

당귀와 백지로부터 분리한 Coumarin계 물질들의 식물병원균에 대한 항균활성

유시용 · 김진철^{1*} · 김영섭 · 김홍태¹ · 김성기 · 최경자¹ · 김정섭 · 이선우¹ · 허정희 · 조광연¹

한국화학연구원 화학물질연구부, ¹스크리닝연구부

요약 : 식물자원에서부터 식물병원균에 대한 항균물질을 탐색하고자 국내에서 재배한 40종의 약용식물 추출물을 대상으로 항균활성을 검색하였다. 우선, 각 식물을 methanol (MeOH)로 추출, 농축한 MeOH추출물을 시료로 하여 2000 µg/mL 농도수준에서 6가지 식물병에 대한 *in vivo* 방제효과를 조사하였다. 40종의 시료 중 14종의 시료가 적어도 한가지 이상의 식물병에 대하여 90% 이상의 방제효과를 나타내었다. 벼·도열병, 토마토·역병 및 밀·붉은녹병에 대해서는 각각 8개, 7개 및 3개의 시료가 90% 이상의 효과를 나타내었으나, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·잿빛곰팡이병 및 보리·흰가루병에 대해서는 90% 이상의 방제효과를 보이는 시료는 없었다. 벼·도열병에 대하여 높은 활성을 보이는 당귀 (*Angelica gigas*, 當歸)와 백지 (*Angelica dahurica*, 白芷)의 MeOH추출물로부터 solvent partitioning과 column chromatography를 통하여 각각 1개 및 2개의 항균물질을 분리하였으며 이들 물질은 질량분석 및 핵자기공명분석에 의하여 모두 coumarin계 물질인 decursin, imperatorin 및 isoimperatorin으로 동정되었다. 구조와 항균활성간의 관계를 알아보기 위하여 분리한 3개의 물질을 7번 위치에 free hydroxyl기를 가지고 있는 umbelliferone (7-hydroxycoumarin)과 scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin)과 비교하여 *in vitro* 및 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. *In vitro*에서 균사생육억제활성을 조사한 결과, 이들 물질들은 대상식물병원 곰팡이에 대하여 50% 균사생육억제농도 (IC₅₀)가 대부분 200 µg/mL 이상으로 나타나 항균활성이 비교적 약한 것으로 나타났다. 또한 7번 위치에 hydroxyl기가 노출되어 있는 umbelliferone과 scopoletin보다는 7번 위치의 free hydroxyl기 대신에 cyclic alkoxy기로 존재하는 decursin과 imperatorin이 곰팡이에 대한 항균활성이 강한 것으로 나타났다. 특히, decursin과 imperatorin은 각각 *Pythium ultimum*과 *Magnaporthe grisea*에 대하여 25 µg/mL 이하의 IC₅₀를 보여 강한 항균활성을 나타냈다. *In vivo* 실험에서는 decursin과 imperatorin은 여섯 가지 식물병 중 벼·도열병에 대하여 항균활성이 높은 것으로 나타났으며, 다른 세 개의 물질은 식물병 방제활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이상의 실험결과 7-hydroxycoumarin계 물질들의 항진균활성과 관련하여 7번 위치에 free hydroxyl기가 있는 것 보다는 이 hydroxyl기가 보다 안정한 cyclic alkoxy기로 치환되는 것이 높은 항균활성을 나타내는데 중요하다는 것을 알 수 있었다.(2001년 8월 1일 접수, 2001년 9월 19일 수리)

Key words : antifungal substances, domestic plants, rice blast, tomato late blight, wheat leaf rust, rice sheath blight, tomato gray mold, barley powdery mildew, *Angelica gigas*, *A. dahurica*, coumarins, decursin, imperatorin, isoimperatorin.

서론

식량증산을 위해 농약의 사용은 필수적이며 농약을 사용하지 않을 경우 작물에 따라 30-100% 수확이 감소되는 것은 이미 증명된 사실이다 (日本植物防役協會, 1998; 松中 昭一, 2000). 기존의 여러 가지 합성농약은 환경오염, 잔류독성, 생태계교란 (환경호르몬) 등의 우려가 있기 때문에 이의 사용량을 가능한 한 제한하도록 유도하고 있다. 현재 OECD회원국의 경우 원제생산량 감소 권장을 받고 있다. 따라서 식량증산을 꾀하고 삶의 질을 향상시키기 위해서는 안전성에 문제가 될 우려가 있는 농약을 대체할 수 있는 새로운 환경친화형 생리활성물질의 개발과 이용이 시급히 이루어져야 할 것이다.

식물, 미생물 및 동물에서 기원하는 천연물질들의 농약 개발에의 이용은 오랫동안 연구되어 왔으며, 이들 천연유래 물질들이 농약을 개발하는 데에는 크게 세 가지 측면에서 기여한다. 먼저 천연물질은 아무런 구조의 변화가 없이 바

로 농약으로 이용되기도 한다. 이 경우에는 주로 미생물 특히 방선균의 인공배양을 통하여 얻어진 항생물질들이며, 살균제로 이용되고 있는 polyoxins, blasticidin S, kasugamycin, validamycin 등과 살충제로 개발된 tetranactin과 avermectins, 그리고 제초제로 개발된 bialaphos 등을 예로 들 수 있다 (Lange 등, 1993). 천연물질의 두 번째 역할은 새로운 농약의 합성을 위한 개발에 선도물질로서 이용되는 것이다. 이 경우의 대표적인 예로는 *Chrysanthemum cinerariaefolium*에서 분리된 pyrethrum (Elliott, 1989), marine worm (*Lumbriconeresis heteropoda*)에서 분리된 nereistoxin (Eldefrawi, 1976; Sakai, 1969), 그리고 버섯인 *Oudemansiella mucida*와 *Strobilurus tenacellus*로부터 각각 분리된 항생물질인 oudemansin A와 strobilurins 등이 있다 (Anke 등, 1977; Musilek 등, 1969). 이들 물질들을 선도물질로 하여 pyrethroid계, cartap 및 thiocyclam 등의 살충제와 azoxystrobin, kresoxim-methyl, metominostrobin 및 trifloxystrobin 등의 strobilurin계 살균제가 개발되었다. 세 번째로는 분리한 천연물질이 구조가 복잡하여 합성이 어려우나 새로운 작용 기작을 가지고 있는 경우에는 이 작용 기작을 이용한 새로운 생물검정법을 개발하

*연락처

여 보다 구조가 단순하고 합성이 용이한 신물질을 발견하는데 기여할 수 있다. 이 예에 해당하는 물질이 바로 soraphen A이다 (Pridzun 등, 1995). 이 물질은 물질 자체의 문제점으로 인하여 직접 살균제로 개발되지는 않았고 또한 합성이 용이하지 못하여 선도물질로서 이용되지는 않았지만 작용기작이 지금까지 보고되지 않은 acetyl-CoA carboxylase를 억제하는 것으로 나타나 이 작용기작에 대한 생물검정법을 확립하여 여러 실험실에서 스크리닝을 실시하고 있는 것으로 알려져 있다.

1940년대 합성농약이 출현하기 전까지는 농약의 대다수가 식물체 추출물이었으나 이후에는 합성농약의 출현으로 인하여 연구가 축소되었다가 최근에 다시 회복되는 추세에 있다. 그 이유는 현대농약의 개발에 있어서도 위에서 언급한 것과 같이 식물체로부터의 천연물질이 막대한 영향력이 있는 것으로 증명되었고 또한 식물의 종은 약 25만종에서 많게는 50만종으로 추정되고 있는데, 지금까지 화학적으로 조사된 것은 약 10%에 지나지 않기 때문이다 (Benner, 1993).

식물은 구조적으로 매우 다양한 항균활성 물질을 생산하는데, 이들은 phenolics과 phenolic acids, coumarins과 pyrones, flavonoids, isoflavonoids, steroids와 steroidal alkaloids 및 기타물질 등 6개 그룹으로 나눌 수 있다 (Mitra 등, 1984). 이들 중 coumarin계 물질은 식물이 생산하는 주요 항균물질의 하나의 그룹으로서, coumarin의 생합성은 조직 특이적이고 또한 성장하면서 조절되는 것으로 알려져 있다 (Murray 등, 1982; Gutierrez 등, 1995; Gutierrez-Mellado 등, 1996). 또한 여러 가지의 비생물적인 또는 생물적인 스트레스나 영양 결핍 또는 식물호르몬 및 난분해성 물질의 대사산물 같은 화학물질 등에 의해 생합성이 유기되는 것으로도 알려져 있다 (Tal과 Robeson, 1986a; Tal과 Robeson, 1986b; Olson과 Roseland, 1991). 특히 scopoletin과 ayapin 등 (Murray 등, 1982; Murray, 1989; Urdangarin 등, 1999) 몇 가지 물질의 경우에는 병원균의 침입시에 침입부위에만 매우 빠른 속도로 축적되는 phytoalexin으로도 알려져 있다. 이들 coumarin물질들은 식물병원균에 대한 항균활성 (Dadak과 Hodak, 1966; Das, 1986; Jurd 등, 1970; Mirta 등, 1984; Pan 등, 1984; Tal과 Robeson, 1986a; Tal과 Robeson, 1986b; Urdangarin 등, 1999)뿐만 아니라 곤충 먹이 기피제 (Olson과 Roseland, 1991) 및 기생식물의 발아억제제 또는 촉진제로서도 (Worsham과 Klingman, 1962) 작용하는 것으로 보고되고 있다.

항균활성과 관련하여 Dadak과 Hodak (1966)은 Gram 음성균에는 전혀 효과가 없으나, Gram 양성균에는 효과가 있는데 4번과 7번 위치에 있는 free hydroxyl기가 항균활성에 중요하다고 하였다. 그러나 Jurd 등 (1970)은 umbelliferone (7-hydroxycoumarin)과 4-hydroxycoumarin 및 이들의 유도체들을 이용한 항진균활성에 대한 실험에서 이들 물질들의 항진균활성을 나타내는 데에는 7번 위치와 4번 위치의 phenolic group이 가수분해에 안정한 ether group으로 보호되는 것이 중요하다고 하였다.

본 연구실에서는 식물자원으로부터 식물병원균팡이에 대한 항균물질을 탐색하던 중에 당귀 (*Angelica gigas* Nakai)

로부터는 dihydropyranocoumarin계 물질인 decursin (그림 1)을 분리하였고, 백지 (*A. dahurica* Benth et Hook.)로부터는 furanocoumarin계 물질인 imperatorin과 isoimperatorin을 분리하였다.

그리고 coumarin계 물질의 구조와 항진균활성을 관계를 알아보기 위하여 분리한 3개의 물질을 umbelliferone과 scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin)과 비교하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항진균활성을 조사하였다. 따라서 본 논문에서는 식물로부터의 coumarin계 물질들을 분리하고 동정하였으며, 또한 구조와 식물병원균팡이에 대한 항진균활성과의 관계에 대하여 보고하는 바이다.

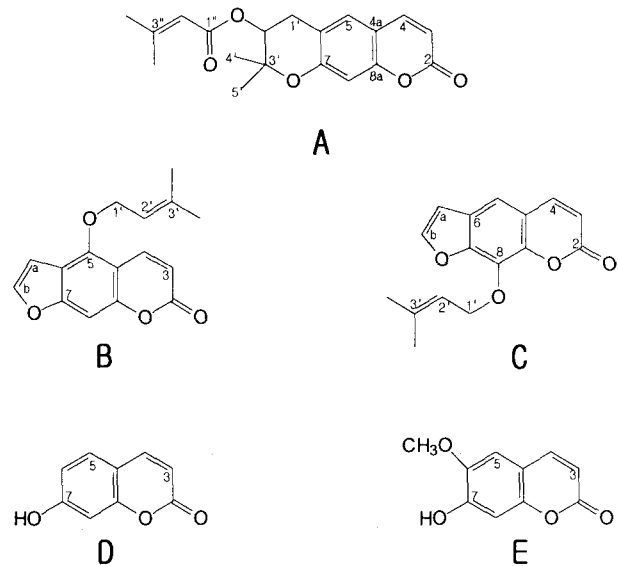


Fig. 1. Chemical structures of decursin (A), isoimperatorin (B), imperatorin (C), umbelliferone (D), and scopoletin (E).

재료 및 방법

식물체 시료의 채취 및 추출

국내에서 재배한 것으로 확인된 40종의 건조된 약용식물 시료 (표 1)를 국내 여러 재래시장에서 수집하였다. 각 시료를 충분한 양의 methanol (MeOH)에 1주일 동안 침지한 후 여과하여 감압 농축하였다. MeOH추출물은 사용할 때까지 냉동고 (-20°C)에 보관하였다.

In vivo 항진균성 검정

항진균성이 높은 시료를 선별하기 위하여 벼·도열병, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·잿빛곰팡이병, 토마토·역병, 밀·붉은녹병, 보리·흰가루병 등의 6가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항진균성을 조사하였다. 시료 60 mg을 1.5 mL의 MeOH에 용해한 다음 Tween 20을 250 µg/mL으로 함유하고 있는 용액 28.5 mL에 희석한 후 여편 살포하였다 (Kim 등, 1999; Park 등, 2000; Kim 등 2001). 대상 식물병당 2포트씩 처리하였고, 약제 살포 24시간 후에 각각의 식물체에 병원균을 접종하였다. 벼 (*Oryza sativa* L., cv

Table 1. Domestic plants used in this study

Korean Name	Scientific Name	Korean Name	Scientific Name
가시오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	소자	<i>Perilla sikokiana</i>
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i>	속단	<i>Phlomis umbrosa</i>
강활	<i>Angelica koreana</i>	시호	<i>Bupleurum falcatum</i>
고본	<i>Angelica tenuissima</i>	애엽	<i>Artemisia asiatica</i>
곽향	<i>Agastache rugosa</i>	연교	<i>Forsythia viridissima</i>
구기자	<i>Lycium chinense</i>	오가피	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>
구절상목	<i>Cudrania tricuspidata</i>	익모초	<i>Leonurus sibiricus</i>
구절초	<i>Chrysanthemum sibiricum</i>	인진호	<i>Artemisia capallaris</i>
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	창출	<i>Atractylodes japonica</i>
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	천궁	<i>Cnidium officinale</i>
당귀	<i>Angelica gigas</i>	친화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
대계	<i>Cirsium haponicum</i>	치자	<i>Gardenia jasmonioides</i>
대추	<i>Zizyphus jujua</i>	토천궁	<i>Cnidium officinale</i>
독활	<i>Aralia cordata</i>	포공영	<i>Taraxacum platycarpa</i>
방풍	<i>Ledebouriella seseloides</i>	하고초	<i>Prunella vulgaris</i>
백지	<i>Angelica dahurica</i>	해동피	<i>Kalopanax pictus</i>
백출	<i>Atractylodes japonica</i>	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>
사삼	<i>Adenophora triphylla</i>	홍화 씨	<i>Carthamus tinctorius</i>
사상자	<i>Torilis japonica</i>	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	희림	<i>Siegesbeckia pubescens</i>

Nakdong), 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv Seokwang), 보리 (*Hordeum sativum* Pers., cv Dongbori) 및 밀 (*Triticum aestivum* L., cv Chokwang)을 지름 4.5 cm 플라스틱 포트에 원예용 상토 또는 수도용 상토를 70% 정도 담고 온실 (25±5°C)에서 1주에서 3주정도 키웠다.

벼·도열병은 2엽기 유묘에 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr 포자현탁액 (5×10⁵ 포자/mL)을 분무하여 접종한 후 25±2°C 습실상 (상대습도 100%)에서 암상태로 하루동안 발병을 유도한 다음, 25±2°C 항온실 (상대습도 70-80%)에 매일 12시간동안 빛을 조사하면서 6일간 배양하였다. 벼·잎집무늬마름병은 3엽기 유묘에 *Corticium sasakii* Matsu가 7일 동안 배양된 배지 (밀기울 90 g, 왕겨 15 g, 증류수 100 mL)를 접종하고 25±2°C 습실상 (상대습도 100%)에서 4일간 암상태로 처리한 후 다시 25±2°C, 상대습도 100%의 습실상에서 매일 12시간동안 빛을 조사하면서 4일간 처리하였다. 토마토·역병은 2엽기 토마토 유묘에 *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary의 유주자낭 현탁액 (10⁵ 유주자낭/mL)에서 나출된 유주자 낭 현탁액을 분무, 접종한 후 암상태로 20±2°C 습실상 (상대습도 100%)에서 4일 동안 발병을 유도하였다.

한편, 토마토·잿빛곰팡이병은 토마토 2엽기 유묘에 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. 포자 현탁액 (10⁶ 포자/mL)을 처리한 후에 암상태로 25±2°C 습실상 (상대습도 100%)에서 3일 동안 발병시켰다. 밀·붉은녹병은 1엽기 유묘에 활물 기생균인 *Puccinia recondita* Roberge ex Desm.의 포자를 Tween 20 용액 (250 µg/mL)에 0.67 g 포자/L 수준으로 현탁한 후 포자현탁액을 분무처리하여 하루동안 20±2°C 습실상 (상대습도 100%)에서 발병을 유도한 후

20±2°C 항온실로 옮겨 매일 12시간동안 광을 조사하면서 6일간 배양하였다. 마지막으로 보리·흰가루병은 보리 유묘 1엽기에 기주식물에서 계대 배양된 *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Marchal 포자를 접종하고 20±2°C 항온실에서 매일 12시간동안 광을 조사하면서 7일동안 발병시켰다. 대조구로는 1%의 DMSO를 혼합하고 있는 Tween 20 용액 (250 µg/mL) 30 mL을 사용하였다. 벼·도열병, 밀·붉은 녹병, 보리·흰가루병은 7일 후, 벼·잎집무늬마름병은 8일 후, 그리고 토마토·잿빛곰팡이병과 토마토·역병은 각각 3일과 4일 후에 병반면적율을 조사하였다.

항균물질의 분리

40종의 식물체 추출물을 6가지 식물병에 대하여 스크리닝을 한 결과, 당귀와 백지가 높은 항균활성을 보여 이 두 식물 추출물로부터 항균활성물질의 분리를 시도하였다. 건조된 당귀 시료 100 g을 충분한 양의 MeOH로 상온에서 침지한 후 여과하였다. 추출액을 감압농축한 다음 추출물 (17 g)을 증류수에 현탁시키고 동량의 methylene chloride로 3회 분획하였다. 수용액층을 다시 ethyl acetate (EtOAc)로 3회 추출하였다. 여기서 얻어진 3개의 분획 중에 methylene chloride층 (8 g)이 활성을 보여 이 시료를 silica gel column (4.0 cm×80 cm; Kiesel gel 60, 70~230 mesh, 400 g)에 가한 후 *n*-hexane:EtOAc (4:1, v/v)로 용출하여 물질을 순화하였다. 여기서 활성이 있는 분획들을 모아 다시 alumina column (neutral Merck)에 가한 후 methylene chloride로 용출하여 순수한 항균물질 (AG-1) 2.8 g을 분리하였다.

또한 건조된 백지시료 200 g을 MeOH로 추출, 여과한

다음 감압농축하였다. 이 추출물을 물로 재용해한 다음 동량의 methylene chloride와 EtOAc로 각각 3회씩 추출한 다음 세 개의 분획을 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과 methylene chloride층이 활성이 있었다. 이 층 (4 g)으로부터 항균활성 물질을 분리하기 위하여 silica gel column (3.0×60 cm; Kiesel gel 60, 70-230 mesh, 200 g) chromatography를 실시하였다. 시료를 충분히 용해한 후 column에 가한 다음 *n*-hexane-EtOAc (10:1, v/v)로 용출하였다. 이 column chromatography를 통하여 두 개의 항균활성 물질 (AD-1, AD-2)을 순수하게 분리하였다.

기기분석

분리한 세 개의 물질의 UV spectrum은 MeOH에 용해한 후 Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer (Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 질량분석은 double-focusing high-resolution (HR) mass spectrometer (JEOL JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Bruker AMX-500 (500 MHz) NMR spectrometer (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였고, tetramethylsilane (TMS)를 internal standard로 이용하였다.

식물병원진균에 대한 균사생육억제 실험

분리한 세 개의 물질과 항균활성을 비교하기 위하여 쑥 [*Artemisia princeps* var. *orientalis* (Pampan.) Hara]에서 분리하였으며, 7번 위치에 free hydroxyl기를 가지고 있는 umbelliferone (7-hydroxycoumarin)과 scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) (Ryu 등, 1997) (그림. 1)을

포함하여 총 5개의 물질들을 dimethyl sulphoxide (DMSO)에 용해한 다음 Poison Food Technique (Dhiangra와 Sinclair, 1986)으로 조사하였다. 10개의 식물병원균에 대하여 실험을 수행하였는데, 사용한 균들은 표 4와 같다. 5개의 물질들을 최종농도가 200, 66.7, 22.2, 7.4, 2.5 및 0.82 µg/mL이 되도록 멸균한 potato dextrose agar (PDA)배지에 가한 다음 Petri dish (φ 55 mm)에 부었다. 약제배지의 한가운데에 PDA배지에서 왕성하게 자라고 있는 곰팡이의 가장자리에서 agar disc (φ 5 mm)를 떼어 접종하였다. *P. infestans*와 *B. cinerea*균은 20°C에서 배양하였고, 나머지 균들은 25°C에서 배양하였다.

결과 및 고찰

40개 식물체 시료의 *in vivo* 항균활성

40개 약용식물체 MeOH추출물의 6가지 식물병에 대한 항균활성을 조사한 결과 2000 µg/mL 수준에서 한 가지 병 이상에 대하여 90% 이상의 높은 방제가를 나타낸 것은 14개 시료였다 (표 2). 벼·도열병에 대해서는 8개의 시료가 90% 이상의 방제가를 나타냈으며, 토마토·역병과 밀·붉은녹병에는 각각 7개와 3개의 시료가 90% 이상의 방제가를 보였다. 그러나 다른 세 가지 식물병 즉, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·갯빛곰팡이병 및 보리·흰가루병에 대해서는 90% 이상의 방제효과를 보이는 시료는 없었다. 이 중 당귀와 백지는 벼·도열병에 96% 이상의 방제효과를 보였고, 당귀는 또한 벼·잎집무늬마름병, 토마토·역병 및 밀·붉은녹병에 대하여 70% 이상의 방제효과를 보였다. 백지는 토마토·역병에 대해서 85%의 높은 방제효과를 나타내었다. 이 밖에도 익모초 (*Leonurus sibiricus* L.), 하고

Table 2. Plant extracts showing potent controlling activities against six plant diseases^{a)}

Plant	Control Value (%) ^{b)}					
	RCB ^{c)}	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
<i>Agastache rugosa</i>	16	20	28	91	26	0
<i>Angelica dahurrica</i>	96	15	0	85	53	16
<i>Angelica gigas</i>	100	70	0	83	86	0
<i>Artemisia asiatica</i>	93	25	14	75	73	0
<i>Atractylodes japonica</i>	16	0	0	98	33	0
<i>Forsythia viridissima</i>	0	5	14	90	16	0
<i>Ledebouriella seseloides</i>	90	15	7	66	0	0
<i>Leonurus sibiricus</i>	93	25	0	87	90	0
<i>Lycium chinense</i>	91	15	0	41	60	0
<i>Perilla sikokiana</i>	8	0	14	90	16	0
<i>Prunella vulgaris</i>	96	30	14	95	93	0
<i>Scutellaria baicalensis</i>	90	20	0	8	73	0
<i>Siegesbeckia pubescens</i>	88	0	75	95	93	0
<i>Taraxacum platycarpa</i>	16	0	0	95	33	0

^{a)}The plant seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organisms 1 day after the chemical solutions were sprayed to run-off on the leaves.

^{b)}Control value (%) = 100 × {disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants} ÷ disease severity of untreated plants

^{c)}RCB = Rice blast; RSB = Rice sheath blight; TGM = Tomato gray mold; TLB = Tomato late blight; WLR = Wheat leaf rust; BPM = Barley powdery mildew.

Table 3. NMR data of decursin in CDCl₃

No.	¹³ C ^{a)}	¹ H (multi, J) ^{b)}	No.	¹³ C	¹ H (multi, J)
2	161.2		2'	76.7	4.96 (t, 4.8 Hz)
3	113.2	7.48 (d, 10 Hz)	3'	69.0	
4	143.1	6.10 (d, 10 Hz)	4'	24.9	1.28 (s)
5	128.6	7.05 (s)	5'	23.1	1.25 (s)
6	115.8		1''	165.6	
7	156.4		2''	115.4	5.55 (m)
8	104.6	6.62 (s)	3''	154.8	
4a	112.7		4''	27.5	2.03 (s)
8a	154.1		5''	20.5	1.76 (s)
1'	27.8	3.07 (dd, 16.8, 4.8 Hz) 2.79 (dd, 16.8, 4.8 Hz)			

^{a)}125 MHz, ^{b)}500 MHz.

초 (*Prunella vulgaris* L.), 회림 (*Siegesbeckia pubescens* Makino) 등이 벼·도열병, 토마토·역병 및 밀·붉은녹병 등 세 가지 식물병에 대하여 80% 이상의 방제가를 보여 *in vivo*에서 항균활성이 우수함을 알 수 있었다.

당귀로부터 항균활성물질의 분리 및 동정

당귀 건조시료 100 g으로부터 MeOH추출, methylene chloride의 분획, silica gel column chromatography와 alumina column chromatography를 통하여 2.8 g의 AG-1물질을 순수 분리하였다. 이 물질의 구조 결정을 위하여 질량분석 및 핵자기공명분석을 실시하였다. AG-1물질의 electron impact (EI) mode로 질량분석을 한 결과 분자이온 (M^+)이 m/z 328에서 나타났고, 주요 fragment ion은 m/z 228, 213 (base peak), 83, 55였다. 이 질량스펙트럼은 decursin과 일치하는 것으로 나타났다. 이 물질의 정확한 구조동정을 위하여 ¹H-과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었다. AG-1물질의 NMR data는 표 3에서와 같이 나타났는데, 이것은 Ahn 등 (1995)이 당귀에서 보고한 decursin과 완전히 일치하였다. 이와 같이 하여 AG-1물질은 dihydro-pyranocoumarin중의 한 물질인 decursin으로 동정되었는데, 이 물질은 *A. decursiva* (Miq.) Fr. et Sav.에서 처음으로 보고되었고 이후에 *A. gigas* (Ahn 등, 1995)와 *Peucedanum terebinthaceum* Fisher et Turcz (Chen 등, 1996)에서도 보고되었다. 이 물질은 *A. gigas*의 뿌리의 주요 성분중의 하나이고, 전통적으로 한국에서는 빈혈증 및 진정제로서 이용되었다. Decursin 외에도 당귀에서는 decursinol, nodakenetin, umbelliferone, nodakenin 등의 coumarin계 물질들이 보고되고 있다 (Chi, 1967; Ryu 등, 1990). 하지만 decursin의 항균활성에 대한 보고는 아직 없다.

백지로부터 항균활성물질의 분리 및 동정

또한 건조된 백지 시료 200 g으로부터 MeOH추출, methylene chloride분획 및 silica gel column chromatography를 통하여 AD-1물질 870 mg과 AD-2물질 540 mg을 순수하게 분리하였다. 이들 물질들의 구조를 동정하기 위하여 AD-1물질과 AD-2물질을 EI mode로 질량분석

을 한 결과 AD-1물질의 경우에는 분자이온이 m/z 270에서 나타났고, 주요 fragment ion이온으로 m/z 232, 218, 202 (base peak), 174, 145, 89 및 69 등에서 피크가 나타났다. AD-2물질의 경우에는 분자이온은 나타나지 않았으며, 주요 fragment ion은 m/z 232 (base peak), 202, 189, 174, 160, 145, 89, 및 69 등이었다. 분자량을 확인하기 위하여 두 물질을 chemical ionization (CI) mode로 질량분석을 하였는데, 두 물질 모두 protonated molecular ion ($[M+H]^+$)이 m/z 271에서 나타나, 두 물질은 서로 isomer관계인 것으로 추정되었다. 정확한 구조의 결정을 위하여 NMR분석을 실시하였다. ¹³C-NMR분석을 실시한 결과, 두 물질 모두 탄소를 16개 가지고 있으며, methyl기도 두 개씩 가지고 있는 것으로 나타났다. 또한 ¹H-NMR분석 결과 (그림 2) 두 물질 모두 탄소와 연결되어 있는 proton수는 14개였다.

H-a [δ_H 6.92 (AD-1)와 6.78 (AD-2)]와 H-b [δ_H 7.57 (AD-1)과 7.67 (AD-2)]사이 특이적인 furan proton doublet (coupling constant $J = 2$)이 두 물질 모두에서 나타남으로서 두 물질 모두 furanocoumarin계 물질임을 알 수 있었다. 또한 AD-1물질은 H-a와 H-8이 W-type long-range coupling ($J = 1$)을 함으로써 linear type의 furanocoumarin임을 알 수 있었다. 이 모든 결과를 종합할 때 이 AD-1과 AD-2물질은 각각 isoimperatorin과 imperatorin으로 동정되었다. 이 두 물질은 *A. koreana* [= *Ostericum koreanum* (Mar.) Kitagawa] (Woo 등, 1982)과 *Esenbeckia yaxhoob* Lundell (Mata 등, 1998) 등의 많은 식물체에서 보고되었다. Imperatorin은 돌피 [*Echinoclora crus-galli* (L.) Beauv.] 등의 식물체의 발아를 억제하였다 (Mata 등, 1998). Imperatorin은 또한 uncoupler와 Hill reaction inhibitor로서도 작용한다고 보고되었다 (Mata 등, 1998).

한편 imperatorin은 *Helminthosporium oryzae*에 대하여 항균활성이 있는 것으로 알려져 있다 (Mirta 등, 1984). Isoimperatorin은 *Peucedanum japonicum* Thunb. (Chen 등, 1996), *Cneoridium dumosum* (Nutt.) Hook. F. 및 *A. koreana* (Dreyer와 Lee, 1969) 등의 몇몇 식물체에서는 imperatorin과 함께 존재하지만, imperatorin과 상관 없이

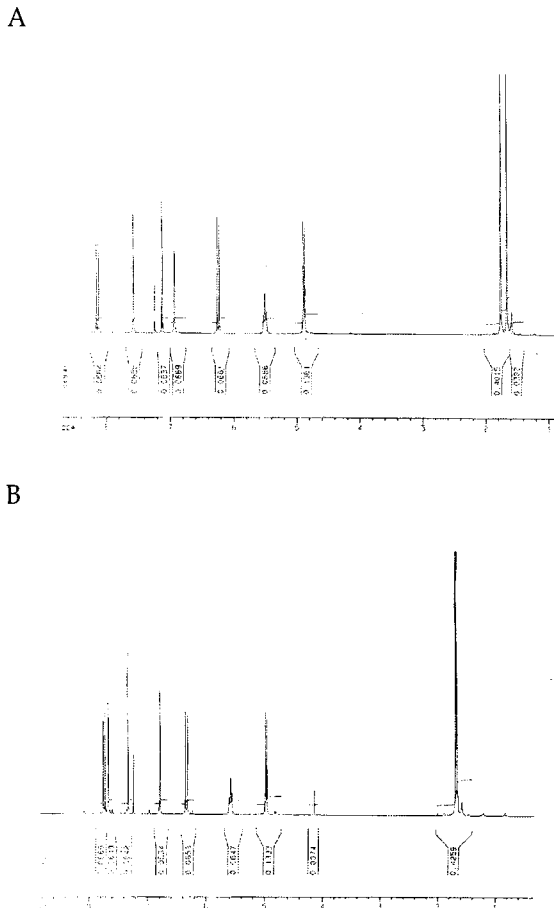


Fig. 2. ¹H-NMR spectra of isoimperatorin (A) and imperatorin (B) in CDCl₃.

단독으로 검출되기도 한다 (Beier 등, 1994; Parsons 등, 1994; Mendez와 Castro-Poceiro, 1983). Imperatorin과는 달리 isoimperatorin에 대한 생리활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이며, 저자들이 아는 한 항균활성에 대한 보고도

전혀 없는 상태이다.

Coumarin계 물질들의 *in vitro* 항균활성

Coumarin계 물질들의 항균활성과 구조와의 관계를 조사하기 위하여 분리한 세 개의 물질을 scopoletin과 umbelliferone과 함께 식물병원곰팡이에 대하여 50% 균사생육억제농도 (IC₅₀ = 50% growth inhibitory concentration)를 조사하였다. 그 결과 전체적으로 5개의 coumarin계 물질들은 *in vitro*에서 식물병원곰팡이에 대한 항균활성이 크지 않은 것으로 나타났다 (표 4). 즉, isoimperatorin, scopoletin 및 umbelliferone의 경우 실험한 10개의 식물병원곰팡이에 대하여 IC₅₀값이 모두 200 µg/mL 이상이었다. 그러나 decursin과 imperatorin의 경우에는 몇몇 곰팡이에 대하여 200 µg/mL 이하의 IC₅₀값을 보였다. 즉, decursin은 *B. cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. 및 *Pythium ultimum* Subr.에 대하여 IC₅₀값이 130, 100 및 23.8 µg/mL로 나타났다. 특히 *P. ultimum*에 대해서는 decursin의 항균활성이 큰 것으로 나타났다. 그리고 imperatorin의 경우에는 *M. grisea*와 *Cochliobolus miyabeanus* Ito et Kurib에 대하여 200 µg/mL 이하의 IC₅₀값을 보여 이들 균에 대하여 비교적 항균활성이 양호한 것으로 나타났고, 특히 벼·도열병균인 *M. grisea*에 대하여 18.0 µg/mL을 나타내어 이 균에 대하여 항균활성이 높은 것으로 나타났다.

서로 이성질체 관계인 imperatorin과 isoimperatorin의 항균활성을 비교하면, imperatorin이 isoimperatorin보다 항균활성이 우수한 것으로 나타났다. Imperatorin은 *Helminthosporium oryzae* Breda de Hann. (완전세대 = *C. miyabeanus*)에 대하여 항균활성이 있다고 알려져 있는데 (Mirta 등, 1984), 본 실험에서도 imperatorin이 다른 곰팡이에 비하여 *C. miyabeanus*에 대하여 비교적 항균활성이 높게 나타났다. 또한 탄소 7번 위치에 hydroxyl기가 노출되어 있는 scopoletin과 umbelliferone보다는 7번 위치의 hydroxyl기 대신에 cyclic alkoxy group을 가지고 있는 decursin과 imperatorin의 항균활성이 더 강한 것으로 나

Table 4. Inhibitory activity of decursin, imperatorin, isoimperatorin, scopoletin, and umbelliferone against mycelial growth of plant pathogenic fungi *in vitro*

Fungal species	IC ₅₀ (µg/mL) ^{a)}				
	DEC ^{b)}	IMP	IIP	SCO	UMB
<i>Alternaria mali</i>	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Botrytis cinerea</i>	130	>200	>200	>200	>200
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	>200	130	>200	>200	>200
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100	>200	>200	>200	>200
<i>Corticium sasaki</i>	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Fusarium oxysporum</i>	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Magnaporthe grisea</i>	>200	18.0	>200	>200	>200
<i>Phytophthora capsici</i>	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Phytophthora infestans</i>	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Pythium ultimum</i>	23.8	>200	>200	>200	>200

^{a)}Concentration required to cause 50% inhibition of growth of fungi.

^{b)}DEC = Decursin; IMP = Imperatorin; IIP = Isoimperatorin; SCO = Scopoletin; UMB = umbelliferone.

Table 5. *In vivo* antifungal activity of decursin, imperatorin, isoimperatorin, scopoletin, and umbelliferone against various fungal pathogens^{a)}

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Control value (%) ^{b)}					
		RCB ^{c)}	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
Decursin	500	80	0	14	50	0	0
	100	62	0	14	16	0	0
Imperatorin	500	96	57	0	0	0	0
	100	80	0	7	0	0	0
Isoimperatorin	500	25	14	7	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0
Scopoletin	500	0	0	0	0	0	25
	100	0	10	25	0	0	17
Umbelliferone	500	17	0	8	0	43	0
	100	8	0	17	0	0	17
Blasticidin S	50	100	- ^{d)}	-	-	-	-
Validamycin	50	-	100	-	-	-	-
Procyimdone	50	-	-	100	-	-	-
Dimethomorph	10	-	-	-	78	-	-
Benomyl	100	-	-	-	-	100	-
Flusilazole	10	-	-	-	-	-	100

^{a)}The plant seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organisms 1 day after the chemical solutions were sprayed to run-off on the leaves.

^{b)}Control value (%) = $100 \times \{\text{disease severity of untreated plants} - \text{disease severity of treated plants}\} \div \text{disease severity of untreated plants}$.

^{c)}RCB = Rice blast; RSB = Rice sheath blight; TGM = Tomato gray mold; TLB = Tomato late blight; WLR = Wheat leaf rust; BPM = Barley powdery mildew.

^{d)}Not tested.

타났다. Jurd 등 (1970)은 7-hydroxycoumarin 유도체들의 곰팡이에 대한 항균활성은 7번 위치의 phenolic기가 안정한 ether grouping에 의해 보호되면 훨씬 증가한다고 보고하였다. 그러나 세균에 대해서는 이러한 양상을 보이지 않는다 하였다.

Coumarin계 물질들의 *in vivo* 항균활성

5개 물질의 6가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. 그 결과 벼·도열병에 대하여 decursin은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 80%의 방제효과를 보였고, imperatorin은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준에서 각각 96%와 80%의 방제효과를 나타냈다 (표 5). Decursin의 재료인 당귀 추출물은 벼·도열병 외에 토마토·역병과 밀·붉은녹병에 대해서도 80% 이상의 방제효과를 보였다. 그러나 decursin은 토마토·역병에 대해서만 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50%의 방제효과를 보였을 뿐 밀·붉은녹병에 대해서는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 그리고 imperatorin의 재료인 백지의 추출물도 역시 토마토·역병에 대하여 85%의 방제효과를 나타냈으나, imperatorin은 토마토·역병에 대하여 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 전혀 효과가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아마도 당귀와 백지에 또 다른 항균활성물질의 존재하거나 아니면 특히 백지에서는 imperatorin과 isoimperatorin의 상승작용이 있을 가능성을 제시한다.

실험한 5개의 물질들 중 decursin과 imperatorin만이 벼·도열병에 대하여 우수한 식물병 방제 활성을 보였고, 나머지 물질들은 거의 *in vivo*에서 항균활성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *in vitro*에서의 항균활성과 일치하는 결과이며, *in vivo*에서도 umbelliferone과 scopoletin보다는 decursin과 imperatorin이 더 높은 활성을 나타냈다. 또한 isoimperatorin보다는 imperatorin이 *in vivo*에서도 활성이 높은 것으로 나타났다. 한가지 흥미로운 결과는 decursin의 경우 *in vitro*에서 벼·도열병균인 *M. grisea*에 대해서 IC_{50} 값이 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 균 생장 억제활성이 약했지만, *in vivo*에서는 비교적 높은 방제효과를 보였다는 것이다. 이것은 아마도 decursin이 균사 생육 억제 활성보다는 식물병원성과 관련된 다른 부위, 즉 포자발아나 부착기 형성, 멜라닌색소 생합성 또는 침입균사 생성 등에 작용하여 *in vivo*에서 활성을 나타내지 않나 생각되며, 이에 대한 연구는 앞으로 수행되어야 한다고 사료된다.

많은 coumarin계 물질들의 식물병원균에 대한 *in vitro* 항균활성은 보고되었으나 (Dadak과 Hodak, 1966; Das, 1986; Jurd 등, 1970; Mirta 등, 1984; Pan 등, 1984; Tal과 Robeson, 1986a; Tal과 Robeson, 1986b; Urdangarin 등, 1999), *in vivo*에서의 항균활성은 전무한 실정이다. Coumarin계 물질들은 합성이 용이한 것으로 알려져 있고 (Singh 등, 1987), 또한 본 실험에서와 같이 *in vivo*에서도

항균활성이 있다는 것이 증명되었으므로, 앞으로 이 물질들을 기본으로 하여 새로운 살균제의 개발이 가능하리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비지원(과제번호 PF002110-01)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Ahn, K.-S., W.-S. Sim, and I.-H. Kim (1995) Decursin: a cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med.* 62:7~9.
- Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich, and G. Schramm (1977) The strobilurins-new antifungal antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot.* 30:806~810.
- Beier, R., G. W. Ivie, and E. H. Oertli (1994) Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. *Phytochem.* 36:869~872.
- Benner, J. P. (1993) Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* 39:95~102.
- Chen, I.-S., C.-T. Chang, W.-S. Sheen, L.-L. Tsai, C.-M. Teng, C.-Y. Duh, and F.-N. Ko (1996) Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Pseuedanum japonicum*. *Phytochem.* 41:525~530.
- Chi, H. J. (1967) Studies on the components of umbelliferous plants in Korea. *J. Pharma. Soc. Korea* 11:36~38.
- Dadak, V. and K. Hodak (1966) Some relations between the structure and the antibacterial activity of natural coumarins. *Experientia* 22:38~39.
- Das, A. K. (1986) Antifungal activity of some furocoumarins of *Selium tenuifolium* and 2-pyrone derivatives of *Didymodarpus aurentiaca*. *Pestology* 10:10~11.
- Dhiangra, O. D. and J. B. Sinclair (1986) Chemical control. pp.227~243, *In Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dreyer, D. L. and A. Lee (1969) Constituents of *Cneoridium dumosum*. *Phytochem.* 8:1499~1501.]
- Eldefrawi, A. I. (1976). The acetylcholine receptor and its interactions with insecticides. pp.297~326, *In Insecticide biochemistry and physiology* (ed C. F. Wilkinson). Plenum Press, New York, USA.
- Elliott, M. (1989) The pyrethroids; early discovery, recent advances, and the future. *Pestic Sci.* 27:337~351.
- Gutierrez, M. C., A. Parry, M. Tena, J. Jorrin, and R. Edwards (1995) Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochem.* 38:1185~1191.
- Gutierrez-Mellado, M. C., R. Edwards, M. Tena, F. Cabello, K. Serfhini, K., and J. Jorrin (1996) The production of coumarin phytoalexins in different plant organs of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Physiol.* 149:261~266.
- Jurd, L., A. D. King Jr., and K. Mihara (1970) The effect of alkylation on the antimicrobial activities of 7-hydroxy- and 4-hydroxycoumarins. *Experientia* 26:1281~1283.
- Kim, H.-J., J.-C. Kim, B. S. Kim, H. K. Kim, and K. Y. Cho (1999) Antibiotic and phytotoxic activities of ophiobolins from *Helminthosporium* sp. *Plant Pathol. J.* 15:14~20.
- Kim, J.-C., G. J. Choi, J.-H. Park, H. T. Kim, and K. W. Cho (2001) Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57:554~559.
- Lange, L., J. Breinholt, F. W. Rasmussen, and R. I. Nielsen (1993) Microbial fungicides-the natural choice. *Pestic. Sci.* 39:155~160.
- Mata, R., M. L. Macias, I. S. Rojas, B. Lotina-Hennsen, R. A. Toscano, and A. L. Anaya (1998) Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*. *Phytochem.* 49:441~449.
- Mendez, J. and J. Castro-Pocheiro (1983) Furocoumarins from *Angelica pachycarpa*. *Phytochem.* 22:2599~2601.
- Mitra, S. R., A. Choudhuri, and N. Adityachaudhury (1984) Production of antifungal compounds by higher plants-a review of recent researches. *Plant Physiol. Biochem.* 11:53~77.
- Murray, R. D. H., J. Mendez, and S. A. Brown (1982) The natural coumarins. Occurrence, chemistry and biochemistry. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Murray, R. D. H. (1989) Coumarins. *Nat. Prod. Rep.* 6:591~624.
- Musilek, V., J. Cerna, V. Sasek, M. Semerdzieva, and M. Vondracek (1969) Antifungal antibiotic of the Basidiomycete *Oudemansiella mucida*. *Folia Microbiol. (Prague)* 14:377~387.
- Olson, M. M. and C. R. Roseland (1991) Induction of the coumarins scopoletin and ayapin in sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding of sunflower beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 20:1166~1172.
- Pan, S., A. Bhattacharya, P. Ghosh, and S. Thakur (1984) Studies on the antifungal activity of some naturally occurring coumarins (fungi, including *Drechslera oryzae*). *Rev. Cresterea Anim.* 90:265~268.
- Park, J.-H., J.-C. Kim, G. J. Choi, H. T. Kim, K.-S.

- Hong, C. Song, J.-S. Kim, J.-G. Kim, and K. Y. Cho (2000) Biological activities of *Fusarium* isolates from soil and plants. *Kor. J. Pestic. Sci.* 4:19~26.
- Parsons, I. C., A. I. Gray, T. G. Hartley, and P. G. Waterman (1994) Acetophenones and coumarins from stem bark and leaves of *Melicope stipitata*. *Phytochem.* 37:565~570.
- Pridzun, L., F. Sasse, and H. Reichenbach (1995) Inhibition of fungal acetyl-CoA carboxylase: a novel target discovered with the myxobacterial compound doraphen. pp.99~109, *In Antifungal Agents Discovery and Mode of Action* (ed. G. K. Dixon, L. G. Copping, and D. W. Hollomon), Guildford, UK.
- Ryu, K. S., N. D. Hong, N. J., Kim, and Y. Y. Kong (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. *Kor. J. Pharmaogn.* 21:64~68.
- Ryu S. Y., J. O. Kim, and S. U. Choi (1997) Cytotoxic components of *Artemisia princeps*. *Planta Medica*, 63:384~385.
- Sakai, M. (1969) Nereistoxin and cartap: their mode of action as insecticides. *Rev. Plant Prot. Res.* 2:17~29.
- Singh, R., B. B. Gupta, and O. P. Malik (1987) Studies on pesticides based on coumarin. I. Antifungal activity of 6-alkyl-3-n-butyl-7-hydroxy-4-methylcoumarins. *Pestic. Sci.* 208:125~130.
- Tal, B. and D. J. Robeson (1986a) The induction, by fungal inoculation, of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochem.* 25:77~79.
- Tal, B. and D. J. Robeson (1986b) The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin. *Plant Physiol.* 82:167~172.
- Urdangarin, C., M. C. Regente, J. Jorrin, and L. De La Canal (1999) Sunflower coumarin phytoalexins inhibit the growth of the virulent pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Phytopathol.* 147:441~443.
- Woo, W. S., C. K. Lee, and K. H. Shin (1982) Isolation of drug metabolism modifiers from roots of *Angelica koreana*. *Planta Medica* 45:234~236.
- Worsham, A. D. and G. C. Klingman (1962) Promotion of germination of *Striga asiatica* by coumarin derivatives and effects on seedling development. *Nature* 4837:199~201.
- 日本植物防役協會 (1998) 農薬の果たす役割. pp.94~97. 農薬概説.
- 松中 昭一 (2000) 農薬のおはなし. 日本規格協會. pp. 16~18. 東京.

Antifungal activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* and *Angelica dahurica* against plant pathogenic fungi

Shi Yong Ryu, Jin-Cheol Kim,^{1*} Young Sup Kim, Heung Tae Kim,¹ Seong Kie Kim, Gyung Ja Choi,¹ Jeoung Seob Kim, Seon-Woo Lee,¹ Junghee Heor, and Kwang Yun Cho (*Bio-organic Science Division and ¹Screening Research Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yusong P.O. Box 107, Taejeon 305-600, Korea*)

Abstract : In order to search potent antifungal substances from domestic plants, 40 plants cultivated in Korea were collected. After extracting with methanol (MeOH) and concentrating to dryness, the MeOH extracts were screened for *in vivo* antifungal activity against six plant diseases at a concentration of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Fourteen extracts showed disease-controlling activity more than 90% against at least one of the 6 plant diseases tested; eight, seven, and three extracts controlled more than 90% the development of rice blast, tomato late blight, and wheat leaf rust, respectively. However, none of the extracts exhibited *in vivo* antifungal activity more than 90% against rice sheath blight, tomato gray mold, and barley powdery mildew. From the MeOH extracts of *Angelica gigas* and *A. dahurica* showing potent controlling activity against rice blast, 1 and 2 antifungal substances, respectively, were isolated by solvent partitioning and column chromatography. The three compounds were identified to be coumarins, namely, decursin, imperatorin, and isoimperatorin, by mass spectrometry and NMR spectroscopy. They were examined for *in vitro* and *in vivo* antifungal activities together with umbelliferone (7-hydroxycoumarin) and scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) containing a free hydroxyl group at position 7 to investigate the structure-activity relationship. *In vitro*, most of 50% growth inhibitory concentrations (IC_{50}) were over 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating that they have relatively weak antifungal activity. The antifungal activity of decursin and scopoletin, containing cyclic alkoxy groups instead of free hydroxyl group at position 7, was stronger than umbelliferone and scopoletin. Especially, decursin and imperatorin showed potent antifungal activities against *Pythium ultimum* and *Magnaporthe grisea*, respectively, with IC_{50} values less than 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *In vivo*, decursin and imperatorin showed potent antifungal activity against rice blast, whereas other coumarins hardly controlled the development of 6 plant diseases tested. These results suggest that the antifungal activity of 7-hydroxycoumarin derivative is substantially increased when the hydroxyl group at position 7 is protected by a stable cyclic alkoxy grouping.

*Corresponding author (Fax : +82-42-861-4913, E-mail : kjinc@kRICT.re.kr)