

## EFEITOS DE TAXAS DE IMPOSIÇÃO E SEVERIDADE DO DÉFICIT HÍDRICO SOBRE A FOTOSSÍNTESE EM FOLHAS DE *Coffea canephora*

Cláudio P. RONCHI<sup>1</sup> E-mail: ronchiap@yahoo.com.br, Ângela Ten CATEN<sup>1</sup>; Gustavo B. K. MORAES<sup>1</sup>; Karine D. BATISTA<sup>1</sup>; Agnaldo R. M. CHAVES<sup>1</sup> e Fábio M. DaMATTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36571-000

### Resumo:

Mudas de *Coffea canephora*, clone 109A, foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a duas taxas de imposição do déficit hídrico, utilizando-se, para isso, de vasos de diferentes volumes: 6 L, taxa rápida; e 24 L, taxa lenta. As amostragens e medições foram feitas quando as plantas atingiram um potencial hídrico de antemã de aproximadamente -2,0 MPa (déficit moderado) e -4,0 MPa (déficit severo), sendo necessário, para isso, 4 e 6 dias nas plantas dos vasos de 6 L, e 12 e 17 dias naquelas dos vasos de 24 L, respectivamente, após a suspender-se a irrigação. Avaliaram-se as trocas gasosas, parâmetros de fluorescência, concentrações de pigmentos e de prolina, e danos celulares (extravazamento de eletrólitos). Os tratamentos não afetaram as concentrações de pigmentos. Pequenas alterações nos parâmetros de fluorescência foram observadas apenas em plantas sob déficit severo, imposto lentamente. Sob déficit severo, os níveis de prolina aumentaram 31 e 212%, em relação às plantas-controle, nas plantas dos vasos pequenos e grandes, respectivamente; enquanto os danos celulares aumentaram em média 239%, em relação às plantas-controle, independente do tamanho do vaso. A taxa fotossintética, a condutância estomática e a transpiração reduziram-se com a severidade do déficit, sem, contudo, que alterações expressivas fossem observadas nesses parâmetros em função das diferentes taxas de imposição do déficit hídrico.

Palavras-chave: fluorescência da clorofila, café, trocas gasosas, tamanho de vaso

### EFFECTS OF RATE OF PROGRESSION AND SEVERITY OF WATER DEFICIT ON PHOTOSYNTHESIS IN *Coffea canephora* LEAVES

#### Abstract:

Seedlings of *Coffea canephora*, clone 109A, grown under greenhouse conditions, were grown in pots containing either 6- or 24-L of substrate, which allowed, respectively, two rates of progression of water deficit after withholding irrigation. All samplings and measurements were performed when predawn leaf water potential approximately -2.0 (moderate water deficit) and -3.0 MPa (severe water deficit) was reached. This was achieved at 4 and 6 days, or at 12 and 17 days after suspending irrigation, respectively, in plants grown in small and large pots. Leaf gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence parameters, pigments and proline concentrations, and cellular damages (electrolyte leakage) were evaluated. Pigment concentrations were not affected by treatments. Little changes in chlorophyll *a* fluorescence were observed, but only in plants submitted to severe slowly imposed water deficit. Under severe water deficit, proline levels increased by 31 and 212%, compared to those of control plants, in the plants of small and large pots, respectively; whereas cellular damage increase by about 239%, compared to those of control plants, irrespective of pot size. Photosynthetic rates, stomatal conductance and leaf transpiration decreased with rising water deficit severity, although only minor changes were detected in those parameters in response to the rates of water deficit progression.

Key words: chlorophyll fluorescence, coffee, gas exchange, pot size.

#### Introdução

A maioria dos experimentos em fisiologia vegetal, como em muitas outras áreas afins, geralmente requer controle das condições ambientais. Por essa razão, frequentemente, os experimentos são realizados com plantas cultivadas em pequenos vasos, mantidos dentro de câmaras de crescimento e, ou, casa de vegetação. Apesar das vantagens, o cultivo em vasos pode levar à formação de plantas com volume radicular reduzido, quando comparado àquele formado no campo ou mesmo em plantas cultivadas em vasos grandes (Townend e Dickinson, 1995), alterando-se, assim, a relação fonte:dreno; principalmente em plantas submetidas ao estresse hídrico.

Poucos trabalhos consideram a possibilidade do tamanho do vaso influenciar a sensibilidade das plantas à taxa de imposição do déficit hídrico. O tamanho do vaso tem grande influência na quantidade de água disponível às plantas nele cultivadas. Obviamente, vasos menores se traduzem em menor disponibilidade global de água, acarretando, portanto, imposição mais rápida do déficit hídrico (Will e Teskey, 1997; Ray e Sinclair, 1998). Segundo Jones e Rawson (1979), a imposição de níveis realísticos de déficit hídrico é difícil, particularmente nos pequenos vasos, com observações largamente dependentes da taxa de desenvolvimento do déficit

A taxa de desenvolvimento do déficit pode ter importantes implicações no crescimento das plantas: se for muito elevada, em toda a zona radicular, como frequentemente observado em vasos pequenos, pode causar estresse hídrico irreversível à planta e, possivelmente, a morte de porção considerável de raízes. Em situação oposta, quando o déficit é imposto lentamente, as plantas podem destinar grande proporção de seus fotoassimilados à produção de raízes para retirar

água em regiões mais profundas no perfil do solo e, também, de proteger as raízes nas regiões (superficiais) mais secas do solo, por meio da suberização (Townend e Dickinson, 1995). Ainda, se o déficit progredir lentamente, é possível que a planta tenha tempo de expressar seus atributos adaptativos à seca, investindo, por exemplo, em mecanismos para dissipação do excesso de energia de excitação sobre a cadeia fotossintética de transporte de elétrons, comumente observado sob condições de seca, reduzindo, portanto, os riscos da ocorrência de danos fotooxidativos (Ort e Baker, 2002), ou promovendo o ajustamento osmótico, para retardar a desidratação (Lawlor e Cornic, 2002).

No Brasil, a maior parte das lavouras de café Canéfora vem sendo formada, nos últimos anos, a partir de mudas clonais, selecionadas de matrizes normalmente cultivadas sob irrigação. Os clones assim obtidos, uma vez conduzidos com restrição hídrica, exibem grande variabilidade quanto a tolerância à seca (DaMatta et al., 2003). Resultados contrastantes de Lima et al. (2002) e Pinheiro (2004), obtidos em clones de café Canéfora submetidos à seca, sugerem respostas diferenciais de aclimação da maquinaria fotossintética ao tamanho do vaso de cultivo e, portanto, à taxa de imposição do déficit hídrico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a aclimação da maquinaria fotossintética a taxas diferenciais de imposição do déficit hídrico, em *C. canephora*.

## Material e Métodos

Mudas de *Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*, clone 109A, com cinco pares de folhas, obtidos no Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, foram plantadas e cultivadas em vasos de volumes diferentes (6 e 24 L), em Viçosa, MG (20°45'S, altitude de 650 m), sob fluxo de fótons fotossintéticos médio de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ao meio-dia. Uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1, v/v/v), fertilizada (para cada 1  $\text{m}^3$ ) com 0,437 kg de P, 0,143 kg de K e 1,0 kg de calcário dolomítico foi usada para enchimento dos vasos. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, cujas laterais permitiam que a troca de ar entre o exterior e o interior da mesma ocorresse livremente. Após 11 meses de cultivo (Setembro de 2004), as plantas foram separadas em dois grupos, sendo cada grupo constituído por 10 plantas; cinco para cada tamanho de vaso. Um grupo foi mantido sob irrigação periódica (controle) e outro, sob déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem um potencial hídrico de antemã ( $\Psi_{\text{am}}$ ) de, aproximadamente, -2,0 e -4,0 MPa (medidos com uma bomba de pressão tipo Scholander), caracterizando, portanto, dois níveis de déficit, moderado e severo, respectivamente. Os dois níveis de déficit foram atingidos aos 4 e 6 dias nas plantas dos vasos de 6 L, e apenas aos 12 e 17 dias naquelas dos vasos de 24 L, respectivamente, após suspender-se a irrigação. Obeve-se, então, duas taxas de imposição do déficit hídrico: rápida, nos vasos pequenos, e lenta, nos vasos grandes.

Utilizou-se do delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (dois tamanhos de vasos ou duas taxas de imposição do déficit hídrico, dois níveis de déficit e dois regimes hídricos), com cinco repetições. Cada unidade experimental consistiu de uma planta por vaso. Uma vez atingido o nível de déficit desejado, avaliaram-se as trocas gasosas e vários parâmetros de fluorescência, entre 07:00 e 08:30 h, nas plantas de ambos os tamanhos de vasos e regimes hídricos. As taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e razão entre concentrações interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram medidas em sistema aberto, sob luz saturante artificial (1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração de  $\text{CO}_2$  ambiente e temperatura constante de 25°C, com analisador de gás a infravermelho (IRGA) portátil (LICOR 6400, Li-COR, Nebraska, USA). Os parâmetros de fluorescência da clorofila  $a$  foram medidos usando-se fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), máxima eficiência fotoquímica do FSII ( $F_v/F_m$ ), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII ( $F_v'/F_m'$ ), coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_p$ ), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\phi_{\text{FSII}}$ ), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e a fração de energia absorvida que não foi utilizada nem na fotoquímica nem dissipada termicamente ( $P_E$ ) foram estimadas exatamente como descrito em Lima et al. (2002) e DaMatta et al. (2002). Procedeu-se, ainda, paralelamente às medições, à coleta de material vegetal para determinação dos níveis foliares de clorofilas e carotenóides (Lichtenthaler, 1987) e de prolina (Bates et al., 1973), além da quantificação dos danos celulares pelo extravazamento de eletrólitos (Lima et al., 2002), em discos foliares coletados ao meio-dia. Tanto as medições como as coletas foram realizadas em folhas completamente expandidas de ramos plagiotrópicos do terço superior das plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Mudas de café Canéfora (clone 109A) foram submetidas ao estresse hídrico progressivo até que o  $\Psi_{\text{am}}$  atingisse -4,0 MPa. Em função dos diferentes tamanhos de vaso utilizados, foi possível obter-se duas taxas de imposição do déficit hídrico: nos vasos pequenos (6 L), o declínio em  $\Psi_{\text{am}}$ , após suspensão da irrigação, ocorreu rapidamente (667  $\text{kPa d}^{-1}$ ), e mais lentamente, nos vasos grandes (235  $\text{kPa d}^{-1}$ ).

Nas plantas dos vasos pequenos, nas quais a taxa de imposição do déficit hídrico foi rápida, houve redução em  $A$  de 39 e 100%, sob déficit moderado (-2,0 MPa) e severo (-4,0 MPa), respectivamente, quando comparadas às plantas-controle; enquanto nas plantas dos vasos grandes, portanto submetidas a uma imposição mais baixa do déficit hídrico, verificaram-se reduções em  $A$  de 49 e 91%, sob déficit moderado e severo, respectivamente (Figura 1a). Nos vasos grandes, as reduções observadas em  $A$  nas plantas sob déficit hídrico foram semelhantes àquelas obtidas por Pinheiro (2004), em plantas do clone 109A submetidas a taxas de imposição do déficit ainda menores (155  $\text{kPa d}^{-1}$ ) que a do presente experimento (235  $\text{kPa d}^{-1}$ ). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas em  $A$  entre os tamanhos de vasos,

para um dado nível de déficit, nas plantas sob déficit severo  $A$  foi virtualmente suprimida ( $-0,07 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos vasos pequenos, mas permaneceu baixa, porém positiva ( $0,67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nas plantas dos vasos grandes (Figura 1a). Respostas similares foram observadas para  $g_s$  e  $E$  (Figura 1b e 1c). Os resultados presentes corroboram informações anteriores: a  $\Psi_{\text{am}}$  de  $-3,0 \text{ MPa}$ ,  $A$  foi suprimida ( $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no sexto dia de déficit) em plantas do clone 109A quando cultivadas em vaso de 6 L (Lima et al., 2002), porém permaneceu a taxas consideráveis ( $2,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no 19º dia de déficit) quando cultivadas em tambores de 120 L (Pinheiro, 2004). Não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na razão  $C_i/C_a$  entre plantas de diferentes tamanhos de vasos, independente do nível de déficit; entretanto, para ambos os tamanhos de vaso, as plantas sob déficit hídrico severo apresentaram maior razão  $C_i/C_a$  que aquelas sob déficit moderado (Figura 1d). Ainda, nas plantas sob déficit severo e lento, a razão  $C_i/C_a$  aumentou em relação à observada em plantas irrigadas (Figura 1d).

Apesar da drástica redução em  $A$ , a máxima eficiência fotoquímica do FSII ( $F_v'/F_m'$ ) não foi afetada pelo estresse hídrico, independente da sua severidade e taxa de imposição (Figura 2a). Este resultado, também verificado em outros trabalhos com café Canéfora, em diferentes condições de cultivo (DaMatta et al., 2002; Lima et al., 2002; Praxedes et al., 2005), indica a ausência de danos fotoinibitórios. Apenas pequenas alterações nos demais parâmetros fotoquímicos ( $F_v'/F_m'$ ,  $q_p$ ,  $\phi_{\text{FSII}}$ , NPQ e  $P_E$ ) foram observadas entre plantas estressadas de ambos os tamanhos de vasos e níveis de déficit; provavelmente, ocorreram em função das variações nas condições ambientes entre dias de medição em detrimento a efeitos de tratamentos, uma vez que variações proporcionais àquelas observadas em plantas estressadas também foram verificadas nas plantas-controle (Figuras 2: b, c, d, e, f). Ademais, nenhuma relação pôde ser estabelecida entre parâmetros fotoquímicos e teores de pigmentos, uma vez que estes não tiveram suas concentrações alteradas em função dos tratamentos aplicados (Tabela 1).

Comparando-se plantas estressadas e irrigadas, constataram-se alterações significativas na maioria dos parâmetros fotoquímicos quando o déficit severo foi imposto lentamente. Observaram-se, então, nesse caso, alterações na fotoquímica do FSII em folhas adaptadas à luz, evidenciadas, por exemplo, em reduções de 32% ( $P < 0,05$ ) em  $\phi_{\text{FSII}}$  nas plantas estressadas, comparadas às irrigadas (Figura 2 d). Esta redução provavelmente ocorreu devido ao decréscimo (33%;  $P < 0,05$ ) em  $q_p$  (Figura 2 c), uma vez que  $F_v'/F_m'$  não se alterou em resposta ao déficit hídrico (Figura 2 b). Contudo, houve acentuada redução em NPQ (49%,  $P < 0,05$ , Figura 2 e), fato que pode ter contribuído para o incremento de 18% em  $P_E$  (Figura 2 f). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que as plantas nos vasos grandes, sob déficit severo, possivelmente apresentaram um mecanismo fotoprotetor, uma vez que ajustaram a taxa de transporte de elétrons à taxa de consumo de poder redutor (Cruz et al., 2003; Praxedes et al., 2005). Resultados de parâmetros fotoquímicos semelhantes aos observados em plantas sob déficit severo ( $\Psi_{\text{am}} = -4 \text{ MPa}$ ), imposto lentamente, também foram constatados por Praxedes et al. (2005), em plantas do clone 109A submetidas ao déficit hídrico imposto ainda mais lentamente.

Sob déficit severo, os níveis de prolina aumentaram em 212% nas plantas dos vasos grandes (Tabela 1). Isso poderia resultar em ajustamento osmótico quando o déficit foi imposto lentamente. Entretanto, nem o possível ajustamento osmótico, tampouco as alterações fotoquímicas contribuíram para a manutenção das trocas gasosas no cafeeiro submetido ao déficit hídrico imposto lentamente. Ademais, o nível de danos celulares causados pelo estresse oxidativo induzidos pela seca foi similar, independente da taxa de imposição do déficit, indicado na Tabela 1, pelo extravazamento de eletrólitos.

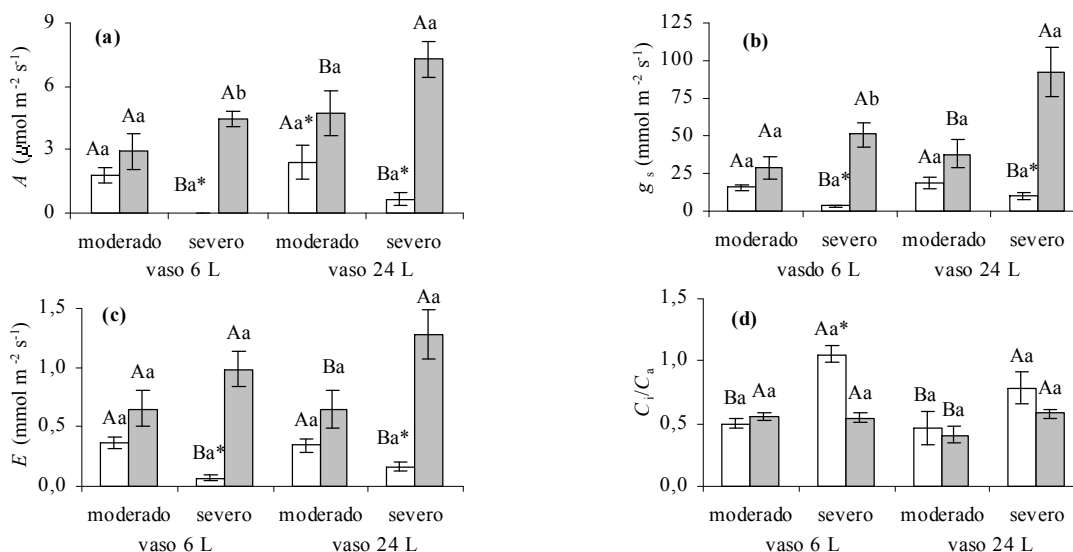


Figura 1. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre as taxas de assimilação líquida de carbono –  $A$  (a), condutância estomática -  $g_s$  (b), transpiração –  $E$  (c) e razão entre concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  -  $C_i/C_a$  (d) em plantas de café. Tanto para plantas estressadas (colunas brancas) ou plantas-controle (colunas cinzas), letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as médias dos níveis de déficit (moderado e severo) dentro de cada tamanho de vaso, enquanto letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dos tamanhos de vasos (6 e 24 L) dentro de cada nível de déficit, pelo teste de Newman-Keuls ( $P < 0.05$ ). As médias de plantas estressadas (colunas brancas) marcadas com um asterisco diferem daquelas controle pelo teste de Newman-Keuls, para  $P < 0.05$ . Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco repetições

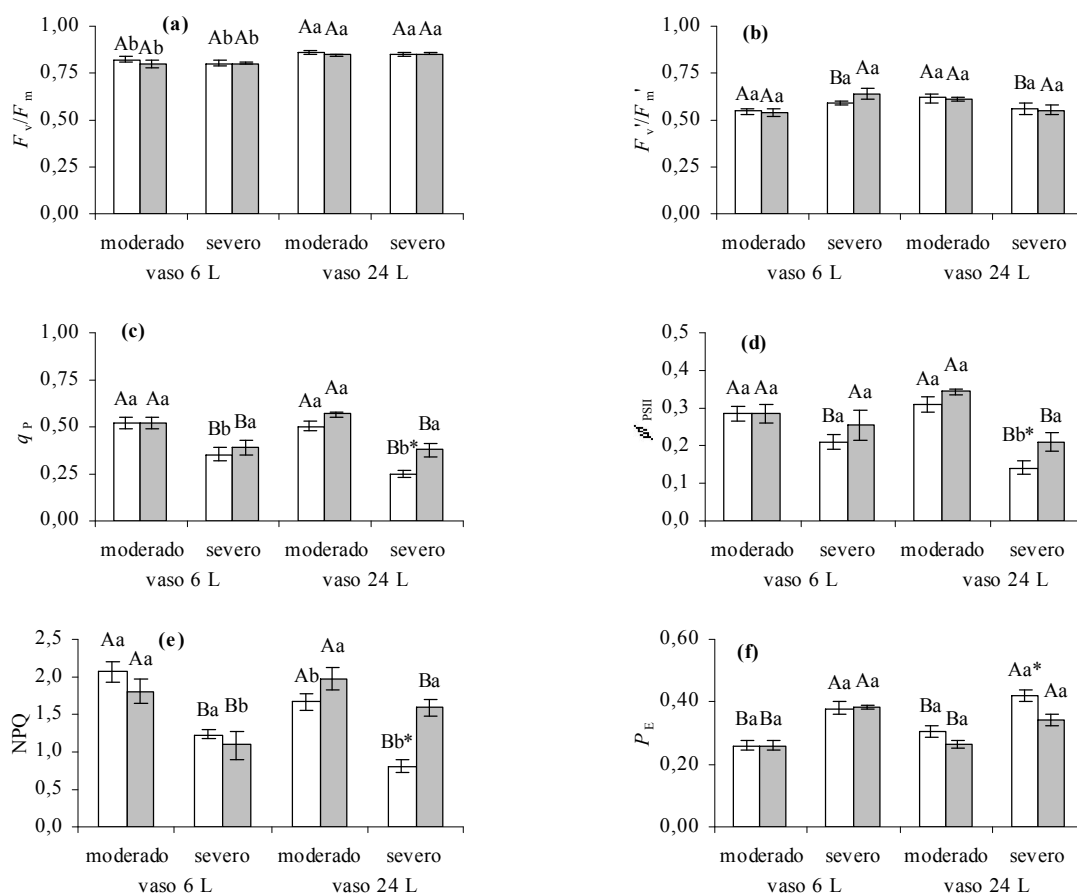


Figura 2. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre a máxima eficiência fotoquímica do FSII -  $F_v/F_m$  (a), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII -  $F_v'/F_m'$  (b), coeficiente de extinção fotoquímica -  $q_p$  (c), rendimento quântico do transporte de elétrons -  $\phi_{PSII}$  (d), coeficiente de extinção não-fotoquímica - NPQ (e) e a fração de energia absorvida que não foi utilizada nem na fotoquímica nem dissipada termicamente -  $P_E$  (f) em plantas de café. Estatística conforme Figura 1

Tabela 1. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre as concentrações foliares de clorofilas *a* (Cl *a*) e *b* (Cl *b*) e totais, carotenóides (Car), prolina, e o extravazamento de eletrólitos (EE) em plantas de café

Tamanho vasos (L)*	Nível de déficit	Regime hídrico	Pigmentos (g m <sup>-2</sup> )				Prolina (mmol kg <sup>-1</sup> MS)	EE (%)
			Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	totais	Car		
6	Moderado	Estresse	492 ± 40 Aa	179 ± 16 Aa	671 ± 55 Aa	141 ± 8 Aa	15,9 ± 2,3 Aa	5,0 ± Ba
6	Moderado	Controle	501 ± 14 Ab	188 ± 14 Aa	689 ± 24 Ab	132 ± 4 Ab	16,5 ± 2,7 Aa	4,1 ± Ba
6	Severo	Estresse	528 ± 23 Aa	187 ± 6 Aa	714 ± 28 Aa	144 ± 6 Aa	15,4 ± 1,8 Ab	17,3 ± Aa*
6	Severo	Controle	473 ± 18 Ab	167 ± 6 Ab	640 ± 22 Ab	132 ± 3 Aa	11,8 ± 2,0 Aa	6,8 ± Aa
24	Moderado	Estresse	597 ± 16 Aa	211 ± 8 Aa	808 ± 24 Aa	146 ± 1 Aa	14,6 ± 2,2 Ba	6,4 ± Ba
24	Moderado	Controle	620 ± 49 Aa	222 ± 15 Aa	842 ± 64 Aa	154 ± 9 Aa	12,4 ± 2,6 Aa	4,3 ± Aa
24	Severo	Estresse	563 ± 57 Aa	198 ± 19 Aa	761 ± 74 Aa	147 ± 9 Aa	29,3 ± 2,2 Aa*	20,3 ± Aa*
24	Severo	Controle	605 ± 39 Aa	222 ± 15 Aa	827 ± 54 Aa	152 ± 9 Aa	9,4 ± 1,6 Aa	4,3 ± Ab

\* 6 L : taxa de imposição rápida; 24 L: taxa de imposição lenta. Estatística conforme Figura 1

## Conclusão

A aclimação da maquinaria fotossintética de *Coffea canephora* à seca ocorreu em resposta ao aumento na severidade do déficit hídrico, sem, contudo, ser afetada pela taxa de imposição do déficit.

## Referências Bibliográficas

- Bates L., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-207.
- Cruz J.L., Mosquim P.R., Pelacani C.R., Araújo W.L., DaMatta F.M. (2003) Photosynthesis impairment in cassava leaves in response to nitrogen deficiency. *Plant and Soil* 257, 417-423.
- DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Pinheiro H.A., Ducatti C., Loureiro M.E. (2003) Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science*, 164, 111-117.
- DaMatta F.M., Loos R.A., Silva E.A., Loureiro M.E. (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology* 159, 975-981.
- Jones H.G., Rawson H.M. (1979) Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential of sorghum. *Physiologia Plantarum* 45, 103-111.
- Lawlor D.H., Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275-294.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology* (eds S. P. Colowick & N. O. Kaplan), Vol. 148, pp. 350-382. Academic Press, San Diego.
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clone of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47, 239-247.
- Ort D.R., Baker N.R. (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5, 193-198.
- Pinheiro, H.A. (2004) Physiological and morphological adaptations as associated with drought tolerance in robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, PhD Thesis.
- Praxedes S.C., DaMatta F.M., Loureiro M.E., Ferrão M.A.G., Cordeiro A.T. (2005) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, no prelo.
- Ray J.D., Sinclair T.R. (1998) The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* 49, 1381-1386.
- Townend J., Dickinson A.L. (1995) A comparison of rooting environments in containers of different sizes. *Plant and Soil* 175, 139-146.
- Will R.E., Teskey R.O. (1997) Effects of elevated carbon dioxide concentration and root restriction on net photosynthesis, water relations and foliar carbohydrate status of loblolly pine seedlings. *Tree Physiology* 17, 655-661.