

南唐钦陵墓室腐蚀壁画丝状蓝藻的形态分析与分子鉴定

郑凌凌¹, 张琪¹, 李天丽¹, 邢伟², 蔡芳芳³, 虞功亮¹, 宋立荣¹

(1.中国科学院 水生生物研究所, 武汉 430072; 2.中国科学院大学 生命科学学院, 北京 101408;

3.武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院, 武汉 430048)

摘要:从南京市南唐钦陵墓室腐蚀壁画采集的样本中分离了一株丝状蓝藻, 该藻株与细点丝藻目(Oculatellales)细点丝藻科(Oculatellaceae)阿尔伯塔(*Albertania*)属的藻种具有相似的生境.通过形态观察和分子系统发育分析, 结果表明: (1)该藻株藻丝体直, 或弯曲盘绕, 无明显收缩, 具鞘.鞘无色, 紧贴着丝状体, 细胞长短于宽, 不产生异形胞和厚壁孢子.胞内具 8~14 条的侧生类囊体, 与阿尔伯塔(*Albertania*)属具有相似的形态特征; (2)通过 16S rDNA 序列的分析, 发现该藻株与阿尔伯塔(*Albertania*)属相似性达 98.06%, 在进化上聚为一支; 这是国内首次对墓穴特殊生境中的蓝藻进行分离, 并采用形态和分子系统发育并结合生态学特征分析, 鉴定的蓝藻新记录属, 对于文物保护研究及丰富蓝藻的多样性具有重要意义.

关键词:壁画; 阿尔伯塔; 蓝藻; 分类; 新记录

中图分类号: Q949.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2025)04-0118-06

墓室、洞窟经考古挖掘后, 由于室内高湿环境加上游客增多, 空气及灰尘中的藻类及真菌孢子常在这些室内的岩画、壁画繁殖滋生, 遮盖壁画、岩画上的图案, 使其无法辨认, 严重损害这些壁画、岩画的考古研究价值和观赏价值^[1-2].由于不同壁画制作材料及保存环境不同, 滋生的藻类及其他微生物的种类也不同, 因此近年来洞窟、墓室等这些特殊生境中的藻类备受关注^[3].这些特殊生境中的藻类以气生蓝藻为优势种类, 这些藻种的分离与鉴定对于文物保护研究及丰富蓝藻的多样性具有重要意义.

传统的蓝藻分类系统是根据藻种的形态特征, 采用植物学命名法则进行命名和描述的, 但由于有些藻种缺乏典型的形态鉴定特征, 因此给蓝藻鉴定工作带来很大的困难.而随着现代分子分析技术的发展, 越来越多的研究利用 16S rDNA 基因测序对蓝藻进行分类^[4-5], 通过分子分析证明蓝藻并非单系, 而是多系的, 因此以系统发育分类为基础, 结合形态学和生态特征的多相法在蓝藻分类中得到广泛应用^[6-7], 已成为蓝藻分类学修订的基础和最佳方法.从 2014 年到 2022 年, 多相法的应用已促进了 80 多个新属的新分类群的建立^[8].

南唐两座陵墓是中国五代十国时期最大的帝王陵墓群, 对研究唐宋时期的建筑、帝王陵墓制度和艺术都具有重要意义.自发掘开发以来, 由于人为活动的影响, 墓室壁画上滋生大面积的苔藓、藻类、真菌等, 对壁画的观赏、研究造成严重的损害.XING 等^[9]等人通过宏基因组学方法对南唐两座陵墓之一的壁画样本进行了分析.结果表明该壁画以变形菌门、放线菌门和蓝藻门占优势.本研究从该墓室腐蚀壁画样本中分离了 1 株丝

收稿日期: 2024-05-26; **修回日期:** 2024-07-30.

基金项目:国家自然科学基金(32000166); 国家重点研发项目(2019YFC1520703).

作者简介:郑凌凌(1980—), 女, 福建永春人, 中国科学院水生生物研究所高级实验师, 研究方向为藻类收集、系统发育及生理生化, E-mail: zhengll@ihb.ac.cn.

通信作者:宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn.

引用本文:郑凌凌, 张琪, 李天丽, 等.南唐钦陵墓室腐蚀壁画丝状蓝藻的形态分析与分子鉴定[J].河南师范大学学报(自然科学版), 2025, 53(4): 118-123. (Zheng Lingling, Zhang Qi, Li Tianli, et al. Morphological analysis and molecular identification of filamentous cyanobacteria from deteriorated wall paintings of Qinling Tomb in the Southern Tang Dynasty[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2025, 53(4): 118-123. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.05.26.0001.)

状蓝藻,进行 16S rDNA 基因序列的分析,并结合形态学和生境分析,确定该藻株为蓝藻门细点丝藻目(*Oculatellales*)细点丝藻科(*Oculatellaceae*)阿尔伯塔(*Albertania*)属的种类.在 AlgaeBase 中,阿尔伯塔(*Albertania*)属目前共有 6 种.

1 材料与方法

1.1 样品的采集

样本采集于南京市南唐钦陵墓室墙壁,采集时间为 2020 年 8 月,墓室潮湿,具有冷凝水.

1.2 藻种的分离

将采集的样本放在 6 孔的无菌细胞培养板中,加入适量的 BG11 的培养基,放在 25 ℃,光照强度为 1 000 lx,光周期 12 h:12 h 的光照培养箱中,培养 2~4 周后,在孔板中取 1 滴样品,采用毛细管分离方法,挑取单根藻丝,反复清洗后,放入 48 孔细胞培养板中培养 30 d,可得到纯培养物,再将纯化的藻种转接到装有 5 mL 灭菌的 BG11 培养基的螺口试管中,保存于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,编号为 FACHB-3649.

1.3 形态观察

取少量藻丝在型号为 OLYMPUS BX53 的显微镜上进行观察,采用型号为 DP80 的 CCD 进行图像采集,拍照及数据分析通过其附带的图像分析软件 Cell Sens Standard(V 1.14)进行.随机选取 50 根藻丝测量和统计藻细胞的长和宽.

1.4 超微结构观察

取 1.5 mL 藻液离心后,用无菌培养基清洗 2 次,用戊二醛-锇酸固定后,用系列乙醇逐级脱水,脱水后的样品由中国科学院水生生物研究所分析测试中心进行包埋切片染色处理,最后在 Hitachi HT-7700 型透射电镜下观察、拍照.

1.5 藻细胞 DNA 的提取及 PCR 扩增、测序

取 2 mL 培养的纯藻种,用无菌水清洗 2~3 次后,DNA 提取采用植物组 DNA 提取的试剂盒,用于扩增 16S rDNA 的引物为 F1: 5'-TTGATCCTGGCTCAGGATGA-3',1480: 5'-AGTCCTACCTTAGGCATC-CCCCTCC-3'^[10],由武汉艾康健生物科技有限公司合成,PCR 扩增的反应体系为 50 μ L,包含引物 1 μ L, mix 反应液 25 μ L,模板 1 μ L,无菌去离子水 22 μ L,PCR 扩增条件,94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,35 个循环,72 ℃延伸 5 min,PCR 扩增产物用质量分数 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,检测后的样品送武汉艾康健生物科技有限公司进行测序.

1.6 系统发育分析

将测序后获得的序列通过 NCBI 上的 blast 进行比对,并从 Genbank 中下载近缘序列,在 <http://www.phylogeny.fr/>网站进行在线比对及提取保守序列.提取的保守序列使用 MEGA 7.0 进行最适模型评估,用于贝叶斯分析(BI)和最大似然法(ML)分析,ML 法模型为 K2+G+I,步展值设为 1 000,空位或缺失位点均当作配对删除(Pairwise deletion)处理,贝叶斯分析采用 MrBayesv 3.2.6 运行 10 000 000 代,每 100 代取样,剔除 25%老化样本,至平均标准偏差低于 0.01 以下,根据剩余的样本构建进化树,分枝支持率用贝叶斯后验概率表示.ML 和 BI 2 个系统发育树均以 *Microcystis* 为外类群.

2 结果与分析

2.1 阿尔伯塔(*Albertania*)属的形态特征

该属的藻种为丝状体,在固体斜面上形成黑褐色斑块藻落,在光学显微镜下(图 1),可观察到藻丝体直,或弯曲盘绕,具鞘,无色,紧贴着丝状体,无明显收缢,藻丝常随机出现断裂,有的具假分枝,细胞长短于宽,长约 1.7 μ m,宽约 2.57 μ m,顶端具 1 个圆形的细胞,不产生异形胞和厚壁孢子,其繁殖主要通过产生藻殖段.

通过透射电镜的切片观察(图 2),也可以看出该属种的细胞呈圆柱形,末端细胞圆形,通过藻殖段进行繁殖,鞘厚,胞内具 8~14 条侧生类囊体(图 2).

2.2 分子系统分析

通过上述引物扩增 FACHB-3649 藻株的 16S rDNA 基因,获得长度为 1 275 bp 的序列片段,其与阿尔伯塔(*Albertania*)属其他藻株 16S rRNA 的序列相似度为 96.86%~98.06%(表 1),与 *Albertania alaskaensis* T27、*Albertania alaskaensis* L11、*Albertania alaskaensis* KV23 这 3 个藻株相似度最高,达到 98.06%,与模式种 *Albertania skiophila* SA373 相似度达到 97.34%.基于 ML 和贝叶斯系统进化树构建方法,以 *Microcystis aeruginosa* (NR074314.1)作为外类群,选取 *Oculatella* 等 7 个属 53 条序列构建系统进化树,从图 3 可以看出在系统发育树中,FACHB-3649 与阿尔伯塔属藻株聚为一个系统进化分支,与 *Oculatella* 属亲缘关系较近,形成姐妹分支,其他几个属则单独成簇,与阿尔伯塔(*Albertania*)属亲缘关系较远,从系统进化树也可以看出 FACHB-3649 与 *Albertania skiophila* SA373、*Albertania* sp. BACA0713 形成的分支进化关系紧密,其 ML 自展值和贝叶斯后验概率分别为 94%和 1,这个结果进一步验证了 FACHB-3649 属于阿尔伯塔(*Albertania*)属.

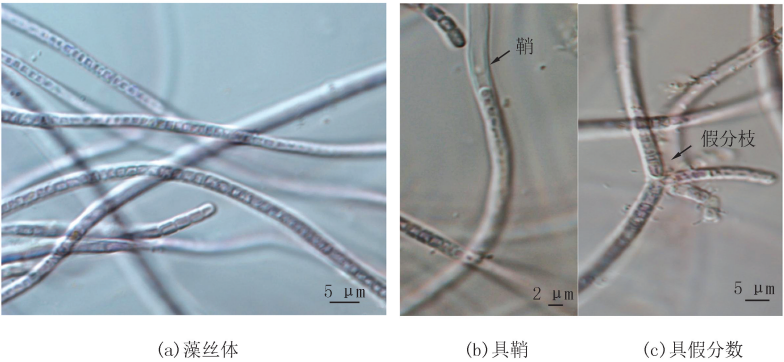


图1 FACHB-3649 在光学显微镜下的形态特征
Fig.1 Morphological characteristics of FACHB-3649

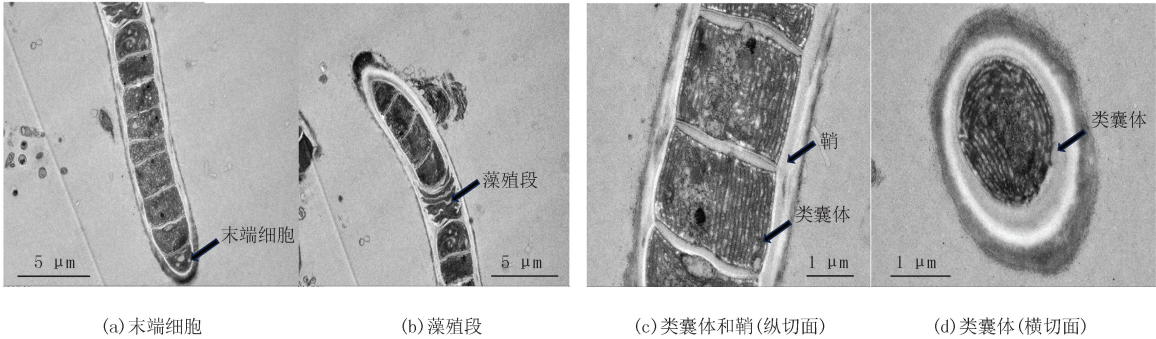
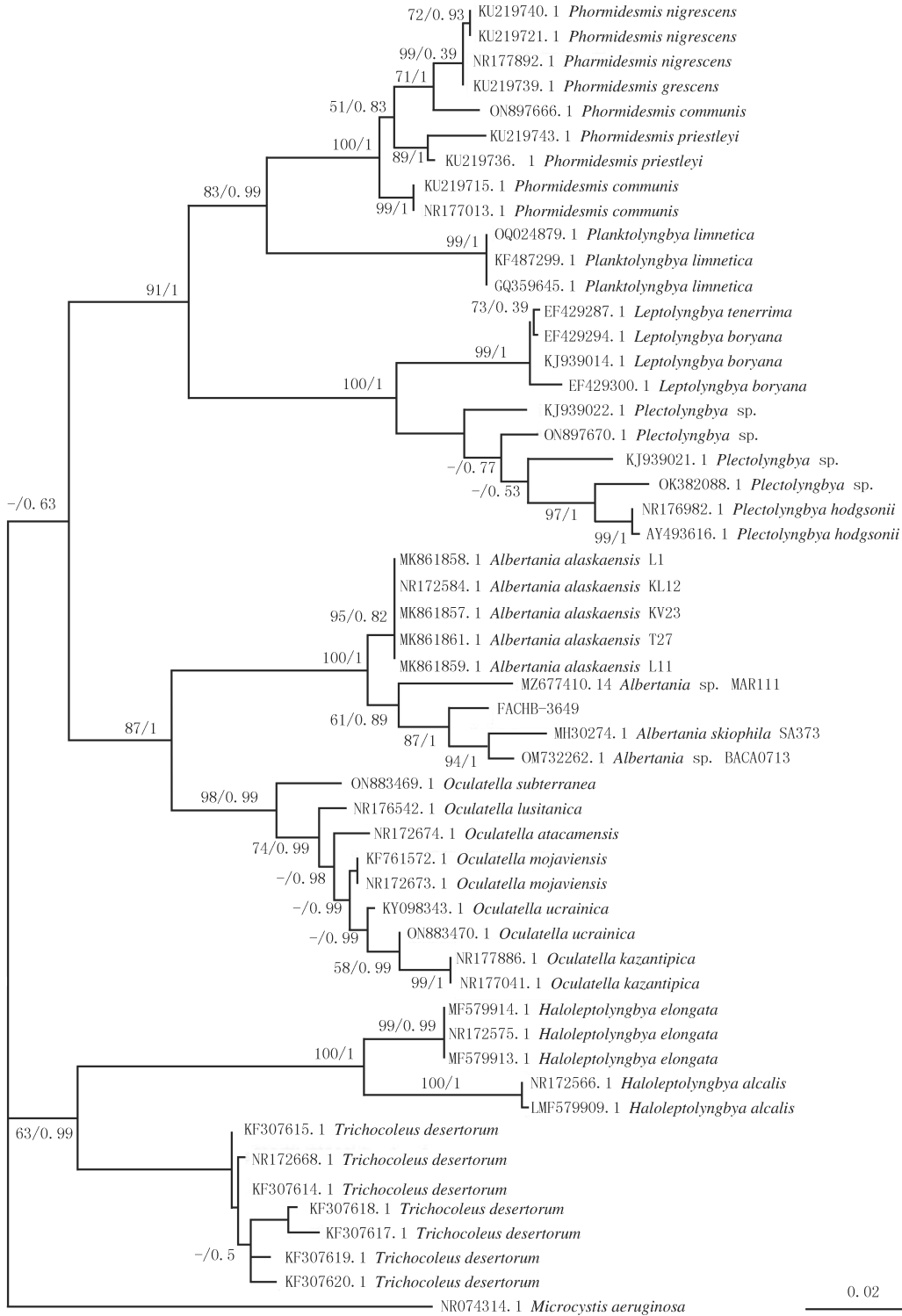


图2 FACHB-3649透射电镜图
Fig.2 Transmission electron microscope image of FACHB-3649

表 1 FACHB-3649 与阿尔伯塔属藻株 16S rDNA 序列相似度比较

Tab. 1 Sequence similarity comparison of the 16S rDNA between FACHB-3649 and *Albertania* strains

序号	藻株	1	2	3	4	5	6	7	8
1	FACHB-3649								
2	<i>Albertania alaskaensis</i> T27	98.06							
3	<i>Albertania alaskaensis</i> KL12	97.96	99.91						
4	<i>Albertania alaskaensis</i> L11	98.06	100	99.91					
5	<i>Albertania alaskaensis</i> KV23	98.06	100	99.91	100				
6	<i>Albertania alaskaensis</i> L1	98.05	100	99.91	100	100			
7	<i>Albertania</i> sp. MAR111	96.86	98.75	97.33	97.22	97.22	97.21		
8	<i>Albertania skiophila</i> SA373	97.34	93.90	96.56	93.90	93.91	93.89	96.23	
9	<i>Albertania</i> sp. BACA0713	98.04	97.44	97.58	97.44	97.47	96.41	96.81	97.92



注:以ML法构建的系统树为基础.节点数字显示大于50/50%的ML自展值和贝叶斯法后验概率.

图3 基于16S rDNA构建的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic trees based on 16S rDNA

3 讨论与结论

阿尔伯塔(*Albertania*)属是 ZAMMIT 等^[11]在对马耳他拉巴特地下墓穴的光自养生物膜研究中,根据

分子进化发育特征及藻丝形态特征,并结合生境分析,将其从聚球藻目细鞘丝藻科中分离出来的新属.根据2014 年 KOMÁREK 等^[7]提出的蓝藻分类的 8 目系统中,聚球藻目 Synechococcales 分成 11 科:Synechococcaceae、Merismopediaceae、Prochloraceae、Coelosphaeriaceae、Acaryochloridaceae、Chamaesiphonaceae、Heteroleibleiniaceae、Leptolyngbyaceae、Pseudanabaenaceae、Romeriaceae 和 Schizotrichaceae.其中细鞘丝藻科 Leptolyngbyaceae 是最大的一个科,包括 *Leptolyngbya*、*Oculatella* 等 14 个属^[12-14].近十年来,根据栖息地特征以及 DNA 序列的系统发育分析,细鞘丝藻科的分类不断修订中.2018 年 MAI 等^[14]将细鞘丝藻科划分为 4 个单系类群,其中有 2 个重新定义的科(Prochlorotrichaceae 和 Leptolyngbyaceae)以及 2 个新提出的科(Oculatellaceae 和 Trichocoleaceae),其中细点丝藻科(Oculatellaceae)是细鞘丝藻科(Leptolyngbyaceae)的姐妹分类群,包含了多种来自土壤和潮湿岩石的亚气生分类群,这个科中的一些类群是从细鞘丝藻科中分离出来的.而在最新的蓝藻分类学中,STRUNECKY 等^[8]根据蓝藻基因组及 16S rDNA 系统发育分析,将蓝藻分为 Gloeobacterales、Thermostichales、Aegeococcales、Acaryochloridales、Pseudanabaenales、Gloeomargaritales、Prochlorotrichales、Synechococcales、Nodosilineales、Oculatellales、Leptolynbyales、Geitlerinematales、Desertifilales、Oscilloriales、Coleofasciculales、Spirulinales、Chroococcales、Gomontiellales、Chroococcidiopsidales 和 Nostocales,共 20 目,细点丝藻科(Oculatellaceae)是细点丝藻目(Oculatellales)唯一的科,包含 17 属,阿尔伯塔(*Albertania*)属是其中的一个属.

阿尔伯塔(*Albertania*)属的藻种基本是气生的种类,常在潮湿弱光的土壤或者岩石、壁画表面形成带颜色的生物膜,其地理分布广泛,已报道的有 6 种,其中模式藻株 *Albertania skiophila* 这个种来自马耳他拉巴特以及意大利的地下墓穴光合生物膜^[11],*Albertania egbensis* 和 *Albertania latericola* 这两个种则来自尼日利亚的一个院子的砖头上^[15],*Albertania obscura* 这个种来自葡萄牙亚速尔群岛的一个天然火山洞穴的岩石上形成的生物膜^[16],*Albertania prattii* 这个种则来自美国黄石公园的火洞湖岸边未被水淹没的区域^[17],*Albertania alaskaensis* 这个种则是来自阿拉斯加小溪边的柳树根上^[18].

本研究对墓室腐蚀壁画分离的这株丝状蓝藻的形态结构特征及 16S rDNA 序列进行分析,并结合该属的生境特征,从而确定这株蓝藻的分类地位.这是阿尔伯塔(*Albertania*)属在我国首次报道,对于丰富蓝藻多样性研究以及后续开展腐蚀壁画保护性研究具有重要的意义.

参 考 文 献

[1] 武发思,汪万福,贺东鹏,等.嘉峪关魏晋墓腐蚀壁画真菌群落组成分析[J].敦煌研究,2013(1):60-66.
WU F S,WANG W F,HE D P,et al.The fungal community composition on mural paintings in tomb of Wei and Jin dynasty,Jiayuguan [J].Dunhuang Research,2013(1):60-66.

[2] 李强,葛琴雅,潘晓轩,等.岩画和壁画类文物微生物病害研究进展[J].生态学报,2014,34(6):1371-1378.
LI Q,GE Q Y,PAN X X,et al.Microbial deterioration in ancient cave and wall paintings[J].Acta Ecologica Sinica,2014,34(6):1371-1378.

[3] BRUNO L,BILLI D,BELLEZZA S,et al.Cytomorphological and genetic characterization of troglobitic Leptolyngbya strains isolated from Roman hypogea[J].Applied and Environmental Microbiology,2009,75(3):608-617.

[4] PERKERSON III R B,JOHANSEN J R,KOVÁČIK L,et al.A unique pseudanabaenalean(cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data(1)[J].Journal of Phycology,2011,47(6):1397-1412.

[5] 晁爱敏,于海燕,肖鹏,等.杭州湘湖拉氏拟柱胞藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)藻株的分离及其特征研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2021,49(4):106-113.
CHAO A M,YU H Y,XIAO P,et al.Isolation and characterization of a *Cylindrospermopsis raciborskii* strain from lake xianghu, Hangzhou[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2021,49(4):106-113.

[6] 李仁辉,程耀,耿若真,等.蓝藻拟柱胞藻(*Cylindrospermopsis*)和尖头藻(*Raphidiopsis*)的分与合[J].河南师范大学学报(自然科学版),2022,50(3):39-46.
LI R H,CHENG Y,GENG R Z,et al.Taxonomic separation and combination of cyanobacterial Genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis*[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2022,50(3):39-46.

[7] KOMÁREK J,KAŠTOVSKÝ J,MAREŠ J,et al.Taxonomic classification of cyanoprokaryotes(cyanobacterial Genera) 2014, using a polyphasic approach[J].Preslia,2014,86(4):295-335.

[8] STRUNECKY O,IVANOVA A P,MAREŠ J.An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and

- polyphasic analysis[J].Journal of Phycology,2023,59(1):12-51.
- [9] XING W,QI B J,CHEN R L,et al.Metagenomic analysis reveals taxonomic and functional diversity of microbial communities on the deteriorated wall paintings of Qinling Tomb in the Southern Tang Dynasty,China[J].BMC Microbiology,2023,23(1):140.
- [10] ZHANG H,JIANG Y G,ZHOU C,et al.Occurrence of mycosporine-like amino acids(MAAs) from the bloom-forming cyanobacteria Aphanizomenon strains[J].Molecules,2022,27(5):1734.
- [11] ZAMMIT G.Systematics and biogeography of sciophilous cyanobacteria: an ecological and molecular description of *Albertania skiophila* (Leptolyngbyaceae) gen. & sp. nov[J].Phycologia,2018,57(5):481-491.
- [12] ZAMMIT G,BILLI D,ALBERTANO P.The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (Oscillatoriales,Cyanophyceae) gen.et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description[J].European Journal of Phycology,2012,47(4):341-354.
- [13] SCIUTO K,MOSCHIN E,MORO I.Cryptic cyanobacterial diversity in the giant cave(Trieste,Italy): The New Genus *Timaviella* (Leptolyngbyaceae)[J].Cryptogamie, Algologie,2017,38(4):285-323.
- [14] MAI T,JOHANSEN J R,PIETRASIAK N,et al.Revision of the Synechococcales(Cyanobacteria)through recognition of four families including Oculatellaceae fam.nov.and Trichocoleaceae fam.nov.and six new Genera containing 14 species[J].Phytotaxa,2018,365(1):1.
- [15] AKAGHA M U,PIETRASIAK N,BUSTOS D,et al.Albertania and Egbenema gen.nov.from Nigeria and the United States,expanding biodiversity in the Oculatellaceae(cyanobacteria)[J].Journal of Phycology,2023,59(6):1217-1236.
- [16] LUZ R,CORDEIRO R,KAŠTOVSKÝ J,et al.New terrestrial cyanobacteria from the Azores Islands:description of Venetifunis gen.nov. and new species of Albertania,Kovacikia and Pegethrix[J].Phycologia,2023,62(5):483-498.
- [17] KAŠTOVSKÝ J,JOHANSEN J R,HAUEROVÁ R,et al.Hot is rich:an enormous diversity of simple trichal cyanobacteria from Yellowstone hot springs[J].Diversity,2023,15(9):975.
- [18] STRUNECKY O,RAABOVA L,BERNARDOVA A,et al.Diversity of cyanobacteria at the Alaska North Slope with description of two new genera:Gibliniella and Shackletoniella[J].FEMS microbiology ecology,2020,96(3):fiz189.

Morphological analysis and molecular identification of filamentous cyanobacteria from deteriorated wall paintings of Qinling Tomb in the Southern Tang Dynasty

Zheng Lingling¹, Zhang Qi¹, Li Tianli¹, Xing Wei², Cai Fangfang³, Yu Gongliang¹, Song Lirong¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China; 3. School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430048, China)

Abstract: A filamentous cyanobacteria strain was isolated from deteriorated wall paintings of Qinling Tomb in the Southern Tang Dynasty. The habitat of the strain was similar with *Albertania* (Oculatellales, Oculatellaceae) genus. Through morphological and molecular phylogenetic analysis, the results showed that: (1) The filaments were straight, or curved and coiled, sheathed, without obvious restraint. The sheath was colorless, tightly attached to the trichomes. The cells were shorter than wide, no heterocytes or akinetes, 8-14 lateral thylakoids in the cell. These morphological characteristics were similar to the genus *Albertania*; (2) The 16S rDNA sequence of the strain was 98.06% similarity to the genus *Albertania* and the phylogenetic analyses based on 16S rDNA sequence showed that the strain was clustered with *Albertania*. The morphological and molecular phylogenetic evidence supported the strain to be a member of *Albertania* genus. The genus *Albertania* is the newly recorded genus in China. This was the first time to isolate cyanobacteria from tomb habitats in China, which was of great significance for the protection of cultural relics and the enrichment of the diversity of cyanobacteria.

Keywords: wall painting; *Albertania*; cyanobacteria; taxonomy; new record

[责任编辑 刘洋 赵晓华]