

MORFOANATOMIA DA RAIZ DE *ARABIDOPSIS THALIANA* SUBMETIDA À CUMARINA (1,2- BENZOPIRONA)

MORPHOANATOMY IN THE ROOT OF *ARABIDOPSIS THALIANA* SUBMITTED TO CUMARINE (1,2-BENZOPYRAN)

MORFANOANOMÍA EN LA RAÍZ DE *ARABIDOPSIS THALIANA* PRESENTADA A CUMARINA (1,2-BENZOPIRANO)

Lívia Maria de Lima Santos¹
Adenilson Henrique Gonçalves²

Resumo

Cumarinas podem alterar a germinação e o desenvolvimento das espécies receptoras, em ambientes naturais ou controlados. Objetivou-se identificar o efeito da cumarina na Germinação Total (G_T (%), Velocidade Média da Germinação (S), Velocidade de Germinação Acumulada (AS) e Comprimento Total da Raiz (CTR), bem como o efeito cumulativo da cumarina sobre a morfoanatomia da raiz de *Arabidopsis thaliana* ao longo do tempo (7 e 14 dias). As sementes foram cultivadas em placas de Petri quadradas, contendo ágar e concentrações de cumarina compondo a curva dose-resposta (0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 μM). A cumarina foi diluída previamente em etanol. Como controle, etanol acrescido ao ágar. Após determinar o IC_{50} (14 μM), sementes de *A. thaliana* foram cultivadas durante 7 e 14 dias. Posteriormente, foram realizados cortes (0,7 μm) dos ápices radiculares e corados com azul de toluidina. A inibição da germinação foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de cumarina maior foi a inibição da germinação. Na maior concentração a germinação foi de 40%, AS e S foi de apenas 37% e o comprimento total das plântulas reduziu 66%. O IC_{50} induziu o espessamento do ápice radicular, principalmente aos 14 dias de cultivo, aumento de pelos radiculares, surgimento de raízes ectópicas e núcleos assimétricos nas células.

Palavras chave: Aleloquímico, *Arabidopsis*, curva dose-resposta, sistema radicular.

Abstract

Morphoanatomy in the root of *Arabidopsis thaliana* submitted to coumarin (1,2-benzopyran) Coumarins can alter the germination and development of recipient species, in natural or controlled environments. The objective was to identify the effect of coumarin on Total Germination (GT (%), Average Germination Speed (S), Accumulated Germination Speed (AS) and Total Root Length (CTR), as well as the cumulative effect of coumarin on the morphology of the *Arabidopsis thaliana* root over time (7 and 14 days) The seeds were grown in square Petri dishes, containing

¹ Universidade Federal de Lavras. E-mail: livia-linne@hotmail.com

² Universidade Federal de Lavras. E-mail: adenilsonhg@ufla.br

agar and concentrations of coumarin composing the dose-response curve (0; 1.5; 3.0; 6.0; 12 and 24 μM). Coumarin was previously diluted in ethanol. As a control, ethanol added to agar. After determining the IC_{50} (14 μM), *A. thaliana* seeds were grown for 7 and 14 days. Cuts (0.7 μm) of the root tips were performed and stained with toluidine blue. Germination inhibition was dose-dependent, that is, the higher the coumarin concentration, the greater the germination inhibition 40%, AS and S was only 37% and the total length of the seedlings them decreased by 66%. The IC_{50} induced thickening of the root apex, mainly at 14 days of cultivation, increased root hair, appearance of ectopic roots and asymmetric nuclei in the cells.

Keywords: Allelochemical, *Arabidopsis*, dose-response curve, root system.

Resumem

Morfanoanomia en la raíz de *Arabidopsis thaliana* presentada a cumarina (1,2-benzopirano). Las cumarinas pueden alterar la germinación y el desarrollo de las especies receptoras, en ambientes naturales o controlados. El objetivo fue identificar el efecto de la cumarina en la germinación total (GT (%), velocidad de germinación promedio (S), velocidad de germinación acumulada (AS) y longitud total de la raíz (CTR), así como el efecto acumulativo de la cumarina en la morfología de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a lo largo del tiempo (7 y 14 días). Las semillas se cultivaron en placas de Petri cuadradas, que contenían agar y concentraciones de cumarina que componían la curva dosis-respuesta (0; 1.5; 3.0; 6, 0, 12 y 24 μM). La cumarina se diluyó previamente en etanol y, como control, se añadió etanol al agar. Después de determinar la IC_{50} (14 μM), las semillas de *A. thaliana* se cultivaron durante 7 y 14 días, con cortes (0.7 μm) en las puntas de las raíces, realizado y teñido con azul de toluidina, la inhibición de la germinación era dependiente de la dosis, es decir, cuanto mayor era la concentración de cumarina, mayor era la inhibición de la germinación 40%, AS y S eran solo 37% y la longitud total de las plántulas disminuyó 66%. El IC_{50} indujo el engrosamiento del ápice de la raíz, principalmente principalmente a los 14 días de crecimiento, aumento del vello radicular, aparición de raíces ectópicas y núcleos asimétricos en las células.

Palabras clave: Aleloquímico, *Arabidopsis*, curva dosis-respuestas, sistemas raíces.

INTRODUÇÃO

Cumarinas são lactonas do ácido hidroxicinâmico originárias da rota dos fenilpropanóides. São sintetizadas pela maioria das plantas superiores (MURRAY et al., 1982; OLIVEIRA et al, 2020) em tecidos foliares, sementes e frutos (ZOBEL e BROWN, 1995).

A cumarina (1,2 benzopirona) é o composto mais simples da classe e capaz de inibir o crescimento das plantas, alterar a respiração e a fotossíntese, afetar a atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo do nitrogênio e, ainda, alterar

a morfologia de raízes (ABENAVOLI e FUGGI, 1995; BROWN, 1981; MORELAND e NOVITZKY, 1987; KUPIDŁOWSKA et al., 1994).

A rizogênese, processo de formação da raiz, é afetada pela cumarina induzindo anormalidades a nível cromossômico, que se expressam em alterações na expansão radial do meristema da raiz (GRAÑA et al., 2017). O sistema radicular é central para a adaptação das plantas à heterogeneidade do solo e é organizado, principalmente, pela ramificação (TERUE et al., 2001). Sendo de fundamental importância o estudo e elucidação da atuação da cumarina sobre a morfologia raiz.

A resposta das plantas receptoras em relação à cumarina é específica e depende da concentração e do tempo de exposição (BENNETTE et al., 2004). O estudo publicado por KUPIDŁOWSKA (2001) relacionou a concentração e o tempo de exposição à cumarina, sobre *A. thaliana*, utilizando 500 µM durante 72 h. Já ABENAVOLI et al. (2008), observaram o cultivo durante 12 dias utilizando 324 µM da cumarina. Apesar dessas evidências, não foram realizados estudos sobre a influência das concentrações de cumarina (1,2 – benzopirona), com vistas a identificar o IC₅₀ capaz de produzir efeitos na morfologia da raiz na espécie modelo, *Arabidopsis thaliana*, ao longo do tempo. Desse modo, objetivou-se avaliar as respostas do efeito cumulativo (7 e 14 dias) da cumarina sobre a morfoanatomia da raiz de *Arabidopsis thaliana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Lehle Seeds, Texas USA), ecotipo Columbia (Col-o), foram esterilizadas em 50% de EtOH (3 min) e 0,5% de NaOH (3 min). Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram incorporadas em ágar 0,1%, e armazenadas a 4 °C durante 72 h para sincronizar a germinação das sementes. Em seguida, 24 sementes foram transferidas para cada placa de Petri quadrada (150 x 150 mm), totalizando 5 placas e 120 sementes por tratamento. As placas continham ágar 0,8% (p/v), 0,44% de macro e micronutrientes (p/v; Murashige- Skoog, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 1% de sacarose; pH 6,0. Após o semeio as placas foram colocadas verticalmente em uma câmara de crescimento a 22 ± 2 °C e 55% de umidade relativa. A cumarina (1,2-benzopirona; 99%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi preparado em 100µL de etanol P.A. (Sigma-Aldrich) e diluída no ágar para obter as concentrações testadas.

Curva de dose-resposta e aquisição de imagem

O meio de cultura suplementado com cumarina (0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 μM) foi utilizado objetivando acompanhar o processo germinativo e o crescimento inicial da raiz, bem como os fenótipos após a exposição a cumarina. Foram utilizados cinco repetições por concentração com 24 sementes, cada. As plântulas foram cultivadas em fotoperíodo de 8 h ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A taxa de germinação total [$G_T(\%)$], a velocidade média de germinação (S) e a velocidade de germinação acumulada (AS) foram calculadas de acordo com a metodologia de CHIAPUSIO et al. (1997). A curva dose-resposta do comprimento da raiz foi determinada após 14 dias da semeadura. Esse parâmetro também foi utilizado para determinar o IC_{50} da raiz (concentração de cumarina em μM necessária para reduzir 50 % do crescimento), por meio do programa GraphPad 7.3.

Após o período de cultivo, durante 7 e 14 dias, na presença do IC_{50} que corresponde 14 μM de cumarina e, na ausência da cumarina, o μM correspondendo ao controle. Após o período de cultivo, as raízes da *A. thaliana* foram analisadas e fotografadas, utilizando o microscópio Nikon Eclipse 800, equipado com uma câmera digital Nikon DS-U2 e um amplificador eletrônico Nikon SMZ 1500 (Melville, NY, EUA) (Nikon, Japão).

Análise da estrutura das raízes da *Arabidopsis thaliana*

Os ápices das raízes de *A. thaliana*, cultivadas durante 7 e 14 dias na presença de 0 μM e do IC_{50} da cumarina, foram fixados em 0,5% de glutaraldeído preparado em tampão de cacodilato a 0,1 M e pH 7,2, e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Após três lavagens, em tampão de cacodilato, os ápices foram transferidos para 2% de tetróxido de ósmio (OsO_4), também preparado em tampão de cacodilato a 0,1 M e pH 7,2, incubado durante 3 h. Em seguida, foram transferidos e mantidos em solução a 10% de acetona com 2% de acetato de uranilo por 1 h. Após esse tempo, amostras foram desidratados em concentrações crescentes de acetona: 50% (2 \times 30 min), 75% (2 \times 1 h), 80% (2 \times 1 h), 95% (2 \times 1 h) e 100% (2 \times 2 h); e depois incorporado na resina de Spurr (DÍAZ-TIELAS et al., 2012).

As seções longitudinais com espessura de 0,7 μm foram coradas com azul de toluidina e observadas em Microscópio de luz Eclipse 800, equipado com uma câmera digital Nikon DS-U2 com o software NIS-Elements D2'30 SP1.

RESULTADOS

Conforme a curva dose-resposta (Tabela 1) de *A. thaliana*, a partir da concentração 6 μM observou-se inibição significativa do crescimento refletindo

noo comprimento total da raiz (CTR), que reduziram 40% em relação ao controle (Tabela 1). Entretanto, as reduções foram maiores nas concentrações de 12 e 24 μM , apresentando-se 54 e 56% menores, respectivamente (Tabela 1). De maneira geral, os parâmetros analisados a espécie vegetal se comportou conforme a curva dose-dependente, ou seja, à medida que a concentração aumentou maior foi a redução dos parâmetros analisados até a concentração 12 μM , onde foi observada a estabilização da curva, atingindo um platô.

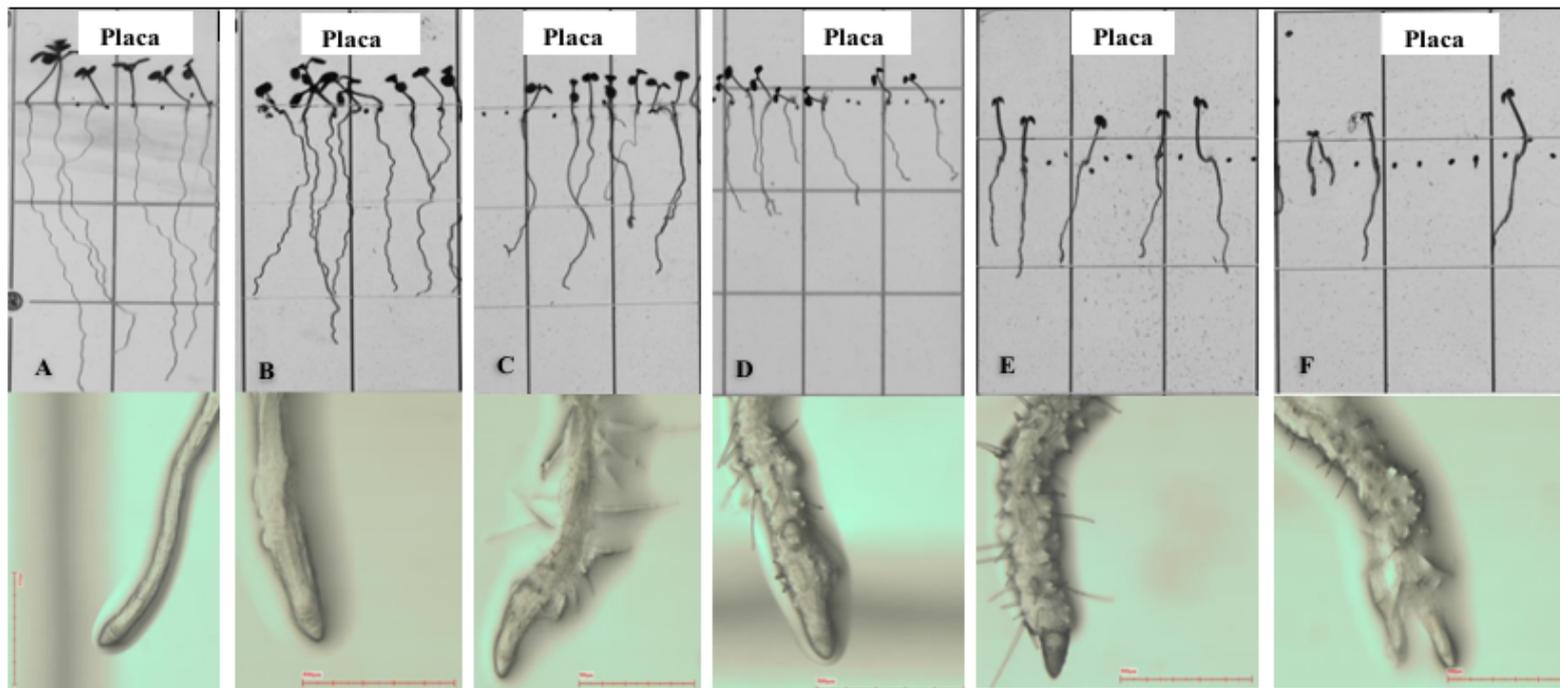
Tabela 1. Germinação total [GT (%)], Velocidade média da germinação (S), Velocidade de germinação acumulada (AS) e Comprimento total da raiz (CTR) da *A. thaliana* submetidas às concentrações de cumarina (0-24 μM). $N = 120$.

	G _T (%)	S	AS	CTR
0 μM	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
1,5 μM	81 ^b	92 ^b	94 ^b	117 ^b
3,0 μM	70 ^c	74 ^c	81 ^c	83 ^c
6,0 μM	60 ^c	67 ^d	64 ^d	56 ^d
12 μM	41 ^d	46 ^e	46 ^e	46 ^e
24 μM	40 ^d	37 ^e	37 ^e	44 ^e
C.V.(%)	14	17	20	8

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$ (teste Tukey) C.V. = coeficiente de variação. $N = 120$.

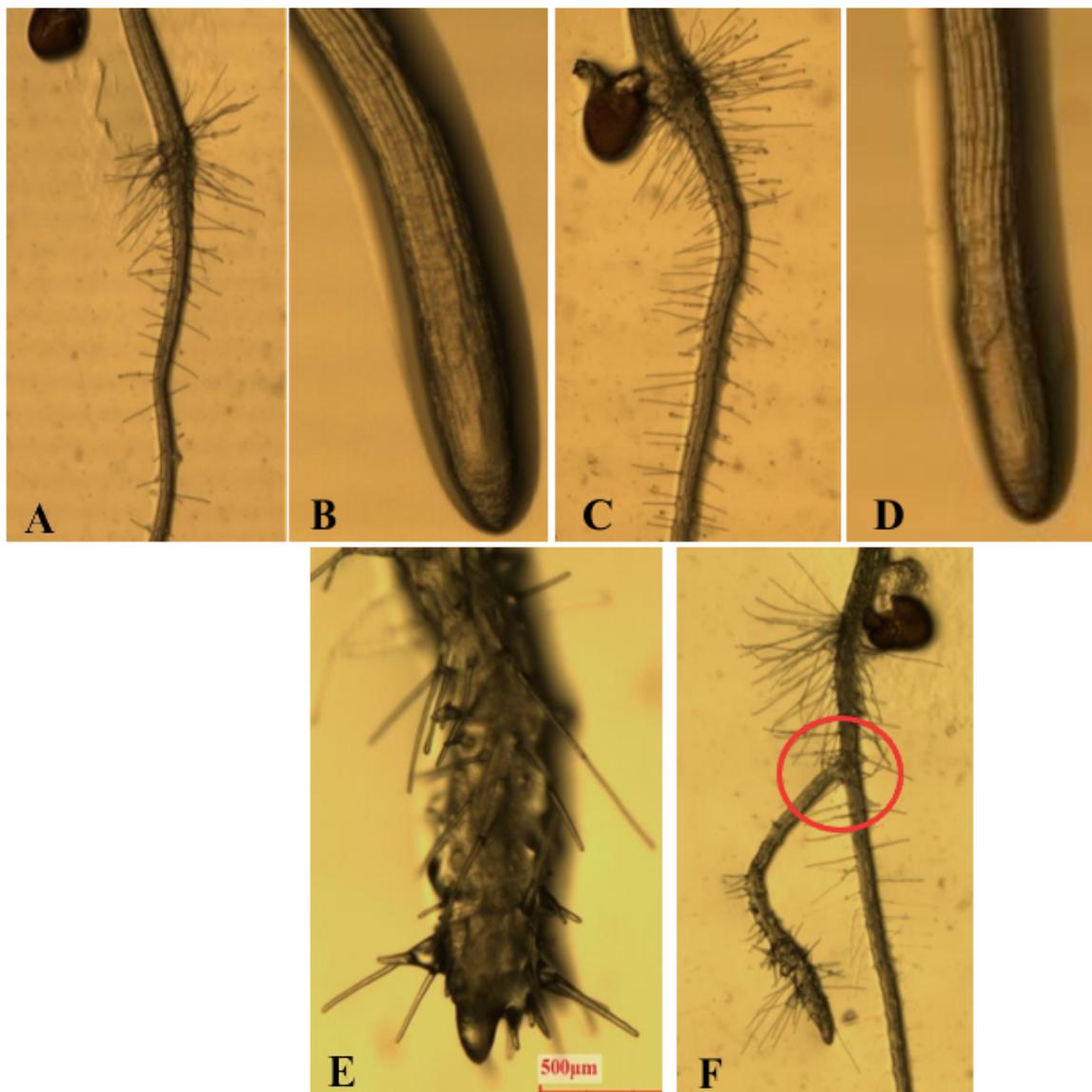
A morfologia geral das plântulas e das raízes de *A. thaliana* cultivadas em meio a cumarina 1,2-benzopirona (0; 1,5; 3; 6,0 e 24 μM) durante 14 dias (Figura 2), foram diferentes conforme a concentração utilizada. As plântulas do controle apresentaram crescimento adequado das raízes (Tabela 1 – CTR) e a estrutura tecidual foi organizada ao longo do eixo de crescimento (Figura 2A). A partir da concentração de 3 μM da cumarina as plântulas apresentaram crescimento irregular e desenvolvimento de grande quantidade pelos ao longo da raiz (Figura 2C 2D, 2E, 2F). Algumas plântulas demonstraram espessamento do ápice radicular (Figura 2E) e na presença de 24 μM de cumarina às raízes desenvolveram bifurcação do ápice radicular (Figura 2F). A partir do emprego da curva dose-resposta foi determinado o IC₅₀ da cumarina, ou seja, refere-se à concentração da cumarina que inibiu 50% a GT (%), S, AS e o CTR em *A. thaliana*. O valor do IC₅₀ foi de 14 μM .

Figura 2. Plântulas da *A. thaliana* submetidas às concentrações da curva dose- resposta durante 14 dias e fotoperíodo de 8 h. As imagens foram capturadas em microscópio eletrônico com amplificador e mostram às plântulas crescendo em placas de Petri quadrados (parte superior da imagem) e as imagens inferiores mostram às raízes das plântulas. A) Controle; B) Concentração 1,5 μ M de cumarina; C) Concentração 3,0 μ M de cumarina; D) Concentração 6,0 μ M de cumarina; E) Concentração 12 μ M de cumarina; F) Concentração 24 μ M de cumarina. Escala: 500 μ m



Sementes de *A. thaliana* foram cultivadas com a concentração do IC_{50} (14 μ M), durante 7 e 14 dias. As raízes das plântulas do controle e as cultivadas durante 7 dias apresentaram estrutura típica, com linhas longitudinais de células simétricas e pelos somente na zona pilífera. As plântulas tratadas com IC_{50} da cumarina, durante 14 dias, apresentaram desenvolvimento de grande quantidade de pelos (Figura 3E) e o aparecimento de raiz ectópico (Figura 3F).

Figura 3. Plântulas de *A. thaliana* cultivadas em meio à concentração de 14 μM (IC_{50}) da cumarina, durante 7 e 14 dias. Controle (a) - zona pilífera; (b) - ápice radicular; Plântula com sete dias de cultivo com a concentração do IC_{50} (c) - zona pilífera, (d) - ápice radicular; Plântula de catorze dias de cultivo com a concentração do IC_{50} (e) - ápice radicular, (f) - zona pilífera destaque região de bifurcação da raiz. Escala: 500 μm .



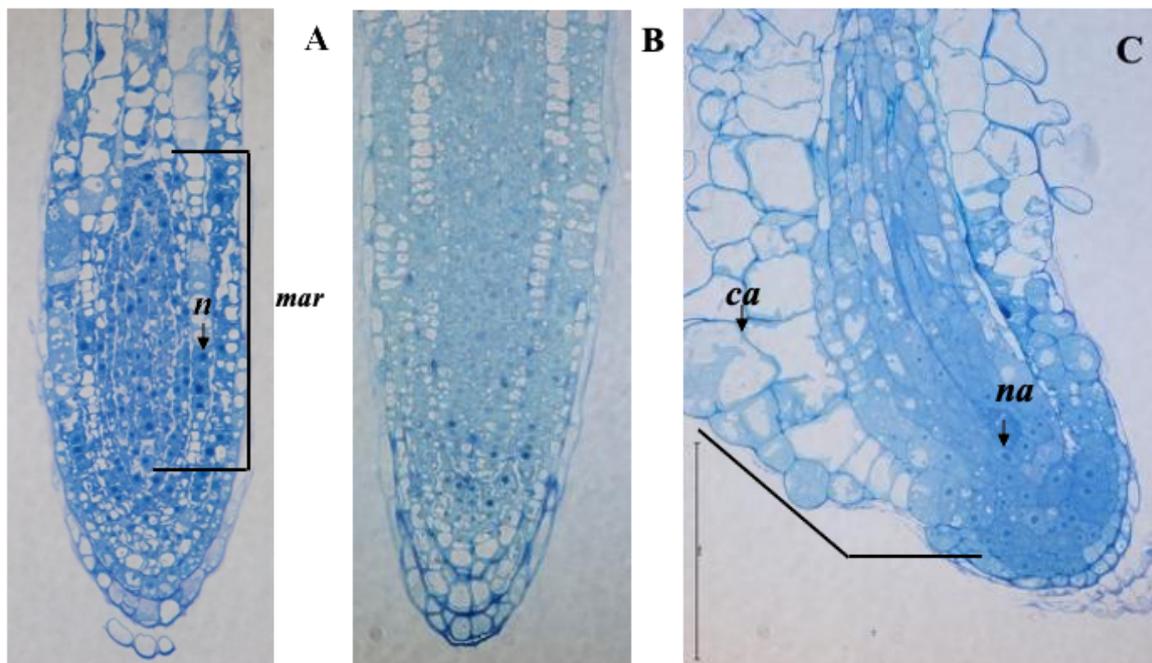
Fonte: Do autor (2018).

As seções semifinas (0,7 μm) analisadas por meio da microscopia óptica demonstraram que às raízes das plântulas do controle possuíam células retangulares, núcleos redondos e isodiamétricos todos em posição central (Figura 4A). Bem como, as raízes tratadas durante 7 dias com a cumarina (Figura 4B), quando comparadas ao controle.

Em se tratando das raízes cultivadas durante 14 dias algumas anormalidades foram observadas (Figura 4C), principalmente as células da zona de crescimento que

apresentaram estrutura desorganizada, espessamento da região subapical da raiz, células com tamanhos e formas irregulares, núcleos alongados e/ou amorfos (Figura 4C).

Figura 4. Microscopia de luz (20x) de seções longitudinais semifinas de ápices de raízes de *Arabidopsis thaliana* coloridas com azul de toluidina. (A) Controle, (B) Plântula de 7 dias de idade tratada com IC_{50} da cumarina 1,2-benzopirona, (C) Plântula de 14 dias tratada com IC_{50} da cumarina. *n*-núcleo, *na*-núcleo assimétrico, *ca*- célula assimétrica, *mar* - meristema apical da raiz.



Fonte: Do autor (2018)

DISCUSSÃO

No presente estudo, a aplicação exógena da cumarina (1,2- benzopirona) sobre *Arabidopsis thaliana* afetou a germinação e levou a redução do crescimento radicular primário, produção de grande quantidade pelos radiculares, raiz ectópica e desorganização tecidual.

A inibição da germinação da espécie *A. thaliana* pela cumarina foi rápida, aparentemente irreversível e cumulativa, à medida que se aumentou a concentração da cumarina. Esses resultados corroboram com os estudos realizados por Aliotta et al. (1992, 1994) e Abenavoli. O principal mecanismo observado pelos mesmos autores está associado à inibição da captação de água na fase I e II da curva de embebição.

Diante dos resultados percebe-se que a cumarina é uma substância com múltiplos alvos fisiológicos e que seus efeitos podem ser estimulantes em baixas

concentrações, como foi observado no crescimento primário da raiz e inibidor em altas concentrações (JANSSON e SVENSSON, 1980).

A cumarina induziu o aumento da área transversal da raiz de *A. thaliana*, principalmente na região subapical. Fato esse que poderia ter sido causado por uma alteração na produção e/ou distribuição da auxina ao longo do corpo da planta (GOREN e TOMER, 1971).

O IC₅₀ encontrado no presente estudo (14 µM) está muito abaixo do observado por Abenavoli et al., (2008) de 324 µM e por Kupidłowska (2001) 500 µM para inibir 50% do crescimento da raiz de *A. thaliana*, isso pode indicar a maior sensibilidade do ecótipo utilizado no presente estudo. Os danos fitotóxicos apresentados pelas plântulas de *Arabidopsis*, após o tratamento com a 1,2-benzopirona, foram superiores aos observados por GRANA et al. (2017) ao utilizar a escopoletina, um tipo de cumarina, com maior inibição da germinação e do comprimento da raiz. Com base nos dados disponíveis, confirma-se a natureza fitotóxica do IC₅₀ da cumarina encontrado com base da curva dose-resposta, sendo efetiva na indução das mudanças na estrutura da raiz e, como tal, merece investigações aprofundadas.

CONCLUSÃO

O IC₅₀ da cumarina foi de 14 µM com fortes danos fitotóxicos aos 14 dias de cultivo, apresentando redução do crescimento radicular, aumento da formação de raízes ectópicas e do número de pelos radiculares; células e núcleos assimétricos em raízes de *A. thaliana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAVOLI MR, CACCO G, SORGONÀ A, MARABOTTINI R, PAOLACCI AR, CIAFFI M, BADIANI M. 2006. The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. **J. Chem. Ecol**, 32: 489– 506.

ABENAVOLI MR, FUGGI A. 1995. Effect of coumarin on growth of cells cultured in liquid medium from carrot (*Daucus carota* L.). **Giornale Botanico Italiano**, 129: 989–990.

ABENAVOLI M R, NICOLÒ A, LUPINI A, OLIVA S, SORGONÀ A. 2008. Effects of different allelochemicals on root morphology of *Arabidopsis thaliana*. **Allelopathy Journal**, 22: 245–250.

BOAY, KOST B, CHUA NH. 2001. Reduced expression of α -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. **Plant J**, 28:145-157.

BASKIN TJ, BETZNER A S, HOGGART R, CORK A, WILIAMSON RE. 1992. Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. **J Plant Physiol**, 19:424-438.

BASKIN T J, BIVENS N J. 1995. Stimulation of radial expansion in *Arabidopsis thaliana* of actomyosin and vesicle secretion but not by various inhibitors of metabolism. **Planta**, 197:514-521.

BENNETT R, PHIPPS R, STRANGE A, GREY P. 2004. Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide tolerant sugar beet: A life-cycle assessment. **Plant Biotechbol. J**, 2:273-278.

BLANCFLORE EB, HASENSTEIN KH. 1995. Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. **Protoplasma**, 185:72-82.

CHIAPUSIO G, SANCHEZ AM, REIGOSA MJ, GONZALEZ L, PELLISSIER F. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? **Journal of Chemical Ecology**, 23:2445- 2453.

CHON SU, KIM YM. 2004. Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. **J. Agric. Crop Sci**, 190:145-150.

CZELUSNIAK KE, BROCCO A, PEREIRA DF, FREITAS GBL. 2012. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Rev. Bras. Plantas Med**, 14:400-409.

GRAÑA E, COSTAS-GILA A, LONGUEIRA S, CELEIROB M, TEIJEIRAB M, REIGOSA MJ, SÁNCHEZ-MOREIRA AM. 2017. Auxin-like effects of the natural coumarin scopoletin on *Arabidopsis* cell structure and morphology. **Journal of Plant Physiology**, 218:45-55.

GRESSEL J. 2011. Global advances in weed management. **J. Agric. Sci**, 149:47-53.

KRAEHMER H, LABER B, ROSINGER C, SCHULZ A. 2014. Herbicides as weed control agents: State of the art: I. Weed control research and safener technology: The path to modern agriculture. **Plant Physiol**, 166:1119-1131.

KUPIDŁOWSKA E. 2001. Changes in cell ultrastructure and morphology of *Arabidopsis thaliana* roots after coumarins treatment. **Acta Societatis Botanicorum**, 70: 187-198.

KUPIDLOWSKA E, DOBRZYNSKA K, PARYS E, ZOBEL AM.1994. Effect of coumarin and xanthotoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake, and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. **Journal of Chemical Ecology**, 20: 2471–2480.

LUPINI A, ARANITI F, SUNSERI F, ABENAVOLI MR. 2014. Coumarin interacts with Auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regul**, 74: 23–31.

MONACO TJ, WELLER SC, ASHTON FM. 2002. Weed Science: Principles and Practices, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 688p.

MORELAND ED, NOVITZKY WP. 1987. Effects of acids, coumarins and flavonoids on isolated chloroplast and mitochondria. In: Waller GR, ed. *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. Washington DC, USA: ACS Symposium Series, p. 247–261.

MUDAY GK, HAWORTH P.1994. Tomato root growth, gravitropism and lateral development: correlation with auxin transport. **Plant Physiol. Biochem**, 32: 193–203.

MUDAY GK, LOMAX TL, RAYLE DL. 1995. Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, diageotropica. **Planta**, 195:548–553.

NAZEMI A H, ASADI GA, GHORBANI R. 2015. Herbicidal activity of coumarin when applied as a pre-plant incorporated into soil. *Not. Sci. Biol*, 7:239–243.

OLIVEIRA AK, COELHO MFB, PORTO FE. 2020. Allelopathic activity of *Amburana cearensis* seed extracts on melon emergence. *Rev. Caatinga*. 233:274-280

PERGO EM, ABRAHIM D, DA SILVA, PCS, KERN KA, DA SILVA LJ, VOLL E, ISHII-IWAMOTO, EL. 2008. *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. **J. Chem. Ecol.**, 34 :499–507.

RUEGGER M, DEWEY E, GRAY WM, HOBBIE L, TURNER J, ESTELLE M.1997. The TIR₁ protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP₂ and yeast Grr1p. *Genes Dev*, 2:198–207.

SBAI H, ZRIBI I, DELLAGRECA M, HAOUALA R. 2017. Bioguided fractionation and isolation of phytotoxic compounds from *Apium graveolens* L. aerial parts (Apiaceae) **South African Journal of Botany**, 108: 423-430.

TERUEL, DA, DOURADO-NETO, D, HOPMANS, JW, REICHARDT K. 2001. Alterações estruturais do sistema radicular de soja em resposta à disponibilidade de fósforo no solo. **Sci. agric**, 58: 55-60.

WU, C, ZHAOG, LIU D, LIU SJ, GUNXX, TANG Q. 2016. Discovery and Weed Inhibition Effects of coumarin as the Predominant Allelochemical of Yellow Sweetclover (*Melilotus officinalis*). **International Journal of Agriculture and Biology**, 18:168-175.

YUKSEL B, AKSOY O. 2017. Cytological effects of coumarin on the mitosis of *lens culinaris medik*. **Fresenius Environmental Bulletin**, 26: 6400-6407.