

稻草还田土壤病毒类群与细菌氮循环相关基因的关联

陈玮玮¹, 铁梅¹, 周昌敏², 孙丽丽², 顾文杰², 卢钰升²,
邓盾³, 徐培智^{1,2*}, 解开治^{1,2*}

(1 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃兰州 730070; 2 广东省农业科学院农业资源与环境研究所 / 农业农村部南方植物营养与肥料重点实验室 / 广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室 / 广东省土壤微生物与耕地保育工程技术研究中心, 广东广州 510640; 3 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东广州 510640)

摘要:【目的】病毒是稻田土壤微生物群落的重要组成部分, 在调节宿主群落和土壤元素生物地球化学循环过程中发挥着不可忽视的作用。探析稻草还田下稻田土壤病毒与宿主相互作用机制以及辅助代谢基因 (AMGs) 的表达, 有助于揭示病毒在稻田土壤氮循环过程中的深远影响, 为了解病毒在土壤元素生物地球化学循环过程中的作用提供新视角。【方法】长期稻草还田定位试验位于广东省惠州市, 始于 2015 年。选择稻草不还田对照 (CK)、1.1 倍稻草还田 (S1, 单季稻草还田量 7075 kg/hm²)、1.2 倍稻草还田 (S2, 单季稻草还田量 7750 kg/hm²)、1.3 倍稻草还田 (S3, 单季稻草还田量 8425 kg/hm²)、稻草全量还田 (S, 单季稻草还田量 6400 kg/hm²) 5 个处理土壤样品, 采用宏基因组和宏病毒组测序技术, 分析了稻田土壤病毒、细菌以及 AMGs 结构。【结果】稻田土壤病毒优势科为圆环病毒科 (Circoviridae)、微小噬菌体科 (Microviridae)、双生病毒科 (Geminiviridae) 和类双生病毒科 (Genomoviridae), 但仍有 84.62%~93.92% 病毒科未被分类或未知。稻草还田量对稻田土壤病毒的影响显著, S 处理中圆环病毒科 (Circoviridae) 的丰度显著增加 ($P<0.05$), S1、S2 和 S3 处理中类双生病毒科 (Genomoviridae) 的丰度显著降低, 而未分类或未知病毒科的相对丰度显著增加 ($P<0.05$)。稻田土壤优势细菌门为变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 稻草还田量和水稻生育期对土壤优势细菌门均无显著影响。共检测到 8 条病毒 contigs 携带有机氮转化基因 *glnA*、*gltD*、*gdhA* 和 *ncd2/npd*, 这些病毒 contigs 在稻草还田处理中的丰度几乎全部高于 CK。宿主预测结果表明, 2 条携带氮循环基因的病毒 contigs 宿主为假单胞菌门 (Pseudomonadota) 和放线菌门 (Actinomycetota), 其余病毒 contigs 未预测到宿主。细菌 *ncd2/npd* 基因丰度与微生物量氮含量呈显著正相关 ($P=0.015$, $n=10$), 而与铵态氮、硝态氮总量之间没有显著相关性 ($P=0.108$, $n=10$)。偏最小二乘路径模型显示, 稻草还田显著影响了稻田土壤细菌的 α 多样性 ($P<0.0007$); 细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 显著影响了稻田土壤微生物量氮的含量 ($P<0.0039$)。【结论】稻草还田显著影响稻田土壤中病毒类群的相对丰度, 促进病毒所携带的有机氮转化基因表达出更多的辅助代谢基因, 进而有利于土壤氮循环。高稻草还田量通过影响土壤病毒和细菌的 α 多样性, 间接影响细菌携带的 *ncd2/npd* 基因的相对丰度, 最终对有机氮转化过程产生重要影响。

关键词: 稻田土壤; 稻草还田; 病毒; 细菌; 氮循环相关基因

Associations between viral communities in rice straw-incorporated soil and nitrogen cycle-related genes in associated bacteria

CHEN Wei-wei¹, TIE Mei¹, ZHOU Chang-min², SUN Li-li², GU Wen-jie², LU Yu-sheng²,
DENG Dun³, XU Pei-zhi^{1,2*}, XIE Kai-zhi^{1,2*}

(1 College of Resources and Environmental Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2 Institute of Agricultural Resources and Environment, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Plant Nutrition and

收稿日期: 2024-09-28 接受日期: 2025-01-27

基金项目: 广东省农业科学院低碳农业与碳中和研究中心项目 (XT2022220); 广东省科技计划项目 (2021B1212050020); 国家自然科学基金 (42307185); 广东省自然科学基金 (2024A1515011125); 广东省重点领域研发计划项目 (2023B0202010027); “十四五”广东省农业科技创新九大主攻方向“揭榜挂帅”项目 (2023SDZG09)。

联系方式: 陈玮玮 E-mail: 2642972069@qq.com

* 通信作者 徐培智 E-mail: pzxu007@163.com; 解开治 E-mail: xiekzsau@163.com

Fertilizer in South Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation / Guangdong Engineering Research Center of Soil Microbes and Cultivated Land Conservation, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3 Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: 【 **Objectives** 】 Viruses are an important component of soil microbial communities in paddy fields, and play a non-negligible role in regulating host communities and elemental biogeochemical cycles. Exploring the interaction mechanism between viruses and hosts and the expression of accessory metabolic genes (AMGs) in paddy fields under rice straw returning is helpful to reveal the far-reaching effects of viruses on soil nitrogen cycling in paddy fields, aiming to provide a new perspective for understanding the role of viruses in the process of soil element biogeochemical cycling. 【 **Methods** 】 A long-term straw return positioning experiment has been conducted in Huizhou, Guangdong Province, since 2015. Soil samples were collected in 2023 from five treatment plots: no straw returning (CK), total straw returning (S, the amount of straw returned to the field in a single season is 6400 kg/hm²), and 1.1, 1.2, and 1.3 times of the whole straw return amount (S1, S2, and S3, the amount of straw returned to the field in a single season are 7075 kg/hm², 7750 kg/hm², 8425 kg/hm², respectively). The community composition of soil viruses and bacteria, and the relative abundances of viruses, bacteria, and AMGs involved in the nitrogen cycle process were analyzed by metagenomic and metavirome sequencing technology. 【 **Results** 】 The dominant families of soil viruses in paddy fields were *Circoviridae*, *Microviridae*, *Geminiviridae* and *Genomoviridae*, but 84.62%–93.92% of the viridae were still unclassified or unknown. S treatment increased the abundance of *Circoviridae* significantly, while S1, S2 and S3 treatments decreased the abundance of *Genomoviridae* but increased the relative abundances of unclassified or unknown viridae significantly ($P<0.05$). The dominant bacterial phylum in paddy field were Proteobacteria, Chloroflexi and Acidobacteria, and the straw return amount and the growth period of rice had no significant effect on the dominant bacterial phylum. A total of 8 viral contigs carrying the organic nitrogen transformation genes *glnA*, *gltD*, *gdhA* and *ncd2/npd*, were identified, and the abundance of these viral contigs in the straw returning treatment was almost all higher than that of CK. The results of host prediction showed that the hosts of two virus contigs carrying nitrogen cycle genes were *Pseudomonas* and *Actinomycetota*, while the hosts for the other virus contigs were unable to predict. The abundance of bacterial *ncd2/npd* gene was positively correlated with microbial biomass nitrogen content ($P=0.015$, $n=10$), but not with total ammonium nitrogen and nitrate nitrogen ($P=0.108$, $n=10$). The partial least squares path model showed that straw return significantly affected the alpha diversity of soil bacteria ($P<0.0007$). The organic nitrogen transformation gene *ncd2/npd* carried by bacteria significantly affected the content of soil microbial biomass nitrogen ($P<0.0039$). 【 **Conclusions** 】 Straw returning significantly affected the relative abundance of virus taxa in paddy field, which could promote the expression of more AMGs encoded by viruses and play an important role in soil nitrogen cycling. By affecting the alpha diversity of soil viruses and bacteria, the amount of rice straw returned to the field indirectly affects the relative abundance of *ncd2/npd* genes carried by bacteria, and ultimately has an important impact on the organic nitrogen transformation process.

Key words: paddy soil; rice straw return; virus; bacteria; nitrogen cycle-related genes

病毒是迄今为止地球上最丰富的生物类群,广泛分布于水体和陆地环境中^[1]。但由于土壤环境的异质性和复杂性,对土壤病毒的研究面临着巨大的挑战,目前已发现的土壤病毒数量约为 4.80×10^{31} 个^[2],这可能仅仅只是冰山一角^[3]。近年来,随着宏基因组和宏病毒组等测序技术的快速发展,土壤病毒的研究焦点已从探究不同土壤中病毒的群落组成、物种

和遗传多样性^[4-7],转向评估其生态环境功能。

土壤病毒具有多种生态功能,包括调节土壤微生物群落组成、结构和功能,介导水平基因转移和表达辅助代谢基因,在碳、氮、磷等元素生物地球化学循环等过程中具有至关重要的作用^[8-9]。Zhu等^[10]报道,在珠穆朗玛峰不同海拔高度土壤中,土壤的养分状况对病毒群落组成和多样性有显著影响,

并发现有多种病毒携带碳水化合物代谢基因, 参与珠穆朗玛峰土壤碳循环。Jin 等^[11]发现, 土壤病毒可能通过编码碳水化合物活性酶 (CAZyme), 参与红树林土壤复杂多糖的生物质循环过程。Emerson 等^[12]发现, 在永久冻土融化过程中, 土壤病毒通过感染或者裂解产甲烷菌和表达辅助代谢基因编码糖苷水解酶, 来参与土壤碳循环。Huang 等^[13]也报道, 在不同的土壤养分条件下, 土壤病毒可以表达辅助代谢基因 *phoB*、*gdh*, 从而参与土壤磷、氮元素循环过程。Han 等^[14]指出农田土壤中, 病毒表达 5 种磷代谢基因 *dUTPase*、*MazG*、*phoH*、*Thy1*、*RNR*, 驱动宿主内部自身核苷酸合成, 从而影响土壤农田生态系统磷循环过程。

稻田系统是最重要的农业系统, 目前更多的研究主要集中在细菌组学特征上^[15-16], 而对稻田系统中病毒及病毒-细菌互作的相关研究仍然较少, 尤其是稻草还田条件下土壤病毒群落特征及其在氮循环过程中的作用研究较少。鉴于土壤病毒在稻田生态系统中的重要性, 本研究依托于广东省惠州市惠阳区惠阳农科服务中心试验站长期稻草还田定位试验, 通过宏基因组和宏病毒组测序技术, 比较不同量稻草还田的土壤病毒和细菌组学特征及其差异, 并探讨这种差异是否也反映在水稻生育周期上。通过分析稻草还田下稻田土壤病毒与细菌之间的联系, 以及病毒 AMGs 在氮循环过程中的作用, 以期了解土壤病毒在土壤氮素生物地球化学循环过程中的作用提供新视角。

1 材料与方法

1.1 试验点概况

长期稻草还田定位试验始于 2015 年 3 月, 试验点位于广东省惠州市惠阳区惠阳农科服务中心 (113°20'E, 23°08'N)。全年日照时数约为 2020.6 h,

平均气温为 22℃, 多年降水量为 800~1500 mm, 属于南亚热带季风气候。一年两熟, 早稻于每年三月中下旬种植, 六月底收割; 晚稻于每年 8 月上旬种植, 10 月底收割。土壤类型为赤红壤, 其基本化学性质如下: pH 5.20、碱解氮 191.50 mg/kg、有效磷 49.60 mg/kg、速效钾 149.40 mg/kg、土壤有机质 22.80 g/kg。

1.2 试验设计

试验地稻草还田模式为早稻稻草粉碎还田+晚稻稻草粉碎还田, 早稻与晚稻稻草还田量相同。田间试验设置 5 个处理: 1) 稻草不还田对照 (CK); 2) 1.1 倍稻草还田, 单季稻草还田量为 7075 kg/hm² (S1); 3) 1.2 倍稻草还田, 单季稻草还田量为 7750 kg/hm² (S2); 4) 1.3 倍稻草还田, 单季稻草还田量为 8425 kg/hm² (S3); 5) 稻草全量还田, 单季稻草还田量为 6400 kg/hm² (S)。小区面积为 72 m² (6 m×12 m), 随机区组排列。

稻草含水率为 49.2%, N、P、K 含量分别为 9.20、2.12 和 16.42 g/kg。每个处理化肥用量除了钾肥 (氯化钾, K₂O 60%) 略有差异外, 氮肥 (尿素, N 46%) 和磷肥 (钙镁磷肥, P₂O₅ 15%) 用量相同, 早稻和晚稻的具体施肥量见表 1。磷肥 100% 基肥深施; 氮肥和钾肥 60% 基肥深施, 剩余 40% 于水稻移栽 15 天后追施。

1.3 土壤样品采集与测定

在 2023 年 8 月 10 日 (晚稻分蘖期) 和 2023 年 10 月 27 日 (晚稻成熟期), 用土钻从各处理小区采集 0—20 cm 土层土壤, 每个小区随机采集 5 点, 剔除根系、枝叶和石砾等杂物, 混匀后分 3 部分分别装至样品袋中, 每个样品 3 个重复。一部分至 4℃ 车载冰箱带回实验室-80℃ 保存, 用于微生物宏基因组和宏病毒组测序; 一部分自然风干后用于测定全氮 (TN) 含量; 一部分新鲜土样用于测定硝态氮 (NO₃⁻-N)、

表 1 各处理早稻和晚稻化肥施用量 (kg/hm²)
Table 1 Chemical fertilizer input in each experimental treatment for early and late rice

处理 Treatment	总计 Total			早稻 Early rice			晚稻 Late rice		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
CK	310.5	94.5	270.0	155.3	47.3	135.0	155.3	47.3	135.0
S1	310.5	94.5	243.0	155.3	47.3	121.5	155.3	47.3	121.5
S2	310.5	94.5	216.0	155.3	47.3	108.0	155.3	47.3	108.0
S3	310.5	94.5	189.0	155.3	47.3	94.5	155.3	47.3	94.5
S	310.5	94.5	270.0	155.3	47.3	135.0	155.3	47.3	135.0

铵态氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和微生物量氮 (MBN) 含量^[17]。

1.4 土壤宏基因组测序

称取 0.5 g 储存于 -80°C 的新鲜土样, 采用 FastDNA SPIN 试剂盒 (MP Bio-medicals, Solon, OH, USA) 提取土壤样品微生物总 DNA^[18-20]。对 DNA 样品质量进行检测, 将检测合格的 DNA 样品加入 fragmentation buffer, 采用超声破碎仪进行随机打断, 得到的短片段 DNA 用于文库构建, 并进行质检。对于质检合格的文库采用 Illumina NovaSeq 6000 高通量测序平台进行 PE150 测序, 测序得到的原始图像数据文件, 经碱基识别 (Base Calling) 分析转化为原始测序序列 (Raw Reads)。采用质控流程软件 Trimmomatic (参数为: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:5:20 MINLEN:50) 对获得的样品宏基因组数据进行质量控制, 获得的高质量序列用于下游数据分析, 得到 Clean reads 共 1.58×10^9 条。利用 MEGAHIT (<https://github.com/voutcn/megahit>) 对质量控制之后的 Clean Data 进行 denovo 拼接 (K-mer 选取 k-min 35, k-max 95, k-step 20), 并将各样品未被利用上的 Reads 放在一起进行混合组装, 以期发现样品中较低丰度物种的信息, 筛选拼接长度在 500 bp 以上的 Scaffolds 进行后续分析。采用 Mmseqs 软件进行基因聚类及去冗余, 非冗余基因集的 Unigenes 平均长度为 500.13 bp, 平均 GC 含量为 60.98%。使用 Diamond (Version 0.9.30) 软件将非冗余的 Unigenes 序列与 NCBI-NR 数据库比对进行物种的同源性 BLAST 比对 (设定阈值为 $e\text{-value} \leq 0.0001$), 共有 11688293 个冗余基因集的 Unigenes 被注释。宏基因组测序工作委托广东美格基因科技有限公司完成。原始序列数据已上传至 NCBI 数据库, 注册编号 ID: PRJNA1166634。

1.5 土壤宏病毒组测序

称取 3.0 g 储存于 -80°C 的新鲜土壤样品, 进行组织破碎和匀浆处理, 低速离心去除组织和细胞的碎片, 运用过滤、超速离心或沉淀等多种病毒学的分离方法对溶液中的病毒样颗粒 (VLP) 进行纯化和浓缩, 然后采用病毒 DNA (dsDNA、ssDNA) 和 RNA (ssRNA、dsRNA) 共提取的方法同时提取核酸^[21]。检测合格的 DNA 或经扩增的 DNA 样品采用超声破碎仪进行随机打断, 将打断后得到的短片段 DNA 用于测序文库构建, 质检合格的文库将采用 Illumina 平台进行测序, 测序读长 PE150。高通量测序得到的图像经 Base Calling 转化为原始测序序列 (Reads),

使用 Fastp 软件对原始数据 (Raw Data) 进行一系列处理, 得到高质量的 clean reads。使用 Prokka (v1.13) 软件对病毒 contigs 进行基因预测, 过滤基因核酸长度小于 200 bp 的 contigs 序列。利用预测出来的基因蛋白序列与 UniProtKB/Swiss-Prot/KEGG 数据库的病毒序列 (ViralZone, reviewed proteins, <https://viralzone.expasy.org/>) 比对, 获得功能注释信息。得到上述潜在的病毒序列集后, 使用 PhaGCN2 软件对序列进行病毒分类学注释。将 reads 比对到鉴定后的病毒 contigs 上, 计算每个 contig 的丰度 [RPKM 值 = $\text{contig reads} / (\text{total mapped reads} \times \text{contig length})$]。鉴定得到的病毒序列, 采用 CheckV 软件中封装的 Prodigal 包对组装的 contigs 进行基因注释, 并将这些片段注释的基因与美格基因自建的病毒数据库 [V4 版, 主要包含参考数据库: KEGG, VOGDB, PfamA, PfamB, IMG/VR, TIGRFAM, RVDB, NCBI GenBank (viral), GVD, GPD, MGv, CHVD, Riboviria 等] 进行比对, 鉴定微生物和病毒的基因。使用 CHERRY 软件 (参数: -len1000-model pretrain-topk1) 和 PHP 软件 (参数: -nhostKmer_60105_kmer4) 根据病毒基因组的序列信息, 分别对过滤后的病毒序列进行宿主预测分析, 并对结果做阈值筛选, 得到最终结果。采用 DRAM 软件对 Virsorter2 预测的噬菌体序列按基因区域进行拆分, 根据其对这些基因的注释, 将噬菌体注释为辅助代谢基因的序列进行划分和归类。宏病毒组测序工作委托广东美格基因科技有限公司完成。原始序列数据已上传至 NCBI 数据库, 注册编号 ID: PRJNA1166100。

1.6 数据处理

采用 SPSS Statistics 23 (IBM, USA) 软件对稻田土壤病毒与细菌群落的相对丰度、氮循环基因丰度等数据进行 Shapiro-Wilk 正态性检验, 符合正态分布的数据采用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 计算其差异显著性。采用 origin 2022 (OriginLab, Northampton, MA, USA) 软件绘制土壤病毒与细菌群落物种丰度百分比柱状堆叠图、病毒与细菌网络图和基因丰度柱状图。采用 R 语言中的 “plspm” 包构建偏最小二乘路径模型。

2 结果与分析

2.1 土壤病毒类群丰度

图 1 显示, 供试稻田土壤病毒科丰度最高的是圆环病毒科 (Circoviridae), 相对丰度 3.54%~12.00%,

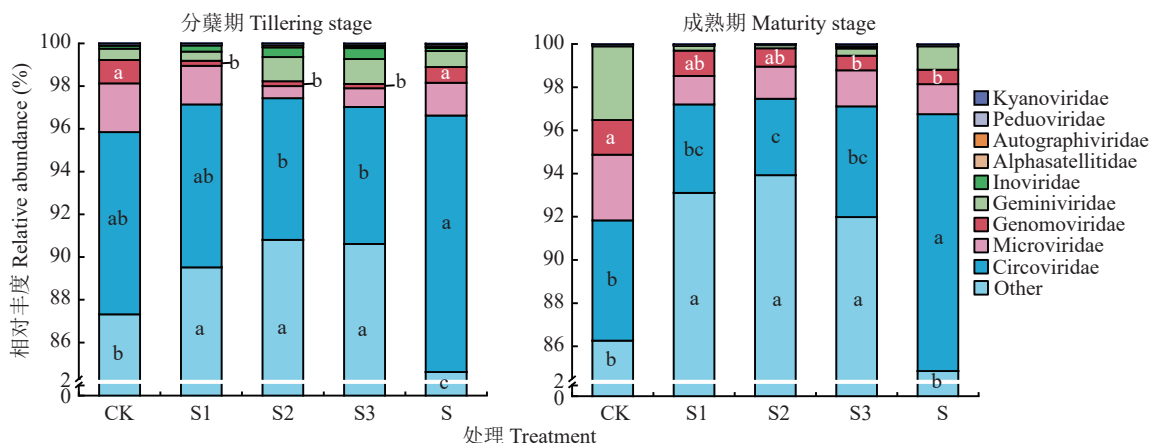


图 1 不同稻草还田量处理晚稻分蘖期和成熟期土壤前 10 位病毒科的相对丰度

Fig. 1 The relative abundance of top 10 soil virus families in the paddy soil at tillering and maturity stages of late rice receiving different rice straw incorporation rates

注: CK 为稻草不还田, S 为全部稻草还田 (单季稻草还田量 6400 kg/hm²), S1、S2、S3 处理的稻草还田量为全部稻草还田的 1.1、1.2、1.3 倍 (单季稻草还田量分别为 7075、7750、8425 kg/hm²)。柱中不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: CK is the straw not returned, S is the whole straw returned (the amount of straw returned to the field in a single season is 6400 kg/hm²), and the amount of straw returned to the field in S1, S2 and S3 is 1.1, 1.2 and 1.3 times that of all the straw returned (the amount of straw returned to the field in a single season are 7075, 7750 and 8425 kg/hm², respectively). Different lowercase letters in the bar indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

其次是微小噬菌体科 (*Microviridae*)、类双生病毒科 (*Genomoviridae*) 和双生病毒科 (*Geminiviridae*), 分别占 0.56%~3.04%、0.43%~1.61% 和 0.20%~3.41%, 其余 5 科病毒丰度合计占 0.05%~0.73%, 但是, 84.62%~93.92% 病毒科未被分类或未知。其中, S 处理的圆环病毒科 (*Circoviridae*) 的丰度显著增加 ($P < 0.05$), 在水稻分蘖期和成熟期分别较 CK 处理增加了 3.47% 和 6.33%, 而其他处理则有所降低。水稻分蘖期 S1、S2 和 S3 处理的类双生病毒科 (*Genomoviridae*) 的丰度分别较 CK 显著降低了 0.86%、0.86%、0.89%。成熟期 S3 和 S 处理双生病毒科 (*Geminiviridae*) 的丰度分别较 CK 显著降低了 0.89% 和 0.35%。值得注意的是, 无论是水稻分蘖期还是成熟期, 未被分类或未知病毒科的相对丰度在 S1、S2 和 S3 处理中显著增加 ($P < 0.05$)。水稻分蘖期与成熟期相比较, 各处理稻田土壤病毒群落的相对丰度变化趋势基本相同。综上所述, 稻草还田量对稻田土壤病毒丰度产生了显著影响, 而水稻不同生育期对土壤病毒类群无显著影响。

在对稻田土壤中携带有机氮转化基因的病毒 contigs 进行进一步统计后, 我们发现共有 8 条病毒 contigs, 且在水稻分蘖期和成熟期, 这些携带有机氮转化基因的病毒 contigs 在稻草还田处理中的相对丰度几乎全部高于 CK 处理, 病毒序列 M.S3|contig_141185 和 T.S3.3|contig_6813 分别在水稻成熟期和分

蘖期表现出独有性 (图 2)。除序列 T.S3.3|contig_6813 以外, 其他 contigs 均在纲水平上被归类为有尾噬菌体纲 (Caudoviricetes), 仅有 M.S3.2|contig_51397 被注释到科分类水平, 为 P2 噬菌体科 (*Peduoviridae*)。水稻分蘖期, 病毒序列 M.S3.2|contig_51397 和 M.S3.3|contig_20350 分别在 S1 处理和 S 处理中相对丰度最高, 而其他病毒序列均在 S2 处理中相对丰度最高。水稻成熟期, 病毒序列 M.S3.2|contig_51397 和 M.S3.3|contig_20350 均在 S 处理中相对丰度最高。

2.2 土壤细菌类群丰度

由图 3 可知, 供试的稻田土壤优势细菌门丰度最高的是变形菌门 (Proteobacteria, 17.3%~19.8%), 其次是绿弯菌门 (Chloroflexi, 14.2%~16.7%)、酸杆菌门 (Acidobacteria, 8.1%~9.7%) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia, 3.7%~4.7%)。不同稻草还田量处理之间细菌优势群落的相对丰度没有显著差异 ($P > 0.05$)。此外, 对比水稻分蘖期与成熟期细菌群落的相对丰度, 其变化趋势基本相同。综上所述, 稻草还田量和水稻生育期对土壤优势细菌门均无显著影响。

2.3 携带有机氮转化基因的土壤病毒与细菌互作

通过 CHERRY 和 PHP 软件对稻田土壤病毒进行宿主预测, 稻田土壤病毒预测到的宿主跨越 71 个细菌门, 其中假单胞菌门 (*Pseudomonadota*) 是被预测

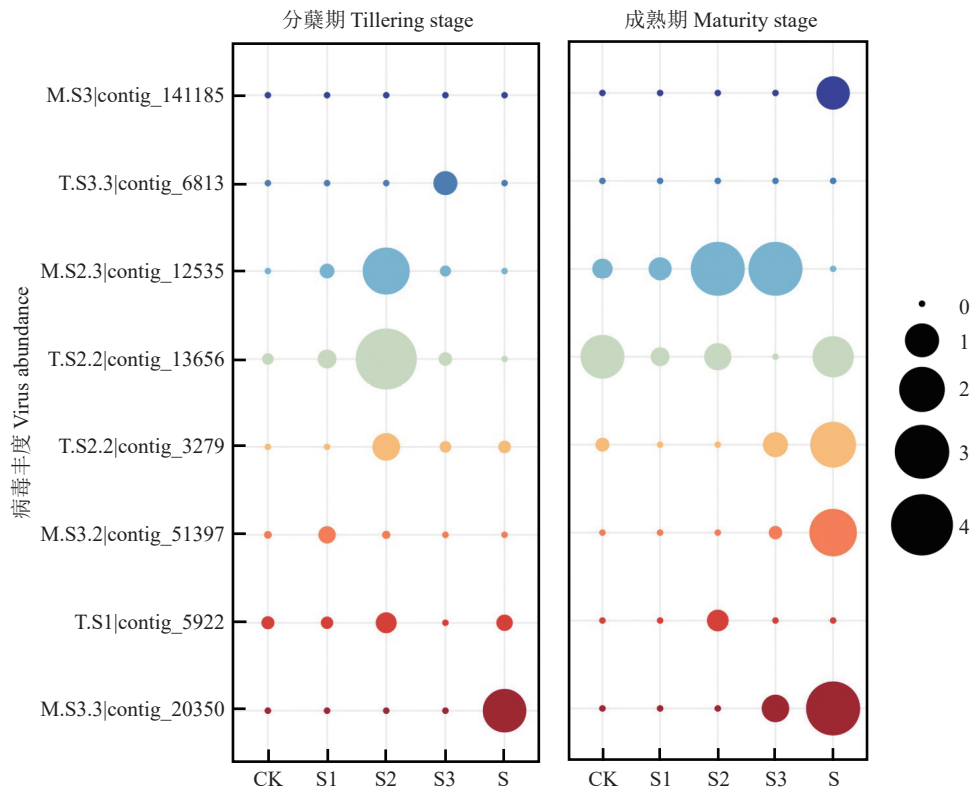


图 2 稻草还田下土壤氮循环相关的病毒 contigs 丰度 Bubble 图

Fig. 2 Bubble diagram of virus contigs abundance associated with soil nitrogen cycling under straw return

注: CK 为稻草不还田, S 为全部稻草还田 (单季稻草还田量 6400 kg/hm^2), S1、S2、S3 处理的稻草还田量为全部稻草还田的 1.1、1.2、1.3 倍 (单季稻草还田量分别为 7075 、 7750 、 8425 kg/hm^2)。图中实心圆大小表示稻草还田下土壤氮循环相关病毒 contigs 的丰度 (基于 RPKM 值) 大小, 不同颜色代表不同病毒 contig。

Note: CK is the straw not returned, S is all the straw returned (the amount of straw returned to the field in a single season is 6400 kg/hm^2), and the amount of straw returned to the field in S1, S2 and S3 is 1.1, 1.2 and 1.3 times that of all straws returned (the amount of straw returned to the field in a single season are 7075 , 7750 and 8425 kg/hm^2 , respectively). The size of the circle in the figure represents the abundance of virus contigs related to soil nitrogen cycling under rice straw return (based on RPKM values), and different colors represent different virus contigs.

最多的细菌门。由图 4 可以看出, 共有 4 个与有机氮转化相关的基因被病毒和细菌共同拥有, 分别是 *gdhA*、*gltD*、*ncd2/npd* 和 *glnA*。对携带这些有机氮转化基因的病毒 contigs 进一步预测宿主, 结果表明, 有 2 条病毒 contigs 预测到宿主。其中, 携带 *ncd2/npd* 基因的病毒序列 M.S3.2|contig_51397 在科水平上被鉴定为 P2 噬菌体科 (Peduoviridae), 预测的宿主为不动杆菌属 (*Acinetobacter*), 属于假单胞菌门 (Pseudomonadota)。而携带 *glnA* 基因的病毒序列 T.S2.2|contig_13656 在科水平上未被分类, 其宿主为北里孢菌属 (*Kitasatospora*), 属于放线菌门 (Actinomycetota)。

2.4 土壤病毒与细菌携带的有机氮转化基因与土壤氮素指标的关系及病毒 AMGs

图 5 显示, 在水稻分蘖期和成熟期, 晚稻田土壤中病毒携带的有机氮转化基因在稻草不还田 (CK) 处理中未被检测到。而在稻草还田的处理中, 仅有

少数处理检测到了个别有机氮转化相关基因。水稻分蘖期, 基因 *glnA* 在 S2 处理中丰度最高; 基因 *ncd2/npd* 在 S1 处理中丰度最高; 基因 *gltD* 在所有处理中丰度均为零; 基因 *gdhA* 在 S 处理中丰度最高。水稻成熟期, 基因 *glnA* 在 S3 处理中丰度最高; 基因 *ncd2/npd* 在 S 处理中丰度最高; 基因 *gltD* 在 S2 处理中丰度最高; 基因 *gdhA* 在 S3 处理中丰度最高。稻草还田量显著影响了细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 的丰度 ($P < 0.05$), 而对基因 *gdhA*、*gltD* 和 *glnA* 的丰度影响不显著。具体而言, 在水稻分蘖期, S2、S3 和 S 处理中基因 *ncd2/npd* 的丰度显著低于 CK 处理 ($P < 0.05$)。水稻成熟期, S 处理中基因 *ncd2/npd* 的丰度显著高于 CK 处理 ($P < 0.05$)。

进一步分析有机氮转化基因 *ncd2/npd* 的丰度与土壤氮素指标之间的关系。图 6 表明, 晚稻田土壤细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 的丰度与微生物量氮含量呈显著正相关关系 ($P = 0.015$, $n = 10$),

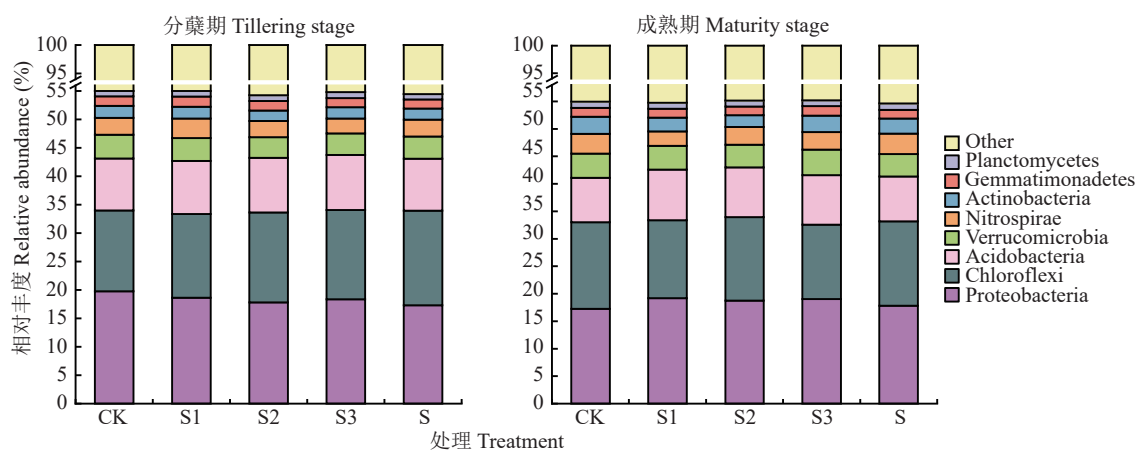


图 3 不同处理下水稻分蘖期与成熟期土壤细菌门相对丰度柱状堆叠图

Fig. 3 Histogram of relative abundance of soil bacteria at tillering and maturity stages under different treatments

注: CK 为稻草不还田, S 为全部稻草还田 (单季稻草还田量 6400 kg/hm²), S1、S2、S3 处理的稻草还田量为全部稻草还田的 1.1、1.2、1.3 倍 (单季稻草还田量分别为 7075、7750、8425 kg/hm²)。

Note: CK is the straw not returned, S is all the straw returned (the amount of straw returned to the field in a single season is 6400 kg/hm²), and the amount of straw returned to the field in S1, S2 and S3 is 1.1, 1.2 and 1.3 times that of all straws returned (the amount of straw returned to the field in a single season are 7075, 7750 and 8425 kg/hm², respectively).

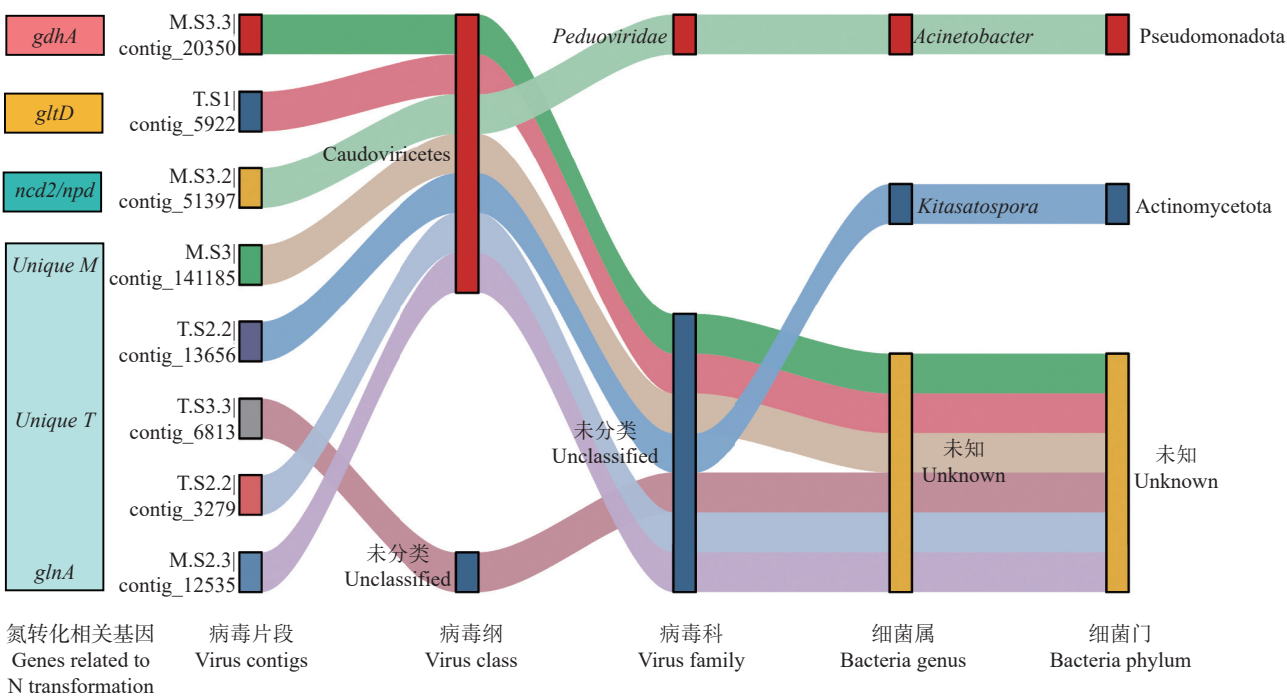


图 4 稻草还田下稻田土壤中有机氮转化相关的病毒与细菌的联系

Fig. 4 Relationship between viruses and bacteria in paddy soil related to soil organic nitrogen transformation under straw return

与铵态氮、硝态氮总量无显著相关关系 ($P=0.108$, $n=10$)。为了探究稻草还田量与稻田土壤病毒、细菌群落多样性、*ncd2/npd* 基因丰度和土壤氮素指标之间的关系, 构建偏最小二乘路径模型用于解释结果。由图 7 可知, 稻草还田量通过影响土壤病毒和细菌的 α 多样性, 进而间接影响细菌携带的 *ncd2/npd* 基因的相对丰度, 最终对有机氮转化过程产生重

要影响。具体表现为, 稻草还田显著影响了稻田土壤细菌的 α 多样性 ($R^2=0.35$, $P<0.0007$); 细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 显著影响了稻田土壤微生物量氮的含量 ($R^2=0.29$, $P<0.0039$)。

基于 DRAM 软件对宏病毒组中 AMGs 进行鉴定, 并结合 KEGG 数据库进行注释。共鉴定到 28 条氮循环相关的 AMGs (表 2)。鉴定到的 AMGs 被注释为两

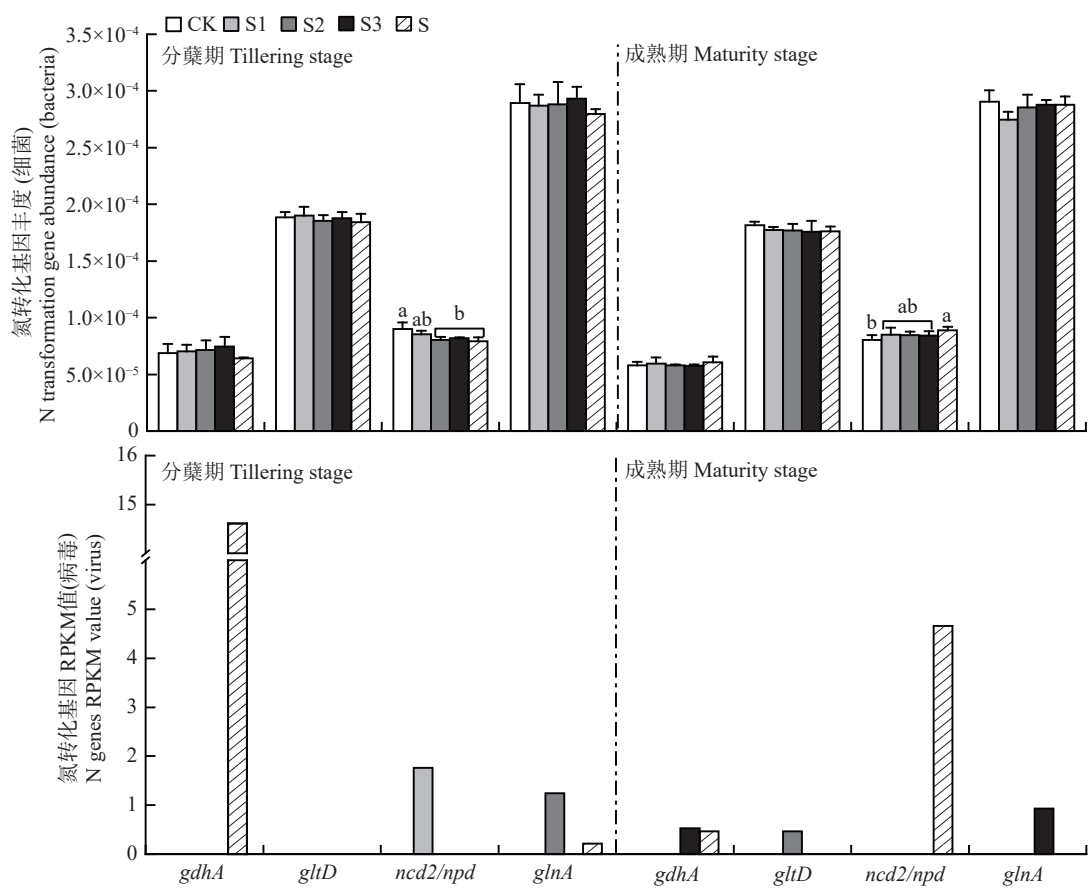


图 5 水稻分蘖期与成熟期土壤细菌和病毒所含的有机氮转化基因丰度

Fig. 5 Abundance of organic nitrogen transformation genes contained in soil bacteria and viruses at tillering and maturity stages of rice

注: CK 为稻草不还田, S 为全部稻草还田 (单季稻草还田量 6400 kg/hm²), S1、S2、S3 处理的稻草还田量为全部稻草还田的 1.1、1.2、1.3 倍 (单季稻草还田量分别为 7075、7750、8425 kg/hm²)。
Note: CK is the straw not returned, S is all the straw returned (the amount of straw returned to the field in a single season is 6400 kg/hm²), and the amount of straw returned to the field in S1, S2 and S3 is 1.1, 1.2 and 1.3 times that of all straws returned (the amount of straw returned to the field in a single season are 7075 kg/hm², 7750 kg/hm², 8425 kg/hm², respectively).

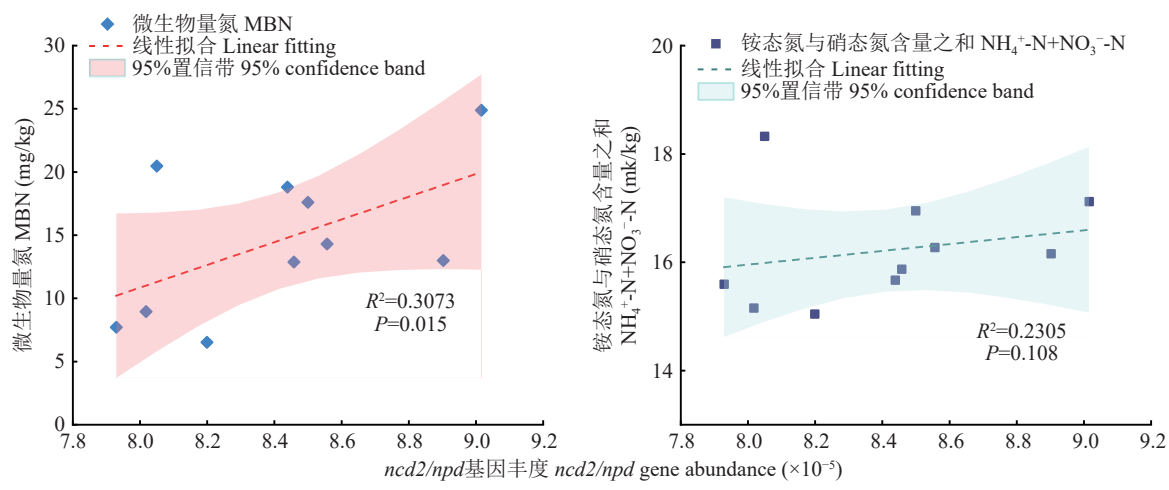


图 6 *ncd2/npd* 基因丰度与微生物量氮含量的线性拟合

Fig. 6 Linear fitting of *ncd2/npd* gene abundance to microbial biomass nitrogen (MBN) content

个 KEGG 有机氮基因 *DNMT1/dcm* 和 *ilvB/ilvG/ilvI*, 在有机氮转化过程中扮演着重要的角色。基因 *DNMT1/dcm* 和 *ilvB/ilvG/ilvI* 均参与有机氮转化的氨基酸代谢过程, 前者编码 DNA(胞嘧啶-5-)-甲基转移酶, 参与

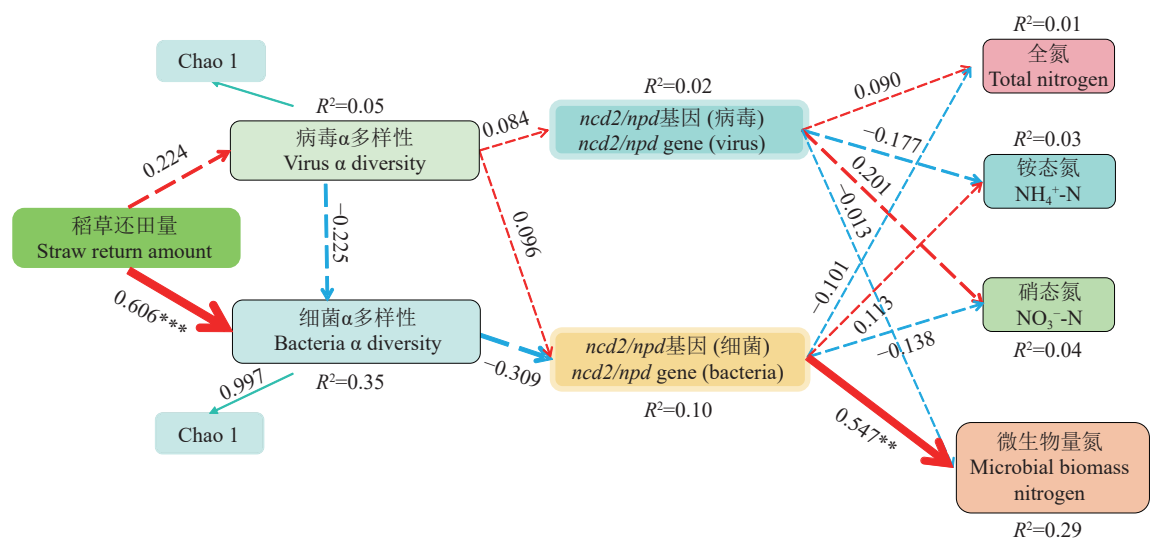


图 7 偏最小二乘路径模型
Fig. 7 Partial least squares path model

注: 箭头旁数字表示路径系数; 红色与蓝色箭头分别表示变量之间正负相关关系。模型可靠性的拟合优度为 0.34。**— $P<0.01$; ***— $P<0.001$ 。
Note: The numbers next to the arrows indicate the path factor; the red and blue arrows indicate positive and negative correlations between variables, respectively. The goodness of fit of the model is 0.34. **— $P<0.01$; ***— $P<0.001$.

表 2 病毒辅助代谢基因
Table 2 Viral auxiliary metabolism genes

KO编号 KO number	基因名称 Gene name	基因 Gene	基因详情 Gene description
K00558	<i>DNMT1 / dcm</i>	M.CK3_contig_11608-cat_2_4	DNA(胞嘧啶-5-)-甲基转移酶
		M.S1.1_contig_7575-cat_1_14	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase
		M.S1.1_contig_8731-cat_2_2	
		M.S1.2_contig_12267-cat_2_8	
		M.S1.2_contig_9944-cat_1_46	
		M.S2.1_contig_1140-cat_2_16	
		M.S2.2_contig_897-cat_2_2	
		M.S3.1_contig_17094-cat_1_43	
		M.S3.2_contig_28456-cat_2_10	
		M.S3.3_contig_151241-cat_2_10	
		M.S3.3_contig_173896-cat_1_4	
		M.S2_contig_35584-cat_2_18	
		M.S3_contig_14916-cat_2_3	
		M.S3_contig_19124-cat_1_13	
		M.S3_contig_43849-cat_2_9	
		T.CK2_contig_11671-cat_2_13	
		T.CK3_contig_9479-cat_1_38	
		T.S1.1_contig_6392-cat_2_4	
		T.S1.1_contig_8281-cat_1_92	
		T.S1.2_contig_2737-cat_1_66	
		T.S1.2_contig_5126-cat_1_23	
		T.S2.3_contig_4688-cat_2_10	
		T.S3.2_contig_16590-cat_1_50	
		T.S3.3_contig_12427-cat_1_15	
		T.S3.3_contig_12963-cat_1_33	
		T.S3.3_contig_8555-cat_2_2	
K01652	<i>ilvB / ilvG / ilvI</i>	M.S3.3_contig_182589-cat_2_4	乙酰乳酸合酶 I / II / III 大亚基
		M.S3.3_contig_182589-cat_2_4	Acetolactate synthase I / II / III large subunit

半胱氨酸和蛋氨酸代谢过程,是氨基酸代谢过程的重要步骤。后者编码乙酰乳酸合酶 I / II / III 大亚基参与多个代谢过程,例如:缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,丁酸酯代谢, C5-支链二元酸代谢,泛酸酯和辅酶 A 的生物合成和氨基酸的生物合成等,其中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成是氨基酸代谢过程的另一重要步骤。

3 讨论

3.1 土壤病毒群落结构特征

病毒在土壤环境中数量丰富且种类多样,在稻田土壤生态系统中具有至关重要的作用。土壤病毒群落组成受到较多因素的影响,不同地区、不同土壤类型和不同耕作方式下稻田土壤病毒群落的组成不同^[22-23]。无论是水环境还是陆地环境^[24],甚至在局部尺度上^[25],病毒群落在不同环境中的组成均具有很大差异。本研究中稻田土壤病毒群落组成主要以圆环病毒科 (*Circoviridae*)、微小噬菌体科 (*Microviridae*) 和双生病毒科 (*Geminiviridae*) 占据优势地位。土壤病毒群落组成会因稻田的地理位置和土壤特性等多种因素影响而不同,刘泽锟等^[26]在一项关于全球稻田土壤病毒多样性的研究中发现,稻田土壤病毒大多来自于有尾噬菌体纲 (*Caudoviricetes*)。王亚娇^[27]在关于中国三大稻区土壤病毒群落组成的研究中发现,稻田土壤病毒优势群落主要属于长尾噬菌体科 (*Siphoviridae*)、藻类去氧核糖核酸病毒科 (*Phycodnaviridae*)、肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*)、疱疹病毒科 (*Herpesviridae*)、短尾噬菌体科 (*Podoviridae*),与本研究呈现的结果明显不同。Han 等^[28]在关于中国 6 种典型农业土壤中病毒群落的探究中发现,在吉林的玉米土壤、湖南和江西的水稻土壤中均以圆环病毒科 (*Circoviridae*) 为主,山东的玉米土壤、吉林和江苏的水稻土壤中均以微小噬菌体科 (*Microviridae*) 丰度占比最高。Gao 等^[29]研究表明,不同砷 (As) 污染水平下稻田土壤病毒群落组成主要以长尾噬菌体科 (*Siphoviridae*)、短尾噬菌体科 (*Podoviridae*)、肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*) 和微小噬菌体科 (*Microviridae*) 为主。

3.2 土壤病毒与细菌宿主的联系

病毒自身不具备独立生存的能力,必须依靠寄生宿主来完成生命活动。病毒与宿主之间紧密联系,环境因素的改变可能导致病毒与宿主的相互作用更加复杂。本研究中主要针对氮循环相关的土壤病毒预测宿主,这些宿主主要来自假单胞菌门

(*Pseudomonadota*)、芽孢杆菌门 (*Bacillota*)、放线菌门 (*Actinomycetota*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*)。刘泽锟等^[26]研究表明,稻田土壤病毒预测出的宿主来自于 11 个细菌门,其中变形菌门 (*Proteobacteria*)、芽孢杆菌门 (*Bacillota*) 数量最多。Wu 等^[7]研究表明,珠穆朗玛峰土壤病毒预测的宿主主要来源于 8 个细菌门,其中变形菌门 (*Proteobacteria*)、芽孢杆菌门 (*Bacillota*)、放线菌门 (*Actinomycetota*) 是可能被大多数病毒感染的细菌门。Yu 等^[30]研究表明,在深海海山沉积物病毒预测的宿主中,变形菌门 (*Proteobacteria*) 被预测最多,然后是放线菌门 (*Actinomycetota*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 和 *Gemmatimonadota* 门。Emerson 等^[12]研究表明,在粪肥施用的农业土壤中,预测到的病毒宿主被归类于变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinomycetota*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 等 10 个细菌门。病毒感染宿主具有特异性,病毒感染造成的选择压力可能引起宿主进化产生抗性,产生抗性的同时可能伴随着自身生长速率降低等后果^[31]。在本研究中,稻草还田增加了变形菌门 (*Proteobacteria*) 的相对丰度。假单胞菌门 (*Pseudomonadota*) 是由变形菌门 (*Proteobacteria*) 去除 ϵ -变形菌纲 (*Epsilonproteobacteria*)、 δ -变形菌纲 (*Deltaproteobacteria*) 和寡弯菌纲 (*Chloroflexi*) 后的改称。符合搭乘胜利者“piggyback-the-winner”假说,该假说认为当宿主密度较高时,温和性生活方式更受青睐,病毒通过溶原而不是裂解宿主来利用它们^[1]。携带基因 *ncd2/npd* 的 P2 噬菌体科 (*Peduviridae*),可能通过感染或裂解宿主假单胞菌门 (*Pseudomonadota*) 的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 将硝基烷烃转化为亚硝酸盐。并且假单胞菌门 (*Pseudomonadota*) 作为稻田土壤中被预测到最多的细菌门,在土壤有机氮转化过程中的作用不可被忽视。变形菌门 (*Proteobacteria*) 作为深海沉积物中病毒最易感染的第一大宿主,参与硝酸盐还原成氨过程和几丁质降解过程,为其他微生物提供生长所需的碳源和氮源,放线菌门 (*Actinomycetota*) 作为深海沉积物中病毒最易感染的第二大宿主,拥有大量的碳水化合物降解基因,参与几丁质、半纤维素和淀粉降解等过程,表明深海沉积物中病毒与变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinomycetota*) 相互作用,在碳、氮等元素循环过程中发挥关键作用^[30-33]。

3.3 土壤病毒与细菌携带的有机氮转化基因与土壤氮素指标的关系及病毒 AMGs

土壤病毒基因注释分布在各种功能中,本研究

针对 KEGG 途径筛选氮循环相关的病毒基因, 以了解病毒与宿主在元素循环过程中的相互作用以及基因之间的联系。有机氮转化过程相关基因 *glnA*、*gltD*、*gdhA* 和 *ncd2/npd* 均在稻草还田处理中检测到丰度, 而在稻草不还田处理中为零, 说明稻草还田可以促进稻田土壤病毒携带有机氮转化基因, 从而参与土壤氮循环过程。Gazitúa 等^[34]和 Roux 等^[35]在不同的宏病毒组样本中检测到数量较少的氮循环基因, 尽管土壤病毒携带的这些有机氮转化基因并非高置信度, 但在土壤氮循环过程中仍具有一定潜力。王美琦等^[36]研究表明, 稻草还田通过增加土壤中碳含量, 导致土壤碳氮比失衡, 进而影响土壤微生物对氮素循环相关微生物及基因的调控。因此, 即使是稻草还田量的微小差异, 也可能通过改变土壤微生物环境, 间接影响病毒携带的有机氮转化基因的丰度和活性。基因 *gdhA* 和 *gltD* 参与 L-谷氨酸的脱氨过程, 产生 2-氧代戊二酸和 NH_3 , 此外基因 *gltD* 还参与 L-谷氨酸的转氨过程, 该过程最终产物为 L-谷氨酰胺和 2-氧代戊二酸。Emerson 等^[12]研究发现, 病毒可能感染厌氧菌科 (*Anaerolineae*) 和浮游菌科 (*Planctomycetaceae*) 细菌, 携带基因 *gdh* 参与谷氨酸和谷氨酰胺代谢, 并且催化有机氮降解。基因 *glnA* 主要参与 NH_3 和 L-谷氨酸转化为 L-谷氨酰胺的过程。基因 *ncd2/npd* 主要参与硝基烷烃转化为亚硝酸盐的过程, 亚硝酸盐通过氮循环过程的其他作用进一步转化为被作物可直接吸收利用的氮源, 从而参与土壤氮循环过程。基因 *ncd2/npd* 是最常见的氮循环相关的 AMGs。晚稻田土壤细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 的丰度与微生物量氮含量呈显著正相关。在水稻分蘖期, 稻草还田通过调节病毒与细菌的 α 多样性, 降低了细菌携带的有机氮转化基因 *ncd2/npd* 的丰度。而稻草还田处理中微生物量氮的含量较低, 这可能是稻草还田处理中部分有机氮被转化为无机氮, 以供应作物在生长盛期的氮素需求。而水稻成熟期, 稻草还田处理中基因 *ncd2/npd* 的丰度有所上升, 土壤中微生物量氮的含量较分蘖期高, 这可能是因为水稻成熟期土壤水分、温度变化以及水稻所需氮素养分较少等因素, 使得有机氮向无机氮转化的速率有所减缓。

病毒表达 AMGs 参与元素生物地球化学循环过程已被广泛认可。以往的研究已经鉴定了许多元素循环相关的 AMGs, 如参与土壤碳循环的 *CAZyme* 和糖苷水解酶基因^[10-11], 参与磷循环的 *phoB*、*dUTPase*、*MazG*、*phoH*、*Thy1*、*RNR* 基因和参与氮循环的

gdh 和 *ncd2/npd* 基因^[13-14, 37]。这些 AMGs 在土壤生物地球化学循环中发挥着重要作用。氨基酸是构成土壤有机氮的重要组成部分, 对于土壤氮循环过程至关重要。稻草还田促进了稻田土壤病毒表达更多的辅助代谢基因 *DNMT1/dcm* 和 *ilvB/ilvG/ilvI*, 在氨基酸合成过程发挥关键作用, 进而影响稻田土壤氮循环过程。

4 结论

稻草还田显著影响了稻田土壤病毒类群的相对丰度, 促进了病毒携带有机氮转化基因表达更多的 AMGs, 在土壤氮循环过程中发挥重要作用。*ncd2/npd* 基因丰度与微生物量氮含量呈显著正相关关系 ($P=0.015$, $n=10$), 而与铵态氮、硝态氮总量之间无显著相关关系 ($P=0.108$, $n=10$)。稻草还田量通过影响土壤病毒和细菌的 α 多样性, 间接影响细菌携带的 *ncd2/npd* 基因的相对丰度, 最终对有机氮转化过程产生重要影响。

参 考 文 献:

- [1] Jansson J K, Wu R N. Soil viral diversity, ecology and climate change[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2022, 21(5): 296–311.
- [2] 王光华, 刘俊杰, 朱冬, 等. 土壤病毒的研究进展与挑战[J]. *土壤学报*, 2020, 57(6): 1319–1332.
Wang G H, Liu J J, Zhu D, et al. Review of researches on viruses in soil—advancement and challenges[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(6): 1319–1332.
- [3] Simon R B J E. Diversity in the soil virosphere: To infinity and beyond?[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(11): 1025–1035.
- [4] Graham B E, Camargo P A, Wu R, et al. A global atlas of soil viruses reveals unexplored biodiversity and potential biogeochemical impacts[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(7): 1873–1883.
- [5] Hu L, Hu L, Song C D, et al. Response of soil viral communities to land use changes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6027–6040.
- [6] Christian S, Katerina E, Yuan M T, et al. Spatial turnover of soil viral populations and genotypes overlain by cohesive responses to moisture in grasslands[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(45): 119–130.
- [7] Wu H M, Yan W K, Wu H M, et al. Consecutive monoculture regimes differently affected the diversity of the rhizosphere soil viral community and accumulated soil-borne plant viruses[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2022, 337: 1–9.
- [8] Liang X L, Radosevich M, DeBruyn J M, et al. Incorporating viruses into soil ecology: A new dimension to understand biogeochemical cycling[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2024, 54(2): 117–137.

- [9] 吴汉卿, 阮楚晋, 韩苗, 王钢. 土壤病毒之奥秘: 研究进展、挑战及未来展望[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1824–1847.
Wu H Q, Ruan C J, Han M, Wang G. Mystery of soil viruses: Advances, challenges, and perspectives[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(6): 1824–1847.
- [10] Zhu Y, Zhang Y, Yan S, *et al.* Viral community structure and functional potential vary with lifestyle and altitude in soils of Mt. Everest[J]. *Environment International*, 2023, 178: 108055–108065.
- [11] Jin M, Guo X, Zhang R, *et al.* Diversities and potential biogeochemical impacts of mangrove soil viruses[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 58–73.
- [12] Emerson J B, Roux S, Brum J R, *et al.* Host-linked soil viral ecology along a permafrost thaw gradient[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(8): 870–880.
- [13] Huang X, Zhou Z C, Liu H Y, *et al.* Soil nutrient conditions alter viral lifestyle strategy and potential function in phosphorous and nitrogen metabolisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2024, 189: 109279–109291.
- [14] Han L L, Yu D T, Bi L, *et al.* Distribution of soil viruses across China and their potential role in phosphorous metabolism[J]. *Environmental Microbiome*, 2022, 17(1): 6–17.
- [15] 郭俊杰, 朱晨, 刘文波, 等. 不同施肥模式对土壤氮循环功能微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(5): 751–759.
Guo J J, Zhu C, Liu W B, *et al.* Effects of different fertilization patterns on soil nitrogen cycling functional microorganisms[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(5): 751–759.
- [16] 王彬浩, 吴愉萍, 陈彦博, 等. 秸秆还田对土壤微生物功能基因和功能类群的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2024, 50(5): 771–784.
Wang B H, Wu Y P, Chen Y B, *et al.* Effects of straw returning on soil microbial functional genes and functional groups[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2024, 50(5): 771–784.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Bao S D. *Soil and agricultural chemical analysis*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [18] 杨叶华, 黄兴成, 朱华清, 等. 长期有机与无机肥配施的黄壤稻田土壤细菌群落结构特征[J]. 植物营养与肥料学报, 2022, 28(6): 984–992.
Yang Y H, Huang X C, Zhu H Q, *et al.* Characteristics of soil bacterial community structure in yellow soil paddy field with long-term combination of organic and inorganic fertilizers[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2022, 28(6): 984–992.
- [19] 邹湘, 易博, 张奇春, 等. 长期施肥对稻田土壤微生物群落结构及氮循环功能微生物数量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(12): 2158–2167.
Zou X, Yi B, Zhang Q C, *et al.* Effects of long-term fertilization on soil microbial community structure and the number of microorganisms with nitrogen cycling function in paddy field[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2020, 26(12): 2158–2167.
- [20] 唐治喜, 高菊生, 宋阿琳, 等. 用宏基因组学方法研究绿肥对水稻根际微生物磷循环功能基因的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(9): 1578–1590.
Tang Z X, Gao J S, Song A L, *et al.* Metagenomics was used to study the effect of green manure on the functional genes of phosphorus cycling in rice rhizosphere microorganisms[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2020, 26(9): 1578–1590.
- [21] 祁慧婷, 郑晓璇, 孙明明, 等. 土壤宏病毒组的研究方法与进展[J]. 土壤学报, 2021, 58(3): 568–577.
Qi H Y, Zheng X X, Sun M M, *et al.* Review in the soil virus metagenome analytical methods and progress[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(3): 568–577.
- [22] Yan Y T, Yu D T, Han L L, *et al.* Diversity and potential interactions of soil viruses and host bacteria under different land use patterns[J]. *Forests*, 2023, 14(2): 342–356.
- [23] Wan Y J, Liu Y, Wu Y X, *et al.* Heterogeneity of soil bacterial and bacteriophage communities in three rice agroecosystems and potential impacts of bacteriophage on nutrient cycling[J]. *Environmental Microbiome*, 2022, 17(1): 1–17.
- [24] Paze-Espino D, Eloë-Fadrsh E A, Pavlopoulos G A, *et al.* Uncovering Earth's virome[J]. *Nature*, 2016, 536: 25–30.
- [25] Liang X L, Zhang Y Y, Wommack E K, *et al.* Lysogenic reproductive strategies of viral communities vary with soil depth and are correlated with bacterial diversity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 144: 107767–107778.
- [26] 刘泽锟, 黄士轩, 杨美艳. 稻田土壤中病毒多样性研究[J]. 土壤学报, 2024, 61(6): 1703–1713.
Liu Z K, Huang S X, Yang M Y. Virus diversity studies in paddy soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2024, 61(6): 1703–1713.
- [27] 王亚娇. 我国主要稻区土壤微生物和病毒多样性及冬小麦休耕对真菌群落和病害发生的影响[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2022.
Wang Y J. Analysis of microbial and viral diversity in paddy soil and effects of long-term wheat fallow on soil fungal diversity and fungal diseases[D]. Beijing: PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022.
- [28] Han L L, Yu D T, Zhang L M, *et al.* Genetic and functional diversity of ubiquitous DNA viruses in selected Chinese agricultural soils[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45142–45153.
- [29] Gao R C, Ma B, Hu M, *et al.* Ecological drivers and potential functions of viral communities in flooded arsenic-contaminated paddy soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 872: 162289–162297.
- [30] Yu M S, Zhang M H, Zheng R Y, *et al.* Diversity and potential host-interactions of viruses inhabiting deep-sea seamount sediments[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3228–3245.
- [31] Rivera N F, Ángel M G, Diana L, *et al.* Bacterial composition and diversity in deep-sea sediments from the Southern Colombian Caribbean Sea[J]. *Diversity*, 2020, 13(1): 10–23.
- [32] 张全国. 病毒及其生态功能[J]. 生命科学, 2014, 26(2): 107–111.

- Zhang Q G. Viruses and their ecological effects[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(2): 107–111.
- [33] Tu Q, He Z, Wu L, *et al.* Metagenomic reconstruction of nitrogen cycling pathways in a CO₂-enriched grassland ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 106: 99–108.
- [34] Gazitúa M C, Vik D R, Gregory A C, *et al.* Potential virus-mediated nitrogen cycling in oxygen-depleted oceanic waters[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(4): 981–998.
- [35] Roux S, Hawley A K, Torres B M, *et al.* Ecology and evolution of viruses infecting uncultivated SUP05 bacteria as revealed by single-cell- and meta-genomics[J]. *eLife*, 2014, 3: 1–20.
- [36] 王美琦, 刘银双, 黄亚丽, 等. 秸秆还田对土壤微生态环境影响的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 807–816.
- Wang M Q, Liu Y S, Huang Y L, *et al.* Research progress on effects of straw incorporation on soil micro-ecological environment[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(2): 807–816.
- [37] Dykma S, Lenk S, Sawicka J E, *et al.* Uncultured gammaproteobacteria and desulfobacteraceae account for major acetate assimilation in a coastal marine sediment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3124–3133.