

INDUÇÃO DE CALOS *IN VITRO* A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE *Coffea canephora* CV. CONILON

Maurício Reginaldo Alves dos Santos²; Maria das Graças Rodrigues Ferreira²;
Arêssa de Oliveira Correia³; Neidiane Farias Costa Reis³; Manuel de Souza Santos³

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

² Pesquisador(a), D.Sc., Embrapa Rondônia, Porto Velho–RO, mauricio@cpafro.embrapa.br;
mgraca@cpafro.embrapa.br

³ Mestrando(a) em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho-RO, aressa_oliveira@yahoo.com.br; dianefarias@yahoo.com.br; msscdas@gmail.com

RESUMO: A espécie *Coffea canephora* possui características genéticas relevantes e que são de amplo interesse em programas de melhoramento vegetal. O objetivo desse trabalho foi avaliar a indução de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Conillon, visando facilitar seu posterior desenvolvimento em embriões ou formação de órgãos. Foram utilizados segmentos foliares dessa espécie. Os experimentos foram realizados em condições assépticas, utilizando câmara de fluxo laminar horizontal. Os explantes foram inoculadas em meio MS 50% com diferentes concentrações de ANA (0; 1,0; 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹) e AIB (0; 1,0; 3,0 e 5,0 mg.L⁻¹). Na ausência de reguladores de crescimento, não foi observada calogênese. O processo de indução de calos teve início na primeira semana de cultivo. Aos 20 e 30 dias após a inoculação, observou-se grande variação na calogênese entre os tratamentos; aos 40 dias, houve grande manifestação de indução de calos, ou seja, todos os tratamentos com reguladores expressaram calogênese em 100% dos explantes.

Palavras-chave: Cafeicultura, reguladores de crescimento, calogênese.

IN VITRO INDUCTION OF CALLUS FROM LEAF SEGMENTS OF *Coffea canephora* CV. CONILON

ABSTRACT: *Coffea canephora* species cv. Conilon has excellent genetic characteristics and is interesting in programs of plan breeding. The objective of this study was to evaluate the callus formation from leaf segments of *Coffea canephora* cv. Conillon, aiming at to facilitate the development in embryos or organogenesis. It has been used leaf segments of this specie. The experiments had been carried through in asseptic conditions, using chamber of horizontal laminar flow. The samples had been inoculated in MS 50% with different concentrations of ANA (0; 1,0; 2,0 and 5,0 mg.L⁻¹) and AIB (0; 1,0; 3,0 and 5,0 mg.L⁻¹). The callus formation was not observed without growth regulators. The induction of calluses had beginning in the first week of culture. After 20 and 30 days, it was observed great variation between the treatments; after 40 days had occurred great manifestation of induction of calluses, that is, all the treatments with regulators had revealed callus formation in 100% of the explants.

Key words: Culture of coffee, growth regulators, callus formation.

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros, mas apenas cinco são cultivadas comercialmente, e entre estas, *Coffea arabica* L. (cafeeiro Arábica) e *C. canephora* Pierre (cafeeiro Robusta) são as mais comercializadas (Carvalho et al., 2001).

No Brasil, a quase totalidade das lavouras cafeeiras, genericamente conhecidas por Robusta, pertence à cultivar Conilon, sendo o Espírito Santo o maior produtor nacional, destacando-se ainda os Estados de Rondônia, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Rio de Janeiro (Martins et al., 2006).

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro no Brasil têm alcançado êxito na obtenção de cultivares produtivas, elevando em cerca de 200% a produtividade das atuais cultivares em relação à primeira variedade plantada no Brasil. Entretanto, o tempo e os recursos gastos são fatores limitantes para o melhoramento do cafeeiro por meio de métodos convencionais uma vez que, nos últimos anos, surgiram novos problemas como doenças, pragas, nematóides e maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor (Mendes, 1997). Contudo, a micropropagação vegetal *in vitro* surge como uma alternativa viável e de curto prazo para a solução desses problemas. (Palú et al., 2004)

Coffea canephora cv. Conilon possui características genéticas relevantes e de amplo interesse em programas de melhoramento vegetal, tais como resistência ao agente causador da ferrugem (*Hemileia vastatrix*), elevada capacidade produtiva e resistência à seca, devido ao grande desenvolvimento do seu sistema radicular, menor exigência em fertilidade, elevada resistência ao nematóide *Meloidogyne exigua* e certo grau de tolerância a *M. incognita* (Martins et al., 2006).

Devido a essas características, o cultivo de *C. canephora* no Brasil é responsável por cerca de 30% da produção de café, sendo importante para o segmento de cafés solúveis, na composição de *blends*. No entanto, a maior parte das plantações existentes ainda é proveniente de sementes, o que causa grande variabilidade (Veneziano & Fazuoli, 2000).

No *Coffea canephora* a fecundação é cruzada, deste modo, as plantações apresentam-se desuniformes quando observadas características vegetativas (porte, arquitetura, ângulo dos galhos, formato e tamanho das folhas), de produção (produtividade, tamanho, formato e maturação dos frutos) e de susceptibilidade às doenças (Paulino et al., 1985). Esta variabilidade dificulta os tratamentos culturais e reduz a produtividade. A qualidade do café Conilon pode ser aumentada com a utilização da micropropagação de plantas-matrizes selecionadas, através de técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Bragança, 2001).

Essas técnicas têm sido utilizadas com sucesso na multiplicação de espécies que apresentam dificuldades na propagação sexuada, além de possibilitar a uniformidade genética do material e permitir a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo (Santos, 2008). Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos em cafeeiro foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies. Após esse período, muitos trabalhos foram realizados com a adoção de métodos e espécies diversas (Santos, 2008).

A calogênese sofre influência de diversos fatores, como: tipo de explante, composição do meio nutritivo e condições físicas de incubação como luz e temperatura (Pinto & Lameira, 2001). O índice de divisão celular dos calos pode elucidar as mudanças fisiológicas das células e auxiliar a otimização dos protocolos de regeneração e transformação genética (Serra, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Conilon em relação a diferentes combinações de reguladores de crescimento, visando facilitar seu posterior desenvolvimento em embriões ou formação de órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia de Porto Velho, utilizando segmentos foliares de *Coffea canephora* cultivar Conilon (clone nº 194, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Rondônia). Foram coletadas folhas do segundo par dos ramos plagiotrópicos e a assepsia foi realizada por meio da lavagem com esponja estéril em água bidestilada estéril por 5 minutos, seguida de imersão em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% (v/v) por 30 minutos, com três enxágües em água bidestilada estéril. As folhas foram segmentadas em pedaços de 1 cm², com o auxílio de pinça e bisturi, sendo inoculados em meio MS 50% (Murashige & Skoog, 1962). O meio foi suplementado com 3% de sacarose, 0,8% de ágar e com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (Tabela 1). O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, a 25±1°C, por um período de 40 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 16 tratamentos e 10 repetições. Observou-se a variável porcentagem de indução de calos (%IC), porcentagem da área foliar coberta por células de calo (%AFCC) e para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%.

Tabela 1 – Combinações de ANA e AIB utilizadas para indução de calos em explantes foliares de *C. canephora* cv. Conilon.

Tratamentos	Concentrações (mg.L ⁻¹)	
	ANA	AIB
1	–	–
2	–	1,0
3	–	3,0
4	–	5,0
5	1,0	–
6	1,0	1,0
7	1,0	3,0
8	1,0	5,0
9	2,0	–
10	2,0	1,0
11	2,0	3,0
12	2,0	5,0
13	5,0	–
14	5,0	1,0

15	5,0	3,0
16	5,0	5,0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos segmentos foliares de *C. canephora* inoculados na ausência de reguladores de crescimento não foi observada calogênese. O processo de indução de calos teve início na primeira semana de cultivo, quando observou-se pontos que se expandiam e recobriam a superfície dos explantes. A calogênese, normalmente, foi observada tendo início nas nervuras foliares, o que se deve ao fato de que o câmbio vascular contém células meristemáticas conhecidas como células-tronco (totipotentes) capazes de se diferenciar em outros tipos celulares (Taiz & Zeiger, 2004).

Os tratamentos 15 e 16 foram os primeiros a manifestar a calogênese. A média da porcentagem da indução em 20 dias foi de 85% para todos os tratamentos; com isso pode-se verificar que a formação de calos aumentou significativamente na maioria dos tratamentos com reguladores de crescimento (Figura 1).

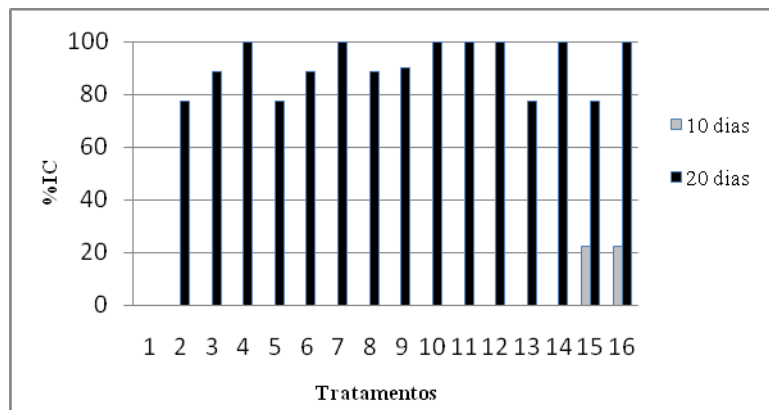


Figura 1 – Efeito dos tratamentos na indução de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Conilon, aos 10 e 20 dias de cultivo.

Aos 30 dias os tratamentos 2, 7 e 9 apresentaram média de porcentagem de 87,7% de manifestação calos; os demais tratamentos apresentaram 100% (Figura 2). Após 40 dias houve grande manifestação de indução de calos, ou seja, todos os tratamentos com hormônio manifestaram 100% de calogênese. Portanto, houve interação significativa para ANA e AIB na indução de calos para a cultivar Conilon. Este estudo demonstrou também que não houve efeito fitotóxico promovido pelas concentrações mais altas de reguladores utilizadas em alguns tratamentos. A adição de reguladores de crescimento ao meio é essencial para a formação de calos nessa cultivar.

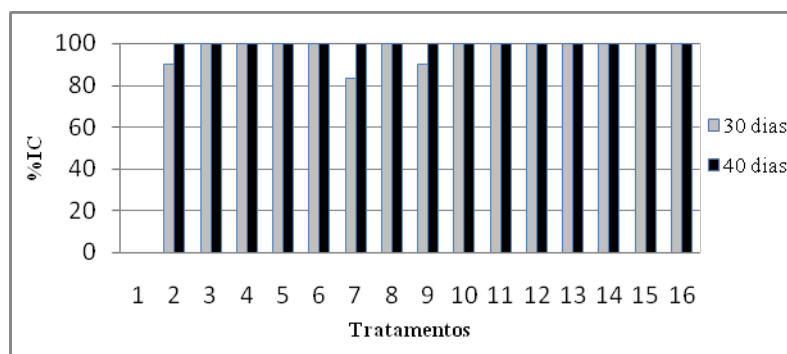


Figura 2 – Efeito dos tratamentos na indução de calos em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Conilon, aos 30 e 40 dias de cultivo.

Ao contrário dos resultados acima mencionados, Santos (2002) relatou que explantes de Catimor (*Coffea arabica* L 'Caturra' x Híbrido de Timor) UFV 395-141 não obtiveram formação de calos nos meios contendo apenas citocinina aos 30 dias de cultivo.

Da mesma forma que neste estudo, Barbosa et al. (2003), após 28 dias de cultivo, verificaram que houve a formação de calos na maioria dos explantes quando cultivados em meios contendo apenas com BAP e que os explantes

do genótipo Catimor (*Coffea arabica* L 'Caturra' x Híbrido de Timor) UFV 395-141 eram mais suscetíveis ao desenvolvimento de calos.

Entretanto outros estudos relatam diversos tipos de interação entre hormônios, como em Santos et al., (2001) que obtiveram indução de calos em *C. arabica* Catuaí Vermelho somente em resposta aos meios com 2,4-D (1,5 µM) combinado com BAP (7,5 µM) e 2iP (25,0 µM) combinado com AIB (5,0 µM).

Costa (2008) verificou que a adição da auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ em *Piper hispidinervum* possibilitou os maiores percentuais de formação de calos e que o tipo de explante usado (segmento foliar) teve forte influência sobre esta variável. Nessas concentrações de ANA, a formação de calos observada com a utilização de segmentos foliares foi de 83,2 a 91,6%, valores significativamente superiores àqueles observados para os segmentos internodais, que resultaram em 43,1 e 49,6% de calogênese.

Considerando a relevância de 100% de indução de calos nos tratamentos 13, 14, 15 e 16 com concentração de 5,0 mg L⁻¹ de ANA, em comparação com outros resultados, pode-se constatar a eficiência dessa concentração para desenvolvimento de calos em segmentos foliares sendo que, dentre estes, apenas o tratamento 13 não contém AIB. Os tratamentos 15 e 16, com 5,0 mg.L⁻¹ de ANA e, respectivamente, 3,0 e 5,0 mg.L⁻¹ de AIB, foram os que promoveram a indução mais rápida, já observada com apenas 10 dias de cultivo. Este estudo mostra também que os tecidos foliares de *C. canephora* cv. Conilon são altamente responsivos à indução de calos.

O mesmo foi observado por Flores et al. (2006), ao estudar a indução de calos em explantes de *Pfaffia tuberosa* Spreng. Os autores verificaram que explantes de origem foliar foram os que proporcionaram os melhores resultados, igualmente aos resultados observados por Dhar & Joshi (2005), que trabalhando com tipos de explantes na indução e crescimento de calos em *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew., observaram significativa influência do tipo primário de explantes (hipocótilo, raízes, cotilédones e folhas) sobre a taxa de formação de calos, sendo as folhas a melhor fonte, com 100% de calogênese.

Após 40 dias de inoculação, observou-se a variável de porcentagem da área foliar coberta por células de calos (%AFCC) (Tabela 2). Os tratamentos de 5 a 16 apresentaram explantes com porcentagens acima de 25%; estes tratamentos são os que contém ANA (1,0, 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹). Na ausência de ANA, não se observou explantes com porcentagens acima de 25% da área foliar coberta por células de calo (tratamentos 1 a 4).

Tabela 2 – Porcentagem da área foliar coberta por células de calos (%AFCC) em segmentos foliares de *Coffea canephora* cv. Conilon, em relação aos tratamentos para indução de calos, 40 dias após inoculação.

Trat	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Sem indução	10a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0-25%	0d	10a	10a	10a	9ab	8bc	9ab	8bc	8bc	8bc	8bc	1d	8bc	8bc	7c	8bc
25-50%	0	0	0	0	1c	2b	1c	2b	2b	2b	2b	8a	2b	2b	1c	2b
50-75%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1b	0	0	2a	0
75-100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Valores seguidos por letras diferentes, em cada linha, diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.

A interação entre duas auxinas mostrou-se importante no aumento da calogênese em explantes foliares de *C. canephora*. Os únicos tratamentos que apresentaram explantes com mais de 50% da AFCC foram 12 (2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 5,0 mg.L⁻¹ de AIB) e 15 (5,0 mg.L⁻¹ de ANA + 3,0 mg.L⁻¹ de AIB), sendo que o tratamento 12 se destacou de todos os demais, apresentando 90% dos explantes com mais de 25% da AFCC e 10% com AFCC acima de 50%. A interação entre os dois reguladores de crescimento se mostrou importante quanto a esta variável.

Este resultado não corrobora com estudos realizados por Cordeiro (1999), que obteve maior calogênese utilizando explantes foliares de *Coffea arabica* L., induzidos apenas com BAP. Porém, a associação de auxinas apresenta resultados divergentes aos de Cordeiro (1999), já que os hormônios AIB e ANA são auxinas reconhecidas geralmente pelo seu efeito positivo na indução de enraizamento, entretanto neste estudo obteve-se resultados significativos quanto à indução de calos.

Quanto à concentração de AIB, também se observou expressiva porcentagem na formação de calos. De acordo com Erig & Schuch (2004), a utilização de auxina pode causar a formação de calo na base do explante e comprometer a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Entretanto, as concentrações utilizadas nesse estudo foram ideais para a indução de calo. Palú et al.(2004), demonstraram que, em experimentos de indução de calos em anteras de *C. arabica* L. Rubi e Acaia Cerrado, as maiores porcentagens de indução de calos ocorreram com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB, na ausência de 2,4-D, com 0,86 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado com a concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB e com 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na ausência de AIB.

Entretanto, algumas pesquisas mostram que outras auxinas também possuem grande influência na formação de calos, como o estudo de Sondahl (1978) que pesquisou os efeitos das auxinas na proliferação de calos de explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Bourbon e observou que o 2,4-D foi a auxina mais efetiva na promoção da proliferação celular. Em relação às concentrações de 2,4-D utilizadas (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), a indução de calos apresentou um acréscimo de 25 % na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ em comparação com 1,0 mg.L⁻¹. Porém, resultado divergente foi relatado por Santos et al. (2008) quando comparou a atividade calogênica de diferentes concentrações de AIB no explante foliar de *C. canephora* cv, Apoatã, não observando diferença significativa entre estas. Contudo, utilizando AIB, independente de sua concentração, em combinação com 2,4-D na concentração de 1,0 mg.L⁻¹, observou-se aumento de 19 % na produção de calos.

CONCLUSÃO

Após as análises dos resultados pode-se afirmar que os tecidos foliares de *C. canephora* cv. Conilon, clone 194, são altamente responsivos à indução de calos.

Pode-se concluir também que a interação entre as duas auxinas AIB e ANA é extremamente positiva para a calogênese em explantes foliares destas plantas e que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é essencial quanto a este aspecto.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, W. M.; CORDEIRO, A. T.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Manose como fonte de carboidrato na calogênese induzida em explantes foliares de *Coffea arabica* e de *Coffea canephora*. In: III SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2003, Porto Seguro, BA. **Anais...** Porto Seguro-BA, 2003.
- BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S. de; FONSECA, A. F. A. da; FERRÃO, R. G. EMCAPA 8111, EMCAPA 8121, EMCAPA 8131: Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.
- CARVALHO, L. de; SILVA, E. A. M.; CECON, P. R.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.
- CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática indireta e fusão interespecífica de protoplasto em Coffea**. 1999. 111 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1999.
- COSTA, F. H. S.; SILVA, T. L.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, UFC-Fortaleza, v. 39, p. 269-274, 2008.
- DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, New York, v. 24, p. 195-200, 2005.
- ERIG, A.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1443-1449, 2004.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Puffia tuberosa* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.
- MARTINS, C. C.; REIS, E. F.; BUSATO, C.; PEZZOPANE, J. E. M. Crescimento inicial do café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) sob diferentes lâminas de irrigação. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 14, p. 193-201, 2006.
- MENDES, A. N. G. Economia cafeeira: o agrobusiness. In: MENDES, A. N. G.; RUBENS, J. G. (Eds.). **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**, Lavras: UFLA/FAEPE, v. 1, p. 1-59, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PALÚ, E. G.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 736-742, jul./ago., 2004.
- PAULINO, A. J.; MATIELLO, J. B.; PAULINI, A. E. **Produção de mudas de café Conilon por estacas: instruções técnicas sobre a cultura de café no Brasil**. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 12 p., 1985.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 80 p., 2001.
- SANTOS, A. C. P.; CORDEIRO, A. T.; ZAMBOLIM, L. Calogênese friável em *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: II SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café Minasplan, v. 1, 2001.
- SANTOS, C. G. Características anatômicas do tecido foliar durante os processos de cultivo *in vitro* e *in vivo* de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: 28 Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 2002, **Anais**. Caxambu-MG, 2002 p. 167-169.

- SANTOS, C. G. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, p. 22-29, 2008.
- SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 40, p. 833-840, 2000.
- SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S. Calogênese de pimenta longa é altamente dependente do tipo de explante e auxina utilizada. In: 46 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2006, Goiânia. 46 Congresso Brasileiro de Olericultura. **Horticultura Brasileira**, suplemento, Goiânia, v. 24. p. 61-64, 2006.
- SONDAHL, M. R. Interações de citoquininas e auxinas no crescimento e embriogênese de explantes de *Coffea* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 6., 1978, Ribeirão Preto. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1978. p. 67.
- STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. **Acta Botanica Neerlandica**, Netherlands, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Artmed: Porto Alegre-RS, 2004. 565p.
- VENEZIANO, W.; FAZUOLI L. C. Avaliação de Cultivares de cafeeiros Robusta (*Coffea canephora*) em Rondônia. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000. Poços de Caldas. **Resumos Expandidos**, vol. 1, p. 459-461, Poços de Caldas, 2000.