

荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gacS* 的克隆和功能分析

魏海雷 张力群*

(中国农业大学植物病理系 北京 100094)

摘 要 荧光假单胞杆菌 2P24 菌株分离自小麦全蚀病自然衰退土壤,可产生多种次生抗菌物质,对一些作物土传病害具有较好的防治能力。通过 PCR 介导的方法从荧光假单胞杆菌 2P24 的基因组文库中克隆到调控基因 *gacS*。序列分析发现,该基因长度为 2754 bp,编码 917 个氨基酸的肽链。此肽链与 *Pseudomonas chlororaphis* 双因子组份之一的感受激酶 GacS 相似性达 91%,与 *P. fluorescens* CHA0 的 GacS 相似性为 89%。与野生菌株 2P24 相比,*gacS* 基因的缺失突变体完全丧失产生抗菌代谢物 2,4-二乙酰基间苯三酚、氢氰酸、蛋白酶的能力。拮抗试验中,*gacS* 缺失突变体丧失对小麦全蚀病菌的拮抗作用,温室生物测定显示 *gacS* 的缺失突变体对小麦全蚀病的生防能力大幅下降。但是 *gacS* 基因的互补突变体能够恢复产生抗菌次生代谢物的能力,且重新获得拮抗能力和生防能力。由此证明 GacS 是生防菌株 2P24 中一个控制生防因子并影响生防效果的重要调控元件。

关键词 荧光假单胞杆菌,生物防治,双因子调控系统,*gacS* 基因

中图分类号 S476 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)03-0368-05

双因子调控系统(Two-component regulatory system)广泛存在于细菌中,它可以帮助细菌根据环境信号适应不同条件,定殖于特定的生态位点。假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)典型的双因子调控系统包括一个感受激酶(Sensor kinase)GacS 和一个反应调控因子(Response regulator)GacA。感受激酶 GacS(最早名为 LemA)是作为 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a 在豌豆叶片上形成病斑的必要因子提出的^[1]。*gacS* 基因的失活突变体使这一菌株失去毒性和生态适应性。在对几组典型的双因子调控系统研究后发现,感受激酶识别信号后可进行自身磷酸化,然后通过磷酸基团的转移激活反应调控因子^[2,3]。但是 GacS/GacA 双因子调控系统在不同微生物中所控制的性状及其对下游基因的调控方式不尽相同。

Pseudomonas fluorescens 2P24 是一株对小麦全蚀病、番茄青枯病、沙打旺根腐病具有较高防效的生防细菌^[4,5],它可以产生 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-DAPG)、氢氰酸(HCN)、嗜铁素、蛋白酶等多种抗菌物质,尤其抗生素 2,4-DAPG 在防治病害中起关键作用^[4,5]。本研究克隆了 2P24 的 GacS/GacA 双因子调控系统的 *gacS* 基因,并通过分子遗传学手段确定了此调控系统与菌株 2P24 生防因子和生防功能的

关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件 本实验所用菌株及质粒见表 1。在 LB 培养基中 *P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌株需 28℃ 培养 36~48h, *Escherichia coli* 各菌株需 37℃ 生长 12~16h。抗生素 2,4-DAPG、HCN 检测为 King's B^[6] 培养基,检测蛋白酶所需培养基参考文献^[7]。双亲和三亲杂交在基本培养基 M9 上进行^[5]。所用抗生素使用浓度分别为:氯苄青霉素 50μg/mL,卡那霉素 50μg/mL,氯霉素 20μg/mL,四环素 20μg/mL。

1.1.2 试剂 实验所需限制性内切酶、连接酶均购自 TaKaRa,包装蛋白购自 Promega。

1.2 DNA 操作和序列分析

质粒 DNA 提取采用碱裂解法,细菌基因组 DNA 提取采用 CTAB 法。限制性酶切、琼脂糖凝胶电泳、感受态制备、连接、转化等操作参考文献^[8]。引物合成与序列测定由上海申友生物技术有限责任公司完成。采用分析软件 BLAST 和 DNAMAN 对核苷酸及氨基酸序列进行分析。

基金项目 国家自然科学基金(30100120,30370952);国家“863 计划”(2003AA241170)

* 通讯作者。Tel:86-10-62733037;Fax:86-10-62731464;E-mail:zhanglq@cau.edu.cn

作者简介 魏海雷(1979-)男,山东博兴县人,研究实习员,现工作单位为中国科学院微生物研究所,研究方向为微生物分子遗传学。Tel:86-10-62658587;E-mail:weihl@im.ac.cn

收稿日期 2004-09-13;修回日期 2005-01-07

表 1 菌株和质粒

Strain or plasmid	Characteristics	Source
Strains		
<i>P. fluorescens</i>		
2P24	Ap ^r , wild type	4
2P24ΔS	Ap ^r , strain 2P24 deleted 650 bp <i>EcoR</i> I fragment in <i>gacS</i> gene	This study
2P24ΔS-ME	Ap ^r , Tc ^r ; 2P24ΔS containing pME6032	This study
2P24-S	Ap ^r , Tc ^r ; 2P24ΔS containing pME-S	This study
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	The fungal pathogen causing wheat take-all	Lab collection
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 thi-1</i>	Lab collection
S17-1 (λ-pir)	<i>thi pro hsdR hsdM⁺ recA RP4-2-Tc :Mu-Km :Tn7 λpir</i>	Lab collection
Plasmids		
pBluescript II SK ⁺	Ap ^r , ColE1 origin	Stratagene
pLAFR5	Tc ^r , <i>oriT</i> cosmid	9
pS31-39	Tc ^r , a cosmid clone containing <i>gacS</i>	This study
pBS-5S	pBluescript containing a 5.4 kb <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> H I fragment from pS31-39 with <i>gacS</i>	This study
pS-BH	pBluescript containing a 3.2 kb <i>Hind</i> III - <i>Bam</i> H I fragment of <i>gacS</i>	This study
pS-BEH	a pS-BH derivative with the 650 bp <i>EcoR</i> I fragment deleted from <i>gacS</i>	This study
pBS-S	pBluescript containing the 3.0 kb <i>Bam</i> H I fragment of <i>gacS</i>	This study
pSR47S	Km ^r , <i>oriT sacB</i>	10
p47SΔS	pSR47S containing 2.53 kb <i>Sal</i> I - <i>Bam</i> H I fragment from pS-BEH	This study
pME6032	Tc ^r , <i>lacIq</i> -Ptac expression vector	11
pME-S	pME6032 containing the 3.0 kb <i>Bam</i> H I fragment from pBS-S	This study
pRK600	Cm ^r , ColE1 RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺ , helper plasmid	12

Ap^r, Km^r, Cm^r and Tc^r indicate resistance to ampicillin, kanamycin, chloramphenicol and tetracycline, respectively.

1.3 *gacS* 基因的克隆

P. fluorescens 2P24 基因组 DNA 经过 *Mbo* I 部分酶切, 连接到 *Bam*H I 和 *Sca* I 双酶切的粘粒 pLAFR5^[9], 体外包装后转染 *E. coli* DH5α 构建基因组文库。根据已发表的 *gacS* 基因核苷酸序列, 在保守区设计引物 S-H :5'-TCGGCATCAACCGCATGGC-3' 和 S-G :5'-GTGCCTTCGCGGGTGAACCT-3'。以菌株 2P24 基因组为模板进行 PCR 扩增。反应体系: 2P24 基因组 0.5μL, 2.5 mmol/L dNTP 5μL, 10μmol/L Primers 5μL, 10 × *Taq* buffer 5μL, 灭菌去离子水 35μL, 5U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.5μL。所得片段经测序验证, 并以此为标记通过 PCR 方法筛选 2P24 基因组文库。所得阳性片段亚克隆后连接质粒 pBluescript 并测序。PCR 反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 40s, 65℃ 40s, 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 10min。

1.4 *gacS* 基因的缺失突变和基因互补

根据克隆的 2P24 菌株 *gacS* 基因序列设计引物 S1 :5'-CATAAGCTTGGCAGCACTC-3' (含 *Hind* III 酶切位点) 和 S3186 :5'-ATGGATCCAGCTTAACCGC-3' (含 *Bam*H I 酶切位点)。以菌株 2P24 基因组为模板进行 PCR 扩增, 反应体系同 1.3。PCR 产物经相应酶切后连接 pBluescript 构建重组质粒 pS-BH。pS-BH

经 *EcoR* I 酶切后自连, 得重组载体 pS-BEH。采用 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切 pS-BEH, 连接相应酶切过的 pSR47S 构建自杀载体 p47SΔS。利用双亲杂交法^[13] 将 p47SΔS 转化 *P. fluorescens* 2P24, 以卡那霉素为标记筛选重组菌。将筛选到的重组菌在无抗生素压力下 28℃ 培养 36h, 连续转接 4 次, 平板筛选丢失卡那霉素抗性的菌株, 即发生第二次重组的菌株, 从而获得 *gacS* 基因的缺失突变体, 命名为 2P24ΔS。

设计引物 S184 :5'-TCGGATCCTGCTTACTCGTC-3' 与引物 S3186 配对, 以 pS-BH 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物经 *Bam*H I 消化后连接 *Bgl* II 酶切过的穿梭载体 pME6032, 获得 pME-S。三亲杂交法^[5] 将重组载体从 *E. coli* DH5α 转入 2P24ΔS, 得到 *gacS* 基因互补菌。

1.5 抗菌代谢物的检测和拮抗测定

抗生素 2-A-DAPG、HCN 与蛋白酶的检测方法, 待测各菌株对小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*) 的拮抗检测均参考文献 [4]。

1.6 生长曲线

将待测各菌株液体培养 28h, 各取 50μL 转接于 5mL 的 LB 培养液中, 28℃ 培养 24h。用新鲜的 LB 将各菌株稀释至 $OD_{600} = 0.5$, 以 1:1000 (V/V) 的比

例将各个相同浓度的菌株接种于 100mL 的 LB 培养液中, 28℃ 140r/min 培养, 每隔 2h 同时测定各菌株在 600nm 的吸光值(试验重复测定 2 次)。

1.7 温室防治小麦全蚀病

将 PDA 平板上培养的全蚀病菌捣碎后接种于湿润的麦麸中, 培养 14d。取出晾干、磨细, 与灭菌土 1:100 (W/W) 混匀。小麦种子表面消毒后 28℃ 催芽, 用 2×10^8 cfu/mL 的各处理菌液浸种 2h 后播种。每处理 3 个重复, 每重复 4 盆, 每盆 5 粒种子。设健康和病株对照。30d 后取苗, 用清水反复冲根, 按分级标准调查发病情况并计算防治效果^[14]。

2 结果

2.1 *gacS* 基因的克隆和序列分析

经测序和相似性比较, 引物 S-H 与 S-G 扩增的 540 bp 片段(图 1 泳道 1)与感受激酶基因相似。利用这对引物用 PCR 方法筛选菌株 2P24 的基因组文库, 结果从 2000 个克隆子中得到 3 个阳性克隆。其中 pS31-39 经 *Hind*III 和 *Bam*HI 亚克隆后得到一个包含 5.4kb 阳性片段的质粒 pBS-5S。测序发现, 一段 2754 bp 的开放阅读框编码 917 个氨基酸, 推测其分子量为 101 kD。BLAST 比较表明, 此肽链与 *P. chlororaphis* O6 的 GacS (Q9R9H1) 相似性达 91%, 与 *P. fluorescens* CHA0 的 GacS (Q9F8D7) 的相似性为 89%, 与 *P. fluorescens* Pf-5 的 ApdA (GacS) (2123353A) 相似性达 88%。在以上相似的菌株中 GacS 被证实为双因子调控系统中的感受激酶, 它能够控制多种次生代谢物的产生, 因此可推断 GacS 在 2P24 中也可能是一个重要的调控元件。本研究所克隆的 *gacS* 基因已递交 GenBank, 序列号为 AY623898。

分析 *P. fluorescens* 2P24 中的 *gacS* 基因, 在起始密码子 GTG 上游 8 个碱基处有一段类似于 Shine-Dalgarno 位点的序列, 可能是感受激酶基因的核糖体结合位点。但是, 在 SD 位点上游没有发现类似于 σ^{70} 、 σ^{54} 、 σ^{32} 的假单胞杆菌启动子^[15]。对氨基酸疏水性分析发现, 在 GacS 的 N-端有 2 个疏水域, 这种结构与典型的感受激酶跨膜区相似。将菌株 2P24 的 GacS 氨基酸序列与近源序列比对发现, 在 2P24 的 GacS 中具有感受激酶保守的自磷酸化的组氨酸残基、接受域 (Receiver domain) 保守氨基酸和 C-末端保守的组氨酸磷酸转移 (Hpt) 功能域。

2.2 *gacS* 基因缺失突变体的构建

将重组质粒 p47SΔS 转化 *P. fluorescens* 2P24, 两

次同源重组后获得缺失 650 bp *Eco*R I 片段的 *gacS* 突变体 2P24ΔS。以 S1 和 S3186 为引物, 以 2P24 和 2P24ΔS 的新鲜菌落为模板, 可分别扩增到 3.2 kb 和 2.5 kb 的片段(图 1 泳道 2 和 3), 由此可以证明 2P24ΔS 为 *gacS* 的缺失突变体。

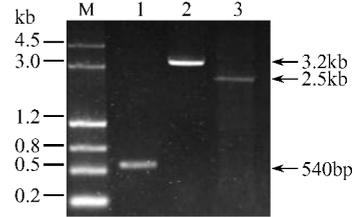


图 1 菌落 PCR 扩增片段的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of colony PCR products

M. Molecular weight marker; 1. The fragment amplified with primers S-H and S-G from 2P24 colony; 2. The fragment amplified with primers S1 and S3186 from 2P24 colony; 3. The fragment amplified with primers S1 and S3186 from 2P24ΔS.

2.3 *gacS* 对次生抗菌物质和拮抗作用的影响

相同条件下检测 2P24、2P24ΔS-ME 和 2P24-S 次生代谢物的产生情况, *gacS* 基因的缺失突变菌 2P24ΔS-ME 完全失去产生抗生素 2,4-DAPG、氢氰酸和蛋白酶的能力(表 2)。拮抗实验表明, 2P24ΔS 完全丧失对小麦全蚀病菌的拮抗作用, 而互补菌 2P24-S 产生以上抗菌代谢物和拮抗病原菌的能力都能恢复到野生菌水平(表 2)。

表 2 *P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌对次生抗菌物产生和拮抗作用的影响

Table 2 Phenotypic characterization of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives

Strain	Character	Secondary-metabolites production			Antibiosis ability to <i>G. graminis</i>
		2,4-DAPG	HCN	Proteinase	
2P24	Wild type	+	+	+	+
2P24ΔS-ME	<i>gacS</i> ⁻	-	-	-	-
2P24-S	<i>gacS</i> ⁺	+	+	+	+

+ : Metabolite detected; - : No metabolite detected.

2.4 *gacS* 对菌株生长的影响

在 LB 培养基中, *P. fluorescens* 2P24 与其衍生菌的生长曲线存在差异(图 2)。2P24ΔS-ME 的迟滞期 (Lag phase) 较野生菌 2P24 缩减了 2h, 而以质粒形式表达 GacS 的 2P24-S 相对野生菌 2P24 来说, 其迟滞期延长了 1h。此外, *gacS* 突变体进入静止生长期 (Stationary phase) 的时间较野生菌 2P24 提前了 2h, 而 2P24-S 进入静止生长期的时间比 2P24 推迟了 1h。由此可见, *gacS* 基因与菌株的生长有关。

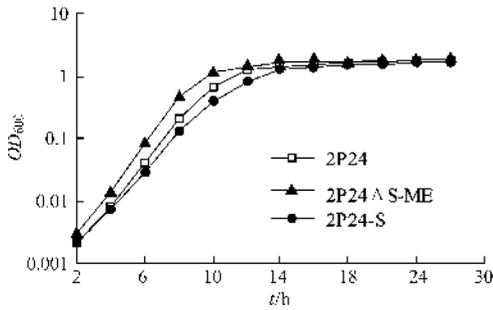


图2 *P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives in LB broth

2.5 温室对小麦全蚀病的防治

从病情指数来看(表3),2P24 Δ S-ME 的病情指数为 69.1,与病处理病情指数(75.0)无显著差异,而 2P24 野生菌处理和 *gacS* 基因互补菌处理的病情指数均显著降低。2P24 野生菌处理和 *gacS* 基因互补菌对小麦全蚀病的防治效果均超过 75%,而 2P24 Δ S-ME 处理对小麦全蚀病的防治效果只有 7.9%,与 2P24 和 2P24-S 的防治效果形成显著差异,野生菌和互补菌之间的病情指数和防治效果相似。由此可见,调控基因 *gacS* 的突变显著影响了菌株 2P24 对小麦全蚀病的防治效果。

表3 *P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌对小麦全蚀病的防治作用

Table 3 Control efficiency of *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives on wheat take-all disease

Treatments	Disease index	Control efficiency/%
Disease control	75.0a	—
2P24	17.1b	77.2
2P24 Δ S-ME	69.1a	7.9
2P24-S	17.5b	76.7

Data followed by different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

3 讨论

本研究从 *P. fluorescens* 2P24 中克隆了 *GacS*/*GacA* 双因子调控系统的组分之一 *gacS* 基因,并通过功能互补证明了 *GacS* 是调控生防因子和生防功能的重要元件。最近我们又从 *P. fluorescens* 2P24 中发现和克隆了 *GacS*/*GacA* 双因子调控系统的下游组分 *gacA* 基因,经过遗传学解析证明其功能与本研究的 *gacS* 基因功能相同,肯定了 *GacS*/*GacA* 双因子调控系统在菌株 2P24 代谢调控中的作用^[16]。

GacS 是一类不常见的组蛋白感受激酶^[1]。在其 *N*-端有两个显著的疏水区,构成了可能的跨膜部分,两个疏水区被称为周质环(Periplasmic loop)的序

列分开。由此推测 *GacS* 可能是一个跨膜蛋白,其精确结构还须研究证明。结合文献报道可以推测,当 *GacS* 接收到环境信号后被激活,引起 *C*-端构象的变化,从而有利于自身磷酸化和磷酸基团的转移。根据文献报道,接受磷酸基团的 *GacA* 随之激活或阻遏调控元件的转录,从而控制目标基因的表达,以此作为对环境信号的应答^[3]。但到目前为止我们还没有明确与 *GacS* 相关的环境或生理信号分子。

有趣的是在我们的实验中,*gacS* 的突变影响了菌株的生长,其进入指数生长期和静止期的时间较野生菌要提前,而互补菌株进入指数生长期和静止期的时间较野生菌要推迟。如果与 *GacS* 控制多种次生代谢联系起来,即当菌株失去几条耗能的代谢途径后,无需太多的营养和能量就能迅速的生长繁殖,而以质粒形式表达 *GacS* 的互补菌由于在强启动子 *P_{lac}* 的启动下大量表达 *GacS*,使得次生代谢旺盛,耗能增强,生长速率减慢。但也有报道称,细菌中的 σ 因子 σ^s (*rpoS* 的产物)是受 *GacS*/*GacA* 双因子系统正调控的^[17],而 *rpoS* 与细菌生长进入静止期有关。因此,这种现象的产生究竟是能量代谢的原因还是 σ^s 的作用,或者还有另外的原因尚需在菌株 2P24 中进一步验证。

我们在 *P. fluorescens* 2P24 中发现了另外一种与生防功能相关的称为 Quorum-sensing 的调控系统,其信号合成基因 *pcol* 的表达证明是在转录水平受 *GacS* 的正调控(待发表)。由此推断 *GacS*/*GacA* 双因子系统调控靶标并非唯一。虽然有人推测 *GacS*/*GacA* 系统主要在转录后水平调控次生代谢物的产生^[3],但在 *P. fluorescens* 2P24 中 *GacS* 调控次生抗菌物质的方式还有待确切验证。结合 *GacS* 对 Quorum-sensing 和次生代谢的调控作用,说明 *GacS*/*GacA* 双因子系统是 *P. fluorescens* 2P24 中次生代谢上游的调控系统。

参 考 文 献

- [1] Kitten T, Kinscherf T G, McEvoy J L, et al. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol*, 1998, **28**: 917 - 929.
- [2] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**: 624 - 653.
- [3] Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the *GacS*/*GacA* two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**: 1351 - 1363.

- [4] 魏海雷, 王 焯, 张力群, 等. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. 植物病理学报, 2004, **34** (1): 80 - 85.
- [5] 魏海雷, 周洪友, 张力群, 等. 抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚作为荧光假单胞杆菌 2P24 菌株生防能因子的实证分析. 微生物学报, 2004, **44** (5): 663 - 666.
- [6] King E O, Ward M K, Raney D E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, 1954, **44**: 301 - 307.
- [7] Reimann C, Beyeler M, Latifi A, et al. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Mol Microbiol*, 1997, **24** (2): 309 - 319.
- [8] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a laboratory (3rd ed)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- [9] Keen N T, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*, 1988, **70**: 191 - 197.
- [10] Andrews H L, Vogel J P, Isberg R R. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun*, 1998, **66**: 950 - 958.
- [11] Heeb S, Blumer C, Haas D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 1046 - 1056.
- [12] De Lorenzo V, Timmis K N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol*, 1994, **235**: 386 - 405.
- [13] Liu L, Shaw P D. Characterization of *dapB*, a gene required by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* BR2.024 for lysine and tabtoxinine-beta-lactam biosynthesis. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 507 - 513.
- [14] Ownley B H, Weller D M, Thomashow L S. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2 - 79. *Phytopathology*, 1992, **82**: 178 - 184.
- [15] Deretic V, Konyecsni W M, Mohr C D, et al. Common denominators of promoter control in *Pseudomonas* and other bacteria. *Bio/Technology*, 1989, **7**: 1249 - 1254.
- [16] 闫小雪, 张力群, 杨之为, 等. 调控基因 *gacA* 在荧光假单胞杆菌 2P24 防治土传病害中的作用. 植物病理学报, 2004, **34** (3): 222 - 229.
- [17] Whistler C A, Corbell N A, Samiguet A, et al. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^{54} and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf - 5. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 6635 - 6641.

Cloning and functional characterization of the *gacS* gene of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* 2P24

WEI Hai-lei ZHANG Li-qun *

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: *Pseudomonas fluorescens* 2P24, a biocontrol agent for soil-borne diseases has been isolated from the wheat take-all decline soil, and was characterized with efficient production of antifungal compounds. In this study, the *gacS* gene was cloned by PCR from the *P. fluorescens* 2P24 genomic library. Nucleotide sequencing indicated that the *gacS* gene contains 2754 bp, and is predicted to encode a peptide of 917 amino acids with molecular mass of 101 kD. The deduced amino acid sequence shares 91% identity to that of the sensor kinase GacS of *P. chlororaphis* and 89% identity to GacS of *P. fluorescens* CHA0. Further research revealed that the *gacS*-knock-out mutant was unable to produce antifungal metabolites, such as 2,4-DAPG, HCN and proteinase. Moreover, it lost the ability to inhibit the growth of *Gaeumannomyces graminis* in Petri dish and to control the development of wheat take-all disease in greenhouse. The complemented strain containing a plasmid-bearing *gacS* gene could restore all of the lost phenotypes. The results indicated that GacS is an important regulatory factor and directly controls the synthesis of key biocontrol factors and the biocontrol efficacy of *P. fluorescens* 2P24.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, Biological control, Two-component regulatory system, *gacS* gene

Foundation item: Chinese National Natural Science Found (30100120, 30370952); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241170)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62733037; Fax: 86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

Received date: 09-13-2004