

产紫杉醇真菌的研究概况与紫杉醇工业生产的一个新思路

Taxol-producing Fungi : a New Approach to Industrial Production of Taxol

纪 元 毕建男 严 冰 朱旭东*

Ji Yuan ,BI Jian-Nan ,YAN Bing and ZHU Xu-Dong*

天津南开大学生命科学学院微生物学系 300071

Department of Microbiology , College of Life Sciences , Nankai University , Tianjin 300071 , China

摘 要 分离自太平洋红豆杉的天然抗癌药物紫杉醇(Taxol)已在临床上广泛应用,市场需求日益增强,但工业产量受原料红豆杉树木短缺的制约,供需存在巨大差距。1993年,Stierle等分离到一株与太平洋红豆杉共生的真菌-安德烈紫杉菌,证实产生紫杉醇,为利用真菌发酵生产紫杉醇带来可能。通过分析目前工业生产技术存在的问题,总结了产紫杉醇真菌研究的进展及其重要意义。认为利用真菌大规模发酵生产紫杉醇或其中间体,是摆脱制约的一条新思路,具有广阔的应用前景,并且可以带动其他产品的开发。

关键词 紫杉醇,内共生真菌,小孢拟盘多毛孢,树状多节孢

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0001-06

Abstract Produced by and purified from *Taxus brevifolia*, Taxol (paclitaxel) has become a widely used cancer drug in clinic. Due to the rapid growing market, current industrial production of taxol by semi-synthesis that consumes large amount of Taxus trees cannot meet the requirement of the market. The discovery of taxol-producing fungus *Taxomyces andeanae*, an endophyte of *T. brevifolia*, by Stierle *et al* (1993), paves a new way to the production of the drug, *i. e.* employing large-scale fungal fermentation to make Taxol at lower cost and yet higher yield. This review discusses the present problems in taxol production in pharmaceutical industry, the finding and research progress on taxol-producing fungi, and the potential application of fungal fermentation to manufacture this important drug.

Key words taxol, endophytic fungi, *Pestalotiopsis microspora*, *Nodulisporium sylviforme*

紫杉醇(Paclitaxel,商品名Taxol)是一种复杂的天然的抗癌药物,属于二萜生物碱,其基本结构由浆果赤霉素Ⅲ(baccatinⅢ)和连接其13位碳上一苯丙氨酸衍生物构成(图1)。紫杉醇发现到临床应用大约经历了30年的时间^[1,2]。上世纪50年代末,美国国家癌症研究所(NCI)制订了一项从全美植物中

筛选抗癌活性物质的庞大计划^[1]。受该计划资助,Wall和Wani于1963年从太平洋红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中提取出紫杉醇粗提物^[5],1966年,紫杉醇得到纯化,并确定了它的结构^[2]。随后几年,证明其对B16黑色素瘤等有很强的活性^[3]。Schiff和Horwitz于1979年阐明紫杉醇特异性结合于分裂中

Received : November 14 , 2005 ; Accepted : November 22 , 2005 .

This work was supported by a grant from Nankai University(No. J02704).

* Corresponding author. Tel : 86-22-23505723 ; E-mail : xudong82@nankai.edu.cn

南开大学引进人才项目(No. J02704)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的细胞如癌细胞的微管束蛋白,尤其是 β -微管蛋白^[4]。1992年12月29日,美国食品药品监督管理局(FDA)终于批准Bristol-Myers-Squibb(BMS)公司将紫杉醇上市,商品名为Taxol,用于治疗卵巢癌和乳腺癌^[5]。此后,临床上陆续发现紫杉醇一些新作用,其中包括与抗艾滋病药物合用可治疗卡波济氏肉瘤(一种艾滋病病人特有的恶性肿瘤),还对结、直肠癌、膀胱癌和转移性乳腺癌等一系列的棘手肿瘤,对肺癌、头部和颈部肿瘤、恶性黑色素瘤和肉瘤等,均展现出一定疗效^[6]。此外,临床上还观察到它对其他疾病的治疗也有一定的应用潜力,例如,它具有抗类风湿性关节炎、抗疟的作用,对中风、早老性痴呆和先天性多囊肾病也有一定的疗效^[6]。紫杉醇已经广泛使用,成为抗肿瘤的主流药物之一。更为重要的是,美国已开始批准生产紫杉醇的通用名药制剂产品,这意味着紫杉醇在已不再是BMS公司独家产品。

但是,由于原料和生产技术的限制,全球紫杉醇产量严重不足,远远不能满足市场需求,因此价格昂贵。据所掌握的资料显示,我国市场上纯品紫杉醇的售价在每千克300~500万元人民币之间,这样的价格,让许多癌症病患者望而却步。近10多年来,全世界的科学家和制药界都在寻找新的更为丰富的生产原料,改善紫杉醇提纯技术,以提高产量。其中,最重要的进展应当是产生紫杉醇真菌的发现,为这一重要药物的研究和工业生产开辟了新途径^[7,8]。

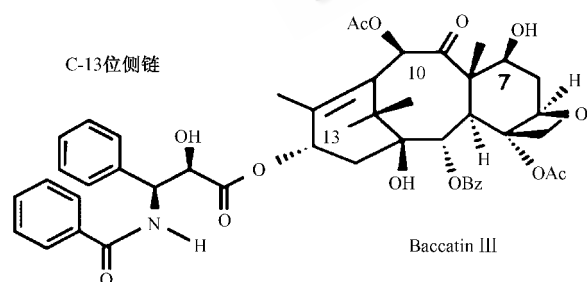


图1 紫杉醇化学结构

C-13 侧链连接于 Baccatin III 核的 13 位碳原子上

Fig. 1 Structure of paclitaxel (taxol)

C-13 side chain and baccatin III core are indicated.

1 紫杉醇工业生产现状与困境

工业生产紫杉醇的早期策略,是采用从红豆杉树木原料中直接提取的方法,由于紫杉醇含量极低,只有树木干重的0.0001%~0.008%,加之紫杉醇溶解性差,平均产量约0.015%^[9],生产1kg紫杉醇,一般需要7000kg,相当于2000~2500棵红豆杉树木的

原料^[9]。以1992年为例,Bristol-Myers Squibb为临床试验提供了16kg的紫杉醇,消耗了120万kg的红豆杉^[5]。有人估计,治疗一个卵巢癌患者需要6棵树龄60~100年的红豆杉树^[10]。随着该药品应用范围的扩大,所需红豆杉数量将十分可观,这也给红豆杉资源带来严重威胁,可能造成生态环境的严重破坏。

化学法全合成紫杉醇,已于1994年在实验室里取得了成功^[11,12],但是,紫杉醇手性基团较多,合成路线复杂,成本高、产率低,至今无法应用于工业生产。近年来,国内外学者进行了大量红豆杉愈伤组织培养和细胞悬浮培养研究,培养的红豆杉细胞系已超过10个,其中大部分已证实产生紫杉醇,但是离体培养生产紫杉醇实现工业化生产的关键问题难以突破,例如,培养物生物量小,紫杉醇产率较低,生产周期长,并且还需要保持细胞生长与生产特性的稳定等等^[13,14]。

Christen首次利用植物细胞悬浮培养技术生产紫杉醇后^[15],研究吸引了众多的实验室跟进,这方面的研究也取得了一定的进展。ESC Agenetics公司在1992年NCI主持的第二次紫杉醇研讨会上宣布他们用细胞培养法所得产物紫杉醇含量为树皮的2~5倍。中国的甘烦远等发现云南红豆杉细胞在发酵罐中生长速率达到12g/L,紫杉醇含量为0.119%,约为成年树树皮中含量的12倍,为栽培植株的40倍^[16]。但是这项技术同样存在一些问题,如培养细胞的褐化问题,虽有该技术进入生物反应器放大阶段的试验,但未见实际应用的报道,短期内成功应用的可能性较小。

国际制药公司当前较普遍采用的生产技术则是生化半合成法^[7,16a]。对东北红豆杉(*T. cuspidate*)紫杉醇生成的分子生物学研究表明,紫杉醇合成大致可分为三个主要的生物合成阶段:1)紫杉烷环baccatin III母核中间体的合成;2)C-13位侧链中间体的合成;3)紫杉烷环和侧链的酰化反应,形成完整的紫杉醇分子^[5]。Baccatin III和C-13位侧链中间体独立合成,可以稳定存在,而且水溶性较好。依据这一特点,利用生物酶类将红豆杉原料进行处理,使baccatin III和C-13位侧链中间体得到一定程度富集,然后提取这些较易溶解的前体,最后利用酶法或化学法将这些前体合成成品紫杉醇^[5]。半合成法虽然提高了紫杉醇产量,但与直接提取紫杉醇的办法并无本质上区别,仍然需要消耗大量红豆杉树木,为此BMS公司开辟了3000万株红豆杉种植场。

综上所述,国际市场上至今仍沿用 10 年前确立的紫杉醇原料药两大制备方法(即红豆杉树皮提取法和树枝提取-半合成法),迄今为止尚未见有第三种方法形成大规模工业化生产的报道。由此可见,紫杉醇的工业生产受到了原料和技术两方面的制约,短期内难以突破。

2 产紫杉醇真菌的发现及其意义

由于紫杉醇的市场供应受制于原料来源和制备技术两方面的制约,使得药价昂贵。为此,制药界和学术界一直在寻找新的更好的原料及方法,来代替现有的生产技术,以提高紫杉醇的产量、满足临床需求。过去十余年中取得的最有意义的进展,是发现了与红豆杉等裸子木本植物共生的一些真菌产生紫杉醇,并且其化学结构和生物活性与红豆杉所产紫杉醇完全相同^[3,17]。

1993 年,Stierle 等从太平洋红豆杉的韧皮部分离到 1 株内生真菌-安德烈紫杉菌(*Taxomyces andreanae*)经培养,采用质谱、色谱(TLC/HPLC)和放射性化学标记等方法,发现该菌的发酵液中存在紫杉醇,尽管产量较低,每升发酵液含紫杉醇 24 ~ 50 ng。同时还证实,这些真菌紫杉醇与红豆杉紫杉醇结构和性质完全一样^[3,17]。随后,许多人分离到不同的产紫杉醇的真菌,例如,Strobel 等从西藏红豆杉枝条上分离到一株小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*),紫杉醇的产量比安德烈紫杉菌高出 1000 多倍,达到每升发酵液含 60 ~ 70 μg ^[18];Li 等从落叶松上分离到 16 个小孢拟盘多毛孢菌株,其中 9 个能产生紫杉醇,有一个产量达每升培养液含 1487 ng 紫杉醇^[19,20]。另外,在红豆杉树以外的树种中,研究人员也分离到产紫杉醇的内生真菌。Strobel 在澳大利亚发现一种松树 *Wollemia nobilis* 上的内生斑污拟盘多毛孢也能分泌紫杉醇^[21];Li 等从秃柏(*Taxodium distichum*)的树皮、韧皮部和木质部中都分离出产紫杉醇的内生真菌^[20]。

我国境内也发现了多种产紫杉醇的内生真菌,自邱德有等^[22]首先从云南红豆杉(*T. yunnanensis*)的树皮中分离出一株可产紫杉醇的内生真菌之后,在我国分布的红豆杉中,均分离到产紫杉醇的真菌^[23,24,25]。例如,国内黑龙江大学生命科学院周东坡小组首先从东北红豆杉(*T. cuspidate*)的树皮中分离、筛选出一株紫杉醇产生量十分可观的菌种,经鉴定是树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*),为我国新纪录属^[26,27]。本文作者从云南、华北和东北采

集到的 309 株内生共生真菌中,分离到 3 株产紫杉醇真菌(毕建男等,未发表)。这些发现表明我国具有丰富的产紫杉醇真菌资源,为开展紫杉醇相关研究和开发提供了良好的条件。据统计,国内外已报道的产生紫杉醇真菌种类已超过 30 种,这些真菌绝大多数是子囊菌或半知菌,而且大都是红豆杉内生菌^[23]。

如此众多的产紫杉醇真菌的报道,向人们强烈预示,真菌界是紫杉醇资源的宝库,具有重大的研究和开发价值,是解决目前原料来源限制的一条新路。红豆杉及其共生真菌产生相同的次生代谢产物,提出了一个显而易见的问题,即这两类属于不同界的物种合成紫杉醇的代谢途径是否相同?换言之,两个途径中参与紫杉醇合成的酶及其编码基因是否相同或具有同源性?因此,对产紫杉醇的真菌进行深入研究,不仅有实际意义,而且有助于解开红豆杉与内生共生真菌的物质和信息交流的机制,提供共生物种在长期的进化过程中相互作用的有用知识。

3 真菌紫杉醇合成的分子生物学研究

阐明紫杉醇分子的生物合成(biosynthesis)途径本身具有重要的生物学意义,也将为解决以下实际应用问题奠定基础,即:1)合成的诱导条件和调控规律;2)合成途径的限速步骤及改进方法;3)高产工程菌株的构建。但是,在红豆杉或真菌中,紫杉醇的合成途径仍然未知^[28]。过去几年,得益于红豆杉细胞培养技术的成功,Croteau 及其同事在这方面取得了较大的进展^[28,29]。他们从 *T. cuspidate* 中克隆了近 10 个与紫杉醇合成相关的基因,并根据紫杉醇的化学结构推测其合成途径由 19 步酶促反应组成^[28]。由于红豆杉的遗传背景知识较少,分子生物学工具相对缺乏,在红豆杉中还无法进行基因敲除,对克隆基因的鉴定,只能通过酿酒酵母表达后,研究其蛋白产物所催化的生化反应来加以验证^[30]。

相对于红豆杉紫杉醇研究的较快进展,真菌中紫杉醇合成代谢途径还一无所知,到目前,没有任何与紫杉醇合成相关基因克隆的报道。但是,对真菌紫杉醇的研究已经受到国内外专家重视。可以预见,利用真菌个体易培养、基因组较小,容易进行分子生物学操作等优越性,该领域将会很快有所突破。目前,国内外对两种产紫杉醇真菌的分子生物学研究较多,即小孢拟盘多毛孢和树状多节孢,现将研究情况介绍如下。

3.1 小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*)

P. microspora 过去一直认为是一种植物致病菌,中国科学院微生物研究所联合编辑部

广泛存在于热带、亚热带雨林,从树的茎、叶、花、果实中都分离到这种真菌^[31]。产紫杉醇菌株 *P. microspora* NE-32 首先是从尼泊尔境内喜马拉雅山下采集的西藏红豆杉(*T. wallachiana*)树枝中分离出来的一种内生真菌^[18]。此后,不同的作者报道了多株 *P. microspora* 产生紫杉醇及其他丰富的次生代谢产物^[32, 33, 34],从而引起人们对该真菌的极大兴趣。

Long 等人建立了 *P. microspora* 的 DNA 原生质体转化方法^[35],将含有潮霉素(hygromycin)抗性基因的质粒,通过原生质体/PEG 法转化到 *P. microspora* NE-32 中,得到 50~1000 个抗性转化子/每 μg 质粒 DNA。值得注意的是,被转化的 DNA 在细胞内全部形成了独立于染色体之外的、可复制的线型 DNA 分子,其两端加上了不同拷贝数的端粒重复序列 5'-TTAGGG-3',但这些 DNA 分子上未检测到其他染色体 DNA 序列。每个转化子含有 3~6 个拷贝的转化的 DNA 分子。遗传稳定性试验表明,在潮霉素选择培养基中,每七天转接一次,这些片段在 6 个月内都没有发生任何结构变化,说明染色体外 DNA 片段保持了复制能力。然而在没有选择的情况下,20 d 后全部丢失。把带有端粒末端重复顺序的 DNA 进行 PCR 扩增,再转化进野生型 *P. microspora* 中,其转化效率较未进行端粒末端重复顺序修饰的质粒载体提高 10~50 倍。但是,作者未对含有 *P. microspora* 基因组 DNA 进行同源重组的实验,因此无法知道在该菌中敲除基因的可行性。

本文作者对一株产紫杉醇的 *P. microspora* NK101 原生质体转化方法也进行了摸索,发现崩溃酶(Driselase)(Sigma, St. Louis, MI, USA)能有效降解其细胞壁,10 mg/mL, 32℃ 保温 2 h,能产生大量原生质体,同时也释放出大量未知脂质物质,影响 DNA 转化效率(纪元等,未发表)。

Metz 等人诱导出 *P. microspora* NE-32 的有性阶段,其有性型为 *Pestalotia hanseni*。子囊壳产生需要较严格的条件,在石竹叶水琼脂平板上,16~20℃、每天至少光照 1 h,3~6 星期产生子囊壳。*P. microspora* 属于同配型(homothallic)子囊菌。有性型的发现将有利于经典遗传方法的使用^[36]。

3.2 树状多节孢(*N. sylviforme*)

在国外报道 *Taxomyces andreanae* 产紫杉醇后不久,我国科学家立即找到类似真菌。随后,在紫杉醇产生菌资源和育种方面也取得了可喜的进展。黑龙江大学周东坡小组从东北红豆杉中分离到 3 株紫杉醇产生菌,其中 2 株(HQD33、HQD48)^[37]经鉴定属于

树状多节孢(*N. sylviforme*),为中国的新记录属和新记录种^[26]。紫杉醇产量最初经高效液相色谱测定为 51.06~125.70 $\mu\text{g/L}$,较 1993 年以前报道的其它菌种发酵单位高,是一种很有前途的紫杉醇产生菌。

周东坡等成功制得树状多节孢的原生质体和 DNA^[27],通过原生质体诱变提高紫杉醇产量,达到 418 $\mu\text{g/L}$ 发酵液,并对高产菌株和出发菌株间的遗传差异进行分析,发现紫杉醇高产株与出发株在 RAPD 图谱中所呈现出的明显的 DNA 差异^[38, 39],表明诱变菌株紫杉醇产量的提高是基因突变的结果。为了进一步分析此差异的规律性,还需对出发菌株和更多的原生质体诱变菌株之间的遗传差异进行分析,以了解哪些基因位点发生了突变以及与紫杉醇产量的联系。赵凯等观察到诱变后的菌株的紫杉醇产量增加与菌株兑制霉素(nystatin)抗性呈正相关性^[39]。

应该指出的是,对产生紫杉醇真菌的分子生物学才刚刚开始,许多问题需要解决,以树状多节孢为对象,高效 DNA 转化系统、遗传标记、遗传杂交系统等,均有待建立。

4 产紫杉醇真菌的工业应用前景

正如前文所述,利用目前的紫杉醇生产技术,即从红豆杉原料中提取紫杉醇或其中间体的方法,不能满足市场需求,亟待解决的一个问题是原料短缺。真菌发酵生产紫杉醇、或中间体,是解决这个问题的有效途径。微生物发酵工业是我国的传统工业,有良好的基础,在我国开展产紫杉醇真菌的研究,推动其工业化生产有独特的优势,在国际上率先实现发酵生产紫杉醇是完全有可能的。一旦实现紫杉醇发酵生产,药品的价格就会大幅度降低,这对成千上万的癌症患者,无疑是一个福音。

发酵过程可以提供微生物最佳生长、繁殖条件,并能人为控制培养规模、周期较短,从而提高产量。丝状真菌深层发酵工艺在我国已相当成熟,它比植物细胞培养容易得多,真菌的培养基简单,原料来源充足,生产成本较低。而且,小孢拟盘多毛孢能分泌紫杉醇到培养介质中,其代谢产物相当单一,为后处理提供了极大方便^[18]。总之,真菌的大规模工业发酵生产紫杉醇具有诱人的发展前景,将产生巨大的市场效益和社会效益。

如果对这一类群真菌的工业化研发取得成功,还会带动相关新产品的开发,例如,在紫杉醇合成中有多步手性酶参与,这些酶类可能有许多新的用途。

具有开发价值,还有如紫杉醇合成途径中的一些前体化合物的开发利用等。

但是,要达到发酵生产的要求,还存在一些问题。例如:1)必须具有良好的适合于发酵的工业菌株。目前报道的菌株大多是红豆杉共生菌,一般菌丝体不发达,影响总产量。要解决这一问题,需要从两方面入手,其一,从自然界中继续寻找更好的适合发酵的原始菌株;其二,对现有菌株进行改造,使其能够产生大量菌丝体。2)提高单位培养液中紫杉醇的含量。到目前为止,已报道的最高产率仍然只在微克级。经过计算,若要实现工业化生产,必须获得毫克级水平的紫杉醇产率,才能获得利润。因此,对现有菌株进行改造,或者寻找高产原始菌株都是当务之急。赵凯等通过理化方法,如UV、EMS等,对出发菌株树状多节孢 NCEU-1 的产率提高了近 100 $\mu\text{g/L}$ ^[39]。随着基因组学/蛋白组学和代谢组学的快速发展,有目的地、精确地改造微生物菌株成为可能。而对真菌紫杉醇合成途径的研究,弄清紫杉醇合成的分子生物学基础、调控机制等过程,是改造菌株的前提。3)紫杉醇合成路线、调控规律和中间体还不清楚,影响了最佳发酵营养条件的确立。如果以溶解性较好的中间体为最终产品,则需要阐明紫杉醇合成途径,构建相应菌株。

总之,我们认为,随着研究工作的深入,利用产紫杉醇真菌进行大规模发酵生产这一重要药物,具有良好的应用前景,并可以对多种产品进行长期的、持续开发。

5 结束语

紫杉醇临床应用的成功,是天然药理学领域的一个重要事件,在学术界和临床上都产生了广泛而深刻的影响。10 多年的临床使用表明,紫杉醇的研究和利用不是已经大功告成,恰恰相反,对紫杉醇各方面的认识仅仅是开始。由于紫杉醇良好的药理特性、独特的作用机制、不断发现的新用途,乐观估计,该药会长期存在,被人们加以利用,如同青霉素等著名天然药物。随着临床用途的不断拓宽,市场需求的稳定增长,紫杉醇目前的产量无法弥补供需之间的巨大差距。产紫杉醇真菌的发现是迫切需求的结果,这一发现将为揭开天然紫杉醇生物合成步骤、高产菌株构建、工业化发酵生产这一重要药物开辟新途径,同时为充分利用我国良好发酵工业基础,形成有我国特色和优势的紫杉醇产业带来希望。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zubrod CG, Schepartz SA, Leiter J *et al.* The chemotherapy program of the NCI: history, analysis, and plans. *Cancer Chemother Rep.* 1966, **50**: 349 – 355
- [2] Wani MC, Taylor HL, Wall ME *et al.* Plant antitumor agents VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J AM Chem Soc*, 1971, **93**: 2325 – 2327
- [3] Wall ME, Wani MC, Taylor HL. Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants. *Cancer Treat Rep*, 1976, **60**: 1011 – 1014
- [4] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*, 1979, **277**(5698): 665 – 667
- [5] Patel RN. Tour De Paclitaxel: biosynthesis for semisynthesis. *Annu Rev Microbiol*, 1998, **98**: 361 – 395
- [6] Croom EM. Taxus for taxol and taxoids. In *Taxol: Science and Applications*, ed. M Suffness, pp. 37-70. Boca Raton, FL: CRC, 1995
- [7] Stone R. Surprise! A fungus factory for taxol? *Science*, 1993, **260**(5150): 154 – 155
- [8] Stierle A, Strobel GA, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science*, 1993, **260**(5150): 214 – 216
- [9] Vidensek N, Lim P, Campbell A *et al.* Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus* species. *J Nat Prod*, 1990, **53**(6): 1609 – 1615
- [10] Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod*, 1993, **56**(10): 1657 – 1668
- [11] Holton RA, Somoza C, Kim HB *et al.* First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J AM Chem Soc*, 1994, **116**: 1597 – 1560
- [12] Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ *et al.* Total synthesis of taxol. *Nature*, 1994, **367**(6464): 630 – 634
- [13] Edgington SM. Plant cell culture for taxol production. *Biotechnology*, 1991, **9**(10): 4782 – 4794
- [14] Gibson DM, Ketchum EB, Hirasuna TJ *et al.* Potential of plant cell culture for taxane production. In *Taxol: Science and Applications*, ed. M Suffness, pp. 71 – 95. Boca Raton, FL: CRC, 1995
- [15] Christen AA, Gibson DM, Bland J. US Patent No. 5019504, 1991
- [16] Gan FY(甘烦远). Study on cell suspension culture of *Taxus yunnanensis*. *Acta Phytophys Sinica*(植物生理学报), 1997, **23**(1): 43 – 46
- [16a] Zhang JZ, Zhang LH, Wang XH *et al.* Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1- β -hydroxy-baccatin I, by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis*. *J Nat Prod*, 1998, **61**: 497 – 500
- [17] Strobel GA, Stierle A, Stierle D *et al.* *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with

- [18] Strobel G , Yang XS , Sears J *et al.* Taxol from *Pestalotiopsis microspora* , an endophytic fungus of *Taxus walachiana* . *Microbiology* , 1996 , **142** : 435 – 440
- [19] Li JY , Sidhu RS , Bollon A *et al.* Stimulation of taxol production in liquid culture of *Pestalotiopsis microspora* . *Mycology Research* , 1998 , **102**(4) : 461 – 464
- [20] Li JY , Strobel GA , Sidhu R *et al.* Endophytic taxol producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum* . *Microbiology* , 1996 , **142** : 2223 – 2226
- [21] Strobel GA , Hess WM , Li JY *Pestalotiopsis guepinii* , a taxol producing endophyte of the wollemi pine , *Wollemia nobilis* . *Aust J Biotech* , 1997 , **45** : 1073 – 1082
- [22] Qiu DY(邱德友) , Huang MJ(黄美娟) , Fang XH(方晓华) *et al.* Isolation of an endophytic fungus associated with *Taxus yunnanensis* . *Acta Mycologica Sinica*(真菌学报) , 1994 , **13**(4) : 314 – 316
- [23] Ma YQ(马玉超) , Zhao K(赵凯) , Wang SW(王世伟) *et al.* Biological diversity of taxol-producing endophytic fungi . *J Fungal Res*(菌物研究) , 2003 , **1**(1) : 28 – 32
- [24] Zhou DF(周东坡) , Ping WX(平文祥) , Sun JQ(孙剑秋) . Study on isolation of taxol producing fungi . *J Microbiol*(微生物学杂志) , 2001 , **21**(1) : 18 – 20
- [25] Li CK(李长田) , Li Y(李玉) , Fang ZM(方浙明) *et al.* Diversity of endophytic fungi from *Taxus cuspidata* . *J Jilin Agricul Univ*(吉林农业大学学报) , 2004 , **26**(6) : 612 – 614
- [26] Zhou DF(周东坡) , Sun JQ(孙剑秋) , Yu HY(于寒颖) *et al.* *Nodulisporium* , a genus new to China . *Mycosystema*(菌物系统) , 2001 , **20**(2) : 277 – 278
- [27] Zhao K(赵凯) , Zhou D F(周东坡) , Ping WX(平文祥) . Study on the mutagenesis of Taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme* protoplast . *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) , 2004 , **24**(9) : 64 – 68
- [28] Jennewein S , Wildung MR , Chau M *et al.* Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis . *PNAS* , 2004 , **101**(24) : 9149 – 9154
- [29] Walker K , Croteau R . Taxol biosynthesis genes . *Phytochemistry* , 2001 , **58** : 1 – 7
- [30] Walker K , Long R , Croteau R . *PNAS* , 2002 , **99** : 9166 – 9171
- [31] Wei JG(韦继光) , Xu T(徐同) . Biodiversity of endophytic fungi *Pestalotiopsis* . *Biversity Science* , 2003 , **11**(2) : 162 – 168
- [32] Lee JC , Strobel GA , Lobkovsky E *et al.* Torreyanic acid : a selectively cytotoxic quinine dimmer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* . *J Org Chem* , 1996 , **61**(10) : 3232 – 3233
- [33] Li JY , Strobel GA . Jesterone and hydroxyl-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxide from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri* . *Phytochemistry* , 2001 **57** : 261 – 265
- [34] Pulici M , Sugawara F , Koshino H *et al.* Metabolites of *Pestalotiopsis* spp . , endophytic fungi of *Taxus brevifolia* . *Phytochemistry* , 1997 , **46**(2) : 313 – 319
- [35] Long DA , Smidansky ED , Archer AJ *et al.* *In vivo* addition of telomeric repeats to foreign DNA generates fungus *Pestalotiopsis microspora* . *Fungal Genetics and Biology* , 1998 , **24** : 335 – 344
- [36] Metz A M , Haddad A , Worapong J *et al.* Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora* , a taxol-producing fungus . *Microbiology* , 2000 , **146** : 2079 – 2089
- [37] Yu HY(于寒影) , Sun JQ(孙剑秋) , Zhang P(张鹏) *et al.* Identification of taxol-producing fungus HQD33 . *J Microbiology*(微生物学杂志) , 2001 , **21**(2) : 22 – 23
- [38] Zhao K(赵凯) , Ping WY(平文祥) , Ma X(马玺) *et al.* Breeding of high-yield strain of taxol by mutagenesis of protoplast and primary discussion of genetic differences between mutants and their parent strain . *Acta Microbiol Sinica* 2005 **45**(3) : 355 – 358
- [39] Zhao K , Zhou DP , Ping WY *et al.* Study on breeding up high-yield strain of Taxol by protoplast mutagenesis . *Chinese J Biotechnology* (生物工程学报) , 2005 , **21**(5) : 848 – 851