

# INTERCAMBIO DE DIÓXIDO DE CARBONO Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN EL PERICARPIO DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO DEL CAFETO<sup>1</sup>

Diana María Ocampo-Agudelo<sup>\*</sup>; Néstor Miguel Riaño-Herrera<sup>\*\*</sup>; Juan Carlos López-Ruiz<sup>\*\*</sup>;  
Yamel López-Forero<sup>\*\*\*</sup>

---

## RESUMEN

OCAMPOA., D.M.; RIAÑO H., N.M.; LÓPEZ R., J.C.; LÓPEZ F., Y. Intercambio de dióxido de carbono y cambios bioquímicos del pericarpio durante el desarrollo del fruto del café. *Cenicafé*, 61(4):327-343. 2010

Con el fin de contribuir al conocimiento de la fisiología del fruto del café, desde la apertura floral hasta la maduración, cada dos semanas, se midió el intercambio neto de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el crecimiento y algunas variables bioquímicas del pericarpio en frutos de *Coffea arabica* cv. Caturra. El intercambio neto de CO<sub>2</sub> se cuantificó en sectores de ramas unidas a la planta, en nudos con hojas y sin frutos, en nudos con hojas y frutos, y en nudos con frutos y sin hojas, tanto a la luz como en la oscuridad. En los nudos con hojas, el intercambio neto de CO<sub>2</sub> bajo iluminación es positivo, pero cuando se determina en frutos solos, el intercambio neto de CO<sub>2</sub> es negativo, debido al predominio de la respiración. Durante la ontogenia del fruto, la respiración es alta en las etapas tempranas, y disminuye hasta alcanzar la maduración. Aproximadamente el 30% de los foto-asimilados almacenados en el grano provienen de la fijación o re-fijación del CO<sub>2</sub> realizada por el aparato fotosintético de las células del pericarpio. El comportamiento del intercambio de CO<sub>2</sub> está relacionado con la actividad de las enzimas de carboxilación fotosintética como la Rubisco, la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPC), y de la síntesis de sacarosa. El crecimiento del fruto puede describirse mediante una función logística, en una curva sigmoideal, donde se identifica una etapa exponencial inicial de crecimiento lento, una lineal de crecimiento acelerado y una final de estabilización. Posteriormente, se observa una etapa de disminución, asociada con procesos degradativos y de postmaduración.

**Palabras claves:** Café, *Coffea arabica* L., fotosíntesis, fruto, pericarpio, rubisco, PEPC, sacarosa.

---

## ABSTRACT

In order to contribute to the knowledge of the coffee tree cherry physiology, the net exchange of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), the growth and some biochemical variables of the pericarp in cherries of *Coffea arabica* L cv. Caturra were measured each two weeks, from floral opening to ripening. The net exchange of CO<sub>2</sub> was quantified in sectors of the branches attached to the plant, in knots with leaves and without cherries, in knots with leaves and cherries and in knots with cherries and without leaves, in the sunshine and in the darkness. In the knots with leaves, the net exchange of CO<sub>2</sub> in the sunshine is positive, but when it is determined only in cherries, it is negative due to the predominance of respiration. During the cherry ontogeny, the respiration is high in the early phases and it decreases gradually until ripening. Approximately 30% of the photoassimilates stored in the grain come from CO<sub>2</sub> fixation or refixation carried out by the photosynthetic apparatus of the pericarpium cells. The behavior of the CO<sub>2</sub> exchange is related to the activity of the enzymes of photosynthetic carboxylation such as Rubisco, phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC), and from sucrose synthesis. The cherry growth can be described through a logistic function in a sigmoidal curve where an initial exponential phase of slow growth, a linear phase of quick growth and a final stabilization phase are identified. Later, a decrease stage associated to degradation and post-maturation processes is observed.

**Keywords:** coffee, *Coffea arabica* L., photosynthesis, cherry, pericarp, rubisco, PEPC, sacarose.

---

<sup>1</sup> Aparte tesis "Fotosíntesis y cambios en la composición del pericarpio durante el desarrollo del fruto del café *Coffea arabica* L. cv Caturra", para optar al título de Ing. Agrónoma. Universidad de Caldas. Autora principal.

\* Ingeniera Agrónoma, Universidad de Caldas

\* Investigador Científico III y Asistente de Investigación hasta mayo de 2012, respectivamente. Disciplina Fisiología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

\*\* Ingeniero Agrónomo Ph.D., Profesor Emérito, Universidad Nacional de Colombia.

Además de las hojas, comúnmente consideradas como la fuente primaria de los foto-asimilados, las plantas superiores pueden utilizar otras estructuras, tanto vegetativas como reproductivas, para llevar a cabo la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  atmosférico. Las hojas, los tallos y las porciones verdes de los órganos florales y los frutos que interceptan Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA), se caracterizan por realizar asimilación del  $\text{CO}_2$ , mientras que los tejidos leñosos, que no contienen clorofila, como la raíz y las estructuras no verdes de los órganos reproductivos, como la mayoría de las semillas en los frutos, no llevan a cabo funciones fotosintéticas, pero reciclan internamente el  $\text{CO}_2$  liberado durante el proceso respiratorio y fotorrespiratorio. La actividad fotosintética no realizada por las hojas, y relacionada con la re-fijación del  $\text{CO}_2$ , se considera una estrategia vegetal adicional de gran importancia para la adquisición del carbono, debido a que éste constituye hasta un 50% de la biomasa producida. En el caso de algunos frutos, se ha establecido que hasta el 60% del total del requerimiento de carbono, proviene de su propia actividad refijadora (7, 10).

Después de la fertilización, durante los estadios tempranos del desarrollo del fruto, éste permanece verde y realiza fotosíntesis, aun cuando en magnitud es heterotrófico, pues requiere del suplemento de foto-asimilados de las hojas adyacentes (14, 29, 34). Durante la maduración, los frutos pierden su capacidad fotosintética y generalmente cambian de color. Los frutos están dotados de estomas en la epidermis, y su tamaño, forma y función es similar al de las hojas de plantas tipo  $\text{C}_3$ . En el manzano, los frutos iniciando su ontogenia presentan la mayor frecuencia estomática sobre la superficie del fruto, para luego disminuir durante su expansión y, posteriormente, se transforman en lenticelas, para el intercambio gaseoso (9). En gran variedad de frutos, se

han observado cloroplastos, tanto en el tejido hipodérmico y perivasculares; en el primero son pequeños, con grana y almidón y presentan metabolismo  $\text{C}_3$ , mientras en el segundo, son de mayor tamaño, no presentan almidón y muestran actividad fotosintética del tipo  $\text{C}_4$  (10, 16, 17, 30). El contenido de clorofila varía con las especies estudiadas y decrece en cantidad a medida que el fruto madura y cambia de color, sin llegar nunca a cero, mientras los contenidos de carotenoides y de antocianinas se incrementan, debido a la actividad de la fitoeno sintasa que se localiza en el estroma de los cloroplastos (7, 14, 19, 22).

El intercambio gaseoso en los frutos se lleva a cabo mediante los estomas y está correlacionado positivamente con su tamaño, el contenido de clorofila, la concentración de  $\text{CO}_2$ , la intensidad lumínica y la baja conductancia difusiva a través de la epidermis (9, 22, 27, 29). El  $\text{CO}_2$  del aire es fijado por la enzima Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa – oxigenasa (Rubisco), la cual alcanza entre 10 y 100 veces menor actividad que en las hojas adyacentes. En contraste, la actividad de la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPC), se encuentra activa en los tejidos de los frutos, incrementando a su vez la capacidad de recapturar el  $\text{CO}_2$  respirado. La relación PEPC / Rubisco de 4:5 en frutos, comparada con la relación 1:10 de las hojas, indica que existe un mecanismo de asimilación diferente al de las hojas (8, 10, 14, 15, 37).

El fruto de *C. arabica* L., es una drupa ovoide o globosa, que contiene normalmente dos semillas, alcanza su máximo desarrollo entre los 220 y los 240 días después de anthesis, y una longitud de 10 a 15 mm. Inicialmente, su color es verde, después amarillo o rojo, dependiendo de la edad y el genotipo. Está constituido por un pericarpio o corteza bien desarrollado, con tres tejidos característicos: exocarpio, mesocarpio y

endocarpio. El exocarpio está formado por una capa de células parenquimáticas, compactas e isodiamétricas, con presencia de estomas; además, durante los primeros estados de desarrollo del fruto hasta los 180 – 195 días de su ontogenia, se encuentran cloroplastos. El mesocarpio está formado por más de 20 capas de células, de forma oval o redondeada, con paredes gruesas que contienen cloroplastos en mayor número que las del exocarpio. En este tejido se encuentran inmersos y dispuestos circularmente los haces vasculares, conformados por xilema en el interior y floema en el exterior. El endocarpio está formado por cinco a siete capas de células esclerenquimáticas de forma irregular, de menor tamaño que las del mesocarpio, y con pocos cloroplastos; más adelante, estas células constituirán la cubierta de la semilla o pergamino, e iniciarán su endurecimiento alrededor de los 90 días, cuando se observa la formación de esclereidas, de forma y dimensiones variables (5, 18, 24, 31, 32).

En estudios previos, se ha encontrado que el pericarpio del fruto de café es activo fotosintéticamente. Durante el desarrollo del grano, el pericarpio exhibe una actividad variable de la Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa – oxigenasa (Rubisco) y de la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), y hacia las 18 semanas de edad, la relación de actividad PEPC/Rubisco, sugiere que buena parte de la actividad fotosintética se debe a la carboxilación realizada por la PEPC (26). El comportamiento de la actividad enzimática fotosintética en el pericarpio del grano puede explicar el hecho de que la fotosíntesis que allí ocurre, contribuye hasta con un 30% a la acumulación total de fotoasimilados almacenados en ellos hasta la cosecha (13).

En estudios de la relación fuente - demanda en el cafeto, Gómez (21), midió el intercambio gaseoso y la acumulación y distribución de biomasa en plantas, a las

cuales les fueron retiradas porciones conocidas de área foliar (fuente) y de frutos presentes (demanda), y determinó que una eliminación hasta del 25% del área foliar, no ocasiona una disminución significativa en el número y peso seco de los frutos, dentro de un mismo ciclo de cosecha.

Los estomas contenidos en el pericarpio varían desde 137 mm<sup>-2</sup>, 45 días después de la floración (DDF), hasta 80 mm<sup>-2</sup>, 195 DDF (31), y tienen un papel fundamental para el intercambio gaseoso y la bioquímica fotosintética del fruto. En general, la actividad respiratoria del fruto es intensa durante toda su etapa de crecimiento, siendo mayor al inicio y disminuyendo hacia el final del período, cuando alcanza la madurez. Sin embargo, la actividad respiratoria es menor en presencia de luz que en oscuridad (2, 28). Después de la floración y el cuajamiento, el fruto pasa por varios estados de crecimiento, durante los cuales sufre cambios internos y externos como producto de la interacción genotipo por ambiente, y alcanza su máximo desarrollo alrededor de los 224 días después de la antesis (32).

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de profundizar en el conocimiento de la fisiología y bioquímica fotosintética del fruto y su relación con el crecimiento, así como para determinar a través de mediciones directas el aporte de algunas de sus funciones bioquímicas al balance de carbono.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones de Café -Cenicafé, Planalto (Manizales, Caldas), ubicado a 4°59' N, 75°35' W y 1.413 m de altitud, y en la Estación Central Naranjal de Cenicafe, ubicada a 4°58' N, 75°39' W y 1.381 m de altitud (20).

**Materiales.** Se utilizaron plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, de 2,5 años de edad, sembradas a una distancia de 1,5 m entre surcos y 1,0 m entre plantas, para una densidad de población de 6.666 plantas/ha. Luego de la floración principal, durante el primer trimestre del año, se seleccionaron aleatoriamente 50 árboles y, en cada uno de ellos, se marcaron cuatro ramas correspondientes a las cruces 24 y 25 (contadas de la base hacia el ápice del tallo), y en cada rama se escogieron los cinco primeros nudos (contados del ápice hacia a la base de la rama).

El intercambio gaseoso se determinó utilizando un sistema portátil de medición de fotosíntesis ADC-LCA4 (*Analytical Development Co, England*), constituido por un analizador infrarrojo de gases para CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, una cámara Parkinson de 6,25 cm<sup>2</sup> para estructuras foliares, una cámara de medición de porciones de rama y un microprocesador que registra las diferencias en concentración de CO<sub>2</sub>, la temperatura del aire en el interior de la cámara y la radiación fotosintéticamente activa (RFA). Como el sistema original está diseñado para la medición en tejido foliar, se le acopló una cámara cilíndrica de PVC y acetato transparente de 0,3 m de longitud y 0,25 m de diámetro, con capacidad para introducir una rama con cinco nudos productivos (Figura 1). El aire dentro de la cámara se homogeneizó con un ventilador que generaba turbulencia, para romper la capa límite que produce resistencia al intercambio gaseoso

cuando se llega al estado estacionario donde la fotosíntesis iguala a la respiración.

#### **Medición de la actividad fotosintética.**

Dos semanas después de la floración, se escogieron aleatoriamente 18 árboles entre los 50 seleccionados, y se formaron tres grupos de seis árboles. En el primer grupo, a dos ramas por árbol en la zona productiva (cruces 24 y 25), se les dejaron los primeros seis nudos contados desde el ápice a la base de la rama y las hojas y frutos presentes; en el segundo grupo, se retiraron los frutos y se dejaron sólo las hojas, mientras que en el tercer grupo se retiraron las hojas y se dejaron sólo los frutos, de tal forma que se generaron los siguientes tratamientos:

1. Nudos de la zona apical de la rama con hojas y frutos
2. Nudos de la zona apical de la rama con hojas y sin frutos
3. Nudos de la zona apical de la rama sin hojas y con frutos

El intercambio gaseoso se midió cada 15 días, entre las 09:00 y 11:00 horas, iniciando una semana después de asignar los tratamientos y se prosiguió hasta la maduración de los frutos. Luego de la medición bajo iluminación, la cámara con la porción de rama en su interior, se cubrió con una tela negra, dejando estabilizar el



**Figura 1.** Medición de intercambio gaseoso en porciones de rama. **a.** Solo hojas; **b.** Solo frutos; **c.** Hojas y frutos.

sistema, y se midió el intercambio gaseoso bajo oscuridad.

Se midió el área foliar en las mismas fechas y porciones de rama, con la regla desarrollada por Arcila (6) y el diámetro menor y mayor de los frutos con un calibrador milimétrico (Mitutoyo 71041) con el fin de calcular su área superficial, mediante la Ecuación <<1>>:

$$S = 4\pi ab$$

Ecuación<<1>>

Donde:

$S$  = Área superficial

$a$  = Radio ecuatorial

$b$  = Radio polar

Con esta información se estimó el área total donde ocurre el intercambio gaseoso por porción de rama con sólo frutos, con sólo hojas, y ramas con hojas y frutos.

**Medición del crecimiento del fruto.** Cada dos semanas, luego de la floración (DDF), se tomó una muestra aleatoria de 150 frutos, a partir de ramas de los 32 árboles restantes y en los cinco primeros nudos del ápice a la base, en cada rama. De esta muestra se escogieron 100 frutos y se pesaron individualmente en una balanza portátil (Mettler BB2400), con el fin de obtener el peso fresco y se secaron a 80°C en estufa con recirculación de aire, hasta peso seco constante.

El porcentaje de humedad de las muestras se determinó mediante las diferencias entre el peso fresco y el peso seco. Las tasas de crecimiento se obtuvieron mediante el cálculo de la primera derivada de la función logística ajustada para cada una de las variables de crecimiento.

El volumen del fruto se determinó utilizando la Ecuación <<2>> del volumen del elipsoide.

$$V = \frac{4\pi ab^2}{3}$$

Ecuación<<2>>

Donde:

$V$  = Volumen del fruto

$a$  = Radio ecuatorial

$b$  = Radio polar

### Medición de variables bioquímicas en el pericarpio del fruto

#### Obtención del extracto del pericarpio.

Desde los 14 hasta los 70 DDF, cada dos semanas, se maceró un gramo de frutos en un mortero pre-enfriado a 4°C, en presencia de 4 mL de búfer de extracción Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, Polivinil Pirrolidona – 40 (PVP-40) 2% (p/v), Polivinil Polipirrolidona (PVPP) 3% (p/v) y glicerol 10%. El macerado se filtró a través de una capa de Miracloth y dos de gasa. El filtrado se centrifugó a 8.000 r.p.m., durante 5 minutos, en una centrífuga Eppendorf 5415C. Luego de los 70 DDF, cuando fue posible separar el pericarpio de los otros tejidos del fruto, se utilizó un gramo de pericarpio siguiendo el procedimiento antes descrito. El sobrenadante obtenido se utilizó para:

#### Cuantificación de clorofila.

Se agregaron 25 µL del sobrenadante a 975 µL de etanol del 96%. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex, se incubó en la oscuridad, a 4°C, durante 30 min, y se midió la absorbancia a 654 nm, en un espectrofotómetro Biorad 3550-UV (*Bio-rad Laboratories*), para determinar el contenido de clorofilas totales, siguiendo el método de Wintermans y De Mots (39).

**Cuantificación de proteína total.** Se filtró 1,0 mL del sobrenadante a través de una columna Econo-Pac G-10 (Biorad, *Inc*), equilibrada con búfer de extracción sin PVP-40 y PVPP. La muestra retenida se eluyó con el mismo búfer, se tomaron 10  $\mu$ L del eluido y se depositaron en cubetas de policarbonato que contenían 990  $\mu$ L de reactivo de Bradford (11). Se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Biorad 3550-UV y se determinó el contenido de proteína soluble total, utilizando los datos de absorbancia contra una curva patrón construida con Albúmina Sérica Bovina (BSA), según el método de Bradford (11).

**Determinación de la actividad de Rubisco.** Se incubaron 50  $\mu$ L del eluido durante 10 min, a 25°C, en presencia de 940  $\mu$ L de Tris - HCL 50 mM, pH 7,8, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADH, 5 mM creatina fosfato, 1 unidad (u) de creatina fosfoquinasa, 1 u de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa y 1 u de fosfoglicerato kinas. La reacción se disparó con Ribulosa 1, 5 bisfosfato (Rubp) hasta alcanzar 660  $\mu$ M en la mezcla. La actividad de la enzima se midió siguiendo el cambio en absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADH y utilizando un coeficiente de extinción de  $6,22 \times 10^3$  M (25, 33).

**Determinación de la actividad de PEPC.** Se incubaron 50  $\mu$ L del extracto proteínico durante 10 min, a 35°C, con 940  $\mu$ L de búfer de actividad Hepes - KOH 100 mM, pH 8,0, 50  $\mu$ M EDTA-Na, 1 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 1mM DDT, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2  $\mu$ M NADH y 5 u de malato deshidrogenasa de corazón de cerdo. La reacción se disparó con PEP hasta alcanzar 0,4 mM en la mezcla y se midió el decrecimiento en la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADH, utilizando un coeficiente de extinción de  $6,22 \times 10^3$  M (1, 33).

**Determinación de la actividad de la sacarosa fosfato sintetasa (SPS).** Se incubaron 50  $\mu$ L del extracto con 950  $\mu$ L de búfer de reacción PIPES (ácido piperazina-N-N-bis 2-etano sulfónico), 50 mM pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM UDP-glucosa (UDPG), 5 mM fructosa-6-fosfato (F6P), 15 mM glucosa-6-Fosfato (G6P), a 30°C, durante 15 min. Se midió la producción de sacarosa + sacarosa fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y UDP glucosa por el método de Van Handel (36). Se utilizó un control negativo consistente en la misma mezcla de reacción sin glucosa-6-fosfato (G6P). La reacción se detuvo con una solución de NaOH hasta alcanzar el 30%. La mezcla se dejó enfriar y se agregaron 2.800  $\mu$ L de antrona 0,15% (p/v) en 80% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se incubó nuevamente a 40°C, durante 20 min. La actividad de la enzima se calculó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU-650 a 620 nm contra una curva patrón de sacarosa.

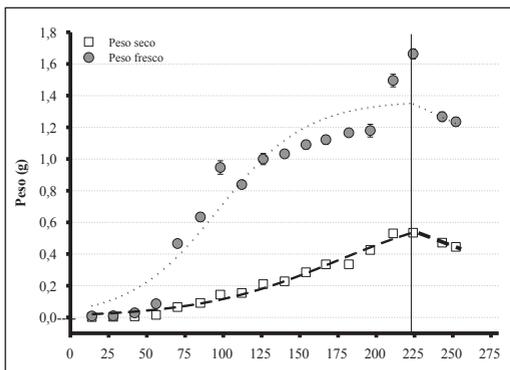
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento del fruto

**Peso fresco y seco.** Durante el crecimiento del fruto de café *Coffea arabica* L. cv Caturra (Figura 2), se pueden observar cuatro fases bien definidas: En la primera, de la antesis hasta los 56 DDF, los frutos siguen un patrón de crecimiento lento; en la segunda, desde los 56 a los 140 días, los frutos crecen rápidamente. En la tercera, de los 140 a los 224 días, el crecimiento llega a su valor máximo (Tabla 1) y el fruto cambia su coloración a medida que va madurando. La última fase, desde los 224 días en adelante, se ajusta al modelo clásico de disminución del crecimiento de Gauss y se caracteriza por pérdidas de peso asociadas con procesos de deshidratación, ataque de microorganismos y aumentos en la respiración de los frutos.

**Tabla 1.** Valores promedio de peso fresco y seco, a través del tiempo, después de la antesis.

DDF	Peso Fresco (g)	Peso seco (g)
14	0,008 ± 0,0005	0,003 ± 0,0001
28	0,001 ± 0,0003	0,004 ± 0,0002
42	0,029 ± 0,0013	0,007 ± 0,0002
56	0,086 ± 0,0042	0,016 ± 0,0007
70	0,466 ± 0,017	0,066 ± 0,001
85	0,634 ± 0,025	0,091 ± 0,002
98	0,947 ± 0,042	0,144 ± 0,004
112	0,838 ± 0,093	0,154 ± 0,001
126	1,000 ± 0,035	0,211 ± 0,008
140	1,032 ± 0,020	0,228 ± 0,003
154	1,090 ± 0,026	0,285 ± 0,009
167	1,222 ± 0,028	0,335 ± 0,011
182	1,165 ± 0,016	0,336 ± 0,016
196	1,179 ± 0,040	0,426 ± 0,011
211	1,496 ± 0,039	0,531 ± 0,016
224	1,664 ± 0,032	0,535 ± 0,009
243	1,267 ± 0,030	0,472 ± 0,009
252	1,235 ± 0,027	0,445 ± 0,011

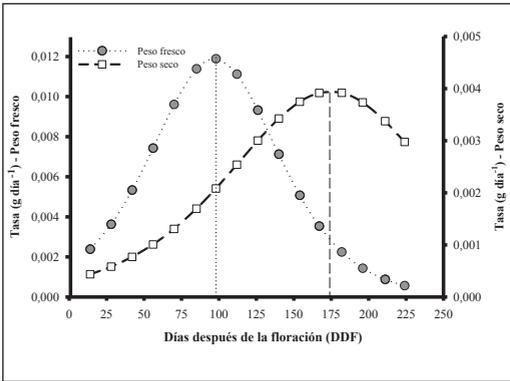


**Figura 2.** Comportamiento del crecimiento del fruto de café en términos de su peso fresco y seco. Las barras verticales indican el error estándar.

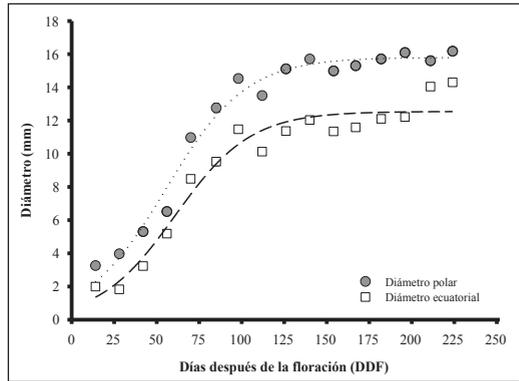
La tasa máxima de acumulación de peso fresco ( $0,0118 \text{ g.día}^{-1}$ ) se alcanzó a los 98 DDF, mientras que para el peso seco se alcanzó a los 182 DDF ( $0,00392 \text{ g.día}^{-1}$ ) (Figura 3).

**Diámetro ecuatorial y polar del fruto.** Los diámetros ecuatorial y polar del fruto de café se comportan siguiendo una curva logística clásica, en la cual se identifican tres fases: una fase inicial exponencial, donde se alcanza una velocidad baja de crecimiento (14 a 28 DDF); una segunda fase de crecimiento lineal que va desde los 29 hasta los 100 DDF; y una fase de estabilización o asintótica que va hasta la madurez del fruto. Aunque las magnitudes son diferentes, el comportamiento de los dos diámetros, es similar y describe consistentemente el crecimiento del fruto en función del tiempo (Figura 4).

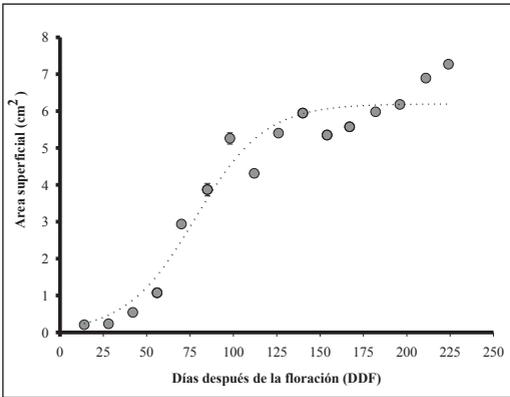
**Área superficial del fruto.** Para determinar la tasa de asimilación del dióxido de carbono atmosférico, fue necesario determinar el área superficial del fruto. Se corroboró que el comportamiento del área ( $\text{cm}^2$ ) sigue el mismo patrón sigmoideal observado para los diámetros (Figura 5).



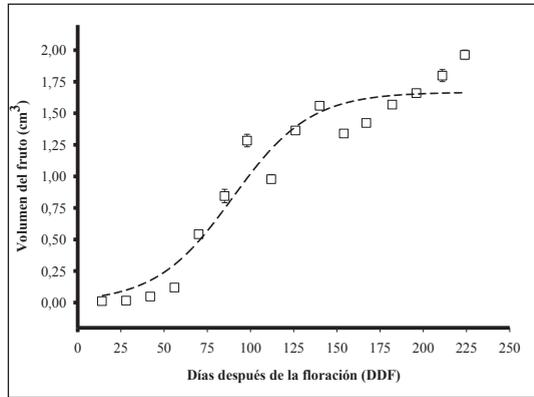
**Figura 3.** Tasas de crecimiento del peso fresco y seco de frutos de *Coffea arabica* L. cv Caturra.



**Figura 4.** Crecimiento en mm de los diámetros polar y ecuatorial del fruto de *Coffea arabica* L. cv Caturra.



**Figura 5.** Comportamiento del área superficial (cm<sup>2</sup>) durante el crecimiento del fruto de *C. arabica* L. cv Caturra.



**Figura 6.** Comportamiento del volumen (cm<sup>3</sup>) durante el crecimiento del fruto de *C. arabica* L. cv Caturra.

**Volumen del fruto.** El volumen promedio del fruto (cm<sup>3</sup>), a través del tiempo, se ajusta a la función logística clásica sigmoidal asintótica (Figura 6).

**Variación en el contenido de humedad del fruto.** El porcentaje de humedad del fruto en función del tiempo alcanza valores máximos alrededor del 86%, a los 76 días DDF, y disminuye hasta el 65% en el momento de su madurez. La máxima humedad alcanzada coincide con el inicio de la fase lineal de acumulación de materia seca, lo cual concuerda con resultados previos obtenidos

por Salazar *et al.* (31, 32), en la misma localidad (Figura 7).

### Actividad fotosintética

El intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> por unidad de superficie para cada uno de los tratamientos, se estimó con la Ecuación <<3>>:

$$A = \mu_s \Delta_c$$

Ecuación <<3>>

Donde:

$A$  = Tasa fotosintética, en  $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

$\mu_s$  = Masa de flujo de aire, en  $\text{molm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

$\Delta_c$  = Diferencial de CO<sub>2</sub>

y con la Ecuación <<4>>:

$$\mu_s = \frac{\mu}{a}$$

Ecuación <<4>>

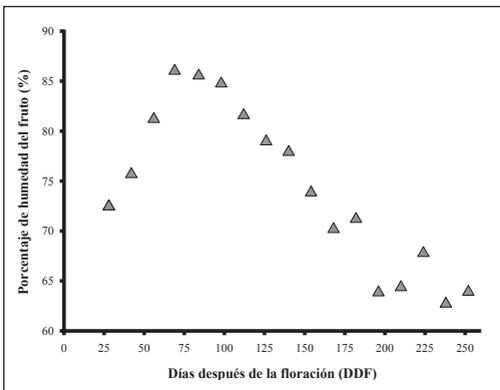
Donde:

$\mu$  = Flujo molar de aire, en mol.s<sup>-1</sup>

$a$  = Área foliar o superficial del fruto, en cm<sup>2</sup>

El flujo molar del aire que ingresa a la cámara de medición es constante (200  $\mu\text{mol}_{\text{aire}}\text{s}^{-1}$ ) y se logra mediante una bomba acoplada al sistema portátil de fotosíntesis ADC-LCA4. El diferencial de CO<sub>2</sub> ( $\Delta_c$ ), en ppm, se calcula mediante la diferencia entre las concentraciones de CO<sub>2</sub> (en ppm) en el aire antes de ingresar a la cámara y luego de pasar por la superficie de asimilación.

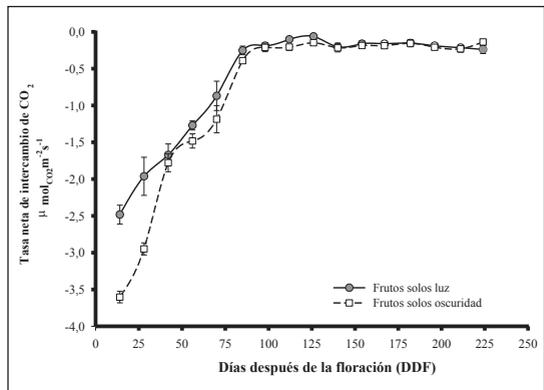
**Intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en ramas con solo frutos.** El intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en frutos adheridos a la rama durante su desarrollo arrojó valores negativos, debidos principalmente a la respiración mitocondrial, en condiciones de luz y en oscuridad (Figura 8).



**Figura 7.** Comportamiento de la humedad del fruto de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo.

Desde el momento de la floración hasta los 126 días, la tasa neta de intercambio de CO<sub>2</sub> en iluminación alcanzó valores menores de respiración que en la oscuridad, lo cual indica que predomina el reciclaje de dióxido de carbono o fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico por parte de los frutos. Este resultado es similar al encontrado en frutos de café por Mosquera (28), en tomate por Carrara *et al.* (14), y en manzana, pomelo, cereales y vaina de arveja por Blanke y Lenz (10). A partir de los 126 DDF, se observan diferencias mínimas de respiración en ambas condiciones (Tabla 2). En este momento, el fruto alcanza su máxima tasa de crecimiento y mantiene este comportamiento hasta alcanzar su madurez a los 224 días.

**Intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en ramas con solo hojas.** El intercambio de CO<sub>2</sub> en hojas alcanzó valores positivos bajo condiciones de iluminación y negativos en oscuridad, lo cual está de acuerdo con el comportamiento foliar normal como órgano de asimilación. Las tasas de fijación de CO<sub>2</sub> registradas en el conjunto del área de



**Figura 8.** Asimilación neta de CO<sub>2</sub> en ramas solo con frutos de *Coffea arabica* L. cv Caturra durante 224 días, expresado en  $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bajo condiciones de luz y oscuridad. Las barras verticales indican el error estándar.

**Tabla 2.** Valores promedio de intercambio neto de CO<sub>2</sub> en frutos bajo condiciones de luz y oscuridad.

DDF	Intercambio neto en luz $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{S}^{-1}$	Error estándar luz	Intercambio neto en oscuridad $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{S}^{-1}$	Error estándar oscuridad
14	-2,48	0,128	-3,60	0,078
28	-1,96	0,259	-2,95	0,082
42	-1,67	0,150	-1,78	0,123
56	-1,27	0,062	-1,48	0,097
70	-0,87	0,199	-1,19	0,185
85	-0,25	0,059	-0,39	0,021
98	-0,19	0,036	-0,21	0,058
112	-0,10	0,003	-0,21	0,045
126	-0,06	0,006	-0,15	0,026
140	-0,20	0,052	-0,22	0,056
154	-0,16	0,041	-0,19	0,042
167	-0,16	0,034	-0,19	0,033
182	-0,15	0,045	-0,16	0,048
196	-0,19	0,025	-0,21	0,034
211	-0,21	0,038	-0,23	0,046
224	-0,24	0,055	-0,14	0,040

intercambio fueron bajas, durante el período de medición, debido a que en ese momento el sistema portátil se ubicó en el tercio medio del dosel del árbol (zona productiva), donde ocurre auto-sombreamiento producido por el tercio superior (Figura 9). Además, se observa el comportamiento del intercambio gaseoso neto descrito en luz y oscuridad.

**Intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en ramas con hojas y frutos.** Así como en las hojas, el intercambio neto de CO<sub>2</sub> arrojó valores positivos bajo iluminación y negativos en la oscuridad, comportamiento que es constante durante todo el desarrollo del fruto (Figura 10).

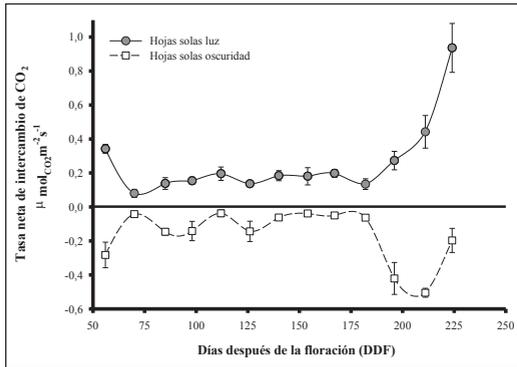
En este tratamiento se observan tasas de asimilación bajas, como en el caso de hojas solas, debido al efecto de sombra producido por el tercio superior del dosel. En condición de oscuridad, se observan mayores valores de respiración en hojas solas que en hojas con la presencia de frutos, esto parece sugerir

que los frutos a diferencia de las hojas, reciclan el CO<sub>2</sub> de órganos en respiración y lo toman en menor cantidad de la atmósfera en condiciones normales de iluminación, resultado similar al obtenido por Blanke y Lenz (10).

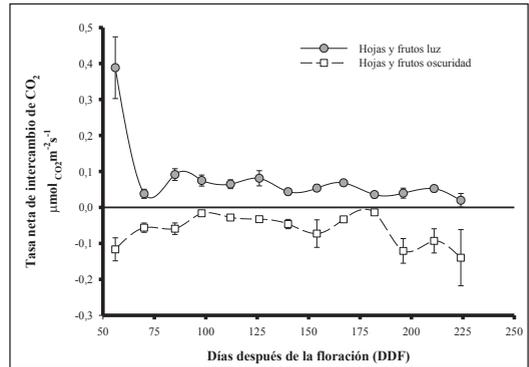
### Contribución fotosintética de los frutos

La contribución fotosintética de los frutos a su propio llenado, se estimó en cada tratamiento, bajo condiciones de luz y oscuridad, para el período que transcurrió entre la floración y la maduración del fruto (210 días) (Figuras 8, 9 y 10), obteniendo la integral bajo la curva para el período indicado. Para ello, el área entre dos períodos consecutivos, se calculó de acuerdo con la función que describe el área del trapecio:

La fórmula se aplicó para los valores obtenidos en cada tratamiento y condición, obteniendo un valor de la integral, así:



**Figura 9.** Intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en ramas solo con hojas de *Coffea arabica* L. cv Caturra durante 224 días (expresado en  $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bajo condiciones de luz y oscuridad. Las barras verticales indican el error estándar.



**Figura 10.** Intercambio gaseoso neto de CO<sub>2</sub> en ramas con hojas y frutos en *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante 224 días (expresado en  $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) bajo condiciones de luz y oscuridad. Las barras verticales indican el error estándar.

Intercambio neto de hojas en luz =  
38,58  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Intercambio neto de hojas en oscuridad =  
-26,45  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Intercambio neto de hojas + frutos  
en luz=  
11,80  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Intercambio neto de hojas + frutos  
en oscuridad =  
-9,80  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Intercambio neto de frutos en luz =  
-136,61  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Intercambio neto de frutos en oscuridad=  
-181,97  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}/\text{período}$

Luego, se calculó la distancia absoluta entre el valor de asimilación en luz y en oscuridad para cada condición y tratamiento. Así, para las ramas con hojas solas el valor es de 65,03  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}$  para 210 días, en tanto que en ramas con hojas y frutos es de 21,6  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}$  para 210 días. La diferencia entre los dos valores es el aporte por

fijación o re-fijación del CO<sub>2</sub> que realizan los frutos (43,43  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}$  para 210 días). La relación algebraica entre los dos valores es 0,33 (Figura 11).

Al llevar a cabo el mismo ejercicio de cálculo con la medición en ramas con frutos solos, en luz y oscuridad, la diferencia obtenida es de 45,36  $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2}$  para 210 días, similar a la registrada anteriormente, y el aporte calculado debido al intercambio gaseoso de los frutos bajo iluminación en condiciones de luz fue de 0,33.

Este resultado obtenido mediante determinaciones directas de intercambio gaseoso, es similar al calculado indirectamente por Cannell (13), lo cual demuestra que al menos 33% de los asimilados almacenados en el grano de café, proceden de la actividad de re-asimilación del CO<sub>2</sub> realizada por la cubierta del grano.

### Bioquímica fotosintética en el pericarpio del fruto

**Clorofila total.** El contenido de clorofila total en el pericarpio del fruto de café cv.

Caturra, disminuye a medida que avanza su proceso de crecimiento y maduración, y llega a valores cercanos a cero (0) (Figura 12).

El comportamiento del contenido de clorofila en el pericarpio del fruto se puede describir mediante una función cuadrática descrita en la Ecuación <<5>>.

$$y = y_0 + ax + bx^2$$

Ecuación <<5>>

Donde:

$y$  = Contenido de clorofila total en  $\text{mg g}^{-1}\text{PF}$

$y_0$  =Intercepto en  $Y$

$a$  y  $b$  =Parámetros del modelo

$x$  =Tiempo en término de los días después de la floración

Los valores de los parámetros del modelo que se presenta en la Figura 12 son:

$$y_0 = 0,3$$

$$a = 0,004$$

$$b = -0,0001$$

$$r^2 = 0,90$$

$$p < 0,0001$$

**Proteína total.** El contenido de proteína total en la cubierta del grano varía con el tiempo. En las primeras fases del desarrollo del fruto (14 a 70 DDF) se alcanzan valores de 19,2 – 10,0  $\text{mg.g}^{-1}$  PF, que luego descienden hasta alcanzar valores cercanos a cero, en la etapa de post-maduración del fruto, alrededor de los 250 días (Figura 13).

**Actividad de Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa – oxigenasa (Rubisco).** La actividad enzimática de Rubisco en el pericarpio del fruto disminuye a través del tiempo, pues ella depende de su contenido en los tejidos fotosintéticos, lo cual está corroborado por el decrecimiento de la proteína total medida (Figura 14). Los valores más altos de actividad de esta enzima en la cubierta del fruto se alcanzan durante las dos primeras fases de su desarrollo (entre los 42 y 70 días DDF) y varían entre 2,5 y 2,6  $\mu\text{mol}_{\text{NADH}} \text{min}^{-1}$ .

Aunque la actividad de Rubisco es variable, se observa una tendencia a la disminución a

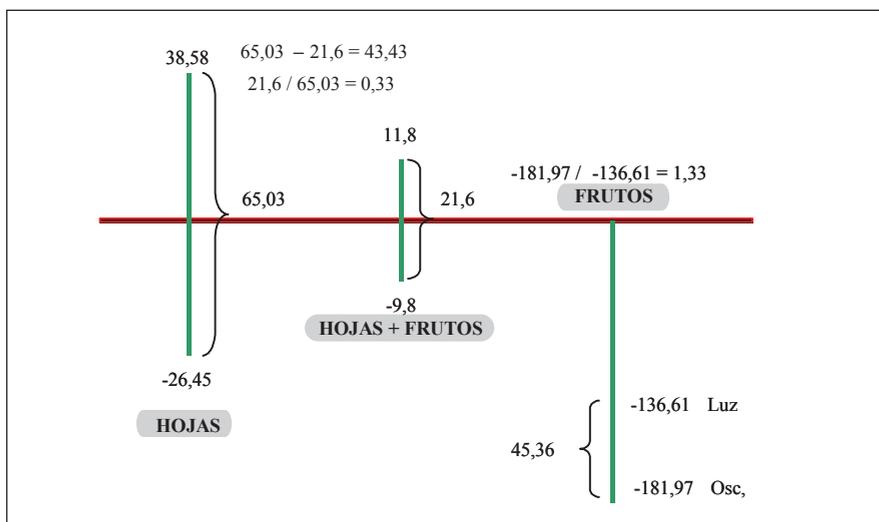


Figura 11. Cálculo de la contribución de la fijación o re-fijación del CO<sub>2</sub> en el fruto de café.

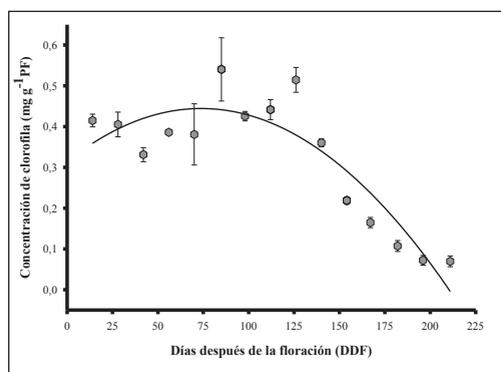
través del tiempo, lo cual es consistente con la disminución del contenido proteínico hacia la finalización del proceso de maduración del fruto.

**Actividad de la Fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC).** La actividad enzimática de PEPC en el pericarpio del fruto, aumenta hasta los 154 DDF, donde alcanza los valores más altos (Figura 15). Estos varían entre 4,3 y 4,0  $\mu\text{mol}_{\text{NADH}}\text{min}^{-1}$ . A partir de los 168 días la actividad disminuye y llega a valores menores a 1,0  $\mu\text{mol}_{\text{NADH}}\text{min}^{-1}$  en la época de madurez del fruto.

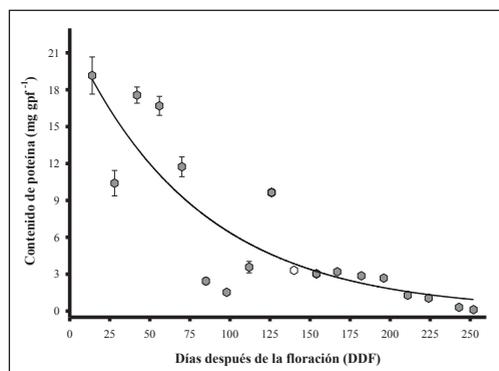
Si se comparan las Figuras 14 y 15, puede observarse que los mayores valores de actividad de PEPC coinciden con valores bajos de actividad en Rubisco (126 a 154 DDF), mecanismo de “flip – flap”, que puede ser explicado por la necesidad de mantener un balance entre la actividad de las dos enzimas, probablemente asociado con el hecho de que las temperaturas óptimas

de funcionamiento de las dos enzimas son notablemente diferentes (25°C para Rubisco y 35°C para PEPC). Este resultado parece indicar que el fruto de café ha desarrollado un mecanismo similar al de las plantas  $C_4$ , que le permite de forma eficiente re-fijar el dióxido de carbono que se produce en la cubierta del grano. El comportamiento de la actividad de la PEPC en el pericarpio del fruto puede ser descrito mediante una función cuadrática.

**Relación de la Actividad Enzimática de PEPC – Rubisco.** La relación de la actividad PEPC - Rubisco en el pericarpio del fruto evidencia una mayor importancia de la PEPC en la actividad fotosintética con respecto a Rubisco, desde la fase inicial del crecimiento hasta los 150 días aproximadamente. Momento en el cual se alcanza la mayor tasa de acumulación del peso seco, tal como se muestra en la Figura 16. Este punto de inflexión, en el comportamiento tanto de la acumulación como de la relación de la actividad de las dos



**Figura 12.** Variación en el contenido de clorofila total en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv Caturra, durante su desarrollo. Las barras verticales indican el error estándar.



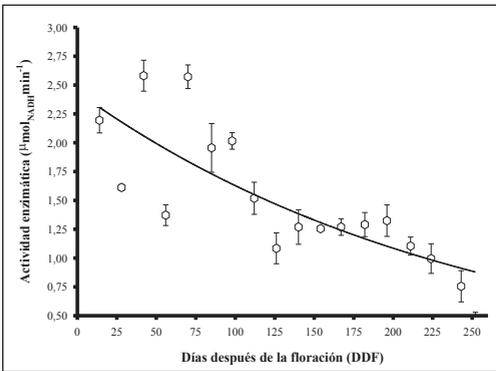
**Figura 13.** Variación en el contenido de proteína total en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo. Las barras verticales indican el error estándar.

enzimas, es una evidencia de la importancia relativa que tiene PEPC en el crecimiento del fruto y de la habilidad de re-fijar el dióxido de carbono en esta etapa, debido que a partir de este punto, las tasas disminuyen, se inicia un cambio tanto en la tasa de crecimiento como en la importancia relativa de actividad de las enzimas, lo cual puede indicar que Rubisco estaría más asociada con los procesos fotosintéticos involucrados en la etapa final de maduración del fruto.

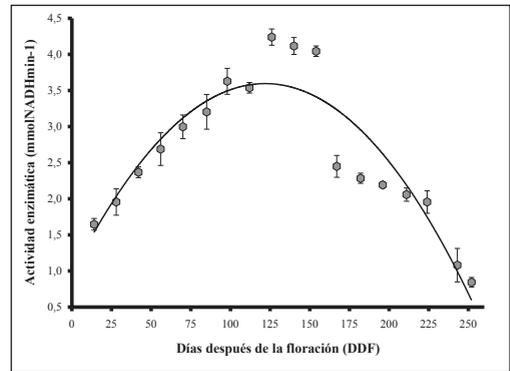
**Sacarosa fosfato sintetasa (SPS).** La actividad de SPS en el pericarpio del fruto alcanza

los valores de mayor actividad entre los 112 y 126 DDF, siendo coincidente con la máxima tasa de crecimiento en peso fresco y de actividad de PEPC, lo cual indica que es en este punto donde ocurre la mayor translocación de asimilados al endospermo y se inicia el periodo de llenado del fruto. Los valores más bajos se observaron cuando el fruto se encontraba sobremaduro (Figura 17).

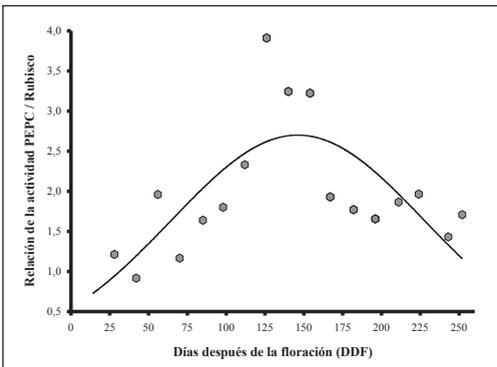
Durante el desarrollo de los frutos de café, el comportamiento del intercambio de  $\text{CO}_2$  medido en condiciones de luz y oscuridad, es mayor en luz, con excepción



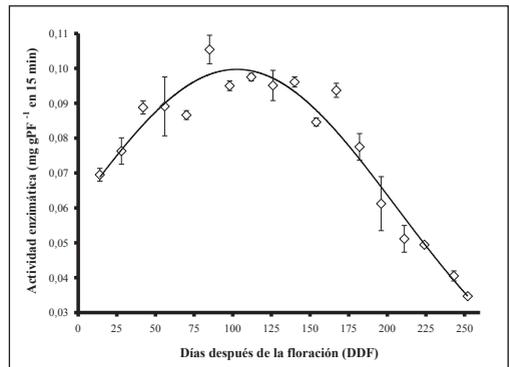
**Figura 14.** Actividad de Rubisco en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo. Las barras verticales indican el error estándar.



**Figura 15.** Actividad de PEPC en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo. Las barras verticales indican el error estándar.



**Figura 16.** Relación de la actividad enzimática de PEPC y Rubisco en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo.



**Figura 17.** Actividad de Sacarosa Fosfato Sintetasa en el pericarpio de frutos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra, durante su desarrollo. Las barras verticales indican el error estándar.

del estado de postmaduración, determinando que hay incorporación neta de dióxido de carbono a la biomasa y componentes del fruto, y se debe a su fijación directa de la atmósfera o por reciclaje del CO<sub>2</sub> liberado por la respiración mitocondrial de otros tejidos del grano. Lo anterior indica que en el pericarpio, las estructuras anatómicas, los organelos subcelulares y la batería enzimática, para llevar a cabo el proceso fotosintético es funcional, y los resultados concuerdan con los presentados previamente para frutos del café y otras especies por Willmer and Johnson (38), Bravdo *et al.* (12), Blanke y Lenz (10), Mosquera *et al.* (28), López *et al.* (26), Carrara *et al.* (14), Aschan y Pfanz (7). Aun cuando se muestra que el intercambio neto de carbono es mayor en los primeros estadios de crecimiento del fruto (Figura 8), cuando se relaciona esta actividad con el crecimiento en biomasa del fruto (cálculos no presentados), la actividad decrece. No fue consistente la observación de algún tipo de respuesta del fruto y su actividad fotosintética con aumentos en la radiación, contrario a lo expuesto por Vaast *et al.* (35). La contribución calculada por la fijación o re-fijación del dióxido de carbono, al desarrollo del fruto en un 33% (Figura 11), coincide con lo hallado por Cannell (13) y Vaast *et al.* (35). Estos últimos afirman que un 30% de los costos respiratorios por mantenimiento provienen de esta actividad, y cerca de un 12% de los costos de crecimiento provienen del mismo, contrastando con lo presentado por Kumar y Tieszen (23), quienes indicaron que la fotosíntesis de los frutos podrían proveer el 100% de sus requerimientos para mantenimiento y hasta un 30% de sus requerimientos para el crecimiento.

En general, los resultados como complemento a otros publicados, muestran que la actividad bioquímica de las enzimas responsables por la carboxilación fotosintética,

tienen su mayor actividad durante el período de mayor crecimiento del fruto y así mismo se asocian con el llenado del mismo. Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis de que a medida que avanza el desarrollo de los frutos, la fijación primaria de CO<sub>2</sub> en los frutos por la vía PEPC, se convierte en su ruta principal de asimilación del carbono. Es la primera vez que se muestra actividad de la Sacarosa Fosfato Sintetasa en frutos de café, comportamiento que evidencia un período de máxima actividad bioquímica y fotosintética hacia la acumulación de carbohidratos, que es concordante con la mayor tasa de crecimiento y de actividad de las enzimas de carboxilación, lo cual indica que hay un período de alta demanda de asimilados, que provienen tanto de la actividad fotosintética foliar circundante como de la re-fijación del CO<sub>2</sub> respirado por el mismo pericarpio. Por ello, cuando se presentan períodos de estrés, principalmente por déficit hídrico, se ocasiona un efecto sobre el llenado del endospermo, que se traduce en la presencia de frutos negros si es anterior a las 18 semanas y de llenado parcial si se produce entre las 18 y 24 semanas, tal como lo reportan Arcila y Jaramillo (4).

Un aspecto a tener en cuenta y que refuerza la importancia de la actividad metabólica del carbono en los frutos, es el asociado con la relación fuente – demanda de asimilados. Así, cuando se midió el intercambio gaseoso directo en frondas de cafetos con presencia diferencial de área foliar y frutos, se encontró que una pérdida del 25 del área foliar fotosintéticamente activa, no ocasiona disminución en el crecimiento y peso final de los frutos presentes (21), lo cual se puede postular debido a la actividad del mismo fruto que responde hasta por un 30% de su propia acumulación de asimilados. Sin embargo, es importante anotar que puede existir un efecto diferencial de la pérdida de tejido foliar, el

cual depende de la zona de la planta que es afectada, Así, Arcila (3), determinó que la pérdida del área foliar en la parte superior del dosel, durante un período seco, puede ocasionar hasta la muerte de la planta, en tanto que una pérdida del área foliar en la mitad inferior de la fronda, no ocasiona pérdidas mayores al 25% en la producción. Esto indica que existe dentro del balance fuente – demanda del café un mecanismo de compensación por pérdida del área foliar, que puede ser asumido directamente por el pericarpio de los frutos, mientras éstos se encuentran iluminados.

### LITERATURA CITADA

1. ANGELOV, M.N.; SUN, J.; [et al.]. Novel characteristics of cassava, *Manihot sculemuncrantz*, a reputed C3-C4 intermediate photosynthesis species. *Photosynthesis research* 38:61-72. 1993.
2. ANGRAND, J.C. Floración, desarrollo vegetativo y fotosíntesis de *Coffea arabica* en diferentes sistemas de cultivos en Pérez Zeledón y Heredia. Costa Rica : CATIE, 2002. 56 p.
3. ARCILA P., J. Efecto de la época de defoliación sobre la recuperación del área foliar y la producción del café. p. En: CENICAFÉ. Informe anual de labores 1992. Chinchiná : CENICAFÉ, 1992. 54 p.
4. -----; JARAMILLO, R.A. Relación entre la humedad del suelo, la floración y el desarrollo del fruto del café. Chinchiná : CENICAFÉ, 2003. 8 p. (Avances Técnicos No. 311).
5. -----; BURÓ, L.; [et al.]. Aplicación de la escala BBCH ampliada para la descripción de las fases fenológicas del desarrollo de la planta de café. Chinchiná : CENICAFÉ, 2001. 32p. (Boletín Técnico No. 23).
6. -----. Métodos prácticos para la medición del área foliar del café: Diseño de una reglilla para medición de área foliar en el campo. p. En: CENICAFÉ. Informe anual de labores 1986 1987. Chinchiná : CENICAFÉ, 1987. p 20-22.
7. ASCHAN, H.; PFANZ, H. Non-foliar photosynthesis: A strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 198(2):81-97. 2003.
8. ATKINS, C.A.; KUO, J.; [et al.]. Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant physiology* 60:779-786. 1977.
9. BLANKE, M.M. Stomata of current fruits: *Angew. Botany* 67:1-2. 1993.
10. -----; LENZ, F. Fruit photosynthesis. *Plant, cell and environment*. 12:31-45. 1989.
11. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254. 1976.
12. BRAVDO, B.A.; PALGI, A.; [et al.]. Changing ribulose diphosphate carboxylase/oxygenase activity in ripening tomato fruit. *Plant physiology* 60:309-312. 1977.
13. CANNELL, M.G.R. Effects of fruiting, defoliation and ring barking on the accumulation and distribution of dry matter of *C. arabica* L. in Kenya. *Experimental agricultura* 7:63-74. 1971.
14. CARRARA, S.; PARDOSI, A.; [et al.]. Photosynthetic activity of ripening tomato fruit. *Photosynthetica* 39(1):75-78. 2001.
15. CHOPRA, J.; KAUR, N.; [et al.]. Changes in the activities of carbon metabolizing enzymes with pod development in lentil (*Lens culinaris* L.) *Acta physiologiae plantarum*. 25:234-240. 2003.
16. CLIJSTER, H. On the photosynthetic activity of developing apple fruits. *Qualitas Plantarum et Materiae vegetabiles*. 1969. Vol. 19: 129 – 140.
17. CROOKSTON, R.K.; O'TOOLE, J.; [et al.]. Characterization of bean pod as a photosynthetic organ. *Crop science* 14:708-712. 1974.
18. DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica cramer*. *Bragantia* 16(23):315-368. 1957.
19. FRASER, D.P.; TRUESDALE, M.D.; [et al.]. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Evidence for tissue-specific gene expression. *Plant physiology* 105:405-413. 1994.
20. CENICAFÉ. Anuario meteorológico 2009. Chinchiná : CENICAFÉ, 2010. 554 p.
21. GÓMEZ, L.F. Relación fuente demanda en el café. En: CENICAFÉ. Informe anual de labores 2004. Chinchiná : CENICAFÉ, 2004. 54 p.

22. JONES, H.G. Carbon dioxide exchange of developing apple (*Malus pumila* Mill.) fruits. Journal of experimental botany 32:1203-1210. 1981.
23. KUMAR, D.; TIESZEN, L.T. Some aspects of photosynthesis and related processes in *Coffea arabica* L. Kenya coffee 41:309-315. 1976.
24. LEON, J.; FOURNIER, L. Crecimiento y desarrollo del fruto de *Coffea arabica* L. Turrialba 12(2):65-74. 1962.
25. LILLEY, R.McC.; WALKER, D.A. An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. Biochemistry and Biophysics Acta. 1979. Vol. 358: 226 - 229.
26. LÓPEZ, Y.; RIAÑO N., M.; [et al.]. Activities of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves and fruit pericarp tissue of different coffee (*Coffea* sp) genotypes. Photosynthetica 38(2):215-220. 2000.
27. MORESHET, S.; GREEN, G.C. Photosynthesis and the diffusion conductance of the Valencia orange fruit under field conditions. Journal of experimental botany 31:15-27. 1980.
28. MOSQUERA S., L.P.; ARCILA P., J.; [et al.]. Determinación de la actividad fotosintética en frutos de café. p. 68-69. Ed. Congreso de la sociedad colombiana de fitomejoramiento y producción de cultivos. Santa Marta : Produmedios, 1997. No. total de págs. del documento.
29. PAVEL, E.W.; JONG, T.M. DE. Estimating the photosynthetic contribution of developing peach (*Prunus presica*) fruits to their growth and maintenance carbohydrate requirements. Physiologia plantarum 88:331-338. 1993.
30. PHAN, C.T. Photosynthetic activity of fruit tissues. Plant and cell physiology 11:823-825. 1970.
31. SALAZAR, G.M.R.; RIAÑO H., N.M; [et al.]. Estudio morfológico, anatómico y ultraestructural de café *Coffea arábica* L. cv Colombia. Cenicafé 45(3):93-105. 1994.
32. -----; CHAVES C.B.; [et al.]. Crecimiento del fruto de *Coffea arábica* L. cv Colombia. Cenicafé 45(2):41-50. 1994.
33. SEGEL, I.H. Biochemical calculations. New York : Jhon Wiley and Sons, 1976. 187-193.
34. SMILLIE, R.M.; HATHERINGTON, S.E.; [et al.]. Photosynthetic activity of the calyx, pericarp and locular parenchyma of tomato fruit. Journal of experimental botany 50:707-718. 1999.
35. VAAST, P.; ANGRAND, J.; [et al.]. Fruit load branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in field. Tree physiology 25:753-760. 2005.
36. HANDEL, E. VAN. Direct microdetermination of sucrose. Analytical biochemistry 22:280-283. 1968.
37. VU, J.C.V.; YELNOSKY, G.; [et al.]. Photosynthetic activity in the flower bud of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Plant physiology 78:420-423. 1985.
38. WILLMER, C.M.; JOHNSTON, W.R. Carbon dioxide assimilation in some aerial plant organs and tissues. Planta 130:33-37. 1976.
39. WINTERMANS, J.F.G.; DE MOTTS, M.A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b their pheophytins in etanol. Biochemical biology acta 109:448-453. 1965.