetativo de los portainjertos de duraznero 'Nemared', y a algunas variables fisiológicas asociadas con el balance hídrico y de carbono bajo cada condición de inundación. Al respecto, existe una gran cantidad de información sobre los efectos negativos del estrés por inundación total de raíces en árboles de durazno (Domingo et al., 2002; Martinazzo et al., 2011; Pistelli et al., 2012; Iacona et al., 2013; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014; Ziegler et al., 2017); sin embargo, no existe información sobre los efectos de una inundación parcial (es decir, a la mitad del sistema radicular) en portainjertos de durazno. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta, fisiológica y de crecimiento, del portainjertos 'Nemared' cuando se inunda hasta la mitad del sistema radicular, en contraste con la inundación total.

## Materiales y métodos

### Material vegetativo y diseño experimental

El experimento se condujo en campo a cielo abierto en la Estación Experimental Agrícola EEA INTA Junín, en la provincia de Mendoza (Argentina), durante enero de 2015. Se utilizaron portainjertos de seis meses de edad del cultivar 'Nemared' (*Prunus persica* [L.] Batsch), debido a su alta susceptibilidad a la inundación total del suelo (Ziegler et al., 2017). Los portainjertos se obtuvieron mediante reproducción sexual (Ramming & Tanner, 1983). Se trasplantaron del almácigo a macetas de plástico en julio, durante el descanso de invierno, en campo abierto cubierto por malla anti-granizo de plástico, y se mantuvieron por seis meses antes de iniciar los diferentes tratamientos para asegurar que las raíces ocuparan el volumen total de la maceta.

Las plantas seleccionadas eran homogéneas en términos de dimensiones (altura, diámetro de tallo y número de tallos), y se colocaron en macetas de 40 L con una mezcla de perlita, turba y bagazo de uva (30:35:35, v/v) como sustrato. Las macetas se distribuyeron aleatoriamente en el terreno mediante un diseño completamente aleatorizado, se regaron

entire volume of substrate in the pot. Before starting the experiment, a sample of three plants from each treatment was taken to verify that the roots were homogeneously distributed throughout the volume of the substrate in the pot profile. The treatments were as follows: 1) control, plants irrigated to prevent water stress, 2) half flooded, consisted in maintaining a height of water equivalent to half the height of the pot, and 3) fully-flooded, water level kept at 50 mm above the soil surface. To avoid water loss from flooded pots, they were placed in 50 L containers without drainage. Control tree pots were also placed in 50 L pots, but with drainage. Seven repetitions were used per treatment for a total of 21 plants under trial. Flooding treatment was continuous and lasted for 6 days.

### Physiological measurements

Stomatal conductance ( $g_s$ ) was measured in mature fully expanded leaves located in the middle third of the central axis of each plant. The measurement was performed using a diffusion porometer (Delta T AP4, Delta-T Devices, Cambridge). The water potential ( $\Psi_w$ ) was measured in the same leaf where  $g_s$  was quantified, using a pressure chamber (Bio-Control, Argentina). Leaf chlorophyll content was evaluated using a chlorophyll portable meter (CL-01, Hansatech Instrument Ltd., UK), on five leaves located in similar positions in each plant.

All physiological measurements were performed before starting treatments and at 0, 1, 2, 3 and 4 days after starting the flooding treatment, always between 11:00 am and 2:00 pm. On the fifth and sixth day no physiological measurements were made due to inappropriate weather conditions.

### Growth measurements

Length and diameter of shoots and trunk diameter were measured and related to values at the beginning of the experiment to obtain the cumulative relative growth. The selected shoots were in the same position within the plants. These measurements were made at the beginning of the experiment, 3 and 6 days after the start of flooding treatments using a folding ruler and a digital vernier caliper. The results of the growth measurements were expressed as a percentage of cumulative increase with respect to the initial measurement.

### Environmental variables

At the time when physiological variables were measured, the air vapor pressure deficit (VPD) was calculated using daily data of air temperature and atmospheric relative humidity (%). All measurements were made on sunny days and records of global solar radiation oscillated between 860 y 900  $Wm^{-2}$ . The

regularmente y, una vez a la semana durante el periodo de crecimiento, se fertilizaron con NPK 15-10-15 y micronutrientes quelados en EDTA (Mg-S, B, Cu, Fe, Mn, Zn y Mo) (2-30-0.01-0.02-0.05-0.05-0.02-0.001).

Al inicio del experimento, las plantas contaban con 150 cm de altura (medido en el tronco), y las raíces ocupaban todo el volumen del sustrato en la maceta. Antes de iniciar el experimento, se tomó una muestra de tres plantas de cada tratamiento para verificar que las raíces estuvieran distribuidas homogéneamente a lo largo y ancho del sustrato en el perfil de la maceta. Se establecieron tres tratamientos: 1) testigo (plantas regadas para prevenir estrés hídrico), 2) semi-inundado (plantas con agua a la mitad de la altura de la maceta y 3) completamente inundado (plantas con el nivel de agua a 50 mm por encima de la superficie del sustrato). Para evitar la pérdida de agua en las macetas inundadas, éstas se colocaron en contenedores de 50 L sin drenaje. Las macetas con árboles testigo también se colocaron en contenedores de 50 L, pero con drenaje. Se emplearon siete repeticiones por tratamiento, lo cual dio un total de 21 plantas en observación. El tratamiento de inundación fue continuo y se mantuvo por 6 días.

### Mediciones fisiológicas

La conductancia estomática ( $g_s$ ) se midió en hojas maduras completamente extendidas ubicadas en el tercio medio del eje central de cada planta. La medición se llevó a cabo utilizando un porómetro de difusión (Delta T AP4, Delta-T Devices, Cambridge). El potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) se determinó en la misma hoja donde se cuantificó la  $g_s$ , mediante una cámara de presión (Bio-Control, Argentina). El contenido foliar de clorofila se evaluó con un medidor de clorofila portátil (CL-01, Hansatech Instrument Ltd., RU) sobre cinco hojas ubicadas en alturas similares en cada planta.

Todas las medidas fisiológicas se efectuaron antes de iniciar los tratamientos, así como a los 0, 1, 2, 3 y 4 días después de iniciar el tratamiento de inundación, siempre entre las 11:00 am y las 2:00 pm. En los días 5 y 6 no se hicieron mediciones debido a condiciones climáticas adversas.

### Mediciones de crecimiento

La longitud y el diámetro de los brotes, así como el diámetro del tronco, se midieron y se relacionaron con los valores obtenidos al inicio del experimento para determinar el crecimiento relativo acumulado. Los brotes seleccionados se encontraban en la misma posición en cada planta. Estas mediciones se realizaron al inicio del experimento, así como 3 y 6 días después del inicio de los tratamientos de inundación, con un flexómetro y un vernier digital. Los resultados de las mediciones de crecimiento se expresaron como porcentaje de aumento acumulado respecto de la medición inicial.



data was obtained by using sensors installed in a micro meteorological station (Agrometrix GEA-X1, Agrometrix, Argentina) located in the site where the experiment took place.

### Statistical analysis

Data were analyzed using analysis of variance. Previously, assumptions of normality and homogeneity of variance were verified. To analyze the response variables recorded, a repeated measure test was used (Moser, Saxton, & Pezeshki, 1990) and means were compared using the Tukey test ( $P < 0.001$ ). All results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation.

## Results

### Vapor pressure deficit

On the second day of treatment, the VPD in the atmosphere was 1.5 kPa. This moment coincided with the measurement of the maximum  $g_s$  value in the control treatment. On the other days, the VPD presented similar values of 2.25 kPa.

### Physiological responses

#### *Effect of flooding on stomatal conductance*

Stomatal conductance was significantly different among all treatments ( $P < 0.001$ ) after 1 day from the start of the experiment (Figure 1A). At that time, the reduction of  $g_s$  in half and fully-flooded treatments, in relation to the control, was 65 and 88 % respectively. Likewise, the reduction of  $g_s$  in fully-flooded treatment with respect to half-flooded treatment was 66 %. After 2 days of beginning the flooding treatment,  $g_s$  of both treatments was reduced by 90 % with respect to the control. No further significant differences in the  $g_s$  between the two flood treatments were detected, always with respect to the control.

#### *Effect of flooding on leaf chlorophylls*

Fully and half-flooded treatments significantly reduced chlorophyll content of leaves with respect to control ( $P < 0.001$ ) after 2 and 3 days, respectively (Figure 1B). After 4 days of flooding, chlorophyll content of leaves in half and fully-flooded treatments decreased by 9 and 20 % respectively, in relation to the control. At this moment there were also significant differences ( $P < 0.001$ ) in the leaf chlorophyll content between the two flood treatments.

#### *Effect of flooding on leaf water potential ( $\Psi_w$ )*

Leaf water potential of fully-flooded treatment differed significantly from the control one day after starting the

### Variables medioambientales

Durante el tiempo de medición de las variables fisiológicas, el déficit de presión de vapor del aire (DPV) se calculó con datos diarios de temperatura del aire y humedad relativa atmosférica (%). Todas las mediciones se realizaron en días soleados, y los registros de radiación solar global oscilaron entre 860 y 900  $Wm^{-2}$ . Los datos se obtuvieron a través de sensores instalados en una estación micro-meteorológica (Agrometrix GEA-X1, Agrometrix, Argentina) ubicada en el sitio del experimento.

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se verificaron con antelación. Para analizar las variables respuesta registradas, se utilizó una prueba de medidas repetidas (Moser, Saxton, & Pezeshki, 1990) y una comparación de medias de Tukey ( $P < 0.001$ ). Todos los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

## Resultados

### Déficit de presión de vapor

Durante el segundo día de tratamiento, el DPV en la atmósfera fue de 1.5 kPa. Este momento coincidió con la medición del valor máximo de la  $g_s$  en el tratamiento testigo. En los otros días, el DPV presentó valores similares de 2.25 kPa.

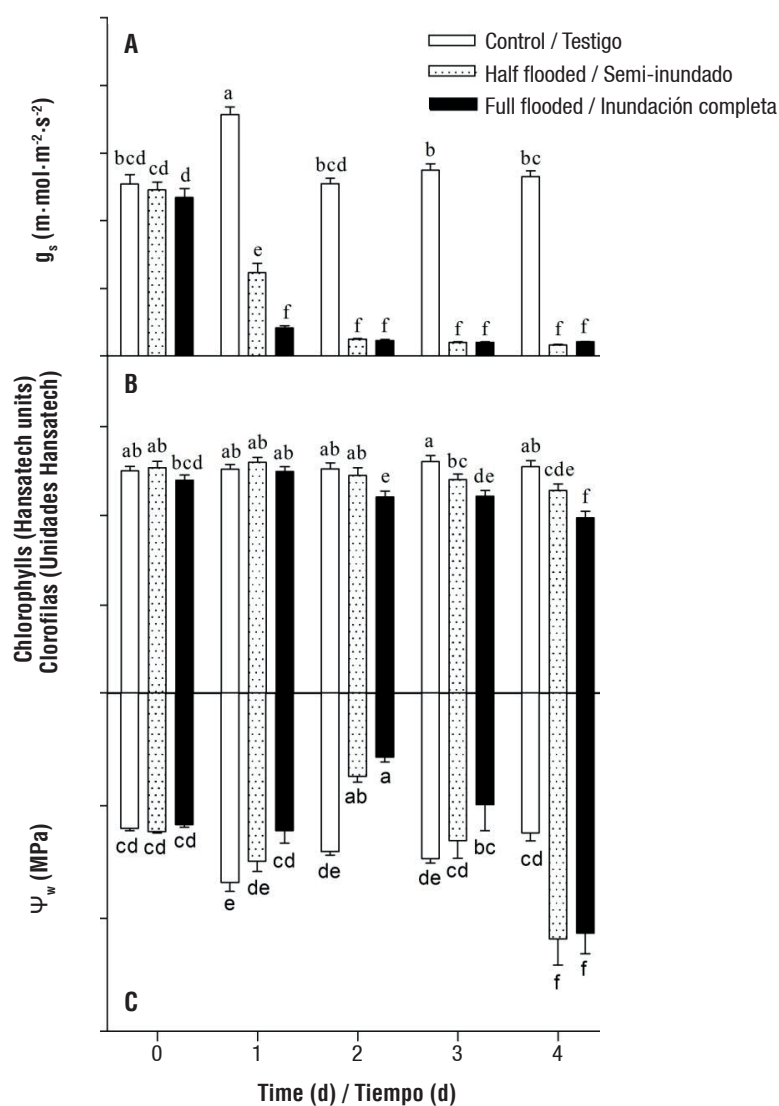
### Respuestas fisiológicas

#### *Efecto de la inundación sobre la conductancia estomática*

La  $g_s$  fue significativamente diferente entre todos los tratamientos ( $P < 0.001$ ) después de 1 día a partir del inicio del experimento (Figura 1A). Para entonces, la reducción de la  $g_s$  en los tratamientos de inundación media y completa, en comparación con el testigo, fue de 65 y 88 %, respectivamente. Asimismo, la reducción de la  $g_s$  en el tratamiento de inundación completa con respecto al de semi-inundación fue de 66 %. Después de 2 días del inicio del tratamiento de inundación, la  $g_s$  de ambos tratamientos se redujo en 90 % con respecto del testigo. No se detectaron más diferencias significativas en la  $g_s$  entre los dos tratamientos, con respecto al testigo.

#### *Efecto de la inundación sobre la clorofila foliar*

Los tratamientos de inundación completa y semi-inundación redujeron significativamente el contenido de clorofila en las hojas con respecto al testigo ( $P < 0.001$ ) después de 2 y 3 días, respectivamente (Figura 1B). Después de 4 días de inundación, el contenido de clorofila de las hojas en los tratamientos



**Figure 1.** A) Stomatal conductance ( $g_s$ ), B) chlorophyll, and C) leaf water potential ( $\Psi_w$ ) of peach rootstock 'Nemared' subjected to three treatments of flooding (control, half and fully flooded) for four days. Error bars indicate standard errors of the means. Different letters indicate significant differences between treatments and between days (Tukey,  $P < 0.001$ ).

**Figura 1.** A) Conductancia estomática ( $g_s$ ), B) clorofila y C) potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) del portainjertos de duraznero 'Nemared' sometido a tres tratamientos de inundación (testigo, semi-inundación e inundación completa) por cuatro días. Las barras de error indican los errores estándar de las medias. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos y entre días (Tukey,  $P < 0.001$ ).

treatment until the end of the experiment ( $P < 0.001$ ) (Figure 1C). While  $\Psi_w$  of half flooding treatment did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) from the control on the first day from the beginning of the experiment, but there were significant differences between both treatments on days 2 ( $P < 0.001$ ). On the third day of the experiment, again only fully-flooded treatment had  $\Psi_w$  values significantly higher than the control ( $P < 0.001$ ), even though stomatal closure was similar for both flood treatments. However, on the fourth day, the  $\Psi_w$  of both flooding treatments was significantly lower compared to the control treatment ( $P < 0.001$ ), without change in  $g_s$ .

de semi-inundación e inundación disminuyó en 9 y 20 % respectivamente, en comparación con el testigo. Para este momento, también hubo diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en el contenido de clorofila foliar entre los dos tratamientos de inundación.

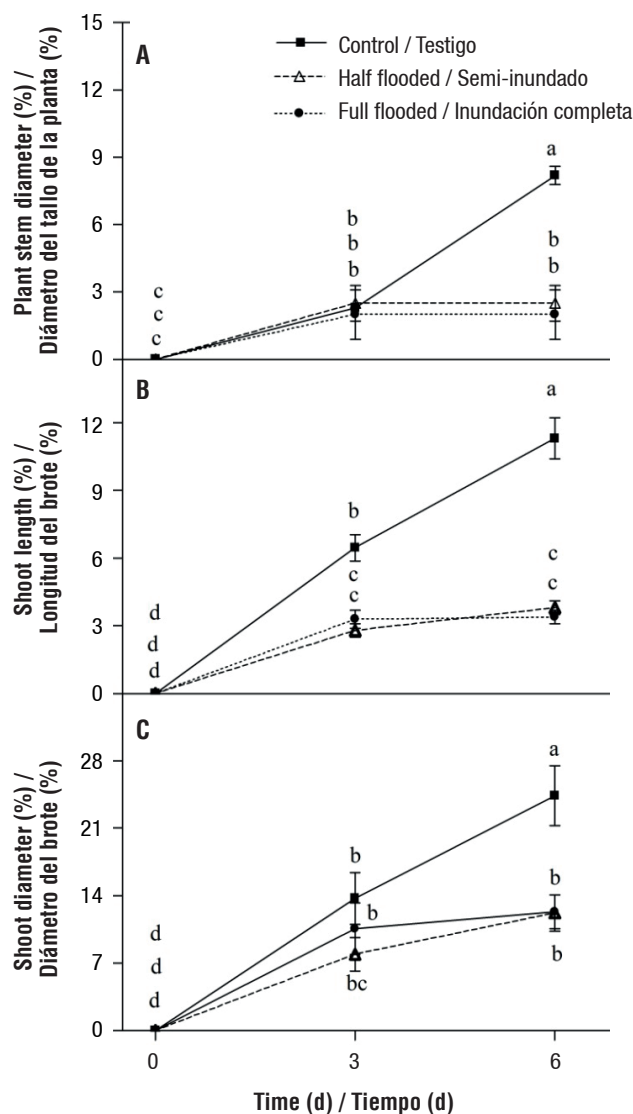
#### *Efecto de la inundación sobre el potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_w$ )*

El  $\Psi_w$  foliar del tratamiento de inundación completa difirió significativamente del testigo un día después de iniciar el tratamiento hasta el final del experimento ( $P < 0.001$ ) (Figura 1C). Mientras que

### Effect of flooding on plant growth

The accumulated growth in trunk diameter in both flooding treatments was significantly lower ( $P < 0.001$ ) with respect to the control plants on the sixth day of treatment (Figure 2A). However, there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in this growth variable between both flooding treatments (Figure 2A). The accumulated growth in shoot length was significantly lower in both flooding treatments compared to the control ( $P < 0.001$ ) on the third and sixth day of treatment, with no difference between

el  $\Psi_w$  del tratamiento semi-inundado no difirió significativamente ( $P > 0.05$ ) del testigo el primer día desde el inicio del experimento, pero hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos a los 2 días ( $P < 0.001$ ). El tercer día del experimento, nuevamente el tratamiento de inundación total tuvo valores de  $\Psi_w$  significativamente superiores al testigo ( $P < 0.001$ ), aunque el cierre estomático fue similar para ambos tratamientos de inundación. No obstante, en el cuarto día, el  $\Psi_w$  de ambos tratamientos de inundación fue significativamente menor en comparación con el testigo ( $P < 0.001$ ), sin cambios en la  $g_s$ .



**Figure 2.** A) Cumulative growth expressed as a percentage of cumulative increase with respect to the initial measurement of plant stem diameter, B) shoot length, and C) shoot diameter, of peach rootstock 'Nemared' subjected to three treatments of flooding (control, half and fully flooded) for six days. Error bars indicate standard errors of the means. Different letters indicate significant differences between days treatments and between days (Tukey,  $P < 0.001$ ).

**Figura 2.** A) Crecimiento acumulado expresado como porcentaje de incremento acumulado con respecto de la medición inicial del diámetro de tallo de la planta, B) longitud del brote y C) diámetro del brote, de portainjertos del duraznero 'Nemared' bajo tres tratamientos de inundación (testigo, semi-inundado y completamente inundado) durante seis días. Las barras de error indican los errores estándar de las medias. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos y entre los días (Tukey,  $P < 0.001$ ).

them (Figure 2B). The accumulated growth in shoot diameter in both flooding treatments was significantly lower than the control ( $P < 0.001$ ) on the sixth day of flooding, without differences between the two flooding levels (Figure 2C). The control treatment plants had an accumulation of stem diameter, shoot length and diameter of 73, 72 and 62 %, respectively, compared to flood treatments.

## Discussion

'Nemared' peach rootstock is very susceptible to soil flooding and, like other rootstocks from *Prunus persica*, it decays when planted on soils with flood episodes, and even dies if the stress persists over time (Andersen, Lombard, & Westwood, 1984; Ranney, 1994; Insausti & Gorjón, 2013; Ziegler et al., 2017). The fast-negative response to flooding recorded in this work coincides with the results obtained by Ziegler et al. (2017). However, in some variables, there is a differential behavior, whether the flood was full or half.

Stomatal conductance was the most rapidly affected variable in response to flooding (within the first 24 h). However,  $g_s$  of half flooded plants were 2.5 times greater than the fully-flooded ones. Probably soil oxygenation, with half of the radical system unaltered, was the cause of the differential response between both flood treatments. However, this result shows that the stomatal sensitivity of this rootstock to soil flooding is high, since flooding of only half of the radical system was sufficient to cause, within the first 24 h, a stomatal opening three times lower than the control.

According to our results,  $\Psi_w$  of both flood treatments increased after 48 h, achieving the highest values for both flood treatments. Therefore, it is assumed that water absorption by roots was not affected during the first two days of flooding. The high values of  $\Psi_w$ , together with lower values of  $g_s$ , suggest that stomatal closure was not a consequence of a hydraulic signal, but it was due to an anticipated response of another type, for example hormonal, which was generated as a consequence of a flood effect. This hypothesis should be tested, however, it is clear that the rapid response of stomata is due to greater speed in the signal-response mechanism that modulates stomata conductance (Vreeburg, Benschop, Peeters, Colmer, & Ammerlaan, 2005).

However, from the third day, the trend of the  $\Psi_w$  changed and the lowest values for flooding treatments were recorded on the fourth day, with a significantly highest value in the control. This change in water potential response, without changes in  $g_s$  or other factors that would be affected by water balance, it could be due to the fact that, after that period, the absorption

## Efecto de la inundación sobre el crecimiento de la planta

El crecimiento acumulado en el diámetro del tronco en ambos tratamientos de inundación fue significativamente ( $P < 0.001$ ) más bajo con respecto a las plantas testigo el sexto día de tratamiento (Figura 2A). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en esta variable de crecimiento entre ambos tratamientos de inundación (Figura 2A). En cuanto al crecimiento acumulado en longitud de brote, éste fue significativamente menor en ambos tratamientos de inundación en comparación con el testigo ( $P < 0.001$ ) en el tercero y sexto días de tratamiento, sin diferencias entre ellos (Figura 2B). El crecimiento acumulado en diámetro de brotes en ambos tratamientos de inundación fue significativamente menor que el del testigo ( $P < 0.001$ ) en el sexto día de inundación, sin diferencias entre los dos niveles de inundación (Figura 2C). Las plantas del tratamiento testigo presentaron una acumulación de diámetro de tallo, longitud y diámetro del brote de 73, 72 y 62 %, respectivamente, en comparación con los tratamientos de inundación.

## Discusión

El portainjertos de durazno 'Nemared' es altamente susceptible a la inundación del terreno y, como otros portainjertos de *Prunus persica*, decae cuando se planta en suelos con eventos de inundación, e incluso muere si el estrés persiste con el tiempo (Andersen, Lombard, & Westwood, 1984; Ranney, 1994; Insausti & Gorjón, 2013; Ziegler et al., 2017). La respuesta negativa, casi inmediata, a la inundación registrada en este estudio coincide con los resultados de Ziegler et al. (2017); sin embargo, en algunas variables, existe un comportamiento diferenciado, ya sea que la inundación sea completa o media.

La  $g_s$  fue la primer variable afectada como respuesta a la inundación (dentro de las primeras 24 h). No obstante, la  $g_s$  de las plantas en semi-inundación fue 2.5 veces mayor que la de las inundadas completamente. Probablemente, la oxigenación del suelo, con la mitad del sistema radicular inalterado, fue la causa de esa respuesta diferenciada entre ambos tratamientos de inundación. Este resultado muestra que la sensibilidad estomática del portainjertos analizado a la inundación del suelo es alta, ya que la semi-inundación del sistema radicular fue suficiente para causar, dentro de las primeras 24 h, una apertura estomática tres veces más baja que la del testigo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el  $\Psi_w$  de ambos tratamientos de inundación incrementó después de 48 h; por ende, se asume que la absorción de agua por las raíces no fue afectada durante los primeros dos días de inundación. Los valores más altos del  $\Psi_w$ ,



of water by roots in both treatments could have been affected by flood itself. The negative effect of floods on the functioning of aquaporins in root cell membranes is well known (Tournaire-Roux et al., 2003; Tan et al., 2018) and so is their effect on water absorption.

On the other hand, a significantly greater stoma opening in the control plants was evident after 24 hours of the beginning of the experiment, with respect to the same treatment in the rest of the days. This answer can be explained as a consequence of the lower value of VPD that day. This effect of VPD on  $g_s$  is widely known (Lambers, Chapin, & Pons, 2008).

Chlorophyll degradation responds to the level of flooding, being maximum with fully-flooded, and intermediate with half-flooded treatment. However, the response to flooding was very fast compared to data from other authors (Martinazzo et al., 2011; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014). Chlorophyll degradation is an active and progressive process that is regulated by various internal development and environmental factors and is mainly mediated by hormone signaling (Koyama, 2014), among which ethylene plays a very important role (Yin et al., 2016). During a flood, ethylene accelerates the degradation of chlorophyll by expressing the yellow coloration in the leaf mesophyll (Jiang, Cao, Dai, & Jing, 2003; Barnawal, Bharti, Maji, Chanotiya, & Kalra, 2012; Chen et al., 2016). When soil flooding only affects a percentage of the roots, it is likely that the mechanisms involved in the degradation of ethylene-mediated chlorophyll, which underlies the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid generated in the flooded root area, may have been affected by unflooded ground oxygen (Ahmed, Nawata, & Sakuratani, 2006).

In relation to vegetative growth, it is widely known that this is rapidly affected in flood situations (Domingo et al., 2002; Iacona et al., 2013; Insausti & Gorjón, 2013; Ziegler et al., 2017). According to the results of this experiment, this response occurred at both levels of flooding, when the physiological variables evaluated, which are related to it, were affected. Vegetative growth necessarily requires a combination of cell division and expansion (Lambers et al., 2008). Water potential is the hydraulic force that, through its pressure component, participates in the cell expansion process (Lambers et al., 2008). There are previous works that have reported that floods affect cell expansion in many species (Setter & Laureles, 1996; Voesenek & Blom, 1999) through their effect on the elasticity of cell wall (Cosgrove, 1993, 2005). Hydraulic changes and stomatal closure, together with lower chlorophyll content in the leaves, which may have affected photosynthesis of flooded plants, could be the main causes of the lower final growth in diameter and elongation of the branches, as well as the stem thickening.

junto con los valores más bajos de la  $g_s$ , sugieren que el cierre estomático no fue consecuencia de una señal hidráulica, sino que se debió a una respuesta anticipada de otro tipo, como hormonal, la cual se generó como una consecuencia de la inundación. Esta hipótesis debería someterse a prueba; sin embargo, es claro que la respuesta rápida de los estomas se debe al aumento en la velocidad del mecanismo de señal-respuesta que modula la conductancia estomática (Vreeburg, Benschop, Peeters, Colmer, & Ammerlaan, 2005).

A pesar de lo anterior, a partir del tercer día la tendencia del  $\Psi_w$  cambió y los valores más bajos en los tratamientos de inundación se presentaron en el cuarto día, con un valor significativamente más alto en el testigo. Dicha variación en la respuesta del  $\Psi_w$ , sin cambios en la  $g_s$  u otros factores que hubieran sido afectados por el balance hídrico, se podría deber a que, después de ese periodo, la absorción de agua por las raíces en ambos tratamientos pudo haber sido afectada por la propia inundación. El efecto negativo de las inundaciones sobre el funcionamiento de las aquaporinas en las membranas celulares de la raíz es ampliamente conocido (Tournaire-Roux et al., 2003; Tan et al., 2018), y también lo es su efecto sobre la absorción del agua.

Por otra parte, una apertura estomática significativamente mayor en las plantas testigo se hizo evidente después de 24 h del inicio del experimento; esto con respecto al mismo tratamiento durante los otros días. Dicha respuesta se puede explicar como una consecuencia del menor valor del DPV de ese día. El efecto del DPV sobre la  $g_s$  es ampliamente conocido (Lambers, Chapin, & Pons, 2008).

La degradación de la clorofila responde al nivel de inundación, ya que su nivel máximo se presentó con inundación completa, y el intermedio con semi-inundación. No obstante, la respuesta a la inundación fue muy rápida comparada con datos de otros autores (Martinazzo et al., 2011; Insausti & Gorjon, 2013; Pimentel et al., 2014). La degradación de la clorofila es un proceso activo y progresivo que se regula por varios factores internos de desarrollo y medioambientales, y es mediada, principalmente, por señalización hormonal (Koyama, 2014), de entre las cuales el etileno desempeña un papel muy importante (Yin et al., 2016). Durante una inundación, el etileno acelera la degradación de la clorofila, con lo cual se expresa la coloración amarilla en el mesófilo de la hoja (Jiang, Cao, Dai, & Jing, 2003; Barnawal, Bharti, Maji, Chanotiya, & Kalra, 2012; Chen et al., 2016). Cuando la inundación del suelo sólo afecta un porcentaje de las raíces, es probable que los mecanismos involucrados en la degradación de la clorofila mediada por etileno, que subyace al ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico generado en el área radicular inundada, pudieran haber sido afectados por el oxígeno del suelo no inundado (Ahmed, Nawata, & Sakuratani, 2006).

## Conclusion

According to our results, the effect of flooding on the 'Nemared' rootstock can occur during total floods and with some variations, also during half floods. This response should be tested at crop level. The importance of this fact is that the occurrence of a half flood goes unnoticed because it affects the lower part of the radical system. This is frequent that occurs when the water table rises, even for a short period of time, because of flood or excessive irrigation.

End of English version

## References / Referencias

- Ahmed, S., Nawata, E., & Sakuratani, T. (2006). Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 57(3), 278-284. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.06.006
- Amador, M. L., Sancho, S., Bielsa, B., Gomez-Aparisi, J., & Rubio-Cabetas, M. J. (2012). Physiological and biochemical parameters controlling waterlogging stress tolerance in *Prunus* before and after drainage. *Physiologia Plantarum*, 144(4), 357-368. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01568.x
- Andersen, P. C., Lombard, P. B., & Westwood, M. N. (1984). Leaf conductance, growth, and survival of willow and deciduous fruit tree species under flooded soil conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(2), 132-138. doi: 10.21273/JASHS.109.2.132
- Armstrong, W., & Drew, M. C. (2002). Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel, Y., Eshel, A., & Kafkafi, U. (Eds.), *Plant roots: The hidden half* (pp. 729-761). New York, USA: Marcel Dekker Publishing.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C., & Kalra, A. (2012). 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 227-235. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.008
- Chen, W., Yao, Q., Patil, G., Agarwal, G., Deshmukh, D., Lin, L., Wang, B., Wang, Y., Prince, S., Song, L., Xu, D., An, Y., Valliyodan, B., Varshney, R., & Nguyen, H. (2016). Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1044. doi: 10.3389/fpls.2016.01044
- Cosgrove, D. J. (1993). Wall extensibility: its nature, measurement, and relationship to plant cell growth. *New Phytologist*, 124(1), 1-23. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03795.x

En cuanto al crecimiento vegetativo, se sabe que éste es afectado rápidamente en ambientes inundados (Domingo et al., 2002; Iacona et al., 2013; Insausti & Gorjón, 2013; Ziegler et al., 2017). De acuerdo con los resultados de este experimento, esta respuesta se presentó en ambos niveles de inundación cuando las variables fisiológicas evaluadas, que se relacionan con él, fueron afectadas. El crecimiento vegetativo requiere necesariamente una combinación de división y expansión celular (Lambers et al., 2008). El  $\Psi_w$  es la fuerza hidráulica que, mediante su componente de presión, participa en el proceso de expansión celular (Lambers et al., 2008). Existen trabajos previos que reportan que las inundaciones afectan la expansión celular en muchas especies (Setter & Laureles, 1996; Voesenek & Blom, 1999) a través de su efecto sobre la elasticidad de la pared celular (Cosgrove, 1993, 2005). Los cambios hidráulicos y el cierre estomático, junto con el menor contenido de clorofila en las hojas (que podría haber afectado la fotosíntesis de las plantas inundadas), pudieron ser las principales causas del menor crecimiento final en diámetro y alargamiento de las ramas, así como del engrosamiento del tallo.

## Conclusión

De acuerdo con los resultados, el efecto de la inundación en el portainjertos 'Nemared' puede ocurrir durante inundaciones totales y, con algunas variantes, en inundaciones parciales. Esta respuesta se debería someter a pruebas a nivel de cultivo. La importancia de lo obtenido en este estudio es que la respuesta correspondiente a la inundación parcial pasa desapercibida porque afecta a la parte baja del sistema radicular. Esto ocurre frecuentemente cuando el nivel freático se eleva durante un breve periodo, debido a inundación o a riego excesivo.

Fin de la versión en español

- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 850-861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Domingo, R., Pérez-Pastor, A., & Ruiz-Sánchez, M. C. (2002). Physiological responses of apricot plants grafted on two different rootstocks to flooding conditions. *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 725-732. doi: 10.1078/0176-1617-0670
- Ganskopp, D. C. (1986). Tolerances of sagebrush, rabbitbrush, and greasewood to elevated water tables. *Journal of Range Management*, 39, 334-337. doi: 10.2307/3899774
- Gillen, A., & Bliss, A. (2005). Identification and mapping of markers linked to the *Mi* gene for root-knot nematode resistance in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(1), 24-33. doi: 10.21273/JASHS.130.1.24

- Iacona, C., Cirilli, M., Zegab, A., Frioni, E., Silvestri, C., & Muleo, R. (2013). A somaclonal myrobalon rootstock increases waterlogging tolerance to peach cultivar in controlled conditions. *Scientia Horticulturae*, 156, 1-8. doi: 10.1016/j.scienta.2013.03.014
- Insausti, P., & Gorjon, S. (2013). Floods affect physiological and growth variables of peach trees (*Prunus persica* (L.) Batsch), as well as the postharvest behavior of fruits. *Scientia Horticulturae*, 152, 56-60. doi: 10.1016/j.scienta.2013.01.005
- Isaakidis, A., Sotiropoulos, T., Almaliotis, D., Therios, I., & Stylianidis, D. (2004). Response to severe water stress of the almond (*Prunus amygdalus*) 'Ferragnes' grafted on eight rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32(4), 355-362. doi: 10.1080/01140671.2004.9514316
- Jiang, D., Cao, W. X., Dai, T. B., & Jing, Q. (2003). Activities of key enzymes for starch synthesis in relation to growth of superior and inferior grains on winter wheat (*Triticum aestivum* L.) spike. *Plant Growth Regulation*, 41, 247-257. doi: 10.1023/B:GROW.0000007500.90240.7d
- Koyama, T. (2014). The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-8. doi: 10.3389/fpls.2014.00650
- Kozłowski, T. T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 17(7), 1-29. doi: 10.1093/treephys/17.7.490
- Lambers, H., Chapin, F., & Pons, T. L. (2008). *Plant physiological ecology*. New York, USA: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-1-4757-2855-2
- Layne, R. E. (1987). Peach rootstocks. In: Rom, R. C., & Carlson, R.F. (Eds.), *Rootstocks for fruit crops* (pp. 185-216). USA: Wiley Interscience.
- Loreti, E., van Veen, H., & Perat, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 64-71. doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.005
- Martinazzo, E. G., Perbon, A. T., Farias, M. E., Bianchi, V. J., & Bacarin, M. A. (2011). Photosynthetic activity in the rootstock of hybrid peach trees submitted to water restriction and flooding. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(3), 231-236. doi: 10.1590/S1677-04202011000300007
- Moser, E. B., Saxton, A. M., & Pezeshki, S. R. (1990). Repeated measures analysis of variance: application to tree research. *Canadian Journal of Forest Research*, 20, 524-535. doi: 10.1139/x90-069
- Naumburg, E., Mata-González, R., Hunter, R., McLendon, T., & Martin, D. (2005). Phreatophytic vegetation and groundwater fluctuations: A review of current research and application of ecosystem response modeling with an emphasis on great basin vegetation. *Journal of Environmental Management*, 35, 726-740. doi: 10.1007/s00267-004-0194-7
- Pimentel, P., Almada, R. D., Salvatierra, A., Toroa, G., Arismendi, M. J., Pino, M. T., Sagredo, B., & Pinto, M. (2014). Physiological and morphological responses of *Prunus* species with different degree of tolerance to long-term root hypoxia. *Scientia Horticulturae*, 180, 14-23. doi: 10.1016/j.scienta.2014.09.055
- Pistelli, L., Iacona, C., Miano, D., Cirilli, M., Colao, M. C., Mensuali-Sodi, A., & Muleo, R. (2012). Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. *Tree Physiology*, 32(3), 355-368. doi: 10.1093/treephys/tpr135
- Ramming, D. W., & Tanner, O. (1983). 'Nemared' peach rootstock. *HortScience*, 18(3), 376.
- Ranney, T. G. (1994). Differential tolerance of eleven *Prunus* taxa to root zone flooding. *Journal of Environmental Horticulture*, 12(3), 138-141. doi: 10.24266/0738-2898-12.3.138
- Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. (2015). Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiology*, 169(1), 3-12. doi: 10.1104/pp.15.00387
- Setter, T. L., & Laureles, E. V. (1996). The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice. *Journal of Experimental Botany*, 47(10), 1551-1559. doi: 10.1093/jxb/47.10.1551
- Stromberg, C. J. (2001). Restoration of riparian vegetation in the south-western United States: Importance of flow regimes and fluvial dynamism. *Journal of Arid Environments*, 49(1), 17-34. doi: 10.1006/jare.2001.0833
- Tan, X., Xu, H., Khan, S., Equiza, M. A., Lee, S. H., Vaziriyeganeh, M., & Zwiazek, J. J. (2018). Plant water transport and aquaporins in oxygen-deprived environments. *Plant Physiology*, 227, 20-30. doi: 10.1016/j.jplph.2018.05.003
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Lu, D. T., Richard-Bligny, R., & Maurel, C. (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425, 393-397. doi: 10.1038/nature01853
- Voesenek, L. A., & Blom, C. W. (1999). Stimulated shoot elongation: a mechanism of semiaquatic plants to avoid submergence stress. In Lerner, H. R. (Ed.), *Plant responses to environmental stress: from phytohormones to genome reorganization* (pp. 431-448). New York, USA: Marcel Dekker. doi: 10.1201/9780203743157
- Vreeburg, R. A., Benschop, J. J., Peeters, A. J., Colmer, T. D., & Ammerlaan, A. H. (2005). Ethylene regulates fast apoplastic acidification and expansin. A transcription during submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris*. *Plant Journal*, 43(4), 597-610. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02477.x
- Webster, D. A. (2001). Rootstocks for temperate fruit crops: Current uses, future potential and alternative strategies. *Acta Horticulturae*, 557, 25-34. doi: 10.17660/ActaHortic.2001.557.1
- Yin, X. R., Xie, X. L., Xia, X. J., Yu, J. Q., Ferguson, I. B., & Giovannoni, J. J. (2016). Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. *Plant Journal*, 86(5), 403-412. doi: 10.1111/tpj.13178
- Ziegler, V. H., Ploschuk, E. L., Weibel, M. A., & Insausti, P. (2017). Short-term responses to flooding stress of three *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 224, 135-141. doi: 10.1016/j.scienta.2017.06.009