

Increased Abiotic Stress Tolerance by Over-expressing *OsABF2* in Transgenic *Arabidopsis thaliana*

Phun Bum Park*

Department of Bioscience and Biotechnology, University of Suwon, Kyonggi-do 445-743, Korea

Received September 18, 2012 / Revised November 2, 2012 / Accepted November 9, 2012

The phytohormone abscisic acid (ABA) plays an important role in the adaptive response of plants to abiotic stresses. ABA also regulates many important processes, including seed dormancy, germination, inhibition of cell division, and stomatal closure. *OsABF2* (*Oryza sativa* ABRE binding factor2) is one of the bZIP type transcription factors, which are involved in abiotic stress response and ABA signaling in rice. Expression of *OsABF2* is induced by ABA and various stress treatments. Findings show that survival rates of *OsABF2* over-expressing *Arabidopsis* lines were increased under drought, salt, and heat stress conditions. The germination ratio of *OsABF2* over-expressing *Arabidopsis* lines was decreased in the presence of ABA. Results indicate that *OsABF2* over-expressing *Arabidopsis* lines have enhanced abiotic stress tolerance and have increased ABA sensitivity.

Key words : *OsABF2*, abiotic stress, abscisic acid, bZIP type transcription factor, gene regulation

서 론

식물은 움직이지 못하는 고착생물이기 때문에 식물체는 스트레스에 반응하고 적응할 수 있는 수용능력을 진화시켜 왔다. 식물이 받을 수 있는 스트레스는 크게 생물학적 스트레스와 비생물학적 스트레스 두 가지로 나눌 수 있다. 생물학적 스트레스는 다른 생명체에 의한 스트레스를 말하며, 그 이외의 가뭄(drought), 염분(salinity), 고온(heat), 저온(cold), 과도한 빛(excess light), 중금속(heavy metal), 오존(ozone), UV (ultra-violet radiation), 저산소(hypoxia), 영양소 결핍(nutrient deficiency) 등이 비생물학적 스트레스의 요인으로 언급이 되고 있다[3,29,30]. 특히, 가뭄이나 염분에 의한 스트레스는 식물에 삼투 스트레스(osmotic stress)로 작용하는데 이는 식물의 생장과 발달에 영향을 주어 작물의 경우에는 생산성에 큰 영향을 미친다[2,47]. 최근에는 생물학적 스트레스보다 더 광범위하고 피해가 심각한 비생물학적 스트레스에 많은 관심이 집중되고 있다.

가뭄이나 염분과 같은 스트레스를 받으면 식물체 내의 수분 균형이 깨지게 되지만, 삼투보호물질(osmoprotectant)인 prolin, mannitol, glycine-betain, sugar alcohol 등과 같은 저분자 물질이 식물체 내에 축적되어 수분 균형을 복원한다[20,47]. 그리고 식물은 가뭄, 염분을 포함한 모든 종류의 스트레스를 받으면 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 생성이 증가한다[31]. 활성산소종은 식물에게 산화적 스트레스로 작용하게 된다. 활성산소종은 alternative oxidase (AOX)에 의해 제거가 된다. AOX는 가뭄과 빛이 조합된 스

트레스에 반응하기 위해서 필요한데, 아마도 활성산소종이 축적되는 것을 감소시킴으로써 이들 스트레스에 대항하는 것으로 사료된다[13].

식물 호르몬인 abscisic acid (ABA) 또한 비생물학적 스트레스에 대항하여 내성을 갖게 하는데 중요한 역할을 한다[49]. ABA는 식물에서 종자의 휴면과 종자의 성숙, 세포 분열의 저해, 종자 발아 등과 같은 생명 현상과 관련된 기능을 수행함과 동시에 각종 스트레스 상황에서 많은 유전자들의 발현을 조절함으로써 내성을 가질 수 있게 한다[23,24,46]. 옥수수의 종자 성숙 단계와 성장하는 조직에서 주된 역할을 하는 B3 domain-containing 전사인자인 VIVIPAROUS1 (VP1)은 염분, 삼투 스트레스를 받았을 때 발현이 증가하고, ABA에 의해서도 그 발현이 증가한다[5]. *Vp1* 돌연변이체는 내생의 ABA 수준은 정상이지만, 외부의 ABA에 대한 민감성은 감소된다[32,36]. 그 결과 정상적인 성숙단계로 들어가지 못하게 되고, 모체발아가 이루어진다[27]. 또한 ABA는 저온에서 내성을 갖는데 필요한 식물 호르몬이다[26]. ABA-deficient (*aba*) 돌연변이체와 ABA-insensitive (*abi*) 돌연변이체는 낮은 온도에서 내성을 가지지 못하였다[12,26]. 그러나 *aba* 돌연변이체에 ABA를 처리하고 저온 스트레스를 주었을 때 저온에 대한 내성이 증가하는 것을 확인되었다[26]. 이처럼 ABA는 비생물학적 스트레스에 관련된 유전자들의 발현을 조절하거나 스트레스에 적응하기 위해서 꼭 필요한 식물 호르몬이다. 비생물학적 스트레스에 반응하여 ABA 유도성 유전자들이 발현을 하는데 이 유전자들의 promoter를 분석하여 ABA-responsive elements (ABREs)로 불리는 여러 종류의 보존된 *cis*-element를 확인하였다. ABREs는 ABA signaling에 관한 가장 좋은 연구 소재 중의 하나이다[4,39]. 여러 ABREs 중 하나는 (C/T)ACGTGGC 염기 서

*Corresponding author

Tel : +82-31-220-2236, Fax : +82-31-220-2519

E-mail : pbpark@suwon.ac.kr

열을 가지고 있는 ABRE이다. 이들은 ABA 또는 스트레스에 조절되는 유전자에서 발견이 되며, G-Box (CACGTG) 염기 서열을 포함하고 있다[14]. 메밀의 DNA binding protein인 EmBP-1은 Em 유전자의 5' 조절 부분에 존재하는 Em1a element (GGACACGTGGC)와 결합을 하고, Em1a element는 G-Box 염기 서열을 포함하고 있다[15]. ABREs는 스트레스 또는 ABA에 의해 발현되는 유전자의 promoter 부근에 존재하는데, 'coupling elements'라 불리는 cis-element 들과 쌍을 이루어 ABA-responsive complex (ABRC)를 형성하면서 활성을 갖는다[4,40]. 보리에 존재하는 유전자인 HVA22와 HVA1에서 각각 coupling element의 종류인 CE1과 CE3를 찾아내었고, 이들은 각각 ABRC1과 ABRC3를 형성한다[38,39]. 또한 ABRE는 몇몇 콩과 식물의 종자에 존재하는 RY element (RY repeat sequence, CATGCATG)와 함께 작용하여 seed-specific 유전자들의 전사를 증강시킨다[10].

식물은 비생물학적 스트레스에 노출이 되면 그 상황에 적응을 하기 위하여 여러 유전자를 발현시킴으로써 생리적 변화에 돌입한다[16]. 비생물학적 스트레스를 받으면 bZIPs, zinc finger proteins, AP2/EREBPs, bHLHs, NACs과 같은 전사 인자들이 발현하여 다른 유전자들의 발현을 조절한다[6,7,35,37]. 이 중 basic leucine zipper (bZIP) 전사인자는 병원체 방어, 종자 성숙, 꽃의 발달 등과 같은 여러 생물학적 과정에 관여한다. 특히, 스트레스에 반응을 하거나 호르몬의 신호전달 경로에서 중요한 역할을 한다[19,43]. bZIP 전사인자는 α -helix 구조를 하고 있으면 DNA와 결합하는 염기성 영역과 7개의 leucine이 반복적으로 나오는 leucine zipper 부분으로 구성되어 있다. DNA와 결합하는 염기성 영역은 특정 cis-element를 인식하여 결합하고, leucine zipper 부분은 다른 단백질과 결합하는 부분으로 bZIP 전사인자가 homo- 또는 heterodimer 형태로 존재하게 된다[19]. bZIP 전사인자들은 ABRE의 ACGT 염기 서열을 인식하고 결합하여, ABA 유도성 유전자들의 전사를 활성화 시킨다. 이러한 bZIP 전사인자들을 ABRE-binding proteins (AREBs) 또는 ABRE-binding factors (ABFs)라고 명명하였고, yeast one-hybrid system을 사용하여 ABRE와 결합하는 ABF1, ABF2, ABF3, ABF4와 AREB1, AREB2, AREB3를 애기장대에서 분리하였다[8,22,34,43].

애기장대의 75개의 bZIP 전사인자를 아미노산의 유사성을 토대로 10개의 subfamily로 구분을 지었다. 그 중에 13개의 유전자로 구성된 A group에 ABFs와 AREBs가 속해있다. A group에 속하는 bZIP 전사인자들은 주로 성장하는 조직에서 ABA 또는 스트레스 신호전달에 관련된 역할을 한다[19]. 애기장대뿐만 아니라 벼에서도 많은 bZIP 전사인자들이 존재한다. 89개의 벼에 존재하는 bZIP 전사인자들을 아미노산 서열과 이 전사인자들이 결합하는 DNA motif를 근간으로 I~XI까지 열 한 개의 group으로 나누었다[33]. 이 중에서 14개의 bZIP 전사인자로 구성된 VI group에 ABFs가 포함되어 있다. 이

group에 포함된 전사인자들은 bZIP 단백질의 염기성 영역의 아미노산들이 잘 보존 되어있고, ABREs와 결합을 한다[33]. bZIP 전사인자인 ABFs와 AREBs들은 각종 스트레스 상황에서 식물이 내성을 증가시키기 위하여 필요한 전사인자이다. 이들은 스트레스 유도성 또는 ABA 유도성 유전자들의 promoter 부근에 있는 cis-element를 인식하고 결합하여 그 유전자들의 발현을 증가시켜 결국 식물이 스트레스에 내성을 갖게 되는 것이다[8,43]. bZIP 전사인자를 과발현 시킨 여러 식물체에서 비생물학적 스트레스에 대한 내성을 확인하였다. 벼에 존재하는 bZIP 전사인자인 OsbZIP23를 과발현하면 가뭄/염분 스트레스에 대한 내성이 증가하고, OsbZIP72가 과발현이 되면 가뭄 스트레스에 대한 내성이 증가 된다[25,45]. ABF3가 과발현된 애기장대는 저온, 고온, 산화적 스트레스 상태에서 야생형 애기장대와 생존율을 비교함으로써 여러 종류의 비생물학적 스트레스에 대한 내성이 동시에 증가하는 것을 확인하였고, 탱자나무에서 분리한 bZIP 전사인자인 ABF를 과발현 시킨 담배에서는 탈수 상태와 가뭄 상태에서 내성이 증가하는 것을 확인하였다[18,21]. 또한 AREB1, AREB2, 그리고 ABF3는 가뭄 스트레스에 대한 내성에 관련된 ABRE 의존적인 ABA 신호전달을 조절하는 주된 전사인자이며, 완전한 활성을 가지기 위해서는 ABA가 필요하다는 사실이 밝혀 졌다[48].

식물이 스트레스를 받으면 ABA 의존적 신호전달 경로와 ABA 비의존적 신호전달 경로를 통해 내성을 보이게 된다[41]. 먼저 식물이 ABA 의존적 신호전달경로로 돌입하면 MYC/MYB, AREB/ABF 등과 같은 전사인자들이 스트레스 내성에 관여하는 유전자인 *RD22*, *RD29B*의 promoter 부근의 cis-element와 결합하고, 이들 유전자의 발현을 증가 시킨다[1, 11]. 반면 ABA 비의존적 신호 전달 경로로 진입하게 되면 ICE1, DREBs/CBF, ZF-HD/NAC 등과 같은 전사인자들에 의해 ERD1, RD29A의 발현이 증가되어 내성을 가질 수 있게 된다[28,42].

최근 연구에서 *OsABF1*과 *OsABF2* 유전자의 발현이 각종 비생물학적 스트레스 상황에서 증가하는 것을 확인하였고, T-DNA가 삽입되어 유전자의 기능이 상실된 *Osabf1*과 *Osabf2* 돌연변이체에 각종 비생물학적 스트레스를 처리하여 표현형을 관찰한 결과, 두 유전자는 벼에서 스트레스에 대한 내성 증가와 ABA 신호전달 과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다[16,17]. 본 연구에서는 단자엽 식물의 모델 식물인 벼에 존재하는 bZIP 전사인자인 OsABF2가 스트레스 상황에서 갖는 기능이 다른 종에서도 유효한지를 확인하기 위하여, 쌍자엽식물의 모델 식물인 애기장대에 *OsABF2* 유전자를 *Agrobacterium*의 binary vector system을 이용하여 삽입시킨 후 homozygous line을 선별하고, 가뭄/염분/고온 스트레스를 처리하고 야생형과 생존율을 비교하여 내성을 측정하였다. 또한 종자의 발아 단계에서 ABA에 대한 sensitivity를 측정하기 위하여 *OsABF2* 형질전환체와 야생형 애기장대의 종자를

ABA가 포함 된 배지에 치상하여 발아율을 측정하였다.

재료 및 방법

식물재료

애기장대(*Arabidopsis thaliana* ecotype *Landsberg erecta*)를 토양에서 혹은 GM배지에서 배양하였다. 배양 조건은 22°C이고 장일상태(16 hr light/8 hr dark)를 유지하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

며 유식물과 형질전환된 애기장대에서 RNA를 분리하기 위해서 조직을 Grinding Mixer Mill MM301 (Retsch, Haan, Germany)을 사용하여 분쇄하였고 TRIZOL reagent (Gibco-BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 2 ug의 분리된 RNA와 oligo (dT) primer와 M-Mulu™ reverse transcriptase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 25 ul 되게 혼합한 후 37°C에서 overnight 반응하였다. 증폭

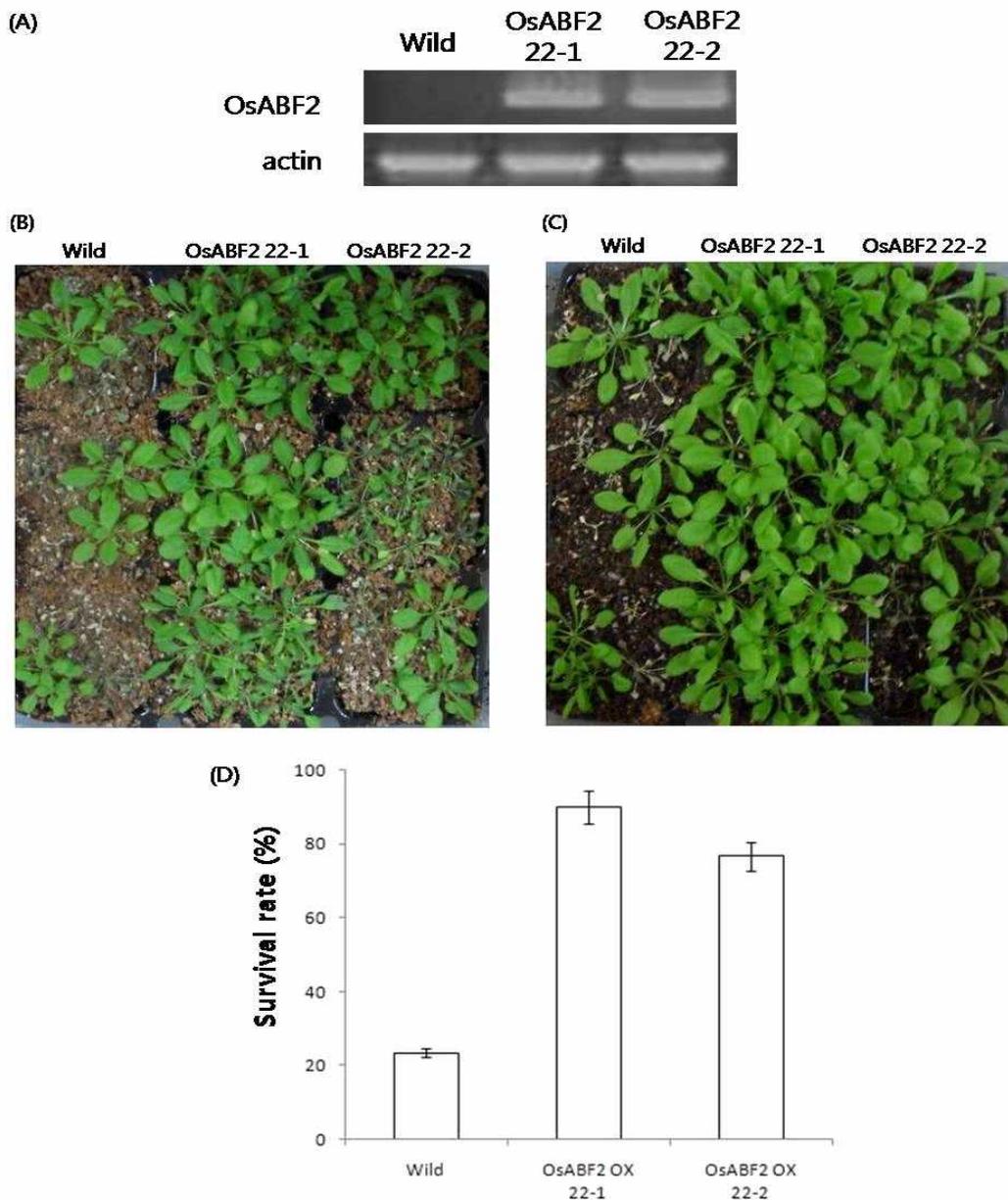


Fig. 1. Increased tolerance of *35S-OsABF2* transgenic *Arabidopsis* lines to water stress. RT-PCR analysis of the three-week-old wild type and independent *35S-OsABF2* transgenic *Arabidopsis* lines (A). Wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines were grown in the pots for three weeks under normal growth conditions. Thereafter, water was withheld for two weeks (B), followed by re-watering for 5 days (C). Survival rates of the wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines (D). The error bars indicate the standard error (triplicates, n=50 each).

반응에 사용한 유전자 특이적 primer는 5'-AAGCTTATGG AGTTGCCGCGGAGGGG-3'과 5'-GAATCCTCAGCATG GACCAGTCAGTGT-3'을 이용하였다.

35S-OsABF2제작과 애기장대 형질전환

Full-length *OsABF2*를 애기장대 형질전환 vector인 pCAMBIA1300의 HindIII site와 EcoRI site에 cloning한 후 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 freeze/thawing 방법을 이용하여 전달하였다[44]. 애기장대 형질전환은 floral dip방법을 이용하여 수행하였다[9]. 형질전환된 애기장대로부터 수확한 종자는 25 mg/l hygromycin이 포함된 GM배지에서 키워 형질전환된 식물체를 선발하였다. 자가수분을 통하여 homozygous T4 line을 선발하여 실험에 사용하였다.

비생물학적 스트레스에 대한 내성 측정

수분 스트레스는 3주 동안 화분에 키운 *Arabidopsis* 식물체에 2주 동안 수분 공급을 중단한 후 다시 물을 준 5일동안 관찰한 후 생존율을 측정하였다. 염 스트레스는 수분 스트레스 측정 시와 마찬가지로 3주 동안 화분에 키운 *Arabidopsis* 식물체에 600 mM NaCl을 7일 동안 처리 한 후 정상적인 수분 공급을 5일 동안 한 후 생존율을 측정하였다. 고온 스트레스는 GM 고체배지에서 10 일 동안 키운 애기장대를 40°C의 배양기에서 5 시간 고온 스트레스를 처리하고 다시 정상 성장조건으로 옮긴 후 5~6 일 관찰하면서 생존율을 측정하였다.

발아율 측정

35S-OsABF2 OX, 야생형 애기장대 종자를 멸균한 후 4°C 암상태에서 24 시간 동안 침종시켰다. 침종 시킨 종자들을 0.5 μM ABA가 포함된 GM 고체배지와 ABA가 포함되지 않은 GM 고체배지에 약 100개씩 치상하여 온도 23°C, 습도 70%, 빛 16 시간, 암 8 시간 조건의 식물배양기에서 7 일 동안 관찰하였다.

결 과

***OsABF2* 과발현 애기장대의 가뭄, 염, 고온에 대한 내성 측정**

3 주간 키운 *OsABF2*가 과발현된 애기장대와 야생형 애기장대에 가뭄 스트레스를 처리하고 다시 물을 준 후 각각의 애기장대의 생존율을 측정하였다. 그 결과 *OsABF2* 과발현체 22-1은 90.0%, *OsABF2* 과발현체22-2는 76.7%, 야생형 애기장대는 23.3%의 생존율을 확인하였다(Fig. 1). 마찬가지로 3 주간 키운 *OsABF2* 과발현 애기장대와 야생형 애기장대에 600 mM NaCl을 처리하여 염 스트레스를 주고 다시 물을 준 후 생존율을 측정하였다. *OsABF2 OX* 22-1은 73.3%, *OsABF2 OX* 22-2는 66.7%, 야생형 애기장대는 20.0%의 생존율을 보였다(Fig. 2). 40°C의 고온 스트레스를 처리하고 정상 조건에서 5~6 일 관찰한 결과 *OsABF2* 과발현체인 22-1은 70.0%, 22-2는 66.7%, 야생형 애기장대는 20.0%의 생존율을 보였다(Fig. 3). 이상의

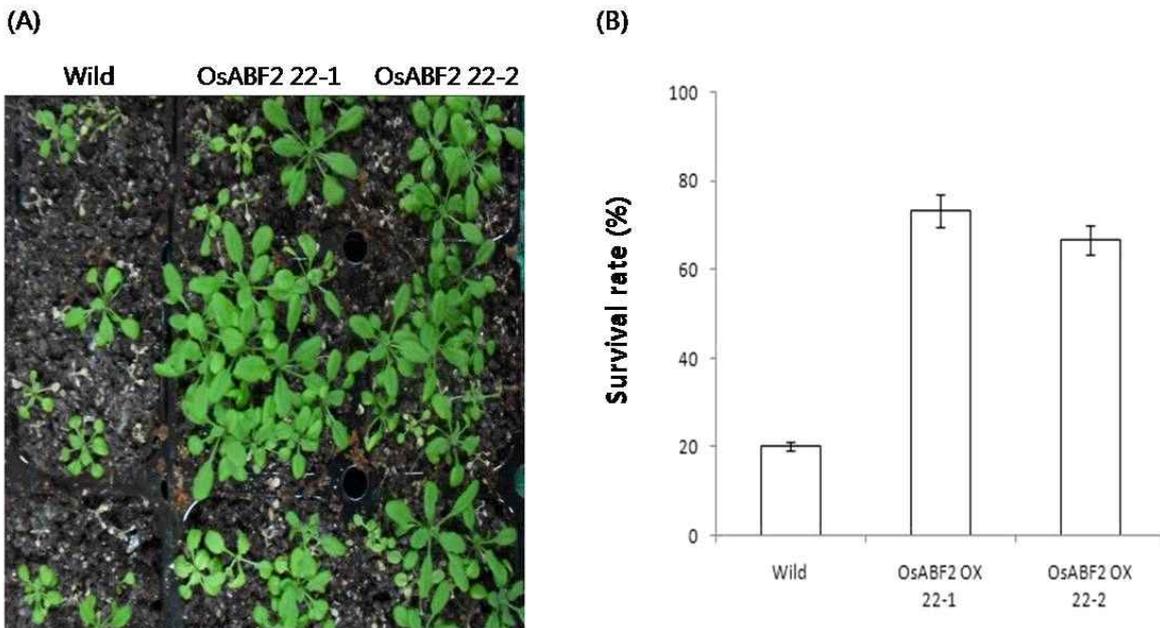


Fig. 2. Increased tolerance of *35S-OsABF2* transgenic *Arabidopsis* lines to salinity stress. Wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines were grown in the pots for three weeks under normal growth conditions. Thereafter, salinity stress (600 mM NaCl) was treated for 7 days (A). Survival rate was assayed after 5 days of the salinity stress (B). The error bars indicate the standard error (triplicates, n=50 each).

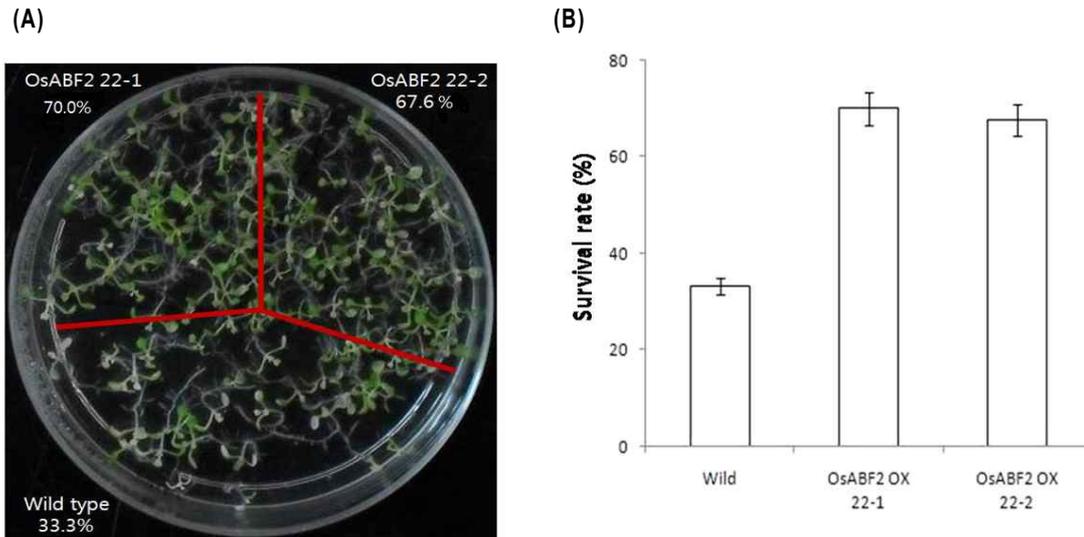


Fig. 3. Increased tolerance of *35S-OsABF2* transgenic *Arabidopsis* lines to heat stress. Wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines were grown in GM medium for 10 days under the normal growth conditions. After exposing plants to 40°C 5 hr (A), the survival rate was assayed (B). The error bars indicate the standard error (triplicates, n=100 each).

결과로 미루어 벼에 존재하는 OsABF2는 비생물학적 스트레스의 신호전달 과정에서 양성조절자로 작용하는 것이 확인되었고, 쌍자엽식물에서도 작용하는 것이 입증되었다.

OsABF2 과발현 애기장대의 발아단계에서의 ABA 감수성 측정

벼에서 *Osabf2* 돌연변이체 연구를 통하여 OsABF2가 ABA 감수성(sensitivity)에 관여한다는 사실에 입각하여[17] *OsABF2* 과발현 애기장대의 ABA 감수성을 발아단계에서 측정하였다. *OsABF2* 과발현 종자와 야생형 종자를 각각 100개씩 암상태에서 4°C 24시간 침종을 시키고 0.5 μM ABA 포함된 GM배지에 치상하였다. 식물배양기에서 9일 동안 키운 후 발아율을 측정하였다. 그 결과 야생형 애기장대는 88.0%, *OsABF222-1*은 22.5%, *OsABF2 22-2*는 27.5%의 발아율을 보였다. 반면 ABA가 포함되지 않은 GM배지에서 같은 조건으로 키운 종자들의 발아율은 90% 이상인 것을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

다양한 bZIP type의 전사인자가비생물학적 스트레스의 내성에 관여하는 것으로 밝혀진바 있다. 벼에는 총 89개의 bZIP type 전사인자가 존재하는데 이들을 아미노산 서열과 전사인자들이 결합하는 DNA motif를 근간으로 하여 I-XI까지 열 개의 group으로 분류하였다[33]. 이 중 14개의 bZIP 전사인자로 구성된 VI group에 ABFs가 포함되어 있다. 이들 ABFs는 염기성 영역의 아미노산들이 잘 보존되어 있고 *cis*-acting elements인 ABREs와 결합을 한다[33]. 이들 ABFs는 스트레스

유도성 또는 ABA 유도성 유전자들의 promoter에 존재하는 ABREs를 인식하고 결합하여 이들 유전자들의 발현을 증가시켜 결국 식물체가 스트레스에 내성을 갖게 되는 것이다[8,43]. 벼에 존재하는 ABFs 중 하나인 OsbZIP23을 벼에서 과발현하면 가뭄/염분 스트레스에 대한 내성이 증가되었고 OsbZIP72를 과발현시키면 가뭄 스트레스에 대한 내성이 증가되는 것이 보고된 바 있다[25,45]. 본 실험실에서는 이들 ABFs 중의 하나인 *OsABF1*과 *OsABF2*를 최근 분리하여 그 기능을 확인한 바 있다[16,17] 이 둘 유전자의 전사는 ABA와 각종 비 생물학적 스트레스 상황에서 증가하는 것을 확인하였고 yeast one hybrid 실험을 통하여 ABREs에 결합하는 것을 확인한 바 있다. 또한 이들 유전자에 T-DNA 삽입된 돌연변이체를 선발하여 각종 스트레스에 대한 내성을 확인하여 본 결과 가뭄과 염에 대한 내성이 감소하는 것이 확인되었다[16,17]. 또한 *Osabf2* 돌연변이체인 경우 발아단계에서 ABA에 대한 감수성이 감소하는 것으로 확인되었다[17]. 이러한 결과로 OsABF2는 비 생물학적 스트레스와 ABA 신호전달과정에 양성조절자(positive regulator)로 작용한다는 사실이 확인되었다. 본 연구에서는 벼에서 확인된 OsABF2가 스트레스 상황에서 쌍자엽식물의 model plant인 애기장대에서도 작용하는 지를 확인하기 위하여 *OsABF2* 유전자가 과발현된 애기장대 형질전환체를 제작한 후 스트레스에 대한 내성과 ABA에 대한 감수성을 확인하였다. 그 결과 가뭄, 고염, 고온 스트레스 상황에서의 내성이 현저하게 증가되는 것이 확인되었고 발아단계에서 ABA 감수성은 증가되는 것으로 확인되었다. 현재 *OsABF2* 유전자가 과발현된 벼 형질전환체를 제작 중에 있다.

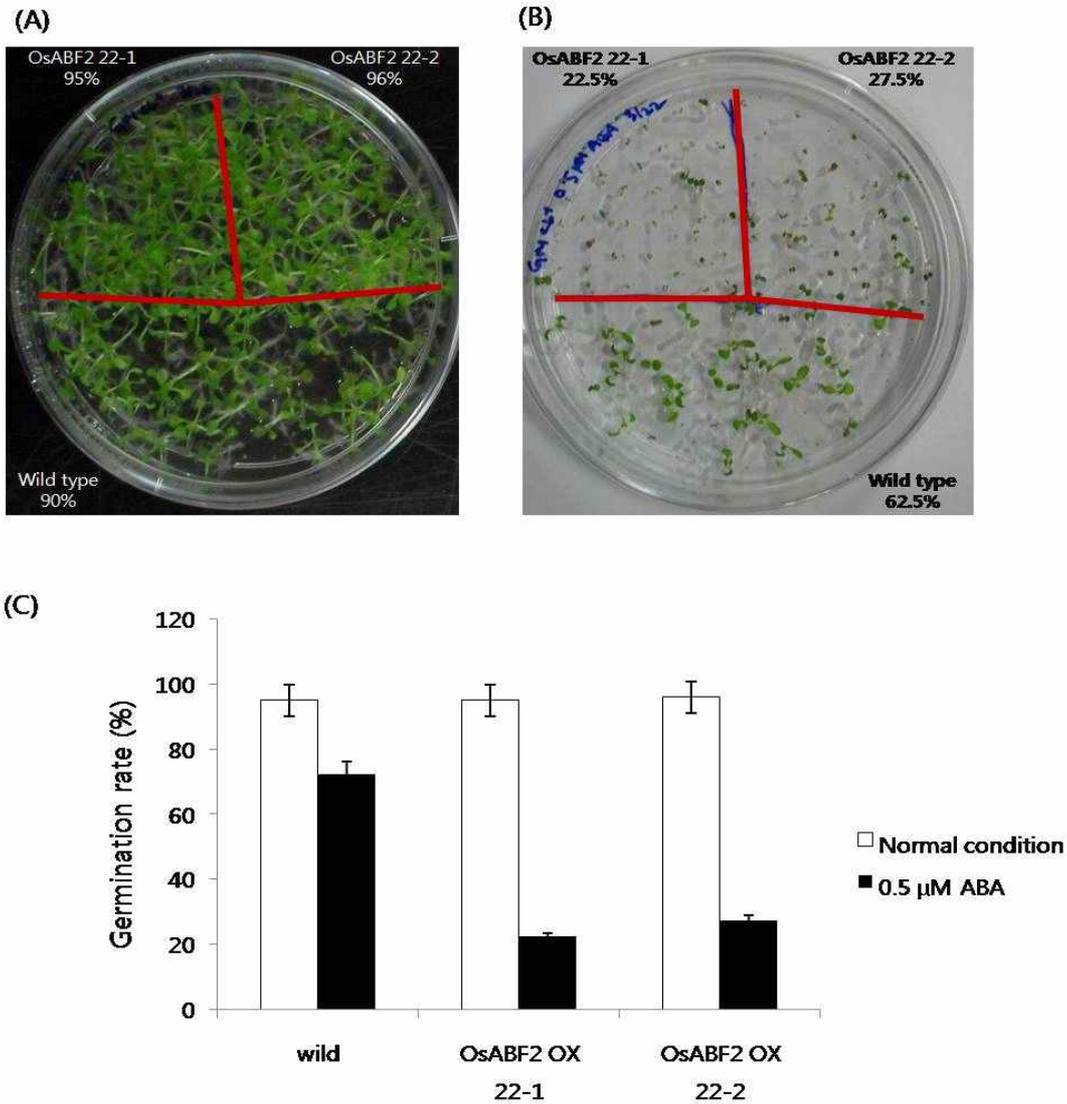


Fig. 4. ABA sensitivity of the wild type and *35S-OsABF2* transgenic *Arabidopsis* plants at germination stage. Germination performance of the wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines without ABA (A). Germination performance of the wild type and *35S-OsABF2* transgenic lines with 0.5 μM ABA (B). Germination rate corresponding to A and B (C). The error bars indicate the standard error (triplicates, n=100 each).

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기초연구사업(과제번호 2011-0000112)에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

References

1. Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868.
2. Adams, P., Thomas, J. C., Vernon, D. M., Bohnert, H. J. and Jensen, R. G. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* **33**, 1215-1223.
3. Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
4. Busk, P. K. and Pages, M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* **37**, 425-435.
5. Cao, X., Costa, L. M., Biderre-Petit, C., Kbhaya, B., Dey, N., Perez, P., McCarty, D. R., Gutierrez-Marcos, J. F. and Becraft, P. W. 2007. Abscisic acid and stress signals induce *Viviparous1* expression in seed and vegetative tissues of maize. *Plant Physiol.* **143**, 720-731.
6. Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham,

- S. A., Budworth, P. R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J. A., Harper, J. F., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dang, J. L., Wang, X. and Zhu, T. 2002. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559-574.
7. Chen, W. and Zhu, T. 2004. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 591-596.
 8. Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S. Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 1723-1730.
 9. Clough, S. J. and Bent, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** 735-743.
 10. Dickinson, C. D., Evans, R. P. and Nielsen, N. C. 1988. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids Res.* **16**, 371.
 11. Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3470-3488.
 12. Gilmour, S. J. and Thomashow, M. F. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1233-1240.
 13. Giraud, E., Ho, L. H. M., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y. F., Howell, K. A., Ivanova, A., Pogson, B. J., Millar, A. H. and Whelan, J. 2008. The absence of alternative oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* **147**, 595-610.
 14. Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P. A. and Cashmore, A. R. 1988. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7089-7093.
 15. Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R. and Quatrano, R. S. 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**, 267-271.
 16. Hossain, M. A., Lee, Y., Cho, J. I., Ahn, C. H., Lee, S. K., Jeon, J. S., Kang, H., Lee, C. H., An, G. and Park, P. B. 2010a. The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. *Plant Mol. Biol.* **72**, 557-566.
 17. Hossain, M. A., Cho, J. I., Han, M., Ahn, C. H., Jeon, J. S., An, G. and Park, P. B. 2010b. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. *J. Plant Physiol.* **167**, 1512-1520.
 18. Huang, X. S., Liu, J. H. and Chen, X. J. 2010. Overexpression of PtrABF gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biol.* **10**, 230.
 19. Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedermann, J., Kroj, T. and Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106-111.
 20. Karakas, B., Ozias-Akins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M. and Rieger, M. 1997. Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* **20**, 609-616.
 21. Kim, J. B., Kang, J. Y. and Kim, S. Y. 2004. Over-expression of a transcription factor regulating ABA responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotech. J.* **2**, 459-466.
 22. Kim, S. Y., Chung, H. J. and Thomas, T. L. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factor that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* **11**, 1237-1251.
 23. Kim, S. Y. 2007. Recent advances in ABA signaling. *J. Plant Biol.* **50**, 117-121.
 24. Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 199-222.
 25. Lu, G., Gao, C., Zhong, X. and Han, B. 2008. Identification of OsbZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice. *Planta* **229**, 605-615.
 26. Mantyla, E., Lang, V. and Palva, E. T. 1995. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 141-148.
 27. McCarty, D. R., Carson, C. B., Stinard, P. S. and Robertson, D. S. 1989. Molecular analysis of viviparous-1: an abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell* **1**, 523-532.
 28. Ming, C., Zhaoshi, X., Lanqin, X., Liancheng, L., Xianguo, C., Jianhui, D., Qiaoyan, W. and Youzhi, M. 2009. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (*Glycine max*L.). *J. Exp. Bot.* **60**, 121-135.
 29. Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **11**, 15-19.
 30. Møller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 459-481.
 31. Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant* **129**, 185-195.
 32. Neill, S. J., Horgan, R. and Rees, A. F. 1987. Seed development and vivirary in *Zea mays* L. *Planta* **171**, 358-364.
 33. Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A. K. and Khurana, J. P. 2008. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol.* **146**, 333-350.
 34. Niu, X., Renshaw-Gegg, L., Miller, L. and Guiltinan, M. J. 1999. Bipartite determinants of DNA binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol. Biol.* **41**, 1-13.
 35. Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yshiwara, K., Seki, M., Shnozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression pro-

- files of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* **133**, 1755-1767.
36. Robichaud, C. S., Wong, J. and Sussex, I. M. 1980. Control of *in vitro* growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Dev. Genet.* **1**, 325-330.
37. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full length cDNA microarray. *Plant J.* **31**, 279-292.
38. Shen, Q. and Ho, T. H. D. 1995. Functional dissection of an abscisic acid (ABA) inducible gene reveals two independent ABA responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* **7**, 295-307.
39. Shen, Q., Zhang, P. and Ho, T. H. D. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* **8**, 1107-1119.
40. Singh, K. B. 1998. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**, 1111-1120.
41. Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2012. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. *Rice* **5**, 6-9.
42. Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* **49**, 46-63.
43. Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11632-11637.
44. Wise, A. A., Liu, Z. Y. and Binns, A. N. 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods Mol. Biol.* **343**, 43-53.
45. Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H. and Xiong, L. 2008. Characterization of OsbZIP23 as a key player of basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol.* **148**, 1938-1952.
46. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2005. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* **10**, 88-94.
47. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
48. Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2010. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* **61**, 672-685.
49. Zeevaert, J. A. and Creelman, R. A. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 439-473.

초록 : *OsABF2*를 과발현시킨 애기장대에서 비생물학적 스트레스에 대한 내성 증가

박 훈 범*

(수원대학교 생명공학과)

식물호르몬인 abscisic acid (ABA)는 식물의 비생물학적 스트레스의 적응과정에서 중요한 역할을 수행하고 있다. 또한 ABA는 종자휴면, 발아, 세포분열의 저해, 기공개폐와 같은 중요한 과정에 관여하고 있다. *OsABF2* (*Oryza sativa* ABRE Binding Factor2)는 벼에서 비생물학적 스트레스와 ABA 신호전달 과정에 양성적으로 관여하는 bZIP 형태의 전사인자이다. *OsABF2* 유전자의 발현은 ABA와 다양한 스트레스 처리에 의해 유도된다. 본 논문에서는 *OsABF2* 유전자를 과발현한 애기장대가 가뭄, 고염, 고온 상태에서의 생존율이 야생형보다 증가하는 것을 확인하였다. 또한 ABA가 존재하는 상황에서 *OsABF2* 유전자를 과발현한 애기장대의 발아율이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 *OsABF2* 유전자를 과발현한 애기장대는 비생물학적 스트레스에 대한 내성이 증가하고 ABA 감수성은 증가하는 것으로 확인되었다.