

INTER-RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES DO GÊNERO *SPONDIAS* COM BASE EM MARCADORES AFLP¹

CARLOS ANTÔNIO FERNANDES SANTOS² & VISELDO RIBEIRO DE OLIVEIRA³

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi construir um fenograma de trinta indivíduos de seis espécies de *Spondias*, amostradas em três diferentes locais, baseado em 120 marcadores AFLP das combinações de primers *EcoRI/MseI* para esclarecer as inter-relações entre as espécies, subsidiar a exploração das espécies como porta-enxerto e fornecer informações genômicas dessas espécies. O fenograma UPGMA do coeficiente de Jaccard apresentou boa definição, com valor co-fenético de 0,925 e localização externa de dois “outgroups” das espécies *Mangifera indica* e *Schinopsis brasiliensis* da família Anacardeaceae. Todos os indivíduos de *S. cytherea*, *S. tuberosa* e *S. purpurea* foram agrupados dentro de cada espécie, independentemente do local de amostragem, enquanto quatro dos seis indivíduos de *Spondias sp* (umbu-cajá) e *S. mombin* foram agrupadas, e outros dois indivíduos foram posicionados fora dos agrupamentos dessas espécies. Os dois indivíduos de *Spondias sp* (umbuguela) não se posicionaram próximos no fenograma. A posição do umbu-cajá e da umbuguela (PE) entre umbuzeiro e cajazeira, e similaridades entre 50% e 60% sugerem que as mesmas possam ser híbridas entre as duas espécies. O fenograma sugeriu que *S. cytherea* foi a espécie mais divergente das estudadas.

Termos para indexação: *Spondias tuberosa*, fenograma, marcadores moleculares, DNA, AFLP, genética.

GENETIC INTER-RELATIONSHIPS AMONG SPECIES OF GENUS *SPONDIAS* BASED ON AFLP MARKERS

ABSTRACT - The goal of this study was to build a phenogram with thirty individuals of six *Spondias* species, sampled in three different locations, based on 120 AFLP markers of *EcoRI/MseI* primers combinations in order to clarify the inter-relationship among these species, to subsidize the establishment of economic grown of these species and to support genomic studies of these species. The UPGMA phenogram of Jaccard coefficient was supported by a cophenetic value of 0.925 and the outside location of the two outgroups species *Mangifera indica* and *Schinopsis brasiliensis*, from the Anacardiaceae family. All individuals of *S. cytherea*, *S. tuberosa* and *S. purpurea* were closely grouped independently of the sampling location, while four out six individuals of *Spondias sp* (umbu-cajá) and *S. mombin* were held together and two other were placed outside of the groups. The two individuals of *Spondias sp* (umbuguela) were not closely positioned in the phenogram. The phenogram position of umbu-cajá and umbuguela, between *S. tuberosa* and *S. mombin*, and the percentage of similarities among 50 and 60% suggested that umbu-cajá and umbuguela could be hybrids of these two species. The produced phenogram suggested that *S. cytherea* was the most divergent *Spondias* species.

Index terms: *Spondias tuberosa*, phenogram, molecular markers, DNA, AFLP, genetic.

INTRODUÇÃO

O gênero *Spondias*, pertencente à família Anacardeaceae, compreende cerca de 20 espécies, incluindo sete taxa nos Neotrópicos e cerca de 10 espécies nos trópicos da Ásia. Quase todas as espécies de *Spondias* têm um endocarpo fibroso e folíolos com veias intra-marginais. Não há estudos sobre as relações filogenéticas das *Spondias* com outros gêneros afins, bem como entre as espécies do gênero *Spondias* (Miller e Schaal, 2005).

No Nordeste do Brasil, algumas *Spondias* são cultivadas em fundos de quintais ou em pequenos pomares, incluindo o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Camara), ciriguela (*S. purpurea* L.), cajá (*S. mombin* L.), umbu-cajá (*Spondias sp.*), cajá-manga (*S. cytherea* Sonn) e umbuguela (*Spondias sp.*). Os frutos das espécies de *Spondias* são consumidos *in natura*, vendidos em mercados locais ou nas margens de algumas rodovias brasileiras.

Santos (1999) estimou que o mercado brasileiro de *Spondias tuberosa* seja de cerca de seis milhões de dólares por ano, incluindo colheita, venda e transformação de frutos resultantes do extrativismo. Em algumas regiões do Estado da Bahia, o comércio de frutas frescas e transformadas está em rápida expansão, com muitas famílias de pequenos produtores e/ou assalariados agrícolas envolvidos (Irpaa, comunicação pessoal).

O umbuzeiro (*S. tuberosa*) é uma planta nativa da região Semi-Árida do Brasil (Prado e Gibbs, 1993), *S. cytherea* é originária da Polinésia (Airy Shaw e Forman, 1967), *S. mombin* é originária da Amazônia ocidental brasileira e Floresta Atlântica (Mitchell e Daly, 1995), *S. purpurea* é nativa das florestas tropicais secas do México e da América Central (Miller e Schaal, 2005), *Spondias sp.* (umbu-cajá) deve ser um híbrido natural entre *S. tuberosa* e *S. mombin*, encontrado no Nordeste do Brasil e de origem desconhecida, enquanto *Spondias sp.* (umbuguela) assemelha-se ao *S. tuberosa* e *S. mombin* e sua ocorrência é reportada nas cidades de Santa Isabel e Tururu, nos Estados da Paraíba e do

¹(Trabalho 200-07). Recebido em: 17-08-2007. Aceito para publicação em: 07-03-2008. Apoio financeiro do BNB-Etene-Fundeci.

²Engo. Agro., Ph.D., pesquisador da Embrapa Semi-Arido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina-PE. Brasil. E-mail: casantos@cpatsa.embrapa.br

³Engo. Florestal, Doutor, pesquisador da Embrapa Semi-Arido. Caixa Postal 23. 56302-970. Petrolina-PE. Brasil. E-mail: viseldo@cpatsa.embrapa.br

Ceará, respectivamente (Souza, 1998).

O nome do umbu-cajá (*Spondias* sp.) é uma junção de nomes do umbu (*S. tuberosa*) e cajá (*S. mombin*), e de acordo com moradores da região, é um híbrido natural dessas duas espécies. O mesmo aplica-se a umbuguela (*Spondias* sp), que tem o nome formado pela junção de umbu e ciriguela. De uma visão mais ampla, intergenérica, cajá-manga (*S. cytherea*) é uma junção de cajá e manga (*Mangifera indica* L.), devido à semelhança do fruto do cajá-manga com o fruto da manga. Esses fatos permanecem não-resolvidos do ponto de vista genético, e cruzamentos controlados entre eles não foram realizados (Souza, 1998).

S. tuberosa, *S. mombin* e *S. cytherea* podem ser propagadas por sementes e vegetativamente, e as outras três *Spondias* desse estudo podem ser propagadas apenas vegetativamente, porque o pólen e/ou embriões não são férteis (Campbell e Sauls, 1991; Souza, 1998). Sementes poliembriônicas têm sido reportadas para *S. cytherea* e *S. mombin*, enquanto *S. tuberosa* apresenta sementes monoembriônicas (Souza, 1998). *S. mombin* e *S. tuberosa* apresentam túberas nas raízes após a germinação da semente, sendo que *S. tuberosa* é a única a apresentar um imenso sistema de raízes modificadas, chamado de xilopódio, capaz de armazenar cerca de 2.000 litros de água e sais minerais (Cavalcanti et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi construir um fenograma com trinta indivíduos de seis espécies de *Spondias*, baseado em marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) para esclarecer as inter-relações entre as espécies, subsidiar a exploração das espécies como porta-enxerto e fornecer informações genômicas dessas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético: Foram coletadas folhas de várias espécies e procedências do gênero *Spondias*, quais sejam: *S. tuberosa* Camara – umbuzeiro; *S. purpurea* L.- ciriguela; *Spondias mombin* L.-cajazeira; *Spondias* sp - umbu-cajazeira; *S. cytherea* Sonn.- cajareira ou caju-mangueira, e *Spondias* sp – umbuguela. As plantas foram amostradas em três locais: Petrolina-PE, Picos-PI e Senhor do Bonfim-BA, na região Nordeste do Brasil. Dois indivíduos foram amostrados para cada espécie, em cada local, exceto a umbuguela, da qual foram amostrados apenas dois indivíduos, um em Petrolina e outro em Senhor do Bonfim, e *S. tuberosa* que não foi amostrada em Picos. Petrolina está distante 120 km de Senhor do Bonfim e 300 km de Picos, enquanto Picos está distante 420 km de Senhor do Bonfim. Esses pontos de amostragem tornam bastante improvável que os materiais de uma dada espécie tenham a mesma origem, via propagação por semente ou vegetativa. A localização geográfica dos materiais foi realizada com o auxílio de um GPS, marca Garmin.

As folhas utilizadas para a extração de DNA foram armazenadas em um freezer de -80°C. Duas outras espécies, *Mangifera indica* (mangueira) e *Schinopsis brasiliensis* (baraúna), da mesma família Anacardeaceae, foram incluídas como “outgroups”.

Extração de DNA, amplificação de AFLP e análise dos dados - As folhas foram congeladas com nitrogênio líquido e pulverizadas, usando-se almofariz e pistilo de porcelana. O DNA foi extraído das folhas usando o protocolo CTAB 2x de Doyle e Doyle (1990), modificado para: 6.000 e 10.000 rpm na primeira e na segunda centrifugação, respectivamente; betamercaptoetanol a 2% e incubação a 60°C durante 30 minutos para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris-EDTA, a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs coisolados. A quantificação e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose, seguido do armazenamento a -20°C.

O DNA genômico foi diluído para 30 ng/μL e, aproximadamente, 200 ng de DNA de cada material genético foram duplamente digeridos com 0,65 unidades das endonucleases *EcoRI* e *MseI* (10 unidade/μL, cada), por 2h30 a 37°C. Após esse período, as endonucleases foram inativadas, incubando-se a mistura por 15 min a 70°C, colocando-se em seguida em gelo. Para a ligação dos adaptadores, foram adicionados, a cada DNA digerido, 6,07 μL de uma solução de ligação dos adaptadores (Gibco – Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 0,18 μL da DNA T4 ligase (3 unidades/μL). A solução foi misturada gentilmente à temperatura ambiente, incubada por 2 horas a 20°C ± 2°C e, em seguida, colocada em gelo. Para realizar a etapa de pré-amplificação, foi feita uma diluição de 1:5 da mistura de ligação dos adaptadores com água ultrapura. Em uma nova placa de PCR, foram adicionados a cada poço 2,0 μL da mistura da ligação diluída, 1,5 μM dos *primers* de pré-amplificação, 1x do tampão 10x de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 unidades da *Taq* DNA polimerase (5 unidades/μL), 2,5 mM de MgCl₂ e água ultrapura para o volume final de 15 μL. Em seguida, os fragmentos foram pré-amplificados em termociclador programado para 20 ciclos (30 s a 94°C + 1 min a 56°C + 1 min a 72°C). Cada reação foi então diluída 20 vezes em tampão TE e armazenada em geladeira.

Foram realizadas reações seletivas de amplificação para um volume final de 10 μL de acordo com o protocolo: 0,2 μM do *primer* da *EcoRI*, 0,3 μM do *primer* da *MseI*, 0,2 mM de dNTPs, 1x tampão de PCR (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Biosystem, Paraná) e 2,0 μL do DNA pré-amplificado. A programação do termociclador para as amplificações seletivas consistiu de: a) um ciclo de 94°C, seguido de 65°C durante 30 s e de 72°C durante 1 min, repetidos 13 vezes e com a temperatura de anelamento de 65°C, diminuindo de 0,7°C em todo o ciclo subsequente; b) 23 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C durante 30 s e 72°C durante 1 min. As reações foram aquecidas durante 3 min a 94°C, na presença de formamida, e imediatamente colocadas sob o gelo antes da aplicação nos géis de poliacrilamida. Os géis foram corados com nitrato de prata conforme descrito por Creste et al. (2001).

O índice de similaridade de Jaccard foi adotado para estimar a similaridade genética entre os indivíduos das espécies estudadas. A matriz de similaridade foi usada para a construção do fenograma, de acordo com o Método de Agrupamento não-Ponderado com base em Média Aritmética-UPGMA, com auxílio do software NTSYS (Rohlf, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 120 fragmentos de AFLP em nove combinações de primers (PC) EcoR1/MseI, com média de 13,3 marcas/PC. Os PCs produziram os seguintes números de bandas: E-ACG/M-CTC (17), E-ACT/M-CAG (14), E-ACT/M-CTG (11), E-ACC/M-CCC (18), E-ACA/M-CTA (9), E-AGC/M-CTA (4), E-AAC/M-CTA (22), E-AAC/M-CAC (12) e E-AAG/M-CTA (13). Foram anotadas apenas as bandas bem definidas, evitando-se bandas que apresentassem pequena diferença na posição no gel (Fig.1).

Algumas bandas foram anotadas consistentemente nas espécies de *Spondias* e foram ausentes nas espécies do “outgroup”, sugerindo que o seqüenciamento das mesmas poderia transformá-las num marcador valioso para distinguir as *Spondias* de outras espécies. Santos e Simon (2002) demonstraram que “amplicons” de AFLP que ocuparam a mesma posição no gel de poli(acrilamida), apresentaram identidades superiores a 90% e que eles mapearam para o mesmo grupo de ligação em duas populações F_2 de cenoura.

A correlação entre o procedimento SAHN com o coeficiente de similaridade da matriz, usando o procedimento MXCOMP do NTSYSpc (Rohlf, 1989), foi de 0,925, indicando que o fenograma produzido (Figura 2) foi uma boa representação dos dados de AFLP. Outra boa indicação do ajuste do fenograma foi a localização externa dos dois “outgroups” das espécies *Mangifera indica* e *Schinopsis brasiliensis*, Anacardiaceae.

Todos os indivíduos de *S. cytherea*, *S. tuberosa* e *S. purpurea* foram agrupados independentemente do local de amostragem, indicando que essas espécies apresentam características que foram facilmente identificadas, tornando possível reproduzi-las sem qualquer dúvida. Quatro dos seis indivíduos de *Spondias sp* (umbu-cajá) e *S. mombin* ficaram sempre juntos, e os outros dois posicionaram-se fora dos grupos, o que pode ser atribuído a alguma confusão local na identificação dos mesmos ou a uma alta variabilidade genética intra-específica desses indivíduos (Fig. 2).

Os dois indivíduos de *Spondias sp* (umbuguela) não foram posicionados juntos no fenograma, sugerindo que os dois indivíduos podem ser espécies diferentes (Fig. 2). O indivíduo de umbuguela amostrado em Petrolina foi introduzido de Areia-PB, que é uma região próxima do registro de ocorrência dessa espécie (Souza, 1998), enquanto a umbuguela amostrada em Senhor do Bonfim-BA pode ser um indivíduo de umbu-cajá com alguma particularidade, pois esse indivíduo posicionou-se entre indivíduos da espécie (Fig. 2).

A maior similaridade foi observada entre os dois indivíduos de umbu-cajá amostrados em Picos-PI (Fig.2), sugerindo que esses dois indivíduos podem ser clones da mesma planta, porque ela é propagada vegetativamente. Apesar de *S. purpurea* ser propagada vegetativamente, o coeficiente de similaridade para todos os indivíduos dessa espécie variou de 72% a 87%, sugerindo alguma variabilidade entre eles.

O fenograma produzido sugere que *S. cytherea* é a mais divergente das espécies de *Spondias* analisadas neste trabalho. Especificamente para *S. tuberosa*, as espécies de *Spondias* mais

distantes foram *S. cytherea* e *S. mombin* (Fig. 2). Quando *S. tuberosa* foi usada como porta-enxerto dessas *Spondias*, foram observados os seguintes percentuais de “pegamento”: 22% com *S. cytherea*, 67% com *S. mombin*, 86% com *S. purpurea* e 90% com *Spondias sp* (umbu-cajá) (Santos et al. 2002), suportando os resultados do presente estudo.

A posição no fenograma da umbuguela amostrada em Petrolina-PE, entre umbuzeiro (*S. tuberosa*) e cajazeira (*S. mombin*), sugere que o mesmo pode ser um híbrido das duas espécies, com similaridade superior a 60%, apesar de o seu nome indicar que seja um híbrido entre umbuzeiro e a ciriguela. A posição do umbu-cajá entre umbuzeiro e cajazeira, com similaridade em torno de 50%, sugere também que o mesmo pode ser um híbrido das duas espécies, como indicado no seu nome. Para a cajarana ou cajá-manga (*S. cytherea*), apesar da sua posição no fenograma entre a cajazeira e a mangueira, a similaridade inferior a 25% indica que dificilmente a espécie seja resultado de cruzamentos entre mangueira e cajazeira (Fig. 2). Deve ser destacado que Miller e Schaal (2005) reportaram um número básico de cromossomos para algumas espécies de *Spondias* variando de $n=4$ a $n=25$, tornando muito difícil a hibridação entre elas. Estudos detalhados com seqüências de cloroplasto podem elucidar aspectos evolutivos e a possibilidade da ocorrência de híbridos naturais entre as duas espécies, como observado preliminarmente neste trabalho para o umbu-cajá e umbuguela.

O umbuzeiro (*S. tuberosa*) é endêmico da região do trópico Semi-Árido brasileiro (Prado e Gibbs, 1993) e apresenta algumas características adaptativas, como raízes modificadas e estruturas fisiológicas, que fazem com que essa espécie seja muito adaptada ao ambiente da região. Santos et al. (2002) relataram o uso do umbuzeiro como porta-enxerto dessas cinco espécies de *Spondias*, talvez no único estudo sobre as inter-relações biológicas entre elas.

As características fisiológicas e a adaptação de algumas *Spondias* associadas com a compatibilidade biológica de porta-enxerto, conforme Santos et al. (2002), e as inter-relações entre algumas espécies de *Spondias*, inferidas com base em marcadores AFLP nesse estudo, serão valiosas para subsidiar o estabelecimento de produção de frutos em regiões semi-áridas sem irrigação regular e para orientar futuros estudos genômicos e de sintonia entre as espécies.

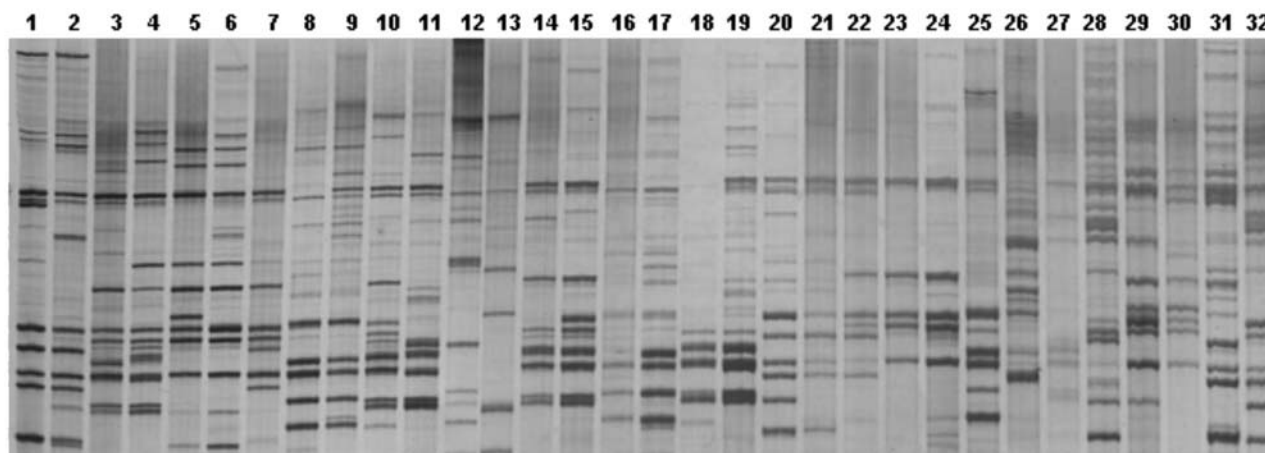


FIGURA 1 - Padrão representativo de bandas AFLP derivado de uma combinação de *primers* E-ACT/M-CTG em trinta indivíduos de seis espécies de *Spondias*, amostrados em três diferentes locais, e dois outros *outgroups* da família Anacardeaceae. Indivíduos da esquerda para a direita: 1-*S. pupurea*-PE1; 2-*S. pupurea*-PE2; 3-*Spondias sp1*-PE1; 4-*Spondias sp1*-PE2; 5-*S. Tuberosa*-PE1; 6-*S. Tuberosa*-PE2; 7-*Spondias sp2*-PE; 8-*S. cytherea*-PE1; 9-*S. cytherea*-PE2; 10-*S. mombin*-PE1; 11-*S. mombin*-PE2; 12-*Schinopsis brasiliensis*; 13-*Mangifera indica*; 14-*Spondias sp1*-PI1; 15-*Spondias sp1*-PI2; 16-*S. cytherea*-PI1; 17-*S. cytherea*-PI2; 18-*S. mombin*-PI1; 19-*S. mombin*-PI2; 20-*S. pupurea*-PI1; 21- *S. pupurea*-PI2; 22-*Spondias sp2*-SR; 23-*S. Tuberosa*-SR1; 24-*S. Tuberosa*-SR2; 25-*S. cytherea*-SR1; 26-*S. cytherea*-SR2; 27-*S. mombin*-SR1; 28-*S. mombin*-SR2; 29-*Spondias sp1*-SR1; 30-*Spondias sp1*-SR2; 31-*S. pupurea*-SR1; 32 *S. pupurea*-SR2.

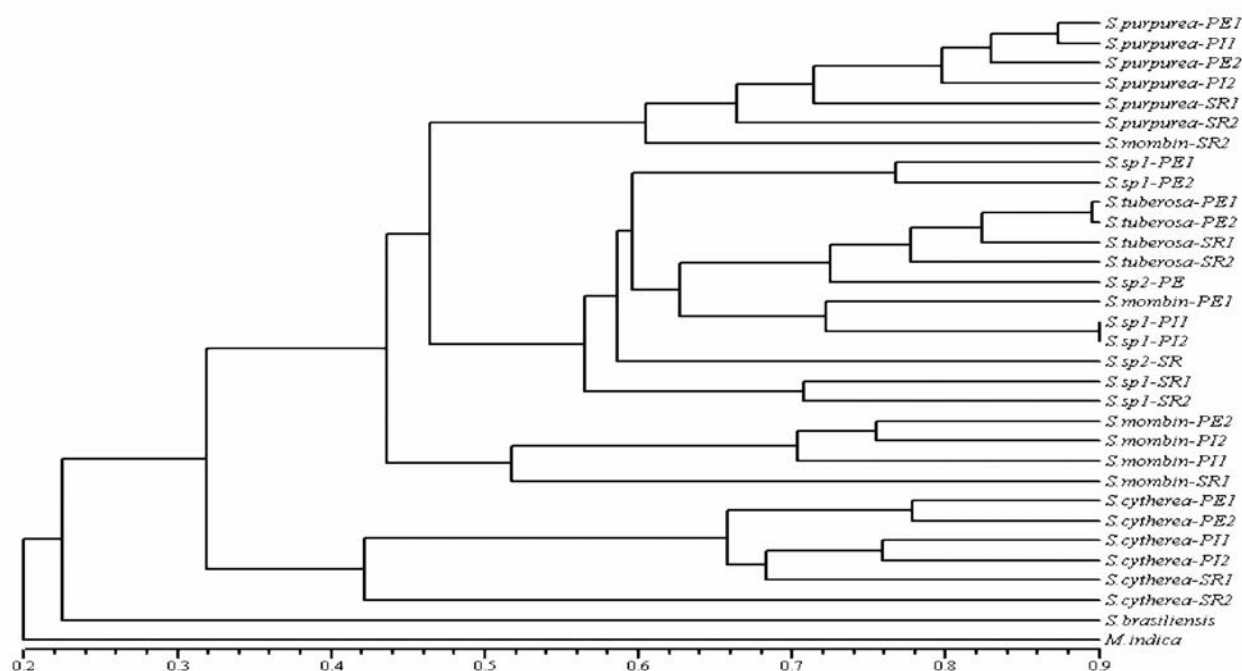


FIGURA 2 - Fenograma UPGMA do coeficiente de Jaccard entre 30 indivíduos de seis espécies de *Spondias*, procedentes de três diferentes locais do Nordeste do Brasil (Petrolina-PE; Picos, PI; Senhor do Bonfim-BA), com base em 120 marcadores AFLP / EcoRI/MseI. *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Mangifera indica* L. são “outgroups” da família Anacardiaceae: valor cofenético = 0.925.

CONCLUSÕES

1-Indivíduos de *S. cytherea*, *S. tuberosa* e *S. purpurea* posicionaram-se no grupo de cada espécie, enquanto indivíduos de *S. mombin*, *Spondias sp.* (umbu-caja) e *Spondias sp.* (umbuguela) não formaram grupos-espécie específicos no fenograma com dados de AFLP.

2-A posição do umbu-cajá entre umbuzeiro e cajazeira, e a similaridade em torno de 50% sugerem que este material pode ser um híbrido das duas espécies, como indicado no seu nome.

3-A posição da umbuguela amostrada em Petrolina-PE entre umbuzeiro e cajazeira, e a similaridade em torno de 60% sugerem que a umbuguela possa ser um híbrido das duas espécies.

4-O fenograma de AFLP mostra que *S. cytherea* foi a espécie mais divergente das espécies analisadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AIRY SHAW, H.K.; FORMAN, L.L. The genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in tropical Asia. **Kew Bulletin**, Richmond, v. 21, n.1, p.1-20, 1967.
- CAMPBELL, C.W.; SAULS, J.W. ***Spondias in Florida***. Gainesville: Florida Cooperative Extension Service/Institute of Food and Agricultural Sciences/University of Florida, 1991. 3p. (Fruit Crops Fact Sheet. FC-63).
- CAVALCANTI, N. de B.; RESENDE, G. M.; BRITO, L. T. de L. Levantamento da produção de xilopódios e os efeitos de sua retirada sobre a frutificação e persistência de plantas nativas de umbuzeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 927-942, 2002
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-15, 1990.
- MILLER A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 12801-12806, 2005.
- MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. Revisão das espécies neotropicais de *Spondias* (Anacardiaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: USP, 1995. p. 207.
- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distribution in the dry season forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 80, n. 4, p. 902-927, 1993.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 1.80. Setauket, NY: Exeter Software, 1989.
- SANTOS, C. A. F.; SIMON, P. W. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F2 populations of carrot. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 195-201, 2002.
- SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P. de; NASCIMENTO, C. E. de S.; LIMA-FILHO, J. M. P. Umbuzeiro como porta-enxerto de outras *Spondias* em condições de sequeiro: avaliações aos cinco anos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002, 1 CD ROM.
- SANTOS, C.A. F.; Nascimento, C. E. de S.; CAMPOS, C. de O. Preservação da variabilidade genética e melhoramento do umbuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n.2, p. 104-109, 1999.
- SOUZA, F. X. ***Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação***. Fortaleza: Embrapa: CNPAT / SEBRAE-CE, 1998. (Documentos, 27)