

产紫杉醇内生真菌 TMS-26 的分离和鉴定

方荣锋, 李浩浩, 张培及, 曹让, 杨淑慎

西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

方荣锋, 李浩浩, 张培及, 等. 产紫杉醇内生真菌 TMS-26 的分离和鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1945–1954.
Fang RF, Li HH, Zhang PJ, et al. Identification and characterization of a taxol-producing endophytic fungus from *Taxus media*. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1945–1954.

摘要: 为丰富产紫杉醇植物内生真菌资源库, 从曼地亚红豆杉 *Taxus media* 茎中分离得到一株产紫杉醇的内生真菌 TMS-26。通过对 TMS-26 的发酵提取物进行高效液相色谱分析, 发现其具有与紫杉醇标准品 (4.545 min) 相近的色谱特征峰。进一步通过液质联用仪检测发现, 内生真菌 TMS-26 的发酵提取物中具有与紫杉醇标准品 ((M+Na)⁺=876) 相近的质谱特征峰, 表明内生真菌 TMS-26 能够产生紫杉醇。同时通过传统形态学分类鉴定方法和 18S rDNA 序列分析、Internal-transcribed spacer (ITS) 序列分析等现代分子生物学分类鉴定方法, 最终将内生真菌 TMS-26 鉴定为曲霉属烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*, 并命名为“烟曲霉 TMS-26”。

关键词: 紫杉醇, 曼地亚红豆杉, 内生真菌, 烟曲霉, 18S rDNA, ITS 序列

Identification and characterization of a taxol-producing endophytic fungus from *Taxus media*

Rongfeng Fang, Haohao Li, Peiji Zhang, Rang Cao, and Shushen Yang

College of Life Sciences, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: To enrich the resource pool of endophytic fungi from plants which produce taxol, a taxol-producing endophytic fungus TMS-26 was isolated from the stem of *Taxus Media*. The result of high performance liquid chromatography (HPLC) showed that TMS-26 extract exhibited similar chromatographic peaks and retention time (4.545 min) with authentic taxol. Then mass spectrometry (MS) analysis further confirmed that TMS-26 extracts contained the same mass peaks with

Received: February 21, 2017; **Accepted:** June 15, 2017

Supported by: Social Development and Key Science & Technology Program of Shaanxi Province (No. 2015SF308).

Corresponding author: Shushen Yang. Tel: +86-29-87092262; Fax: +86-29-87082816; E-mail: yangshushen2014@163.com

陕西省社会发展科技攻关项目 (No. 2015SF308) 资助。

网络出版时间: 2017-06-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170626.1449.001.html>

authentic taxol ((M+Na)⁺=876). These indicated that the isolated endophytic fungus TMS-26 can produce taxol. According to the morphological characteristics, the molecular analysis of 18S rDNA and internal transcribed spacer nuclear rDNA gene sequence, the fungus was identified as *Aspergillus fumigatus* TMS-26.

Keywords: taxol, *Taxus media*, endophytic fungus, *Aspergillus fumigatus*, 18S rDNA, ITS sequence

紫杉醇 (Paclitaxel, 商品名 Taxol) 是一种具有天然抗肿瘤活性的二萜类物质。1971 年美国化学家 Wani 等^[1]首先从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 树皮中分离得到, 并命名为紫杉醇, 即 Paclitaxel。随后 Schiff 等^[2]发现了紫杉醇独特的抗癌机理, 它能抑制微管的解聚, 影响纺锤丝的形成, 从而阻断癌细胞的有丝分裂而达到治疗肿瘤的目的。自从紫杉醇问世以来, 由于其良好、广谱的抗癌效果, 被誉为是近半个世纪以来最好的抗癌药物之一^[3]。《世界癌症报告》指出在今后的近 20 年, 全球癌症病例将呈现迅猛增长的态势^[4], 由此对紫杉醇的需求也会陡然增长。然而, 目前紫杉醇主要从红豆杉的树皮中提取, 其含量仅为 0.01%–0.05%^[5], 造成了紫杉醇来源的严重匮乏, 导致其市场价格居高不下, 限制了其在临床上的广泛应用。因此探索其他方法生产紫杉醇十分迫切。

1993 年 Stierle 等^[6]首次从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 中分离出 1 株产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae*, 这一发现为紫杉醇生产开辟了新的途径。因此从红豆杉属等植物中分离内生真菌, 无疑能缓解紫杉醇生产原料危机^[7]。到目前为止, 已报道有 40 多个属的 200 多种菌株可以产生紫杉醇^[8], 表现出丰富的物种多样性。但由于大部分菌株发酵性能较低, 初始产量尚未达到 1 mg/L 的工业化生产的盈亏平衡点^[9]。

本研究以生长在陕西关中地区的 9 年生曼地亚红豆杉 *Taxus media* 为材料, 从中分离出

1 株产紫杉醇的内生真菌 TMS-26, 通过高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 和质谱法 (Mass spectrum, MS) 对其所提取得到的疑似紫杉醇物质进行了分析, 同时通过传统形态学分类鉴定方法和 18S rDNA 序列分析、Internal-transcribed spacer (ITS) 序列分析, 对内生真菌 TMS-26 进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 分离自曼地亚红豆杉外植体, 已保存于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC No: M 2014258)。

红豆杉: 9 年生曼地亚红豆杉 *Taxus media* 栽培于西北农林科技大学博览园。根据植物内生真菌在植物组织和器官中的分布特点及其在植物中的生活习性, 选用曼地亚红豆杉的根、茎、叶以及树皮作为内生真菌分离的主要部位。

研究材料采集方法如下:

根: 使用园艺铲沿所选曼地亚红豆杉植株根部向下挖, 取地表以下 15 cm 处的曼地亚红豆杉多年生根, 用园艺剪剪下装入无菌袋备用。

茎: 取所选曼地亚红豆杉植株多年生、健康且粗壮的茎, 使用园艺剪剪下装入无菌袋备用。

叶: 取所选曼地亚红豆杉多年生、健康且较大的叶片, 连同枝条用园艺剪剪下装入无菌袋备用。

树皮: 取所选曼地亚红豆杉多年生的茎, 用

园艺剪剪下,在超净工作台上用无菌手术刀和镊子将皮剥下备用。

主要仪器和试剂:Waters 1525-2424 型高效液相色谱仪(美国 Waters);AB Sciex API 2000 型三重四级杆液质联用仪(美国 AB Sciex);JSM-6360LV 型扫描电子显微镜(日本电子仪器公司)。工具酶、IPTG 购自 TaKaRa 公司;DNA 片段凝胶回收试剂盒购于 TIANGEN BIOTECH(北京)公司;紫杉醇标准品购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产色谱纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化

将采集的曼地亚红豆杉的外植体放入自来水中冲洗 30 min,再用无菌水冲洗 3 次。转移至洁净工作台内,先用 75%的乙醇浸泡 30 s,然后用无菌水冲洗 3-5 次,接着用 0.1%的升汞溶液浸泡 10 min,完成后用无菌水冲洗 3-5 次,将最后一轮的洗液涂布于 PDA 固体培养基上,作为对照组以检验是否消毒彻底。然后将外植体用无菌的解剖剪和解剖刀剪切成 0.5 cm×0.5 cm 左右的小块,按外植体部位分别接种于已经准备好的 PDA 固体培养基上。倒置于 28 °C 培养箱中黑暗培养 3-7 d,观察记录菌丝生长情况。

当观察对照组的平板无菌落长出,而实验组平板上长出菌丝后,根据所长出的菌落颜色、形态以及分泌物的不同,挑取不同菌落菌丝的尖端接种于新的 PDA 固体培养基上,28 °C 倒置于培养箱中黑暗培养 3-7 d,每天观察记录菌丝生长情况。当有不同颜色或形态的菌落生长出来以后,继续以菌丝顶端纯化法进行纯化操作直至各个菌落为单一纯培养为止,然后将纯化后的单一菌株分别编号记录并保存到 4 °C 冰箱备用^[10]。

1.2.2 发酵液中紫杉醇的提取与分析

将保藏于 4 °C 冰箱中的 26 株菌种取出,以划线接种法接种于 PDA 平板上,倒置于 28 °C 培养箱中黑暗培养 3-4 d,待菌丝均匀长出后,在洁净工作台用无菌手术刀片切取 0.5 cm×0.5 cm 大小生长均匀的带培养基菌块儿,然后分别接入装有 50 mL PDA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28 °C、180 r/min 暗培养 12-15 d。

将发酵培养液进行过滤,滤液用等体积的二氯甲烷 120 r/min 振荡萃取 3 次,分液,合并收集二氯甲烷相。将二氯甲烷相于旋转蒸发仪中 40 °C 减压蒸干,用色谱级甲醇溶解蒸干后所得的固体残留物,定容至 4 mL,然后再用 0.22 μm 的微孔过滤器进行过滤后于 4 °C 冰箱中黑暗保存备用。

采用薄层色谱法对曼地亚红豆杉产紫杉醇内生真菌进行初步筛选,将菌株发酵提取物的甲醇溶液及标准品溶液点样于 GF₂₅₄ 硅胶板上,以三氯甲烷:乙腈(V:V)=9:1 为展开剂,甲醇:浓硫酸:香草醛(V:V:M)=90 mL:10 mL:1 g 为显色剂,根据提取物与标准品的显色情况,以初步判定菌株发酵液中是否含有紫杉醇^[11]。对于经薄层色谱法检测后得出的疑似产紫杉醇的菌株,进一步通过高效液相色谱法检测,来确认这些菌株是否能够产紫杉醇。本次高效液相色谱法检测条件为:色谱柱为 C18 反向柱(4.5 mm×150 mm,5 μm),紫外检测波长为 227 nm,进样量为 5 μL,流动相为甲醇:水(V:V)=68:32,流速为 1 mL/min,柱温为室温。根据高效液相色谱法检测结果得到疑似紫杉醇高产菌株,为了进一步确认菌株所产紫杉醇的结构,采用液质联用色谱法(LC/MS/MS)对高产菌株发酵提取物进行检测,检测条件如下:在紫杉醇的二级质谱检测中,紫杉醇加钠峰

所产生质荷比为 308.10 的碎片离子和紫杉醇加氢峰所产生质荷比为 286.30 的碎片离子的检测灵敏度最高,故在此后的检测中,选择 $m/z=876.60/308.10$ 和 $m/z=854.70/286.30$ 的两对子母离子对为特征检测对象,使用电喷雾 (ESI) 离子源,正离子多反应监测 (MRM) 扫描模式。气帘气流速 (CUR) 为 20 L/min,碰撞气流速 (CAD) 为 5 L/min,离子源电压 (IS) 为 5 000 V,离子源温度 (TEM) 为 500 °C,离子源气流速 1 (GS1) 为 50 L/min,离子源气流速 2 (GS2) 为 60 L/min,去簇电压 (DP) 为 37 V,调焦电压 (FP) 为 400 V,入口电压 (EP) 为 10 V,碰撞电池出口电压 (CXP) 为 4 V。

1.2.3 分离菌株的形态学特征

本研究中采用单点法将 26# 菌株接种于 PDA 培养基上进行培养。对其培养 6 d 的菌落基本特征、光学显微镜下菌丝形态以及扫描电子显微镜下菌丝孢子形态等进行观测和鉴定。

1.2.4 分离菌株的分子系统学分析

采用 CTAB 法提取 26# 菌株总基因组 DNA^[12],用于随后的 18S rDNA 和 ITS 序列的扩增^[13]。

菌株 18S rDNA 的扩增与序列分析:

PCR 扩增体系(50 μ L): 30–150 ng 基因组 DNA 模板,引物 18S-NS1 (5'-GTAGTCATATG CTTGTCTC-3') 和 18S-NS8 (5'-TCCGCAGGTT CACCTACGGA-3')^[14]各 1 μ L, 2 \times Taq MasterMix 25 μ L, 无菌双蒸水补足 50 μ L。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 后延伸 10 min, 4 °C 保存。

PCR 扩增完成后, DNA 目的片段经过电泳

检测, 然后进行切胶回收 DNA 片段。纯化后的 18S rDNA 目的片段送交给英潍捷基(上海)生物技术有限公司完成双向测序。将所得序列上传至 GenBank 数据库, 并获得序列登录号。而后将所得序列输入 GenBank 数据库中进行 BLAST 检索比对, 利用 MEGA5.2 软件分析, 自展数据集为 1 000, 其他为默认参数, 采用邻位相连 (Neighbor-joining) 算法构建系统发育树^[15-16]。

PCR 扩增体系 (20 μ L): 10–50 ng 基因组 DNA 模板, 引物 ITS1 和 ITS4^[14]各 0.5 μ L, 10 \times Taq 缓冲液 2 μ L, MgCl₂ 1.5 μ L, dNTPs 1 μ L, Taq DNA polymerase 0.2 μ L, 无菌双蒸水补足 20 μ L。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 后延伸 7 min, 4 °C 保存。

序列比对及构建系统发育树方法与 18S rDNA 构建方法相同。

2 结果与分析

2.1 曼地亚红豆杉内生真菌的分离与筛选

2.1.1 薄层色谱法检测

在本研究所用检测体系中, 紫杉醇标准品经过薄层层析检测后显靛蓝色, R_f (点样斑点中心至斑点中心的距离/点样斑点中心至展开剂前沿的距离) 值为 0.56。通过对所分离出来的 26 株曼地亚红豆杉内生真菌的发酵提取物进行薄层色谱法点样检测, 结果显示其中的 1#、3#、6#、11#、15#、17#、21#、26# 这 8 株内生真菌的发酵提取物斑点颜色接近靛蓝色, 并且它们的 R_f 值也接近于 0.56 (图 1)。

2.1.2 疑似产紫杉醇菌株高效液相色谱检测

通过在相同色谱条件下对 8 株疑似产紫杉

醇菌株的发酵提取物进行高效液相色谱法检测,检测结果发现 26#、17#以及 11#菌株的发酵提取物能够产生保留时间分别为 4.486、4.502 和 4.630 min 的色谱峰(图 2B–2D),这与紫杉醇标准品在相同色谱条件下检测所得特征峰的保留时间 4.545 min(图 2A) 极其接近($\Delta \leq 0.2$ min),这说明 26#、17#、11#菌株在发酵培养过程中能够产生紫杉醇。

2.1.3 紫杉醇高产菌株液质联用色谱法检测

由高效液相色谱法测得,26#菌株的紫杉醇产量相对较高,为了进一步确认 26#菌株发酵提取物中紫杉醇的结构,本研究采用三重四级杆液质联用仪进行正离子模式多反应监测(MRM)扫描检测,对 26#菌株发酵提取物中的紫杉醇进行结构确认分析。通过对紫杉醇标准品和 26#菌株发酵提取物中的紫杉醇进行正离子模式多反应监测(MRM)扫描检测,发现在提取离子流图中,样品与标品的加钠峰和加氢峰保留时间极其接近($\Delta \leq 0.2$ min),且在二级质谱图,样品产生了和标品相同且对应的离子对峰,从而证明样品中的紫杉醇结构与标品相同(图 3)。

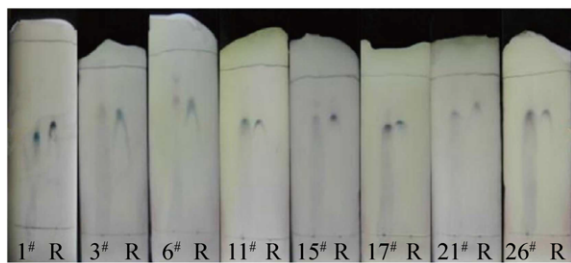


图 1 疑似产紫杉醇菌株发酵提取物 TLC 图(其中右侧 R 为紫杉醇标品,左侧编号为样品)

Fig. 1 TLC analysis on the fermentation extract of the suspected taxol-producing endophytic (R which on the right represents authentic taxol and samples are on the left).

2.2 菌株的菌落形态结构特征

在 PDA 培养基上于 28 °C 培养 6 d 后,26#菌株的菌落呈规则的椭圆形,直径 75 mm,厚度约为 1 mm,表面呈绒毛辐射状(图 4A)。菌落均一平坦无隆起,不透明,正面中心为蓝绿色,边缘灰白色,背面中心为黄绿色,向外依次变浅,整体较为干燥,与培养基结合较为紧密,无明显气味,生长较快且较为旺盛。

在 TFM-850 型倒置荧光显微镜白光模式下观测发现,26#菌株菌丝呈树枝状,有明显隔膜(图 4B);分生孢子梗较长,无分枝,无色;分生孢子囊呈椭圆形(图 4C),分生孢子呈圆形,蓝绿色。

在 JSM-6360LV 型扫描电子显微镜下,菌株菌丝有隔,多分枝,较粗,直径 3.0–6.0 μm ,分生孢子梗是从膨大的足细胞垂直生出,无色,光滑,无分枝,顶端膨大形成近似球形的顶囊,顶囊表面形成小梗,小梗平行簇生于顶囊顶部。小梗单层,分生孢子自小梗顶端相继形成。分生孢子为蓝绿色,近圆球形,形状均匀,表面有不规则块状突起,分生孢子直径 1.8–2.2 μm 。

以上形态学观测结果与《真菌鉴定手册》^[17]进行对比,发现 26#菌株的形态学特征与曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.)相似。

2.3 分子生物学方法鉴定

用 CTAB 法获得菌株总基因组 DNA,通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后,PCR 扩增,获得 26#菌株 18S rDNA 序列,测序后片段大小为 1 687 bp,所得序列提交至 GenBank 数据库并获得序列登录号 KJ746594。对菌株 18S rDNA 序列进行聚类分析,得到菌株系统发育树(图 5A),显示 26#菌株与烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus* 的 18S rDNA 序列同源性极高,序列相似度达到 99%,证明依据菌株 18S rDNA 序列分析结果可以将 26#菌株分类鉴定为烟曲霉菌。

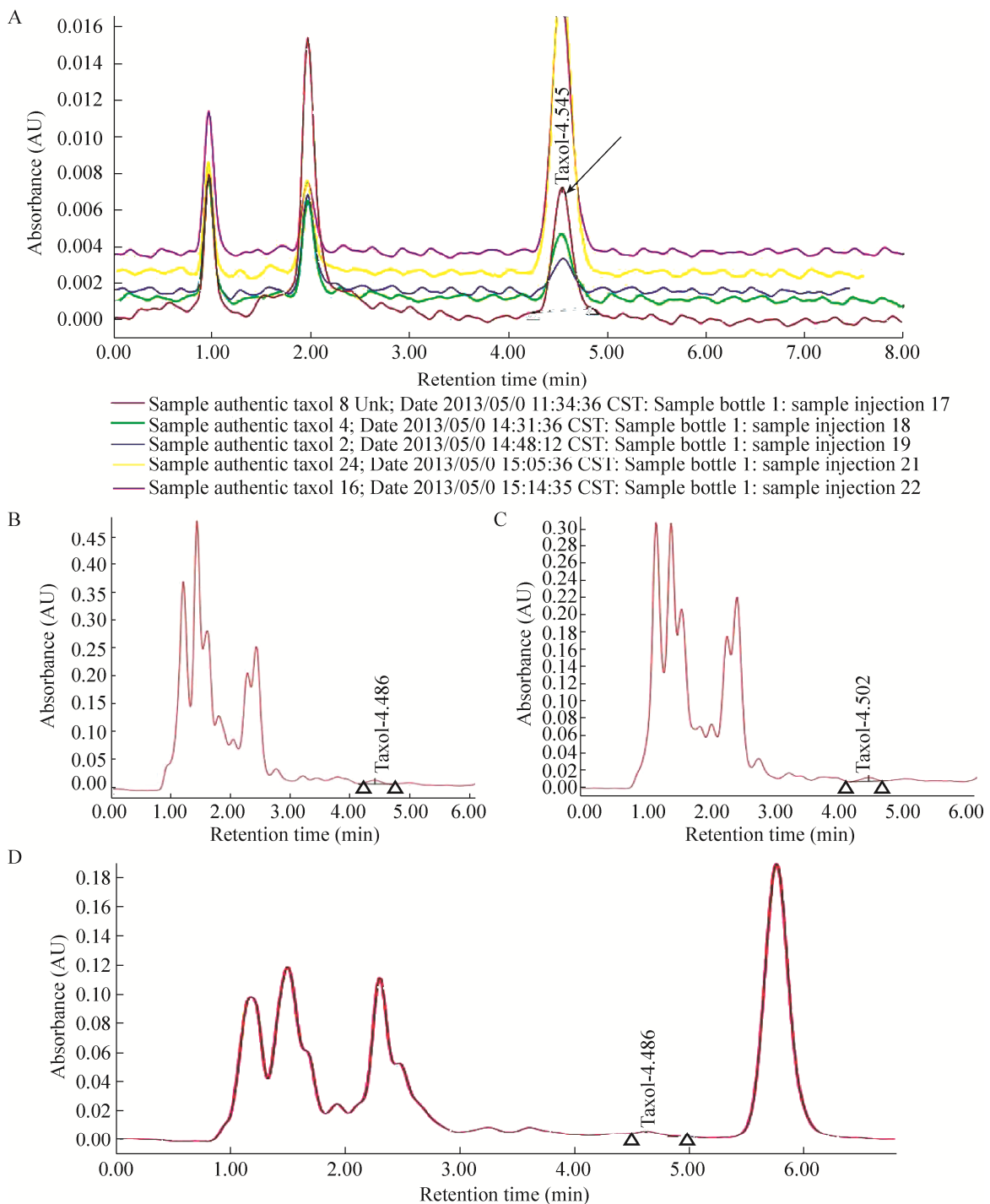


图 2 紫杉醇标准溶液及发酵提取物 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of authentic taxol and the sample extracted from three strains. (A) An HPLC chromatograms of authentic taxol (Arrow indicates the taxol-specific peaks). (B) An HPLC chromatogram of the sample extracted from strain 26#. (C) An HPLC chromatogram of the sample extracted from strain 17#. (D) An HPLC chromatogram of the sample extracted from strain 11#.

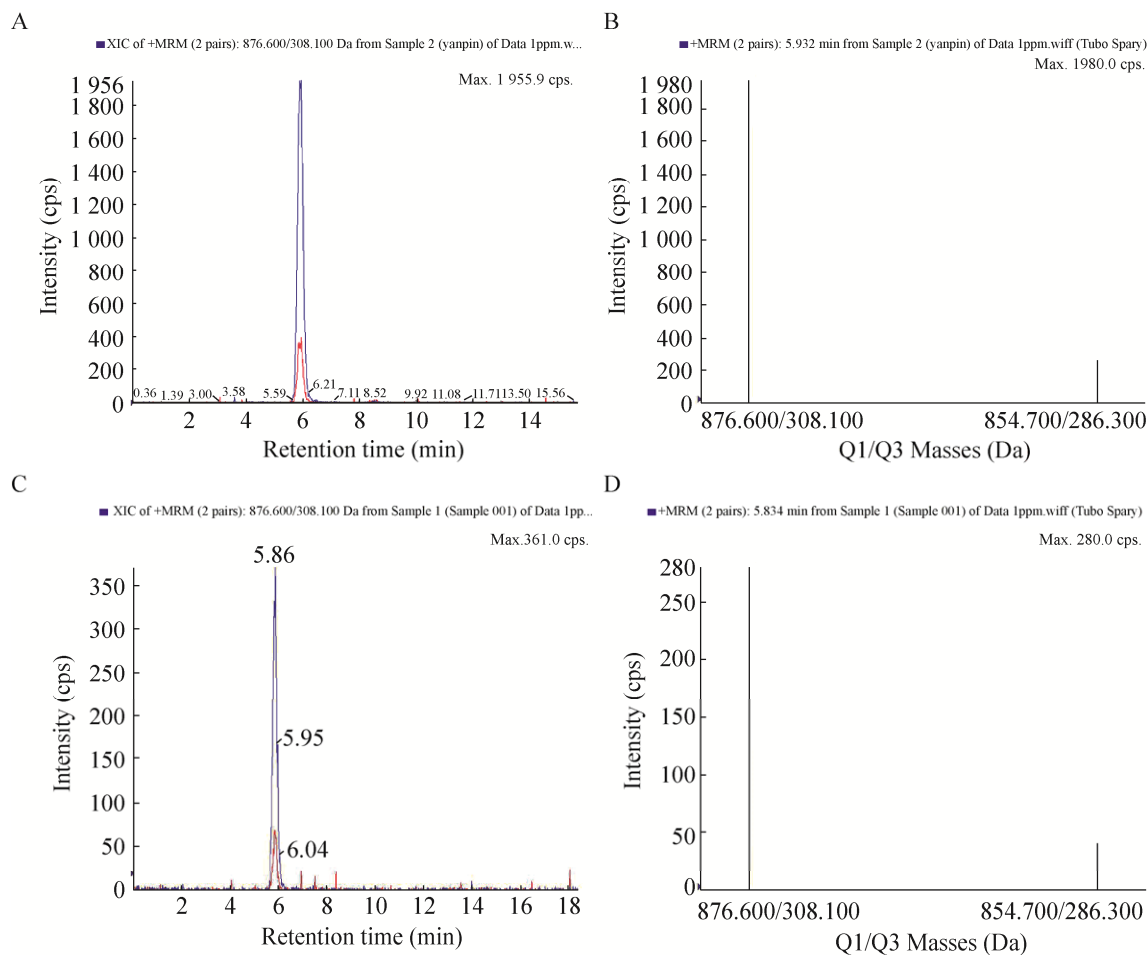


图3 紫杉醇标准品 (A) 和 26#菌株发酵提取物 (C) 的质谱提取粒子流图以及紫杉醇标准品 (B) 和 26#菌株发酵提取物 (D) 的二级质谱离子峰图

Fig. 3 Extracted ion chromatograms of LC/MS/MS of the authentic taxol (A) and the fungal taxol produced by strain 26# (C), and the mass spectrum figures of the authentic taxol (B) and the fungal taxol produced by strain 26# (D).

2.4 菌株 ITS 序列分析

26#菌株 ITS 序列测序后, 片段大小为 555 bp, 所得序列提交至 GenBank 数据库并获得序列登录号 KJ716967。对菌株 ITS 序列进行聚类分析, 得到菌株系统发育树 (图 5B), 显示 26#菌株与烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus* 的 ITS 序列同源性极高, 序列相似性也达到了 99%, 证明依据

菌株 ITS 序列分析结果可以将 26#菌株分类鉴定为烟曲霉菌, 与 26#菌株 18S rDNA 序列分析结果一致。

综合传统分类学方法鉴定结果和现代分子系统学分析的方法, 26#菌株被鉴定为曲霉属烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*, 将其命名为: 烟曲霉 TMS-26。

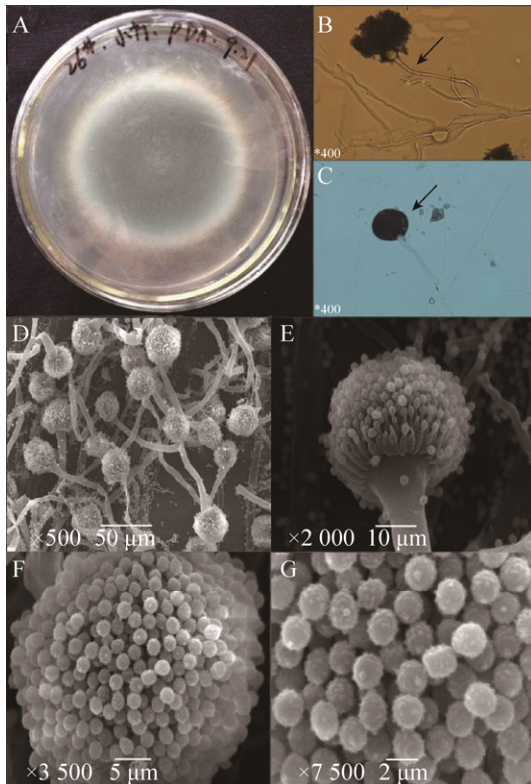


图4 26#菌株形态结构特征

Fig. 4 Morphological structure characteristics of strain 26#. (A) Colony of strain 26# after cultured on PDA medium at 28 °C for 6 days. (B,C) Mycelial morphology and sporangium morphology of strain 26#. (D-G) Conidia of strain 26# under a scanning electron microscope.

3 讨论

与直接从红豆杉属植物的树皮中提取紫杉醇相比,内生真菌生产紫杉醇具有更大的发展潜力。真菌不仅能在简单的培养基上良好生长,产生大量的发酵产物,发酵周期短,还可以在生物反应器中人为控制各种参数,并可通过诱变育种等传统育种和基因工程手段来提高菌种性能以提高紫杉醇产量,如赵凯等对紫杉醇产生菌 NCEU-1 的原生质体进行 UV 和 LiCl 复合诱变,紫杉醇产量提高了 33.17%^[18];同时随着对紫杉醇合成途径中

关键酶研究的不断深入,使构建紫杉醇高产基因工程菌株成为可能^[19]。通过内生真菌发酵法生产对于植物来源的天然药物的开发及濒危药用植物的保护具有十分重要的经济及生态效益,并为生产紫杉醇药物开辟了新的途径^[20]。

研究者们关注的焦点主要集中在太平洋短叶红豆杉、欧洲红豆杉、东北红豆杉、西藏红豆杉以及云南红豆杉等品种红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选^[21],对于杂交种曼地亚红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选研究报道较少。本研究从生长在关中地区的曼地亚红豆杉中分离出 26 株内生真菌,筛选获得 3 株产紫杉醇菌株,通过 HPLC 对其发酵提取物进行分析(图 2B-2D) 并对 26#菌株的发酵产物进行了 MS 分析(图 3)。并对 26#菌株菌落、菌丝体和孢子形态特征分析(图 4A-4G) 和 18S rDNA 和 ITS 序列分析(图 5A、5B) 将其鉴定为曲霉属烟曲霉真菌,并命名为“烟曲霉 TMS-26”。

烟曲霉是自然界普遍存在的丝状腐生真菌,也是条件致病菌和重要的变应原^[22]。TMS-26 菌株分类为曲霉属烟曲霉,目前产紫杉醇内生真菌已有 20 多个属,如拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis microspora*、树状多节孢 *Noduzisporium sylviforme*、链格孢菌 *Alternaria*、茎点霉属 *Phomopsis*、曲霉属 *Aspergillus niger* var 等,但关于产紫杉醇的曲霉属烟曲霉菌株只有一例,编号 EPTP-1^[23]。与本研究分离得到的烟曲霉 TMS-26 菌株相比,菌株 EPTP-1 在形态特征和 ITS 序列上存在一定差异:在形态特征上,PDA 培养基 28 °C 暗培养 5 d 后,菌株 EPTP-1 产生黑灰色分生孢子,且菌落有黄色渗出液产生;在菌株 ITS 序列比较上,经过 DNAMAN V6.0 软件比对后发现,菌株 EPTP-1 的 ITS 序列(GenBank 序列登录号为

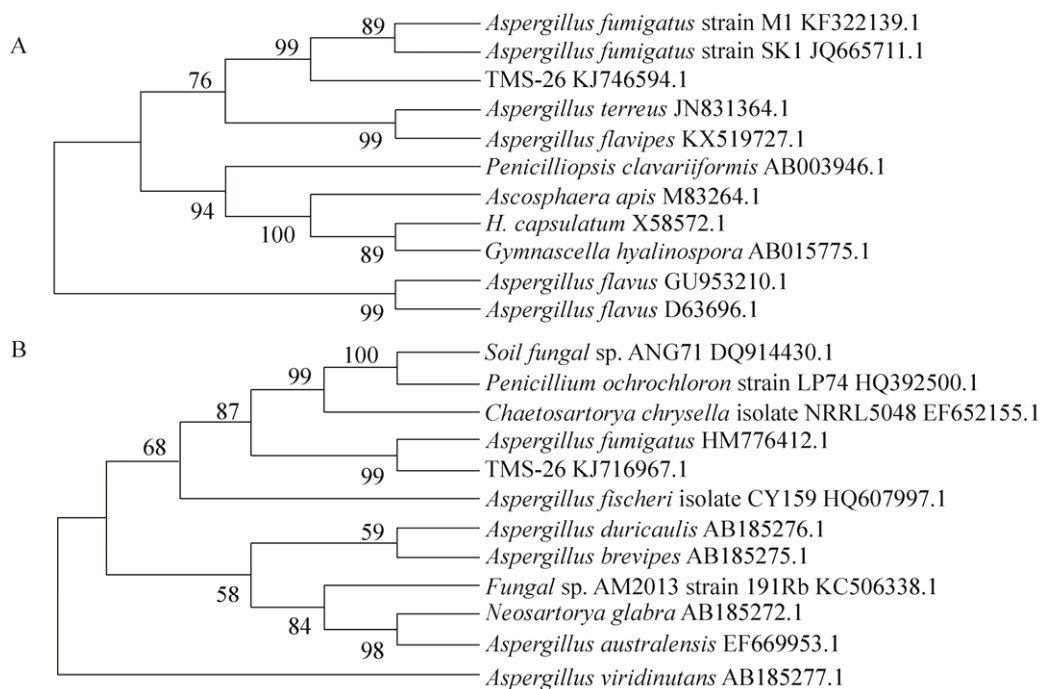


图 5 26#菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain 26#. (A) Phylogenetic trees showing relationship of strain 26# with other related fungal species retrieved from GenBank based on their sequence homologies of 18S rDNA sequence. (B) Phylogenetic trees showing relationship of strain 26# with other related fungal species retrieved from GenBank based on their sequence homologies of ITS sequence.

EU256469) 与烟曲霉 TMS-26 菌株的 ITS 序列拥有 91% 的序列同源性。综合两个菌株形态特征和 ITS 序列比较结果可知, 本研究分离得到的烟曲霉 TMS-26 菌株和菌株 EPTP-1 属于两个不同的菌株。本研究首次报道了从曼地亚红豆杉中分离出产紫杉醇的曲霉属烟曲霉菌株, 这丰富了产紫杉醇内生真菌的种群资源, 为寻找适合人工修饰的产紫杉醇原始出发菌株奠定了基础^[24-25]。但 *Aspergillus fumigatus* TMS-26 的发酵潜能以及发酵产物的生物学活性尚未明确, 有待进一步研究。

REFERENCES

[1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol,

a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.

[2] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature, 1979, 277(5698): 665-667.

[3] Li W, Tang YX, Wan L, et al. Effects of combining taxol and cyclooxygenase inhibitors on the angiogenesis and apoptosis in human ovarian cancer xenografts. Oncol Lett, 2013, 5(3): 923-928.

[4] Bray F, Znaor A, Cueva P, et al. Planning and developing population-based cancer registration in low- and middle-income settings. IARC Technical, 2015: 1-31.

[5] Wheeler NC, Jech K, Masters S, et al. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. J Nat Prod, 1992, 55(4): 432-440.

[6] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science, 1993, 260(5105): 214-216.

- [7] Gond SK, Kharwar RN, White Jr JFW. Will fungi be the new source of the blockbuster drug taxol? *Fungal Biol Rev*, 2014, 28(4): 77–84.
- [8] Kusari S, Singh S, Jayabaskaran C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2014, 32(6): 304–311.
- [9] Jin R, Kang JC, Wen TC, et al. A study on optimal fermentation of an endophytic fungus producing taxol. *Mycosystema*, 2011, 30(2): 235–241 (in Chinese).
靳瑞, 康冀川, 文庭池, 等. 一株产紫杉醇内生真菌液体发酵工艺的优化. *菌物学报*, 2011, 30(2): 235–241.
- [10] Strobel G, Yang X, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 1996, 142(Pt2): 435–440.
- [11] Zhuang XL, Yu SH, Wang RW, et al. Detection of taxol by TLC-UV spectrophotography. *Biotechnology*, 2001, 11(1): 45–47 (in Chinese).
庄晓蕾, 于树宏, 王人为, 等. TLC-紫外分光光度法定量检测紫杉醇. *生物技术*, 2001, 11(1): 45–47.
- [12] Zhang D, Yang Y, Castlebury LA, et al. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 145(2): 261–265.
- [13] Garyali S, Kumar A, Reddy MS. Diversity and antimutagenic activity of taxol-producing endophytic fungi isolated from Himalayan yew. *Ann Microbiol*, 2014, 64(3): 1413–1422.
- [14] Zhu D, Wang J, Zeng Q, et al. A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Sif14, isolated from *Huperzia serrata*. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(4): 1469–1478.
- [15] Gu Y, Wang YL, Ma XP, et al. Greater taxol yield of fungus *Pestalotiopsis hainanensis* from dermatitic scurf of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(1): 155–165.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [17] Wei JC. *A Manual for Fungi Identification*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 560–733 (in Chinese).
魏景超. *真菌鉴定手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 560–733.
- [18] Zhao K, Zhou DP, Ping WX, et al. Study on breeding up high-yield strain of taxol by protoplast mutagenesis. *Chin J Biotech*, 2005, 21(5): 848–851 (in Chinese).
赵凯, 周东坡, 平文祥, 等. 产紫杉醇菌株原生质体诱变育种的研究. *生物工程学报*, 2005, 21(5): 848–851.
- [19] Zhao K, Yu L, Jin YY, et al. Advances and prospects of taxol biosynthesis by endophytic fungi. *Chin J Biotech*, 2016, 32(8): 1038–1051.
赵凯, 宇璐, 金昱言, 等. 内生真菌紫杉醇生物合成的研究现状与展望. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1038–1051.
- [20] Zhou XW, Zhu HF, Liu L, et al. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1707–1717.
- [21] Ren N. Genetic diversity analysis and biotransformation research among endophytic fungi from *Taxus* [D]. Hunan: Central South University, 2011 (in Chinese).
任娜. 红豆杉内生真菌遗传多样性分析及生物转化研究[D]. 湖南: 中南大学, 2011.
- [22] Wang Q, Li RY, Liu W. The progress in antifungal resistance of pathogenic *Aspergillus* spp. *J Microbes Infect*, 2015, 10(2): 116–121 (in Chinese).
王千, 李若瑜, 刘伟. 致病性曲霉的耐药性研究进展. *微生物与感染*, 2015, 10(2): 116–121.
- [23] Sun RF, Ran XQ, Wang JF. Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiol Sin*, 2008, 48(5): 589–595 (in Chinese).
孙端方, 冉雪琴, 王嘉福. 一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定. *微生物学报*, 2008, 48(5): 589–595.
- [24] Ashkezari SJ, Fotouhifar KB. Diversity of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata*, L.) in Iran. *Mycol Prog*, 2017, 16(3): 247–256.
- [25] Li Y, Zhang G, Pfeifer BA. Current and emerging options for taxol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 148: 405–425.

(本文责编 陈宏宇)