

좁목형 엽 추출물의 Allelopathy에 관한 연구¹

서병수² · 문성필² · 손정훈³

A Study on the Effect of Allelopathy of *Vitex negundo* var. *incisa* Leaves Extracts¹

Byung-Soo Seo², Sung-Phil Mun², Jung-Hoon Son³

요 약

마편초과의 좁목형 엽에 함유된 물질의 allelopathy 효과를 구명하기 위해 수용성 엽 추출액, 메탄올 엽 추출액, 엽 분말과 토양과의 혼합된 pot에 각각 상치, 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자를 발아실험하여 발아 억제물질을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 좁목형 엽 분말을 증류수에 각각 24, 48, 72시간 침지 후 추출물에 상치, 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자를 파종한 후의 발아율은 각 처리구마다 대조구보다 높은 발아억제를 보였고, 48시간 침지시에는 각각 26.9%, 58.8%, 6.6%, 22.2%의 발아율을 보여 강한 발아억제현상을 보였다.

2. 좁목형 엽 분말을 메탄올 75%에 24, 48시간 침지 후 추출물에 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자를 파종한 후의 발아율은 48시간 추출액때 각각 33.3%, 15.4%, 7.7%를 보여 48시간 수용성 추출액과 24시간 메탄올 추출액보다 강한 발아억제효과가 있었다.

3. 좁목형 엽 분말과 vermiculite를 1 : 99, 5 : 95, 10 : 90, 20 : 80(w/w)으로 구분한 pot에 공시수종을 파종한 결과 엽 분말의 비율이 높을수록 발아억제효과가 컸으며, 엽 분말이 20%인 경우 발아된 부분의 건중량의 비율은 실험구와 대조구간에 비교한 발아율의 비율보다 훨씬 낮아 생장억제효과가 있는 것으로 나타났다.

4. Column chromatography와 TLC를 이용하여 최종 7 fraction을 찾고 최종 생물검정 결과 5, 6번 fraction에서 강한 활성을 나타냈다.

5. UV와 IR 분광분석 결과 UV 분광분석은 256nm와 336nm에서 흡수 최대를 나타내었으며, 이들은 시르티시약을 사용하여 검토했던 결과 7위에 에테르 결합한 전형적인 플라본류로 추정되었고, IR 분광분석 결과 지방족에 에테르 결합이 존재하는 것으로 생각되었다.

6. Py-GC-MS 분석으로부터 5, 6 fraction의 경우 플라본류에 1개의 당이 결합한 배당체 구조이고 B환의 경우 1개 또는 2개 이상의 페놀성 수산기의 존재가 예상되었다.

주요어 : Allelopathy, 좁목형, 발아억제

ABSTRACT

To examine allelopathy effect of components in *Vitex negundo* var. *incisa* leaf (Verbenaceae), seeds of *Lactuca sativa*, *Lolium multiflorum*, *Cymbopogon tortilis* var. *goeringii* and

* 이 논문은 1999년도 전북대학교 학술연구조성비의 지원에 의한 연구임

1 접수 5월 31일 Received on May 31, 2001

2 전북대학교 농과대학 산림과학부(농업과학기술연구소) Faculty of Forest Science, College of Agriculture(Institute of Agricultural Science & Technology), Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

3 전라북도 산림환경연구소 Jeolla Buk-Do Forest Environment Research Institute

Miscanthus sinensis var. *purpurascens* were planted into the soil pots mixed with water-soluble extract and methanol extract of leaves and pulverized leaves. The germination result of those seeds showed that *Vitex negundo* var. *incisa* leaves had some inhibition components against seed germination. The results of the leaves components analysis are as follows;

1. After pulverized leaves powder of *Vitex negundo* var. *incisa* was digested in distilled water for 24, 48 and 72 hours, each extract was mixed with soil. Seeds of *Lactuca sativa*, *Lolium multiflorum*, *Cymbopogon tortilis* var. *goeringii* and *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* were planted into the soil pots and each pot showed inhibition effect against germination. The soil pot mixed with the extract from 48 hour digestion had the highest inhibition effect showing 26.9%, 58.8%, 6.6% and 22.2% for *Lactuca sativa*, *Lolium multiflorum*, *Cymbopogon tortilis* var. *goeringii* and *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*, respectively.

2. Each extract was mixed with soil after pulverized leaves powder of *Vitex negundo* var. *incisa* was digested in 75% of methanol for 24 and 48 hours. Seeds of *Lolium multiflorum*, *Cymbopogon tortilis* var. *goeringii* and *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* were planted into the soil pots. The soil pot mixed with the extract from 48 hour digestion had significant inhibition effect against germination showing 33.3% and 15.4% and 7.7% for each kind of seed, respectively.

3. Seeds of *Lolium multiflorum*, *Cymbopogon tortilis* var. *goeringii* and *Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* were planted into pots where pulverized leaves powder of *Vitex negundo* var. *incisa* was mixed with vermiculite in the ratios of 1 : 99, 5 : 95, 10 : 90 and 20 : 80 (w/w). When the percentage of leaf powder was bigger, the inhibition effects against germination were become higher.

4. Using column chromatography and thin layer chromatography (TLC), final 7 fraction was detected. The final bio-examination showed that 5 and 6 fractions had the highest bioactivity.

5. UV spectrum analysis showed that there was highest absorption between 256 and 336nm. When it was observed using Shift treatment, the activity was assumed to be typical flavone combining ether at position 7. IR spectrum analysis suggested that there was ether combination at aliphatic structure.

6. Py-GC-MS analysis suggested that 5 and 6 fractions had glycoside structure with flavone combining one sugar, and circle B had one or more than 2 phenolic OH.

KEY WORDS : ALLELOPATHY, *Vitex negundo* var. *incisa*, GERMINATION INHIBITION

서론

식물 생태계 내에서 어떤 식물은 자신의 생육 영역에 대한 방어기능 및 영역확보를 위해 생리적인 여러 특성을 가지고 있다. Allelopathy는 식물 생태계에서 식물간에 생화학적으로 직·간접적인 영향을 주고받음으로써 발생하는 현상으로 식물이 화학물질을 분비하여 타종 식물의 생육이나 자신의 생육에 영향을 주어 생육을 돕거나 저해하는 것으로 알려져 있다. Rice(1984)는 식물체가 분비한 화학물질이 미생물을 포함한 다른 식물에 미치는 영향이 음성적이거나 양성적인 현상 모두를 "allelopathy" 현상으로

새롭게 정의하였다. 특히, Whittaker와 Feeny(1971)는 이 화학물질들은 식물의 성장이나 종자 발아의 억제 현상으로 나타나며, 이러한 물질을 "allelochemicals"라 정의하고, 이는 식물 상호간 생장의 억제나 촉진을 유발시키는 식물의 2차적 대사 물질이라 하였으며, 이러한 물질로는 terpenodes, phenyl propanes, terpinoids, steroids류, phenolic acids 등으로 분류한 바 있다.

임상에서의 생태·생리적인 천이의 변화에 주요한 원인은 햇빛, 수분 및 공간의 요인뿐만 아니라 이들 임분에서 분비하는 allelopathy 물질에도 그 원인이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Kohli et al., 1997).

Allelopathy에 관한 국외 연구로는 Jameson (1961)이 *Juniperus*(향나무속) 3종의 엽 추출물 발아시험 결과 밀과 무의 생장을 강하게 억제한다고 보고하였고, Fisher *et al.*(1978)은 미역취류(*Solidago canadensis*, *Solidago graminifolia*)와 *Aster* spp.(*Erigeron annuus*, *Hieracium pratense*, *Aster nova-abgliae*) 수용성 추출액으로 설탕단풍(*Acer saccharum*, sugar maple)의 일반토양과 산림토양의 발아억제효과를 알기 위해 발아실험한 결과 산림 토양군에서 발아억제효과가 컸고 수용성 추출액 발아실험에서 설탕단풍 종자의 발아억제가 큰 초본류로 *Aster* spp.와 *Solidago canadensis*, *S. graminifolia*라고 보고하였다. Jobidon(1996)은 *A. balsamea*, *Picea mariana*, *Pinus resinosa*, *Thuja occidentalis*의 엽·유기물층 및 수용성 추출액을 발아실험한 결과 *A. balsamea*, *Pinus resinosa* 엽·유기물층에서 *Phleum pratense*, *Agropyron repense*, *Poa pratense*는 줄기생장과 뿌리생장에 강한 생육억제가 있다고 보고하였다. 또한, Pellissier(1994)는 독일가문비(*Picea abies*)에 대한 연구에서 본 수종 생육지의 부식토층에서 4종의 페놀성 화합물을 밝혀 타식물의 종자발아와 생장억제가 일어나 다른 식물종의 출현이 어렵다고 발표하였다.

국내 연구로는 소나무(*Pinus densiflora*)와 리기다 소나무(*P. rigida*)에 대해 페놀성 화합물이 식물의 생장을 억제한다는 연구(길봉섭, 1987; 1988)를 하였으며, 때죽나무(*Styrax japonica*) 엽 추출물이 사방초류 종자의 발아와 생장을 억제한다고 하였으며(서병수, 1985), 참나무과(Fagaceae) 5종에 대한 종자발아 실험을 통해서 억제물질로 페놀성 화합물을 확인한 바 있다(김미현, 1991). 한편, 윤준현 등(1995)은 참나무과 상수리나무(*Quercus acutissima*), 졸참나무(*Q. serrata*), 떡갈나무(*Q. dentata*)에서의 억제물질 검색에서도 메탄올 및 아세톤 혼합추출물이 무 종자 발아를 억제한 것은 상수리나무 엽이라고 하였으며, 12가지의 페놀성 화합물을 분리·동정한 바 있다. 이상과 같이 목본식물에서는 페놀성 화합물(phenolic compounds)이 식물의 생장을 억제하는 경향으로 나타나고 있다.

좁목형(*Vitex negundo* var. *incisa*)은 마편초과(Verbenaceae)의 순비기나무속(*Vitex*)에 속하는 낙엽관목으로 우리 나라 산록가나 하천 부의 바위틈에 자라는 수종으로 7~8월에는 자주색의 꽃이 피며, 열매는 9~10월에 검게 익으며, 줄기와 잎에는 방향유가 있어 예전에 민간에서 모깃불을 피우는 데 사용

을 하였다는 기록이 있다(김삼식 등, 1994). 또한, 엽에서는 강한 향기가 발산되고 생육지 주변에 타식물의 생장이 잘 되지 않는 것으로 관찰되어 allelopathy 효과가 있는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구는 국·내외를 막론하고 본 수종의 allelopathy에 관한 연구가 전무한 상태이므로 좁목형(*Vitex negundo* var. *incisa*)의 엽 추출물이 타식물의 생장에 어떤 영향을 주는지를 파악하여 좁목형에 대한 생리·생태적 특성의 기초자료를 제공할 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구의 공시재료인 좁목형(*Vitex negundo* var. *incisa*)은 전북대학교 교내에 식재되어 있는 것으로 엽을 1998년 7~9월 및 1999년 7~9월에 채집하여 기건한 후 분쇄기로 분말을 만들어 시료를 냉장고에 보관하여 사용하였다.

발아실험에 사용한 종자는 상치(*Lactuca sativa*), 이탈리아안라이그라스(*Lolium multiflorum*), 개솔새(*Cymbopogon tortilis* var. *goeringii*), 억새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*)이다.

2. 방법

(1) 물 추출액에 의한 발아실험

① 엽 추출액의 제조

분말 상태로 저온·보관된 좁목형의 엽 20g에 증류수 200ml를 첨가하여 24, 48, 72시간(이하 각각 24, 48, 72시간 수용성 추출액이라 함) 동안 3~4℃로 냉장·보관하였다. 그 후 이들을 11cm 직경의 여지로 2회 여과 한 후 잔유물을 제거하고 수용성 엽 추출액을 제조하였다.

② 상치 및 사방초류 종자의 발아실험

좁목형 엽 분말을 24, 48, 72시간 증류수 침적 후 추출한 추출액의 발아효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 엽추출액 5ml를 petri dish 안의 whatman(No. 9) 여지에 고루 적신 후 위에 상치 종자를 각각 100립씩 파종하여 3반복 발아시험하였고 24, 48, 72시간 엽추출액 5ml를 petri dish 안의 whatman 여지에 고루 적시고 이 위에 이탈리아나

이그라스, 개솔새, 익새 종자를 각각 100립씩 파종하여 3반복 발아시험하였다. 대조구는 증류수를 사용하였으며 7일 동안 발아 상태를 조사하여 유근이 발생하면 발아한 것으로 간주하였다.

(2) 메탄올 추출액에 의한 발아실험

① 추출액의 제조

메탄올에 의한 엽 추출액이 종자 발아에 어떤 영향을 주는지를 조사하기 위해 분말 상태로 저온 보관된 즙목형의 엽 20g에 메탄올 75% 200ml를 첨가하여 24, 48시간 동안 3~4℃로 냉장·보관하였다. 그 후 이들을 직경 11cm 여지로 2회 여과 한 후 잔유물을 제거하고 40℃에서 농축·건고시킨 다음 증류수 100ml를 첨가하여 제조하였다.

② 사방용 초류종자의 발아실험

추출액이 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 엽분말을 24, 48시간 메탄올에 침지한 다음 추출물을(이하 메탄올 추출액이라 함) 5ml를 petri dish 안의 whatman(No. 9) 여지에 고루 적신 후 위에 이탈리아라이그라스, 개솔새, 익새 종자를 각각 100립씩 파종하여 3반복 발아시험하였다. 대조구는 증류수를 사용하였으며 10일 동안 발아 상태를 조사하여 유근이 발생하면 발아한 것으로 간주하였다.

(3) 즙목형 분말과 토양 혼화 발아실험

① 토양 혼화제조: 토양에 즙목형 분말을 혼합하였을 때 발아효과를 알기 위하여 점토인 vermiculite를 pot에 즙목형 분말: vermiculite를 1 : 99, 5 : 95, 10 : 90, 20 : 80(w/w)로 구분하여 실험구로 하고 혼화하지 않은 vermiculite pot를 대조구로 하였다.

② 발아시험: 공시 종자인 이탈리아라이그라스, 개솔새, 익새 종자를 파종상에 100립씩 3반복 파종하여 2일에 한 번씩 300ml 물을 일정량 공급하고 Growth chamber(HB, M-301) 온도 27℃, 습도 80%로 25일 간 생육하여 발아율을 조사하였으며 건중량은 건조기에서 80℃로 24시간 건조 후 조사하였다.

(4) 발아억제물질 추출

즙목형(*Vitex negundo* var. *incisa*) 엽에 함유된 발아억제물질을 추출하기 위한 추출과정(Sauvesty et al., 1992)은 Figure 1에 나타내었다.

① 추출과정

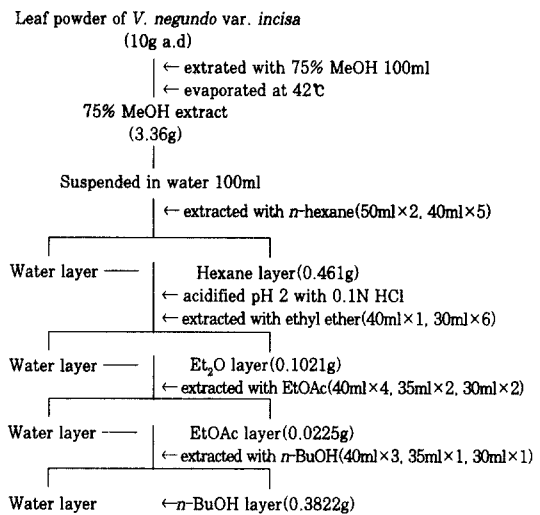


Figure 1. Extraction procedure of allelopathic fractions from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

② 추출과정 및 bioassay

발아억제물질 추출과정은 먼저 Figure 1과 같이 소량으로 예비실험을 통해 얻은 3가지의 용매층(Et₂O layer, EtOAc layer, n-BuOH layer)에서 발아억제물질 존재의 유무를 확인하기 위한 1차적 생물검정(bioassay) 실시는 Et₂O layer를 농축 후 건고물, EtOAc 농축 후 건고물, n-BuOH layer 농축 후 건고물 각각에 이탈리아라이그라스, 개솔새, 익새 종자를 100립씩 3반복, 대조구는 동일한 양의 증류수를 공급하여 7일 후 발아율을 조사하고 발아억제가 가장 현저한 유기용매층을 대량 추출하였다.

예비추출 과정을 통해 발아억제가 가장 현저한 유기용매층을 물질분석하기 위해 동일 추출과정에 양을 20배로 늘려 추출을 진행하였다. 2차적인 bioassay는 발아억제물질의 효과를 정확히 판단하기 위해 이탈리아라이그라스, 개솔새, 익새 종자를 50립씩 3반복, 대조구는 동일한 양의 증류수를 공급하여 7일 후에 발아율 조사를 통해 발아억제물질 유무를 확인하였다.

③ Column chromatography와 bioassay

생장억제물질을 분석(이춘우 등, 1997)하기 위해 직경 4.3cm, 높이 115cm의 컬럼에 silicagel(Merck, Art 7733, 70~230mesh) 450g을 컬럼에 채운 후 EtOAc(100%) 2l가 고루 스며들게 한 다음 EtOAc 농축·건고물을 MeOH(100%)에 소

량을 녹여 피펫으로 서서히 스며들게 하고 MeOH 혼합물이 안정되도록 하였다.

MeOH(100%) 혼합물을 컬럼에서 용출이 용이하게 될 수 있도록 용리액을 공급하였고 용리액 주입 순서는 다음과 같다.

EtOAc(100%)1 l → MeOH(100%)50ml + EtOAc(100%)950ml → MeOH(100%)100ml + EtOAc(100%)900ml → MeOH(100%)200ml + EtOAc(100%)800ml → MeOH(100%)350ml + EtOAc(100%)650ml

위와같은 용리액을 주입하여 1번과 2번 분획은 100ml를 받고 나머지 68개의 분획은 10분당 50ml를 받아 보관하였다.

또한, 컬럼의 분획을 전개하면서 미리 잔량으로 생물검정을 실시하기 위해 남긴 EtOAc 건조물을 MeOH(100%) 10ml에 녹인 후 농축·건고하여 증류수 80ml로 현탁액을 만들어 발아억제물질의 유무를 생물검정을 통하여 조사하였다.

생물검정에 쓰인 종자는 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자를 50립씩 대조구와 동일한 조건에서 7일 후 발아율을 조사하였다.

④ TLC 전개 및 bioassay

Column chromatography에서 받은 68개의 분획을 1차 TLC 전개를 하였는데 20×20cm의 silicagel(Merck, TLC aluminium sheets, 60 F₂₅₄) TLC를 가로 6.5cm×세로 7.5cm 크기로 잘라 각 4개씩 전개를 하였다.

전개용매는 1~52의 분획은 EtOAc(100%) 10ml를 사용하고, 53~68의 분획은 EtOAc(100%) 8ml + MeOH(100%) 2ml를 혼합하여 사용하고 각 TLC에 대한 분리능을 254nm와 365nm의 UV(Spectroline, ul 977c inspection equipment)하에서 분리능을 확인하였다. 1차 TLC 전개에서 얻은 동일 종류의 분리능을 확인하여 모두 6종의 fraction으로 나누고 2차 TLC를 전개하였다.

2차 TLC 진행에 사용된 전개용매는 EtOAc(100%) 8ml + MeOH(100%) 2ml를 혼합하여 전개를 하였고, 2차 TLC 전개 후 UV와 IR 분광분석 전 단계로 가장 큰 발아억제효과를 가진 fraction을 찾기 위해 각 fraction별로 소량을 농축·건고하고 증류수 12.5ml로 각각 현탁액을 만들어 생물검정을 실시하였다. 종자는 이탈리아라이그라스 10립씩을 발아실험 종자로 사용하여 매일 2.5ml씩 현탁액을 5일 간 공급하고 대조구는 같은 양의 증류수를 공급하여 5일 후에 발아율을 조사하였다.

(5) 발아억제물질의 물리화학적 분석

① UV 및 IR 분광분석

생장억제물질을 함유하고 있는 최종 fraction에 대한 화학적 성질을 알아보기 위해 2차 TLC 진행 후 발아억제효과가 가장 큰 fraction에 대해 UV와 IR 분광분석기를 사용하여 발아억제물질을 분석하였다. UV 분광분석에는 HP사의 8452A, Diode array 분광분석기(U.S.A)를 사용하였다. MeOH를 기본 전개물질로 사용하였으며, 여기에 NaOH 수용액, NaOAc, AlCl, NaOAc-H₃BO₃를 각각 첨가하여 시프트 정도를 분석하였다. IR 분광분석은 Shimadzu사의, FTIR-8201PC(Japan)를 이용하였으며 KBr 정제법으로 분석하였다.

② Py-GC-MS 분석

활성 구분 6을 소량 취하여 메탄올에 녹이고 여기에 약 10mg의 glass wool을 넣었다. 용액이 완전히 흡수된 것을 105±1℃ 송풍 건조기에서 4시간 건조시켰다. 이들 액화물로 침투된 glass wool의 극소량을 취하여 분석 시료로 사용하였다.

Py-GC-MS(Pyrolysis Gas chromatograph-Mass spectrometer) 분석에 있어서 pyrolyzer는 Shimadzu사의 PYR-4A(Japan)를 사용하였으며, 열분해 온도는 600℃로 하였다. GC-MS 분석에는 Shimadzu사의 QP 5050(Japan)을 사용하였다. 컬럼은 CBP 20 column (0.22mm×25m)을 사용하였고, 오븐 온도는 50℃에서 1분 간 유지시킨 후 200℃까지 분당 2℃씩 승온시켰으며, 200℃에서 5분 간 유지시켰다. He의 유속은 0.2ml/min으로 하였으며, split 비는 38로 하였다. 또한, MS 검출기의 전압은 1.5 KV로 하였다.

결과 및 고찰

1. 물 추출물에 의한 발아실험

좁목형 엽을 물에 침지한 후 침지시간을 달리한 추출액에 상치(*Lactuca sativa*), 이탈리아라이그라스(*Lolium multiflorum*), 개솔새(*Cymbopogon tortilis* var. *goeringii*), 억새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*) 종자를 파종한 후 7일까지의 결과는 Table 1과 같다.

침지시간에 따른 상치, 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자의 발아율은 대조구에 비해 침지시간이 길수록 24시간대와 48시간대에서 각각 유의성을 나

Table 1. Mean germination ratio(%) of 4 plants seeds with pregermination treatments in aqueous extract of *Vitex negundo* var. *incisa* leaves by different times(24, 48,72 hours)

	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	92.2a	90.0a	78.9a	66.6a
Aq. extract (24h)	64.9b	74.8ab	61.6b	50.6b
Aq. extract (48h)	26.9c	58.9b	6.7c	22.2c
Aq. extract (72h)	25.3c	57.2b	5.5c	20.9c

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

타내며 발아율이 현저히 떨어짐을 알 수 있었으나 48시간 처리구와 72시간 처리구 사이에는 거의 차이를 보이지 않았다.

전재희(1994)는 초본류 4종, 목본류 1종의 엽추출액을 이용한 allelopathy 실험에서 농도가 높을수록 발아억제가 있고 초본류보다 목본류에 의한 allelopathy 효과가 크다고 보고하였으며 Zackrisson와 Nilson(1992)은 *Empetrum hermaphroditum*의 엽 추출액의 시간별 수용성 엽 추출액에 따른(12시간, 24시간, 48시간) 구주 소나무(*Pinus silvestris*, scotch pine)와 유럽사시나무(*Populus tremula*, aspen) 종자발아 실험에서 48시간 동안의 침지처리가 가장 발아억제효과를 보였다고 하였고, 오기수(1991)는 가지의 allelopathy 실험에서 수용성 추출액 처리시간은 48시간이 유식물생장에 가장 억제하였다는 효과가 있었다고 하였는데 본 실험의 결과도 같은 현상을 나타냈다.

서병수(1985)는 목본식물 49과 165종의 엽추출물에 의한 상치, 이탈리아라이그라스, 솔새 등의 발아실험에서 가장 발아억제효과를 나타냈었던 때죽나무를 제외한 해송, 산벚나무 등 7수종에서 발아억제효과와 비슷한 경향을 나타냈다. 쯤목형 엽을 물에 침지한 후 침지시간을 달리한 추출액에 상치

(*Lactuca sativa*), 이탈리아라이그라스(*Lolium multiflorum*), 개솔새(*Cytopogon tortilis* var. *goeringii*), 억새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens*) 종자를 파종한 후 7일까지의 결과는 Table 1과 같다.

침지시간에 따른 상치, 이탈리아라이그라스, 개솔새, 억새 종자의 발아율은 대조구에 비해 침지시간이 길수록 24시간대와 48시간대에서 각각 유의성을 나타내며 발아율이 현저히 떨어짐을 알 수 있었으나 48시간 처리구와 72시간 처리구 사이에는 거의 차이를 보이지 않았다.

2. 메탄올 추출물에 의한 발아실험

쯤목형 엽에 함유된 종자발아억제 물질이 발아에 미치는 영향을 확인하기 위해 24, 48시간 메탄올 추출액에 10일 동안 발아실험 결과는 Table 2와 같다.

메탄올 추출액에 의한 결과에서도 개솔새, 억새 종자의 발아율은 대조구에 비해 침지시간이 길수록 24시간대와 48시간대에서 각각 유의성을 나타내며 발아율이 현저히 떨어졌다. 이탈리아라이그라스에서는 48시간의 침지에서 비로소 발아율이 유의성 있게 떨어져 다른 두 초종에 비해 상대적으로 발아억제효과가 낮게 나타났다.

Table 2. Mean germination ratio(%) of 3 plants seeds with pregermination treatments in metanol extract of *Vitex negundo* var. *incisa* leaves by different times(24, 48 hours)

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	95.5a	81.8a	60.0a
Metanol extract(24h)	74.4a	41.0b	24.4b
Metanol extract(48h)	33.3b	15.4c	7.7c

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

Table 3. Mean germination ratio(%) of 3 plants seeds by different soil materials of 1, 5, 10 and 20%(w/w) powdered *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	100a	81.0a	71.0a
1% <i>Vitex</i> powder	100a	67.7b	59.2b
5% <i>Vitex</i> powder	85.5b	60.3b	46.6c
10% <i>Vitex</i> powder	46.6c	46.6c	13.3d
20% <i>Vitex</i> powder	42.2c	25.5d	0.0e

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

Manikandan 등(1998)은 *Acacia melanoxylon*의 잎을 메탄올에 추출한 추출물은 *Phaseolus mungo*와 석결영 및 항부자의 종자발아, 유식물의 생장, 생체량의 증가를 억제하였고, 전재철 등(1987)은 썩의 24시간 메탄올 85% 추출액으로 참깨와 무의 발아에 90% 이상 억제효과를 보고한 바 있다. Chung과 Alan(1986)은 식물의 성분추출은 유기용매 중 메탄올과 아세톤이 일반적으로 추출용매로 많이 사용되는데 물과의 혼화성이 좋고 킬럼의 안정화에 좋은 효율성을 지니고 있다고 나타내었다. 알코올은 세포막을 파괴하여 세포 내 물질추출이 가능하다고 하였는데(우원식, 1996), 본 실험에서도 메탄올 추출물이 물 추출물에 비해 발아억제효과가 컸다.

3. 좁목형 분말과 Vermiculite 혼화 발아실험

좁목형 엽 건조분말을 1, 5, 10, 20%(w/w) 농도로 Vermiculite와 혼화 처리하고 여기에 공시종자를 파종하여 25일 경과 후 관찰한 발아율과 건중량은 Tables 3, 4와 같다.

개술새, 억새 종자의 발아율은 대조구에 비해 1%의 좁목형 엽 분말농도에서부터 유의성 있는 반응을

시작하여 분말의 농도가 높을수록 현격히 발아율이 저하되었고 이탈리아라이그라스는 5% 농도에서부터 발아율이 유의성 있게 저하됨을 보여 주었다(Table 3). 한편, 좁목형 잎의 함유물질은 상대 초종의 발아억제뿐만 아니라 생장에도 영향을 주었는데 1%의 좁목형 엽 분말 첨가라도 유의차가 있었다. 특히, 농도 20% 경우 발아율과 건중량을 각각 대조구에 비교하면 건중량이 비율이 낮아 생장억제효과가 있음을 보였다(Table 4).

McPherson과 Thompson(1972)은 *Quercus stellata*와 *Q. marilandica* 산림지대의 하층식생이 피압되는 원인의 하나로 참나무 유기물층의 종자발아 억제와 참나무 엽에서 수용성 독성물질의 분비로 인하여 하층식생의 생장이 억제됨을 증명하였고, 김상렬 등(1994)도 수수(*Sorghum vulgare*) 줄기 잔유물을 온실에서 토양에 농도(w/w)별로 mulching한 후 발아율을 조사한 결과 농도가 증가함에 따라 *Echinochloa colona*와 무(*Raphanus sativus* var. *acanthiformis*)에 상당한 발아억제에 효과가 있었다고 보고하였다. Jose와 Gillespie(1998)은 *Juglans nigra*에서 분비하는 juglone은 토양에 지속적으로 잔류하여 식물의 생육

Table 4. Mean total dry weight(g) of 3 plants in 25 days after sowing by different soil materials of 1, 5, 10 and 20%(w/w) powdered *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	6.43a	5.16a	1.36a
1% <i>Vitex</i> powder	3.66b	2.62b	0.36b
5% <i>Vitex</i> powder	3.29c	2.52b	0.32b
10% <i>Vitex</i> powder	2.99d	1.88c	0.24b
20% <i>Vitex</i> powder	2.10e	1.32d	0.0c

*Total dry weight(g) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

Table 5. Mean germination ratio(%) of 3 plants seeds by the different treatments

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	86.1a	75.5a	68.4a
Ethyl ether extract	77.7a	55.5b	46.6b
Butanol extract	38.8b	38.8c	29.0c
Ethy acetate extract	31.0b	22.0d	16.5d

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

을 방해하는데 juglone은 비의 의해 엽에서 분비되는 독성물질이 토양에 축적되어 식물의 생육을 방해한다고 보고하였다. 쯔목형도 엽의 경우에도 함유된 물질이 증류수 공급으로 인해 분비되면서 엽 분말의 농도가 높을수록 발아율과 건중량이 크게 감소한 원인으로 사료된다.

4. 발아억제물질 추출

(1) 추출과정 및 Bioassay

Table 5는 발아억제물질 예비추출과정에서 얻어진 에테르층(Et₂O), 에틸 아세테이트층(EtOAc), 부탄올층(*n*-BUOH)에 대해 단계별로 진공 농축하여 얻어진 건고물에 증류수를 각각 100ml, 80ml, 80ml를 첨가하여 현탁액으로 생물검정을 실시한 결과 얻어진 발아율을 나타낸 것이다. Et₂O, *n*-BUOH, EtOAc액 전처리 후 이탈리아 안라이그라스, 개솔새, 역새 종자의 발아율은 대조구에 비해 모든 층에서 유의성 있게 저하함을 알 수

있고, 특히 EtOAc층에서 발아억제효과가 가장 크게 나타났다.

발아억제효과가 컸던 EtOAc층을 대량 추출 후 발아억제물질의 유무를 판단하기 위해 생물검정을 실시한 결과 유의성이 있었다(Table 6).

(2) Column chromatography

Table 7은 Column chromatography 분석을 위해 EtOAc 농축물 소량(0.222g)을 증류수 80ml를 첨가하여 만든 현탁액에 생물검정한 결과이다. 모든 초종(草種)에서 유의성 있게 발아율이 저하되었지만 이탈리아 안라이그라스는 불과 10%의 감소에 그쳤고, 개솔새와 역새에 있어서는 각각 40%와 55%의 감소를 보여 주었다.

(3) TLC 전개 및 농도별 bioassay

Column chromatography에서 얻은 68개의 분획을 1차 TLC를 진행하여 모두 7종의 fraction으로 나누고 2차 TLC로 얻은 결과는 Figure 2와 같다.

Table 6. Mean germination ratio(%) of 3 plants seeds by the treatments

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	90.0a	73.3a	63.3a
Ethyl acetate*	30.0b	16.6b	3.3b

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

Table 7. Mean germination ratio(%) of 3 plants seeds by the treatments

	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Cytopogon tortilis</i> var. <i>goeringii</i>	<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>
Control	100a	70.0a	58.3a
Ethyl acetate**	90.0b	30.0b	3.3b

*Germination ratio(%) and Duncan-Test($\alpha=5\%$ level)

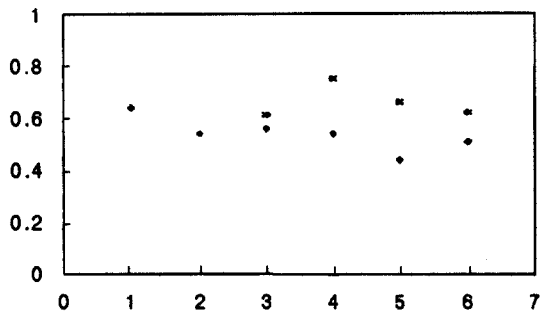


Figure 2. Spot on the thin layer chromatography in the second column chromatography of EtOAc extracts from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

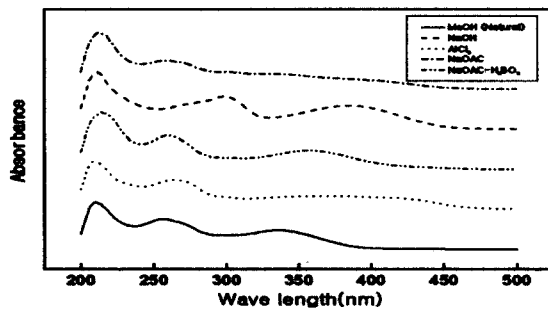


Figure 3. UV spectra of the germination inhibiting substance extracted from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

1차 TLC를 전개하며 UV lamp로 조사한 바 단과장에서 물질의 확인이 대부분 이루어졌으나 2차 TLC 전개시에 6종의 혼합 분배액 spot에서 단과장에서 관찰이 되지 않았던 붉은색과 푸른색이 365nm의 UV lamp 장파장에서 관찰되었다.

TLC 전개 후 UV-spectrum과 IR-spectrum 분석을 하기 위해 발아억제물질을 함유하고 있는 각 fraction 별로 소량씩을 MeOH에 녹여 농축·건고하여 증류수 12.5ml를 첨가한 현탁액을 5일 동안 생물검정을 한 결과 Table 8에서와 같이 fraction 5, 6에서 강한 발아억제가 되었다

5. 발아억제물질의 물리화학적 분석

발아억제효과가 가장 크게 나타났던 5, 6 fraction의 화학적 성질을 구명하기 위해 억제물질의 UV 분광분석 결과(Figure 3)와 IR 분광분석 결과(Figures 4, 5) 및 Py-GC-MS 결과는(Figure 6) 다음과 같다(Appendix 1, 2 참고)

(1) UV 분광분석

시료를 메탄올에 녹이고 이를 UV 스펙트럼을 분석한 결과 Figure 3에 나타낸 것처럼 256nm, 336nm에 흡수 최대를 나타내었다. 중성 UV 스펙트럼으로부터 본 화합물이 방향족 화합물이며, 공액 카

르보닐기가 존재한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 중성 스펙트럼의 흡수 최대 피크의 분포는 전형적인 플라본류를 나타내기 때문에 이를 확인하기 위하여 플라보노이드류의 구조 동정에 흔히 사용되는 전형적인 시프트 시약을 처리하였다. 분획 6의 메탄올 용액에 NaOH 수용액을 처리하면 256nm의 피크는 300nm로 336nm는 384nm로 각각 44, 48nm 심색 이동하였다. 이러한 이동은 플라본류의 골격의 B환의 4' 위에 페놀성 수산기가 있음을 의미한다. 중성용액에 대하여 AlCl₃를 처리하면, 256nm의 경우 8nm 장파장으로 이동한 264nm, 336nm의 경우, 보다 장파장쪽으로 넓게 퍼졌다. 이러한 사실은 전형적인 플라본류의 4위의 케톤과 A환의 5위에 수산기가 존재한다는 것을 나타낸다.

즉, 알루미늄이온의 경우 상기와 같은 구조가 존재할 경우, 4위와 5위에서 알루미늄의 착염을 형성하기 때문이다. 한편, NaOAc를 처리하면, 중성에서 256nm의 흡수피크는 거의 변동이 없었으나, 336nm의 것은 그 흡수대가 낮아지며, 보다 장파장쪽으로 넓게 확산되었다. 이처럼 NaOAc 처리에 의하여 256nm의 흡수대가 그대로 존재하는 것은 A환의 7위에 수산기가 존재하지 않거나 다른 화합물과의 결합이 있음을 나타낸다.

특히 7위의 경우 이들 플라보노이드류의 생합성 경로로부터 볼 때 반드시 수산기가 있어야 하므로

Table 8. The germination ratio of *Lolium multiflorum* in the second thin layer chromatography of extract from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves(unit: %)

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	Control
<i>Lolium multiflorum</i>	50	30	40	30	0	0	50	80

본 결과에서는 7위에 수산기가 메틸화되었거나 당류 등이 에테르 결합하여 존재할 가능성이 높다고 생각되었다. 본 용액에 H_3BO_3 분말을 처리하면, 256nm의 것은 약 4nm 이동하였으나, 336nm의 경우 22nm 장파장으로 이동한 358nm에 흡수피크를 나타내었다. 이것은 플라본류 B 환의 3', 4'위가 페놀성 수산기로 카테콜 형태를 유지하고 있다는 것을 나타낸다. 이상의 UV 스펙트라의 결과로부터 본 활성 구분은 대부분 플라본류로 이루어진 것으로 추정되었다. 그러나 보다 상세한 검토를 위해서는 다시 정제 분리하여야 할 것으로 생각된다.

(2) IR 스펙트라

Figure 4는 활성 구분의 IR 스펙트럼을 나타내었다. $3,300cm^{-1}$ 부근은 수산기의 신축진동을, $1,600$, $1,500$ 및 $1,400cm^{-1}$ 부근은 전형적인 방향족 고리의 C-H 신축진동을 나타낸다. 따라서 본 화합물은 방향족 화합물이라는 것을 알 수 있다. 그리고 $2,900cm^{-1}$ 부근은 CH_3 , CH_2 등과 같은 알킬기의 C-H 신축진동을 나타낸다. 한편, $1,620cm^{-1}$ 부근은 C=C 결합을, $1,700cm^{-1}$ 부분은 환상 케톤으로 생각되므로 상술한 UV 스펙트라의 결과와 유사하게 본 활성 구분은 플라본 골격으로 이루어져 있음을 IR 스펙트럼으로도 확인 할 수 있었다. 한편, $1,050\sim 1,070cm^{-1}$ 부근은 전형적인 지방족 에테르 결합을 나타내는 것으로 주로 탄수화물에 유래할 것으로 생각되고 Figure 3 역시 Figure 4의 IR 스펙트럼 결과와 유사한 것으로 판단된다. 따라서 본 활성 구분은 플라본류의 3위에 당이 결합한 형태

로 생각되지만, 앞으로 더욱 검토해야 할 것으로 생각된다.

(3) Py-GC-MS 분석

상기 활성 화합물 5 및 6의 경우 아직 순수 분리하지 않았으므로 전체 구조를 파악한다는 것은 어렵지만 본 분석 방법을 사용하면, 적어도 플라본류에 당류의 결합유무, 결합한 당류의 개수, 방향족 골격에 있어서 페놀성 수산기 유무 등을 파악할 수 있기 때문에 상기 활성 구분 6에 대하여 Py-GC-MS 분석을 행하였다. Figure 5는 시료를 $600^\circ C$ 에서 열분해하고 발생하는 기체의 TIC(total ion chromatogram)을 나타내었다. Mun에 의하면, 일반적으로 당류가 결합된 플라본류에 있어서 이들이 적당한 온도에서 열분해되면 당류의 경우 주로 초산으로 분해되며, 나머지는 furfural 등의 당 탈수화물이 생성된다. 페놀성 수산기가 있는 플라보노이드류의 경우 공통적으로 가장 현저한 생성물은 페놀이며, 기타 방향족 화합물이 대량으로 검출된다. 본 활성 화합물 6의 경우 탄수화물의 열분해물인 hydroxy acetone, furfural, 초산이 RT 7.475분, 14.125분 및 16.433분에 나타났다. 따라서 본 활성 구분에는 상술한 IR 스펙트럼 및 UV 분광분석에서 예상한 것처럼 당이 결합해 있는 것으로 생각되었다. 또한 furfural이 많이 검출되었으므로 5탄당류가 결합되어 있을 가능성이 높은 것으로 추정되었다. RT 42.708분 및 46.717분의 경우 각각 페놀과 4-methyl phenol로 플라본류가 열분해되면, 공통적으로 생성되는 열 분해물이다. 그러나 본 활성 구분의 열분해

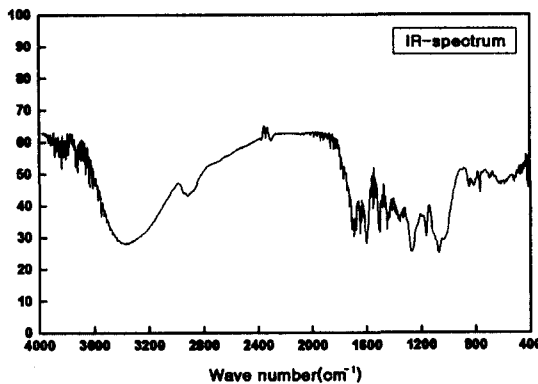


Figure 4. IR spectra of the germination inhibiting fraction 5 extracted from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves(fraction 5)

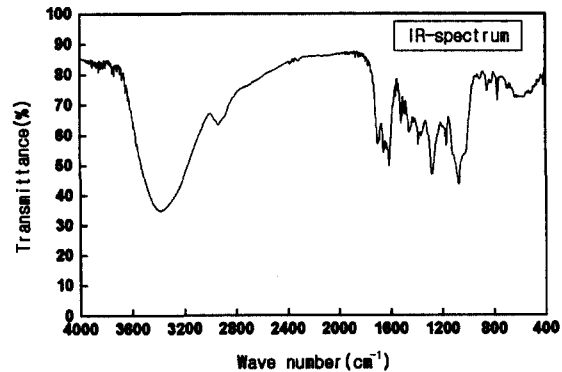
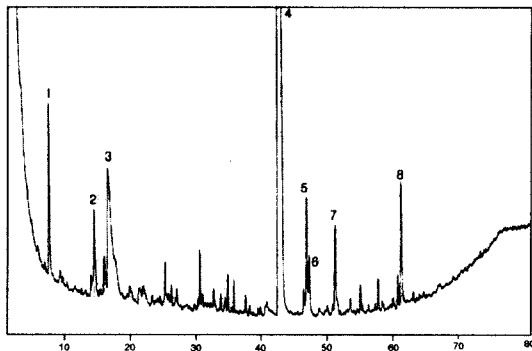


Figure 5. IR spectra of the germination inhibiting fraction 6 extracted from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves(fraction 6)



Retention time(min.)
 1: hydroxy acetone, 2: furfural, 3: acetic acid,
 4: phenol, 5: 3 · 4 dimethyl phenol, 6: 4-methyl
 phenol, 7: ethyl phenol, 8: 2 · 3 dihydro benzo-
 furan

Figure 6. Pyrogram(Py-GC-MS) of fraction 6

물의 경우 페놀부분의 양이 4-methyl phenol보다 훨씬 많이 존재하여 B환의 경우 4' 위에 수산기가 있는 구조가 3', 4' 위에 수산기가 있는 것보다 많이 존재하는 것으로 생각되었다. 또한 당류의 지표인 초산의 피크의 높이가 4-methyl phenol과 유사하여 분할성 화합물군 6에는 1개의 당류가 결합된 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 활성 구분 6 및 5의 경우, 플라본류에 5탄당류 1개가 결합된 배당체이며, B환의 경우 페놀성 수산기가 다른 화합물의 혼재가 예상되었다. 앞으로 이들을 다시 분리하여 각각의 구조를 동정해야 할 것으로 생각되었다.

본 실험에서 발아억제물질을 분석한 결과 좀목형 엽 내 함유된 물질은 IR 및 UV 분광분석 및 Py-GC-MS 분석에서 공통적으로 페놀성 물질 중 플라본 성분과 당이 결합한 배당체 화합물로 나타났다.

Macias(1997)은 *Helianthus annuus cultivars*중에 함유된 플라보노이드 성분이 유식물의芽(아) 성장억제에 영향을 미친다고 보고하였고, Chou 등(1995)은 농업에서 쓰는 제초제 대신 천연활성물질 성분 중 Flavonoid 성분을 활용하여 토양의 Autointoxication 피해를 최소화가 가능하다는 연구 보고를 발표하였다. Samiyyan와 Chandrasekharan(1995)은 nochi(*Vitex negundo*)의 엽 추출액으로 thrips(삼주벌레류)의 서식밀도를 줄여 벼 재배 지역의 피해를 줄일 수 있다는 결과를 언급한 바 있어 좀목형 엽에 함유된 물질에 대해 해충의 천

연활성 성분으로 활용가치가 있으리라 보고하였다. Nishimura 등(1995)은 *Eucalyptus citiodora*, *Polygonum sachalinense*는 뿌리 추출물에서 *p*-menthane-3,8-diol(*cis* and *trans*)가 상처의 발아를 억제하였다는 결과를, Heisey(1996)는 *Ailanthus altissima* 수용성 추출물에서 alianthone, quassinoid compound를 분리하여 garden grass(*Lepidium sativum*) 종자를 생물검정한 결과 50% 이상 유근생장이 억제되었다는 결과를 발표한 바 있다.

곽승훈(1993)은 편백림에서 식물종 출현이 혼합림보다 적은 이유는 햇빛에 대한 흡수부족 이외에도 테르펜류의 휘발성 물질로 인한 allelopathy의 효과에도 원인이 있다고 하였고, 김근보 등(1998)은 지리산 구상나무림의 유수형성 및 종자발아의 영향이 구상-신갈-조릿대 군락의 부식질에서 *p*-hydroxybenzoic acid 등의 페놀성 화합물의 영향으로 생육이 저해될 수 있다는 결과를 보고하였는데 좀목형의 엽에 함유된 발아억제물질이 토양에 축적되어 타식물의 종자발아나 생육저해 등의 타감작용을 일으킬 수 있는 조건이 가능하다고 생각한다.

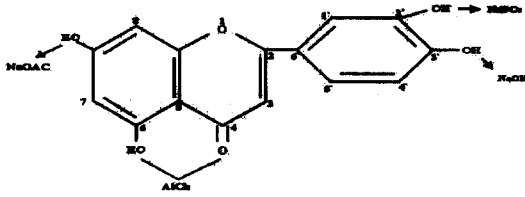
또한 김성환 등(1997)은 계절변화에 따른 두충나무 및 자작나무의 플라보노이드화합물의 변화가 5~10월 사이에 함량의 증가가 이루어지는 시기로 판단하였는데 본 실험에서 좀목형의 엽 채취시기가 7~9월의 여름철이었고 엽에서 발산되는 향이 강한 것으로 보아 플라보노이드 성분의 함량에 대한 변화를 예측할 수 있으리라 사료된다.

인용 문헌

- 곽승훈(1993) 편백림 하층식생의 식물생장에 Allelopathy 영향. 원광대학교 대학원 박사학위 논문, 123쪽.
- 길봉섭(1987) 소나무 Allelopathy 효과. 한국생태학회지 6: 27-33.
- 길봉섭(1988) 리기다 소나무 Allelopathy 효과. 한국생태학회지 11(2): 65-76.
- 김근보, 이경준, 현정오(1998) 지리산 구상나무림에서 타감작용이 유수형성에 미치는 영향. 한국임학회지 87(2): 230-238.
- 김미현(1991) 상처의 발아와 생장에 미치는 참나무과 5종의 Allelopathy 효과. 김두영 박사 회갑기념 논문집, 97-113쪽.
- 김삼식, 변수현, 홍성천(1994) 원색한국수목도감. 계명

- 사, 서울, 310쪽.
- 김상렬, S. K. De Datta, R. P. Robles, 김길용, 이상철, 신동현(1994) 수수의 타감작용에 관한 연구. 한국잡초학회지 14(1): 34-41.
- 김성환, 김상교, 권영주, 박정희(1997) 계절에 따른 두충 및 자작나무잎 플라보노이드 화합물의 변화분석. 경상북도 보건환경연구원보 9: 5-14.
- 서병수(1985) 때죽나무 잎 내 함유물질이 사방초류의 발아억제에 미치는 영향. 전북대학교대학원 박사학위논문. 31쪽.
- 오기수(1991) 가지의 Allelopathy 효과 연구. 원광대학교 교육대학원 석사학위 논문. 22쪽.
- 우원식(1996) 천연물 화학연구법. 서울대학교 출판부. 437쪽.
- 윤준현, 김정규, 임수길(1995) 참나무과 식물로부터의 Allelochemicals 검색.
- 이춘우, 김용욱, 윤의병(1997) 벚꽃에 함유된 생리활성 물질 탐색. 한국잡초학회지 17(4): 375-381.
- 전재철, 한강완, 장병춘, 신현승(1987) 발 주요 잡초종의 Allelopathy 작용성 탐색. 한국잡초학회지 7(2): 156-164.
- 전재희(1994) 페놀 화합물질이 수종 식물의 종자발아와 유근생장에 미치는 Allelopathy 효과. 건국대학교 대학원 석사학위 논문. 37쪽.
- Chung, S. T. and R. P. Alan(1986) The Science of Allelopathy. A Willey-interscience publication. USA. 317pp.
- Chou, C. H., C. H. Chang and F. A. Einhellig(1995) Allelopathy-organism-process applications. American Chemical Society. ref. 211-223.
- Fisher, R. F., R. A. Woods and M. R. Glavicic(1978) Allelopathic effect of golden rod and aster on young sugar maple. Can. J. For. Res. 8(1): 1-9.
- Heisey, R. M.(1996) Identification of an allelopathic compound from *Allianthus altissima* and characterization of its herbicidal activity. American, J. Bot. 83(2): 192-200.
- Jameson, D. A.(1961) Growth inhibitor in native plants of northern Arizona. Res. Note. 61. Rocky M. For. Range Exp. Stn. USDA.
- Jobidon, R.(1996) Allelopathic potential of Coniferous species to old-field in Eastern Quebec. Forest Science 32(1): 112-118.
- Jose, S and A. R. Gillespie(1998) Allelopathy in black walnut(*Juglan nigra*) Alley Cropping I. Plant and Soil. 203(2): 191-197.
- Kohli, R. K., D. R. Batish and H. P. Singh(1997) Allelopathy and its implication in agroecosystem, J. Crop. Prod. 1: 169-202.
- Macias, F. A.(1997) Bioactive flavonoids from *Helinthus annuus cultivars*. Phytochemistry 45(4): 683-687.
- Manikandan, M. M., M. Jayakumar and B. S. Kil(1998) The Bioefficacy of Methanol Crude Leaf Extracts of *Acacia melanoxylon*. J. Ecol. 261(6): 805-808.
- McPherson, J. K., and G. L. Thompson(1972) Competitive and allelopathic suppression of understory by Oklahoma oak forest. Bull. Torrey Bot. Club 99: 56-59.
- Nishimura, H., J. Mizutani and F. A. Einhellig(1995) Identification and allelochemicals in *Eucalyptus Citriodora* and *Polygonum sachalinense*. American chemical Society. 26ref: 74-85.
- Pellissier, F.(1994) Effect of phenolic compounds in humus on the natural regeneration of spruce. Phytochemistry 36: 865-867.
- Rice, E. L.(1984) Allelopathy(2nd. ed.). Academic Press, Inc., Orlando, Florida. 422pp.
- Samiayyan, K. and B. Chandrasekharan(1995) Efficacy of botanicals against rice thrips in nursery. Madras. J. Agricultural. 82: 6-8, 497-498.
- Sauvesty, A., F. Page, and J. Huot(1992) A simple method for extracting plant phenolic compounds. Can. J. For. Res. 22: 654-659.
- Whittaker, R. H. and P. P. Feeny(1971) Allelochemicals - Chemical interactions between species - Sci. 171: 757-770.
- Zackrisson, O. and M. C. Nilson(1992) Allelopathic effect by *Empetrium hemaphroditum* on seed germination of two boreal tree species. Can. J. For. Res. 22: 1310-1319.

Appendix 1. Expected flavone structure of *Vitex negundo* var. *incisa* leaves when treated with Shift at UV spectrum analysis



Appendix 2. Expected structure of the final inhibiting germination compound extracted from *Vitex negundo* var. *incisa* leaves

