

쪽 선발계통의 생육특성 및 색소함량 차이

김성주* · 허복구** · 김관수*[†]

*목포대학교 자연과학대학 한약자원학과, **나주시천연염색문화재단

Differences of Growth Characteristics and Colorant Level in Two Breeding Lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross

Seong-Ju Kim*, Buk-Gu Heo**, and Kwan-Su Kim*[†]

*Department of Oriental Medicine Resources, College of Natural Science, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

**Naju Foundation of Natural Dyeing Culture, Naju 520-931, Korea

ABSTRACT Indigo crop, *Persicaria tinctoria* H. Gross is an annual plant containing natural colorant, the blue dye indigo, and local cultivars had been cultivated to produce natural indigo for textile dyeing in Korea since ancient times. Naju No. 2 is a new mass-selected line from the mother population, Naju Local cultivar. In this study, two breeding lines of Naju Local and Naju No. 2, have been cultivated in four different locations, the South regions of Korea, to compare plant growth and yield characteristics between two lines. Naju No. 2 was higher in plant height, and Naju Local has more 1st branches. Naju No. 2 has larger leaf area and higher width/length ratio of leaf, showing the round leaf type as morphological stable character without regional differences. Though there was considerable regional variation in fresh and dry top weight of harvested plant, the significant difference of plant weight between two lines were not shown. The ratio of leaf to total shoot of dry weight of Naju No. 2 was higher than one of Naju Local, indicating that Naju No. 2 has better yielding of colorant which is synthesized mostly in leaf. Naju No. 2 contained more Niram (crude indigo extract) and indigo, and showed much blueness at dyeing of silk using fresh leaves than Naju Local. We concluded that a new line, Naju No. 2 could be a superior cultivar due to having higher leaf yield and better quality of natural colorant than Naju local cultivar.

Keywords : *Persicaria tinctoria* H. Gross, indigo crop, growth characteristics, natural colorant, breeding lines

천연 청색염료성분인 인디고(indigo)를 생산하는 식물에는 인도, 아프리카 등 열대지방에서 재배하는 콩과 목본

식물인 인도쪽나무(*Indigofera* spp.), 한국, 중국, 일본 등에서 재배하는 마디풀과(Polygonaceae) 일년생 초본식물인 쪽(*Persicaria tinctoria* H. Gross), 그리고 유럽지역에서 주로 생산하는 월년생 초본식물인 대청(*Isatis tinctoria* L.)이 있다(John & Angelini, 2009).

쪽을 발효시킨 후 석회를 넣어 저어주면 남색의 거품이 일어나는데, 이것을 걷어 햇볕에서 말린 것을 청대(靑黛)라 하여 생약으로 이용하기도 하며, 이와 같이 쪽 식물의 경엽으로부터 천연 남색색소를 추출한 니람(泥藍)으로 보관하면서 다시 환원시켜 염료로 사용한다(John & Angelini, 2009; Shin 2010). 쪽의 생잎 중에는 색소 성분인 인디고(indigo)가 함유되어 있지 않고, 인디고로 변화될 수 있는 전구체인 인디칸(indican)으로 존재하고 있다. 인디칸은 수용성인 글루코스(glucose) 화합물로서 수용액 중에서 가수분해가 되면 글루코스와 무색의 인독실(indoxyl)의 두 가지 성분으로 분해된다. 이 인독실 상태로 섬유와 결합된 후 공기 중의 산소에 의하여 산화가 되면 인디고로 변화가 되어 염색이 되는 것으로 알려져 있다(Minagawa *et al.*, 1980; Minami 2001). 쪽은 염료이외에도 차, 화장품, 비누, 건강식품, 생약 등으로 이용되기도 하며(Seo 2008; Shin 2010) 쪽은 다른 천연 염료에 비해 우수한 견뢰도를 지닐 뿐만 아니라(Crews 1987) 항균성, 항암성 등의 생리활성을 가지고 있다(Han & Choi, 2000; Lin *et al.*, 2009; Seo 2008).

국내에서 쪽은 전라남도 나주와 보성지역을 중심으로 재래종이 재배되고 있는데, 이 재래종들은 오래전에 일본이나 중국으로부터 도입되어 오던 것으로 형태적으로 차이가 있다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-450-2661 (E-mail) kskim@mokpo.ac.kr

<Received 11 February, 2012; Revised 17 August, 2012; Accepted 22 August, 2012>

재래종들을 형태적으로 크게 구분하면 잎의 모양이 장타원형이면서 잎끝이 뾰족한 형태와 타원형이면서 잎끝이 둥근 형태로 구분할 수 있고 일본쪽과 조선쪽이라 불리기도 한다 (John & Angelini, 2009). 각 지역별로 재배방법도 다른데, 주로 논이나 밭에서 이식재배를 하지만 비닐피복을 하기도 하며 주로 7-8월 개화 전에 생엽을 수확하여 니람을 추출하여 염색에 사용하고 있다.

국내에서 재배되고 있지만 재배기술에 대한 연구결과는 미흡한 실정이며, 유럽에서 주로 재배되는 십자화과(Cruciferae)에 속하는 월년생 염료식물인 대청(*Isatis tinctoria* L.)이나 쪽을 대상으로 경엽 수량 및 인디고 수율에 대한 환경요인분석, 재배방법, 그리고 인디고 전구물질의 시기별 변화 등에 대한 연구결과가 보고되고 있다(Angelini *et al.*, 2004, Sales *et al.*, 2006; Campeol *et al.*, 2006). 그리고 대청 근연종(*Isatis indigotica* Fort.)이 대청보다 인디고 전구물질 생산성이 높지만 엽 수량은 적다는 보고도 있다(Angelini *et al.*, 2007). 국내에서 쪽 조직배양이나 모상근 배양을 통한 인디고 생합성관련 연구도 있지만(Shim *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006) 재배나 육종관련 연구결과는 매우 적은 편이었다.

본 시험에서는 나주지역 재래종과 이 모집단으로부터 집단선발하여 육성한 계통인 나주2호의 생육특성 및 색소함량을 조사 비교하여 경엽 생산성이 높고 색소추출 효율성이 높은 우수계통을 선발하고자 전남 나주 등 4개 지역에서 재배시험을 수행한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

선발계통 특성

시험에 이용한 나주재래종은 분지가 많으며 장타원형이면서 잎끝이 뾰족한 형태의 잎 특성을 가지고 있으며 나주지역에서 주로 재배되고 있는 재래종 집단이다. 나주2호는 나주지역에서 나주재래종을 모집단으로 하여 2001년부터 타원형이면서 잎끝이 둥근모양의 잎을 가지며 엽육이 두껍고 녹색이 진하여 분지가 적고 다소 직립형의 특성을 갖는 개체들을 집단채종하여 엽형을 중심으로 집단선발 및 특성을 유지해온 계통(PT02)이다. 한편 둥근 모양의 잎 형태를 가지는 보성재래종 집단과는 형태적으로는 비슷하나 개화기가 늦고, 종자발아율이 높고 종자 탈립이 잘되지 않는 특성 등에서 다르며 유전분석(RAPD)에서도 차이를 보였다(자료 미제시).

재배방법 및 생육특성 조사

발아율은 페트리디쉬에 쪽 종자를 50립씩 넣은 후 종자

소독 후 20/25°C(8/16 hrs) 발아상에 치상하여 15일째 최종 발아율을 조사하였다.

나주재래종과 나주2호 종자를 준비하고 4월 25일경에 파종 및 육묘한 쪽 묘를 6월 4일경에 전북 전주, 전남 보성, 나주, 무안에 이식 재배 후 개화시인 9월 1일경에 생육특성 조사를 하였으며 수확 후 색소 함량, 염색성 등의 특성 분석을 하였다. 시험에 사용한 두 계통의 개화기는 9월 10일 경이었으며 8월 중하순부터 개화되는 개체가 나타나기 시작하였다. 보통 개화 전에 수확하는 것이 색소수량이 높은 것으로 알려져 있다.

생육조사 항목은 종자 발아율과 초장, 엽면적, 엽장폭비, 지상부의 생중 및 건중, 1차 분지수, 엽중비율 등이었는데 엽장폭비는 잎의 길이에 대한 너비의 비율로 엽형(둥근잎과 뾰족한잎)의 상대적 척도이며 엽중비율은 지상부 경엽 전체에 대한 줄기를 제외한 잎만의 무게 비율이다. 일반적으로 지상부 전체를 수확하여 색소를 추출하는데, 색소는 주로 잎에 함유되어 있으므로 엽중비율이 높다는 것은 색소 추출효율과 수율이 높다는 의미로 판단할 수 있다.

파종은 105구 육묘포트를 사용하였으며 구당 1개체씩 육묘 후 주간 40 cm 조간 20 cm로 이식 재배하였으며 시험구는 3반복으로 수행하였다. 보성지역에서는 관행방법인 주간 85 cm, 조간 15 cm로 이식 재배하였다. 시료 채취는 개체를 전정가위나 낫으로 지상부를 수확한 후 흙을 털고 마대자루에 넣어 무게를 측정하였다. 초장은 지표면으로부터 총 지상부 길이를 자를 이용하여 반복당 5개체를 측정하였다. 분지수는 개체 당 총 분지수를 1차 분지까지 반복당 5개체를 측정하였다. 장폭비는 지상부 정단부위로부터 3-4번째 마디의 엽을 채취하여 잎 너비에 대한 길이의 비로 반복당 5개체를 측정하였다. 지상부 경엽의 생중은 지상부를 반복 당 10개체를 수확하여 마대자루에 넣은 후 무게를 측정하였다. 건중은 생중을 측정 후 건조기에 넣어 55°C로 48시간 정도 건조한 후 측정하였다. 엽중비율은 잎을 줄기와 분리한 후 지상부 건물중 전체에 대한 분리된 잎의 무게 비율로 하였다. 엽면적(cm²)은 (길이 × 너비)/2로 계산하였다. 생육특성들은 4개 지역을 조사하여 각 지역별로 또는 두 계통을 서로 비교하였다. 재배지역 중 보성, 무안, 전주에서는 피복재배를 하였고 나주지역에서는 피복재배를 하지 않았다.

색소분석 및 통계처리

염색성 비교를 위해서 실크를 이용하여 생엽 염색을 한 후 색차를 측정하였다. 니람은 생잎을 증류수로 1일 추출 후 석회 첨가하여 침전된 니람 건조무게를 측정하였다. 인디고 함량분석은 추출된 니람을 DMSO(dimethyl sulfoxide)

Table 1. Germination rate of two lines, Naju local cultivar and Naju No. 2 of *Persicaria tinctoria* H. Gross.

Lines	Naju Local	Naju No. 2
Germination rate (%)	84.0 ± 9.2	82.7 ± 4.2

용매로 녹여 추출액을 만들어 UV 619 nm에서 인디고 표준액과 비교하여 정량하였다. 염색성과 색소분석 시험은 무안에서 생산된 재료를 이용하였다.

모든 자료의 통계분석은 t-검정을 수행하여 나주재래종과 나주2호 두 계통의 평균간 비교를 하였다.

결과 및 고찰

발아특성

나주재래종과 나주2호의 발아율을 보면(Table 1) 나주재래종이 나주2호보다 발아율이 높았지만 두 계통 모두 80% 이상의 발아율을 나타내 두 계통 모두 파종 및 육묘재배를 위한 발아에는 문제는 없는 것으로 나타났다. 쪽 종자의 과피는 식물분류학적으로는 화피인데, 화피를 제거한 종자와 제거하지 않은 종자의 발아율은 서로 차이가 없었으며 종자의 천립중은 2.69 g 정도로 나타났다.

지상부 생육특성

나주재래종과 나주2호의 지상부 생육특성을 비교한 결과는 Table 2와 같이 나주재래종 보다 나주2호의 초장이 비교적 더 큰 것으로 나타났다. 쪽은 잎에 청색색소인 인디고성분이 함유되어 있으므로 엽면적이 클수록 재배 수확 후 염색에 이용하기가 쉬울 것이다. 엽장폭비는 엽장에 대한 엽폭의 비율로서 장폭비가 클수록 엽 너비가 큰 넓은 타원형이면서 잎끝이 둥근 형태를 띠고 있는 것으로 나주재래종과 나주2호의 중요한 형태적 구별특성이다. 나주2호의 엽장폭비가 나주재래종에 비하여 큰 것으로 나타나 나주2호가 둥근 잎을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 쪽의 1차 분지수에서는 나주재래종이 나주2호에 비해 더 많은 분지수를 가지고 있어 포복성이 비교적 강한 반면 나주2호는 분지수가 적고 직립성에 가까운 것으로 보였다.

Table 2. Characteristics of top growth in two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross.

Lines	Plant length (cm)	Leaf area (cm ²)	WL ratio of leaf (Width/Length)	No. of 1st branches
Naju Local	83.0 ± 5.7	28.2 ± 4.5	0.40 ± 0.02	34.8** ± 7.2
Naju No. 2	87.9 ± 2.9	30.7 ± 3.7	0.55** ± 0.03	23.6 ± 4.6

**p<0.01

Table 3. Yield characteristics of two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross.

Lines	Fresh weight (g/plant)	Dry weight (g/plant)	Leaf/Top ratio of dry weight
Naju Local	735.0 ± 246.7	138.5 ± 48.2	40.8 ± 0.76
Naju No. 2	737.7 ± 163.1	142.1 ± 29.7	45.6** ± 0.82

**p<0.01

나주재래종과 나주2호의 지상부 경엽의 개체당 생중, 건중 그리고 엽중비율 등 생육특성을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 나주재래종과 나주2호의 생체중은 비슷하였으나 건중에서는 나주2호가 나주재래종보다 다소 높은 것으로 조사되었다. 엽중비율은 지상부 전체에 대한 잎의 무게 비율을 나타낸 것으로 엽중비율이 클수록 인디고성분이 많이 들어 있는 쪽 잎의 무게가 더 무겁다는 것을 알 수 있는 특성으로 동일한 생육을 하였어도 생체중 대비 색소함량이 달라지는 중요한 특성이다. 나주2호가 나주재래종보다 엽중비율이 더 큰 것으로 나타나 인디고 수율이 높을 것으로 생각되었다.

재배지역별 생육특성

나주재래종과 나주2호의 지역별 재배시험은 전남 나주, 보성, 무안, 전북 전주 등 4개 지역에서 수행하여 초장, 엽장폭비, 개체당 생체중과 건물중을 비교하였다. 두 계통의 초장을 지역별 비교한 결과는 Fig. 1과 같이 4개 지역 모두 나주2호가 나주재래종 보다 초장이 큰 경향이어서, 두 계통을 구분할 수 있는 형질로 초장을 사용할 수 있었다.

두 계통의 지역별 엽장폭비를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 장폭비는 엽폭/엽장으로 장폭비가 클수록 잎의 너비가 커진다는 것을 의미하고 1에 가까워질수록 둥근형에 가깝다는 것을 의미한다. 장폭비를 기준으로 본 결과 보성, 무안, 나주, 전주 등 모든 지역에서 나주재래종보다 나주2호에서 더 높아 타원형의 특성을 나타내었다. 따라서 잎의 형태는 지역별 차이가 없는 안정된 형질임을 확인할 수 있었다.

두 계통의 개체당 지상부 생체중을 지역별로 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 전남 보성지역에서만 나주재래종이 높았으며 나머지 모든 지역에서는 나주2호가 더 높게 나타났다.

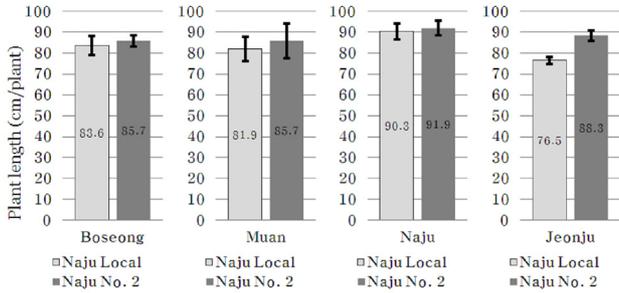


Fig. 1. Comparison of plant length between two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross cultivated in different regions.

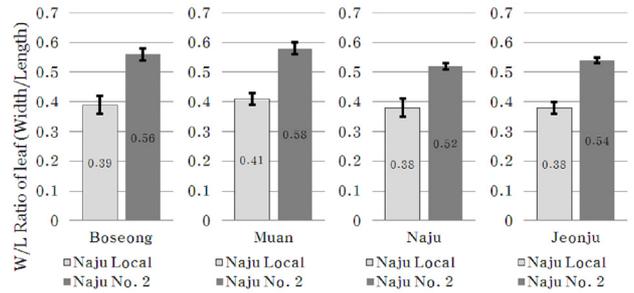


Fig. 2. Comparison of width/length ratio of leaf between two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross cultivated in different regions.

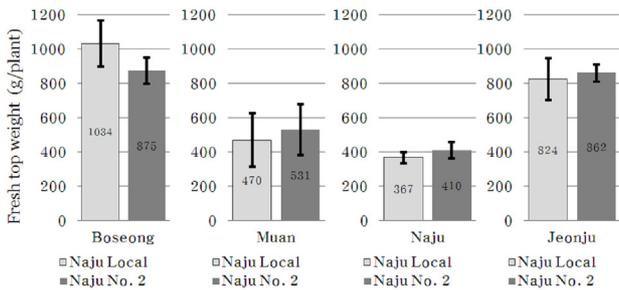


Fig. 3. Comparison of individual fresh top weight between two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross cultivated in different regions.

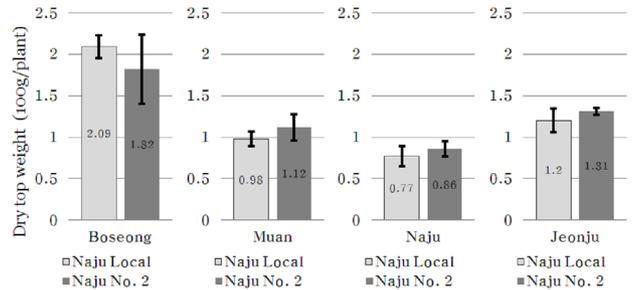


Fig. 4. Comparison of individual dry top weight between two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross cultivated in different regions.

나주지역이 다른 세지역보다 생중이 낮은 것은 보성, 무안, 전주에서는 피복재배를 하였고 나주지역은 피복재배를 하지 않았던 이유도 있으며, 전남 보성지역은 한 두둑에 한 줄로 재배를 하였고, 전남 무안과 전북 전주지역은 한 두둑에 두 줄로 심었으며, 전남 나주지역은 한 두둑에 다섯줄로 쪽을 재배하여 밀식 정도의 차이가 개체당 생체중의 차이를 가져온 것으로 생각되었다.

두 계통의 개체당 이상부 건물중을 지역간 비교한 결과는 Fig. 4와 같으며 생체중 결과와 비슷한 경향을 보였다. 전남 보성지역은 나주재래종이 나주2호보다 다소 높았으나, 나머지 지역인 무안, 나주, 전주에서는 나주2호가 더 높은 개체당 건물중을 보여 지역간 차이가 큰 경향이였다. 그러나 각 지역에서의 두 계통, 나주재래와 나주2호의 차이는 크지 않았다. 개체당 건물중의 지역간 차이가 큰 이유는 각 지역의 재배 방법이 달라 재식밀도의 차이와 두둑넓이, 피복여부 등이라 할 수 있다. 무안과 전주의 경우 이랑 1.2 m에 두줄로 조간 40 cm 주간 20 cm로 재식하였으며 나주의 경우 2.0 m 두둑에 5 줄로 조간 40 cm 주간 20 cm로 재식한 반면, 보성의 경우 두둑 85 cm에 한줄로 조간 15 cm로 재식하여 보성에서 가장 소식을 하였고 나주에서 가장 밀식을 하였다. 나주지역은 무피복재배를 하였으며 나머지 지역은 피복재배

를 하였으며 생육중기(분얼이 왕성할 때로 7월정도)에 비닐을 벗겨 분지 발생에 영향을 적게 주도록 하였다. 이러한 재식밀도의 차이나 피복여부가 지역간 차이를 가져왔으며 단위면적당 수량은 보성과 전주에서는 높았고 무안과 나주에서는 상대적으로 낮았다. 추후 재식밀도 또는 피복재배여부에 따른 수량차이를 알아볼 필요가 있으며 재배방법에 따른 수량차이가 있을 것으로 생각되었다.

색소특성

두 계통의 니람(泥藍)과 인디고(indigo) 함량을 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 쪽을 수확한 후 니람을 추출하여 니람의 양을 비교하고 추출니람을 용매로 녹여 인디고 성분함량을 측정하였다. 생잎 100 g에 대한 니람의 함량은 나주재래종은 1.92 g이며, 나주2호는 2.02 g으로 나타나(Fig. 5, A) 나주2호가 나주재래종에 비하여 많은 양의 니람을 추출할 수가 있었다. 추출된 니람에 함유된 인디고 함량을 측정한 결과 생잎 100 g에 대한 인디고의 함량은 나주재래종은 15.89 mg이며, 나주2호는 22.43 mg이 추출되었다(Fig. 5, B). 쪽의 니람과 인디고 함량은 나주2호가 나주재래종에 비하여 더 높게 나타나 색소수율은 나주2호가 더 높은 것으로 나타났다. 두 계통의 잎을 이용하여 각각 실크로 생쪽 염색을 하여

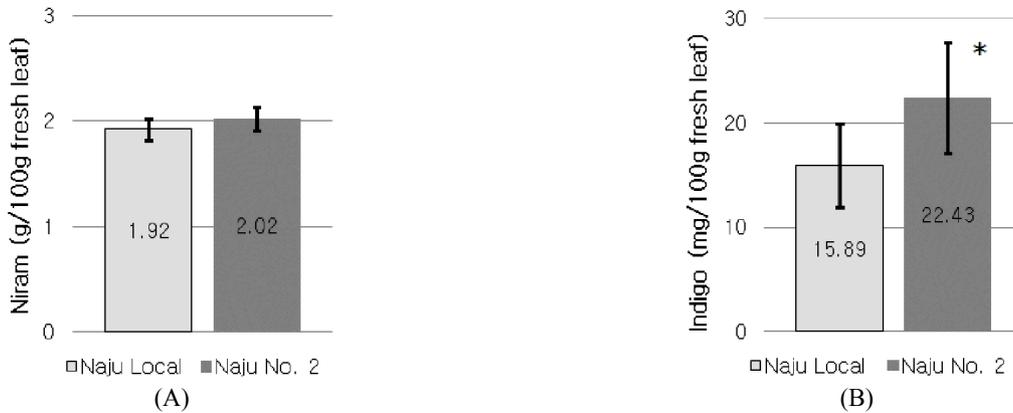


Fig. 5. Contents of Niram, crude indigo extract (A) and indigo (B) extracted from two lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross. * $p < 0.05$

Table 4. Dyeability of silk by natural indigo from fresh leaves of two lines in *Persicaria tinctoria* H. Gross.

Lines	L	a	b
Naju Local	47.9 ± 1.9	-6.83 ± 0.81	-17.2 ± 0.46
Naju No. 2	48.1 ± 1.9	-5.17 ± 0.76	-19.2** ± 0.44

* $p < 0.05$

색 차이를 비교한 결과는 Table 4와 같다. 색차에서 명도를 나타내는 L(Lightness)의 차이는 거의 없었으나 나주2호가 약간 더 높았으며, a 값은 적색과 녹색을 나타내는데 나주재래종이 더 녹색에 가까우며, b 값은 황색과 청색을 나타내며 음(-)의 값이 클수록 청색에 가까운데 나주2호가 음의 값이 더 크기 때문에 나주2호가 나주재래종 보다 더 청색에 가까운 염색을 할 수 있는 것으로 생각되었다.

두 가지 계통, 나주재래종과 선발 육성된 나주2호에 대한 생육특성 및 색소함량을 비교한 결과, 나주2호가 초장이 다소 크고 분지수가 적은 편이며 엽중비율이 높아 색소수율면에서 유리했으며 니람이나 인디고 함량이 높았고 실크염색에서 염색성이 더 우수한 것으로 나타났다. 앞으로 나주2호에 대한 재식밀도, 시비량, 수확방법 등 표준재배기술에 대한 연구가 보강될 필요가 있다고 생각되었다.

적 요

나주재래종과 새로이 선발된 나주2호의 지역별 재배시험 결과, 초장은 나주2호가 다소 컸으며, 분지수는 나주재래종이 나주2호 보다 많은 경향이였다. 엽면적은 나주2호가 더 넓었으며, 엽장폭비도 나주2호가 더 크게 나타나 등근 잎 특성의 안정성을 보였다. 두 계통의 지상부 생중과 건중은 큰

차이가 없었으나, 지상부 전체에 대한 엽의 무게 비율은 나주2호가 더 높아 색소수율면에서 유리하였다. 인디고(indigo) 성분과 니람(泥藍) 함량은 나주2호가 나주재래종 보다 높게 나타났으며 실크로 생업 이용 염색을 한 결과 청색을 더 많이 나타냈다. 따라서 엽 수량이 높고 색소 품질이 좋은 나주2호가 쪽 재배에 유리한 계통으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 농림바이오기술산업화지원사업 “인디고/인디루빈 생산작물 산업화 연구사업단(810003-03-1-SB110)”의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과와 일부이며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Angelini, L. G., S. Tozzi, and N. N. Nasso. 2004. Environmental factors affecting productivity, indican content, and indigo yield in *Polygonum tinctorium* Ait. a subtropical crop grown under temperate conditions. *J. Agric. Food Chem.* 52(25) : 7541-7547.
- Angelini, L. G., S. Tozzi, and N. N. Nasso. 2007. Differences in leaf yield and indigo precursors production in woad (*Isatis tinctoria* L.) and Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.) geno-types. *Field Crops Res.* 101(3) : 285-295.
- Campeol, E., L. G. Angelini, S. Tozzi, and M. Bertolacci. 2006. Seasonal variation of indigo precursors in *Isatis tinctoria* L. and *Polygonum tinctorium* Ait. as affected by water deficit. *Environ. Exp. Botany* 58 : 223-233.
- Crews, P. C. 1987. The fading rates of some natural dyes. *Studies in Conservation* 32(2) : 65-72.
- Han, S. Y. and S. C. Choi. 2000. A study on the physiological

- effects and dyeing properties of the extract of fermented indigo (Part II). J. Kor. Soc. of Clothing and Textiles 24(1) : 96-104.
- John, P. and L. G. Angelini. 2009. Indigo-Agricultural Aspects, In : T. Bechtold & R. Mussak (eds.), Chap. 7, Handbook of Natural Colorants, Wiley, UK, pp. 75-104.
- Kim, J. N., H. G. Jang, S. U. Park, and H. W. Ryu. 2006. Effect of polyamines on indigo biosynthesis in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. Kor. J. Crop Sci. 51(S) : 247-250.
- Lin, Y. K., Y. L. Leu, T. H. Huang, Y. H. Wu, P. J. Chung, J. H. S. Pang, and T. L. Hwang. 2009. Anti-inflammatory effects of the extract of indigo naturalis in human neutrophils. J. Ethnopharm. 125(1) : 51-58.
- Minagawa, M., Y. Yoshida, and K. Matsumoto. 1980. Studies on the dyeing of silk (Part X) - Dyeing affinity of silk by natural indigo. Reports of the Science of Living 28 : 87-99.
- Minami, Y. 2001. Indican metabolism in *Polygonum tinctorium*. Recent Res. Dev. Plant Biol. 1 : 155-162.
- Sales, E., R. Kanhonou, C. Baixauli, A. Giner, D. Cooke, K. Gilbert, I. Arrillaga, J. Segura, and R. Ros. 2006. Sowing date, transplanting, plant density and nitrogen fertilization affect indigo production from *Isatis* species in a Mediterranean region of Spain. Ind. Crop. Prod. 23 : 29-39.
- Seo, H. S. 2008. The experimental study on anti-inflammation and anti-oxidation of Indigo Naturalis and Rehmanniae Radix. J. of Kor. Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 21(3) : 104-110.
- Shim, J. Y., Y. J. Chang, and S. U. Kim. 1998. Indigo and indirubin derivatives from indoles in *Polygonum tinctorium* tissue cultures. Biotechnol. Lett. 20(12) : 1139-1143.
- Shin, Y. J. 2010. An experimental study on the dyeability of Indigo and Indigo Pulberata Levis. J. Kor. Fashion & Costume Design Association 12(4) : 149-157.