

猕猴桃溃疡病菌侵染过程中鞭毛基因的转录组表达分析

吴莲莲¹, 黄露², 安星宇², 吴石平^{2*}

¹贵州大学农学院, 贵阳 贵州

²贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵阳 贵州

收稿日期: 2022年3月18日; 录用日期: 2022年6月5日; 发布日期: 2022年6月14日

摘要

为了发掘猕猴桃溃疡病菌的致病相关基因, 利用(RNA sequencing, RNA-Seq)技术对接菌不同时间点的猕猴桃与溃疡病菌进行互作转录组测序分析。结果表明: 共获得101.01 Gb Clean Data, 各样品Clean Data均达到4.85 Gb以上, Q30碱基百分比在96.77%以上。其中与鞭毛相关并表达的差异基因有31个。鞭毛相关差异表达基因GO注释表明参与细胞过程的基因数目最多, 细胞组分和分子功能次之; 鞭毛相关差异表达基因KEGG通路分析表明差异基因的注释以细胞运动为主。经qRT-PCR检测表明, 5个随机选择的差异表达基因表达量变化与转录组测序结果基本一致。本研究结果对猕猴桃溃疡病致病基因发掘具有重要的理论指导和实践意义。

关键词

猕猴桃溃疡病菌, 转录组, 鞭毛基因

Transcriptome Expression Analysis of Flagella Gene during Infection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Lianlian Wu¹, Lu Huang², Xingyu An², Shiping Wu^{2*}

¹College of Agricultural, Guizhou University, Guiyang Guizhou

²Guizhou Academy of Agricultural Sciences Institute of Plant Protection, Guiyang Guizhou

Received: Mar. 18th, 2022; accepted: Jun. 5th, 2022; published: Jun. 14th, 2022

Abstract

In order to explore the pathogenic genes of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, use (RNA se-
*通讯作者。

文章引用: 吴莲莲, 黄露, 安星宇, 吴石平. 猕猴桃溃疡病菌侵染过程中鞭毛基因的转录组表达分析[J]. 生物过程, 2022, 12(2): 106-115. DOI: 10.12677/bp.2022.122012

quencing, RNA-Seq) transcriptome sequencing analysis of interaction between kiwifruit and Psa at different time points of technology docking bacteria. The results show that: a total of 101.01 Gb of clean data were obtained, the clean data of each sample reached more than 4.85 Gb, and the base percentage of Q30 was more than 96.77%. Among them, there are 31 differentially expressed genes related to flagella. GO annotation of flagella-related differentially expressed genes showed that the number of genes involved in cell process was the largest, followed by cell components and molecular functions. KEGG pathway analysis of flagella-related differentially expressed genes showed that the enrichment of differential genes was mainly cell movement. qRT-PCR showed that the expression changes of five randomly selected differentially expressed genes were consistent with the transcriptome sequencing results. The results of this study have important theoretical guidance and practical significance for discovering the pathogenic genes of kiwifruit canker.

Keywords

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*, Transcriptome, Flagella Gene

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

猕猴桃溃疡病是由丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa)引起的病害,严重影响猕猴桃产业的发展[1]。该病害对各国猕猴桃生产造成了巨大的经济损失[2] [3] [4] [5]。近年来针对猕猴桃溃疡病的防治开展了一系列研究,在生物防治上,已经筛选出多种细菌、真菌、噬菌体等对 Psa 有显著抑制效果的拮抗菌株[6] [7] [8] [9] [10],在化学防治上针对新型药剂进行研发,研究发现多羟基双萘醌提取物对 Psa 具有抑制效果[11]。为了开发出更高效防治药剂,针对猕猴桃溃疡病菌的致病机理进行了一系列研究,其中勘探寄主致病相关基因显得尤其重要。鞭毛作为细菌的运动器官,与病菌的定殖、侵染能力、粘附、诱导防卫反应和生物膜形成能力相关[12],是重要的致病因子[13]。目前,利用 RNA-Seq 技术在转录组水平上已开展了大量植物相关基因及抗病基因挖掘研究[14] [15],这些研究为发掘参与抗病性的转录因子及基因提供了理论依据和研究思路。本研究以贵长猕猴桃为材料,以接种溃疡病菌后不同时间点的贵长猕猴桃叶片为供试材料,利用 RNA-Seq 技术进行测序,在获得大量差异表达基因的基础上,对其中的鞭毛相关差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 分析,以期对猕猴桃溃疡病菌鞭毛致病基因挖掘提供基础。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料及处理

供试材料为一年生健康贵长猕猴桃,取自贵州省植物保护所植病课题组基地。猕猴桃溃疡病菌菌株丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa),强致病力菌株(菌株保存号:GZCC7520201),分离自贵州省修文县洒坪镇红星村,保存于本实验室(数据未发表)。分别于接菌 0 h、1 h、2 d、20 d 后对猕猴桃进行取样,样本重量 50 mg~100 mg 之间。重复 5 次,采用液氮速冻,用于转录组测序。

2.2. RNA-Seq 测序

待全部样本采集完成后, 通过干冰将样品寄到上海美吉生物医药科技有限公司, 委托其对样品进行 RNA 提取以及后续 RNA-Seq 测序。公司利用 TruSeq™ Stranded Total RNA Library Prep Kit 试剂构建文库, 文库利用 Illumina HiSeq 平台测序构建。

2.3. 差异表达基因鉴定

根据样品的测序数据, 采用 FPKM 算法 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 和控制阈值来筛选差异表达基因。Fold Change 表示不同处理之间各个基因表达量的比值, 对差异表达基因的筛选阈值为 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1$, $P \leq 0.05$ 且 $\text{FDR} < 0.01$ 。

2.4. 鞭毛相关基因的 GO 和 KEGG 通路分析

将筛选出的鞭毛相关差异表达基因注释到 GO 数据库和 KEGG 数据库, 通过 GO 注释或 KEGG 注释对差异基因功能进行预测。

2.5. 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

从转录组测序分析结果中随机挑取 5 个差异基因, 以验证转录组测序的可靠性。分别以康为世纪生物科技有限公司的 RNA 提取试剂盒 (DNase I) 提取预留样品 RNA, 采用 TOYOBO 公司的 Rever TraAceq PCR-RTKit 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, 作为实时荧光 PCR 反应的模板。利用 primerpremier5.0 软件设计 qRT-PCR 引物, 以 *gyrB* 为内参基因, 根据 Go Taq PCR Master Mix, SYBR Green I 步骤分析表达水平, 在 BioRad 实时荧光定量 PCR 仪上运行, 设置反应参数 $95^\circ\text{C} \sim 5 \text{ min}$, 1 循环; $95^\circ\text{C} \sim 10 \text{ s}$ 、 $58^\circ\text{C} \sim 30 \text{ s}$, 40 个循环; 熔解曲线 (55°C , $0.5^\circ\text{C}/\text{s}$, 至 95°C)。各样本各基因均作 3 次重复, 参照 Schmittgen 的方法, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对表达量 [16]。引物详情如表 1。

Table 1. Real-time quantitative PCR detection primers

表 1. 实时荧光定量检测部分基因引物

引物	序列(5'-3')	温度(°C)
NZ708_RS06870-F	CCAGCCACAACCTCTCAGTG	58
NZ708_RS06870-R	TTGCGAAAAGAACATGCCG	
NZ708_RS06865-F	AACAGCAAGCCTGGTACTG	58
NZ708_RS06865-R	TCTGTTGATCTGCAAGCCG	
NZ708_RS06815-F	TCACACCAACATGGACCAG	58
NZ708_RS06815-R	GCTTTATTGATACCGTGCTTGG	
NZ708_RS06745-F	GATTACAGTCAAGGGCGAGG	58
NZ708_RS06745-R	CGATTTTCAAGTGGGTGTTGG	
NZ708_RS03570-F	CACTCAACGCCATATCAACAC	58
NZ708_RS03570-R	GACTGACAAGTGAATCTACGGG	
<i>gyrB</i> -F	GACAACCTCTACAAAGTATCCGG	58
<i>gyrB</i> -R	GAAGTTCTGAAAGGGCGTTAAC	

3. 结果及分析

3.1. 测序数据质量评估

将 Psa 分别接种贵长 0 h、1 h、2 d 和 20 d 后, 共 8 个样品在 Illumina Hiseq 测序平台采用双端测序, 共获得 101.01 Gb Clean Data, 各样品 Clean Data 均达到 4.85Gb 以上, Q30 碱基百分比在 96.77% 以上。0h 样品的原始测序序列 raw reads 都在 3900 万~1.37 亿之间, 随后将 raw reads 中含有带接头的、低质量的 reads 去掉, 最终得到的 clean reads 数在 3800 万~1.26 亿之间。8 个样品经过测序得到的总 reads 数再过滤后得到的 clean reads 数比例较高, 均在 97.66% 以上。Q20 在 99.05~99.28 之间, 表明此次测序质量较好, 能满足后续分析得基本要求。其余各项指标结果详见表 2。

Table 2. Summary of data quality of RNA-Seq of each sample

表 2. 各样本 RNA-Seq 的数据质量情况汇总

样本名称	原始数据	有效数据	质控后碱基错误率(%)	Clean Q20 (%)	Clean Q30 (%)
1 hpi_1	137166640	136270958	0.022	99.28	97.3
1 hpi_2	136856936	135761422	0.0221	99.26	97.24
2 dpi_1	123168276	122447614	0.0223	99.19	96.98
2 dpi_2	125473978	124733478	0.0222	99.19	97
20 dpi_1	88024432	86952218	0.0225	99.05	96.77
20 dpi_2	89665736	89058314	0.0224	99.11	96.83
0h_1	39194618	38478834	0.022	99.28	97.25
0h_2	41264018	40299214	0.0221	99.24	97.19

注: Psa 代表猕猴桃溃疡病菌, 0 h、1 h、2 d、20 d 代表接种 Psa 的不同时间点, 1 和 2 代表两次重复。

3.2. 鞭毛相关差异基因鉴定及分析

根据 FPKM 值筛选标准, 在 8 个样本中筛选出鞭毛相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs) 31 个(表 3)。31 个鞭毛相关差异表达基因中, 溃疡病菌 1 hpi 相对 0 h 有 26 个基因上调, 4 个基因下调; 2 dpi 对于 0 h 有 23 个基因上调, 7 个基因下调; 20 dpi 对于 0 h 有 12 个基因上调、19 个基因下调。并且上调基因的个数多于下调基因个数。

Table 3. FPKM expression analysis

表 3. FPKM 表达量分析

Gene_name	0 h	1 hpi	2 dpi	20 dpi
NZ708_RS06860	2.54	0	364.02	36.63
NZ708_RS06870	1.17	1.71	463.38	44.01
NZ708_RS09780	159.5	643.54	577.87	112.77
flgD	398.95	2868.55	713.29	140.39
NZ708_RS09875	5.89	46.73	11.02	2.69

Continued

NZ708_RS09885	1253.97	1221.78	536.5	205.61
flgG	1297.43	1709.43	742.18	221.34
flgH	658.72	1153.95	364.65	91.15
flgJ	229.08	698.98	214.75	65.23
NZ708_RS09935	2762.95	18442.86	10724.29	708.15
fliS	1213.98	1459.83	2106.84	381.28
fliT	606.28	786	1065.38	248.45
fliE	1237.55	879.34	986.67	440.7
fliG	66.93	448.76	272.03	57.47
fliH	50.79	298.57	214.93	48.27
fliJ	7.48	71.89	56.91	20.32
fliO	125.66	270.61	226.89	80.75
fliP	23.92	262.72	163.15	35.64
NZ708_RS10060	34.23	219.09	183.07	41.07
flhB	4.96	44.89	35.53	10.43
flhF	538.55	415.78	338.32	137.21
fleN	229.82	370.07	227.16	62.11
NZ708_RS10115	8.23	193.09	64.76	19.56
motD	12.18	168.69	85.81	17.65
NZ708_RS17885	16.74	27.21	74.22	10.3
NZ708_RS22970	6.65	231.88	153.85	22.05
motA	45.35	354.35	289.76	36.72
NZ708_RS30440	1.54	5.82	13.89	7.96
fliR	8.35	52.51	27.53	14.52
fliI	38.89	125.48	81.16	37.59
NZ708_RS14195	0	0	0	1.76

3.3. 鞭毛相关基因的 GO 注释

对 31 个差异基因进行 GO 注释。GO 注释结果表明:差异基因主要分布于生物过程(Biological process)、细胞成分(Cellular component)及分子功能(Molecular function) 3 大类,其中参与生物过程方面的基因数目最多,其次是细胞组分和分子功能。在三大类一级分类下有很多的二级分类,其中在生物过程中有 4 个二级分类,细胞组分中有 2 个二级分类,分子功能中有 3 个二级分类。在生物过程中的功能参与细胞过程(cellular process)、移动(locomotion)、代谢过程(metabolic process)等,其中参与细胞过程的基因数目最多;在细胞组分方面,主要作为细胞解剖实体(cellular anatomical entity)发挥作用。在分子功能方面,具有催化活性(catalytic activity)、结合性(binding)等,其中注释催化活性(catalytic activity)的数目最多(图 1)。

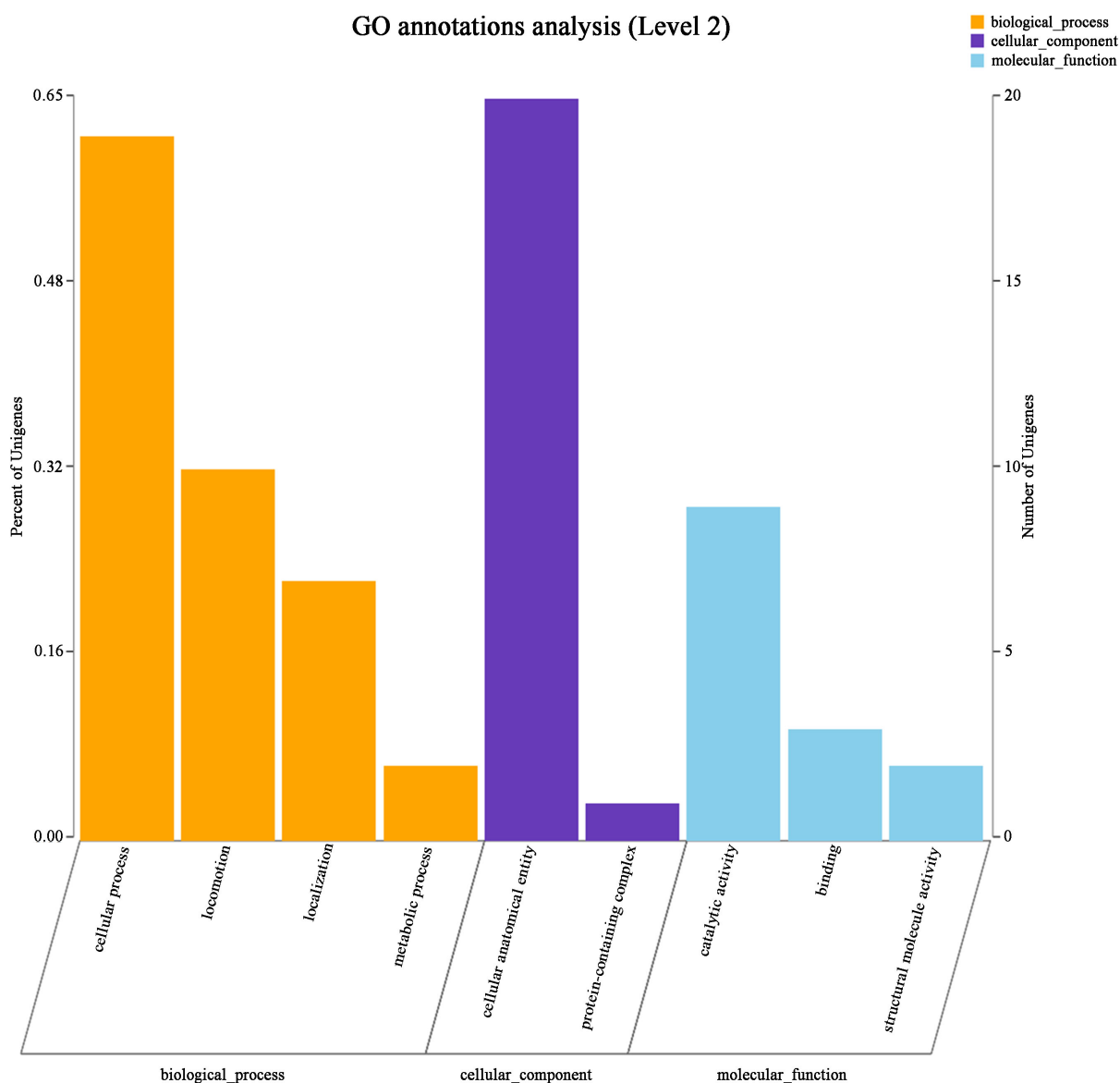


Figure 1. GO function classification of differentially expressed genes. Note: The abscissa in the figure indicates the secondary classification terminology of GO, the left ordinate indicates the percentage of genes contained in the secondary classification in the total, and the right ordinate indicates the number of genes compared with the secondary classification

图 1. 差异表达基因的 GO 功能分类。注：图中横坐标表示 GO 的二级分类术语，左边纵坐标表示包含在该二级分类中的基因占总数的百分比，右边纵坐标表示对上该二级分类的基因数量

3.4. 鞭毛相关基因的 KEGG 注释

对 31 个差异基因进行 KEGG 注释。KEGG 注释结果表明：鞭毛相关基因 KEGG 代谢通路可分为 4 个主要通路：环境信息处理(Environmental Information Processing)，细胞过程(Cellular Processes)，生物体系统(Organismal Systems)等。4 个主要通路下面被分为 6 个次级通路，包括细菌性传染病(Infectious disease: bacterial)、免疫系统(Immune system)、环境适应(Environmental adaptation)、细胞运动(Cell motility)、信号传导(Signal transduction)、膜运输(Membrane transport)，其中注释在细胞运动(Cell motility)中的基因数目最多，为 20 个。其次是信号传导(Signal transduction)，有 3 个。其余的功能中注释的数目均为 1 个(图 2)。

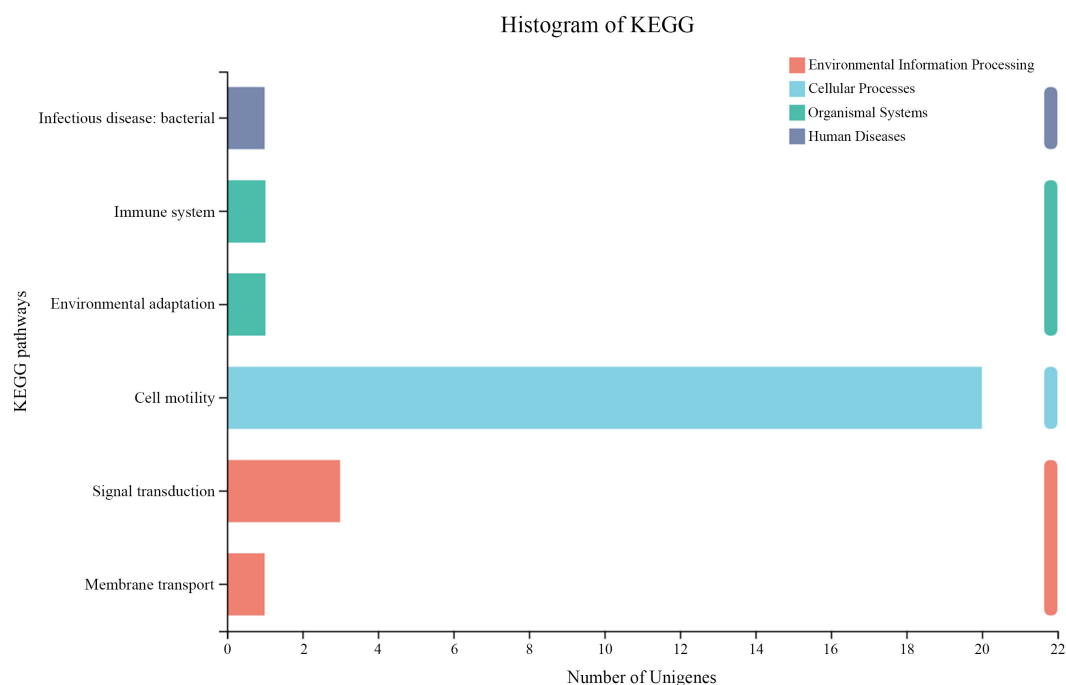


Figure 2. KEGG pathway of differentially expressed genes. Note: The ordinate is the name of KEGG metabolic pathway, and the abscissa is the number of genes annotated to this pathway

图 2. 差异表达基因的 KEGG 代谢通路。注：纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称，横坐标为注释到该通路的基因数目

3.5. 差异表达基因的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

为了验证转录组测序的可靠性，本研究选取了 5 个差异基因，使用 qRT-PCR 来验证转录组分析的可靠性。这些基因包括 III 型分泌系统蛋白(NZ708_RS06865)、III 型分泌蛋白 HrpF (NZ708_RS06815)、鞭毛钩长控制蛋白 FliK (NZ708_RS06870)、III 型效应蛋白 HrpK (NZ708_RS06745)、丁香内酯生物合成蛋白 AvrD1 (NZ708_RS03570)，以 *gyrB* 基因为内参基因。结果表明，上述 5 个基因在接种不同时间点的表达量不同，5 个基因在接种 2 d 后的表达量均达到上调倍数最高，总体来说 qRT-PCR 与 RNA-Seq 的表达趋势基本一致。基于 RNA-Seq 分析的数据可靠性，差异表达基因可以用于下一步的分析(图 3)。

4. 讨论

建立在新一代高通量测序平台 Illumina 基础上的 RNA-Seq 技术成为研究、挖掘新基因的重要手段。越来越多的人针对不同生物体转录组测序展开了一系列研究，其中包括分析苹果树腐烂病真菌与植物互作机制[17]，检测石榴中的 miRNA [18]，并赵斌针对溃疡病菌与毛花猕猴桃互作转录组分析的研究[15]。目前，利用 RNA-Seq 技术在转录组水平上已开展了大量相关植物的抗病基因挖掘研究，但关于猕猴桃与溃疡病互作在转录组水平上的研究鲜有报道。

本研究利用贵长猕猴桃为材料，利用 RNA-Seq 技术，以接种溃疡病菌 0 h、1 h、2 d 和 20 d 的猕猴桃枝条为供试材料，从 RNA 转录组水平上分析溃疡病菌侵染后不同时间点鞭毛相关基因表达情况，31 个鞭毛相关差异表达基因中，溃疡病菌 1 hpi 相对 0 h 有 26 个基因上调，4 个基因下调；2 dpi 对于 0 h 有 23 个基因上调，7 个基因下调；20 dpi 对于 0 h 有 12 个基因上调、19 个基因下调。并且上调基因的个数多于下调基因个数。并随机选取了 5 个差异基因，使用 qRT-PCR 来验证转录组分析的可靠性。总体来说 qRT-PCR 与 RNA-Seq 的表达趋势基本一致。

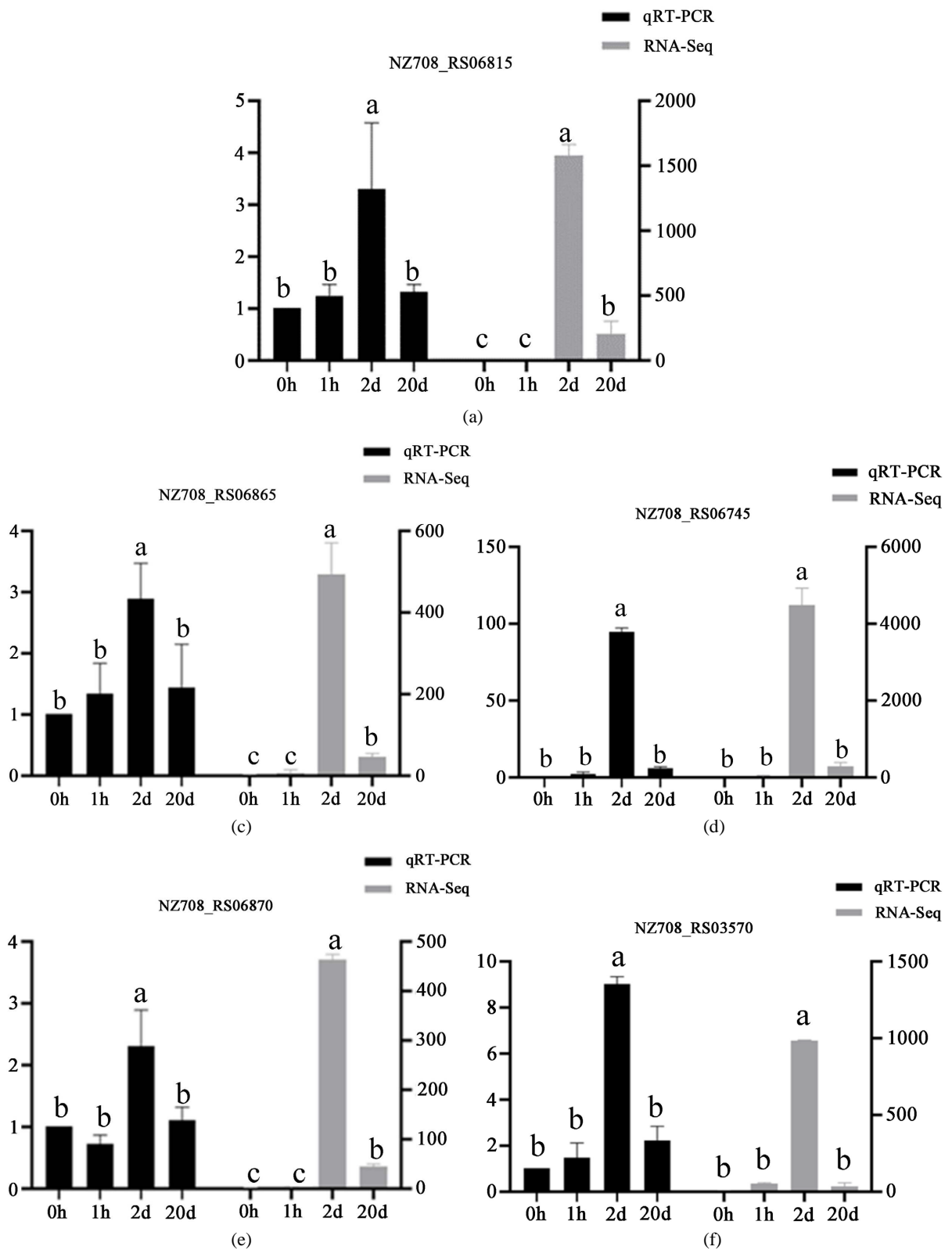


Figure 3. qRT-PCR verification. Note: Different lowercase letters have significant differences ($P < 0.05$), but the same lowercase letters have no significant differences

图 3. qRT-PCR 验证。注：不同小写字母差异显著 ($P < 0.05$)，相同小写字母差异不显著

鞭毛相关基因 GO 生物学分析过程表明, 参与生物过程的差异基因表达的数目最多, 细胞组分和分子功能次之。参与细胞组分的差异表达基因主要作为细胞解剖实体(cellular anatomical entity)发挥作用。在分子功能方面, 参与催化活性(catalytic activity)的数目最多。鞭毛相关基因 KEGG 注释结果表明: 鞭毛相关基因 KEGG 代谢通路可分为 4 个主要通路, 其次 4 个主要通路下面被分为 6 个次级通路, 其中注释在细胞运动(Cell motility)中的基因数目最多, 为 20 个。其次是信号传导(Signal transduction), 有 3 个。这与井赵斌针对溃疡病菌与毛花猕猴桃互作转录组分析的研究结果类似, 表明在受到溃疡病菌侵染后, 贵长猕猴桃体内多个生物学过程进行了响应[15]。

基于上述研究, 根据 31 鞭毛相关差异表达基因的 GO 注释以及 KEGG 注释情况, 结合鞭毛在细菌中的作用, 可用于后续克隆功能分析, 从而对贵长猕猴桃与溃疡病菌之间的互作机制进行进一步了解, 更好地理解 Psa 的致病机制, 为猕猴桃溃疡病的科学防控提供理论依据。

参考文献

- [1] 李黎, 钟彩虹, 李大卫, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 124-133.
- [2] 黄其玲, 高小宁, 赵志博, 等. GFPuv 标记猕猴桃溃疡病菌的生物学特性及其在土壤根系中的定殖[J]. 中国农业科学, 2013, 46(2): 282-291.
- [3] Bartoli, C., Lamichhane, J.R., Berge, O., et al. (2015) A Framework to Gauge the Epidemic Potential of Plant Pathogens in Environmental Reservoirs: The Example of Kiwifruit Canker. *Molecular Plant Pathology*, **16**, 137-149. <https://doi.org/10.1111/mpp.12167>
- [4] Dharmaraj, K., Cui, W., Rikkerink, E., et al. (2019) Construction of a Kiwifruit Yeast Two-Hybrid cDNA Library to Identify Host Targets of the *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Effector AvrPto5. *BMC Research Notes*, **12**, Article No. 63. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4102-x>
- [5] Donati, L., Cellini, A., Sangiorgio, D., et al. (2020) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, Infection Dynamics and Disease Epidemiology. *Microbial Ecology*, **80**, 81-102. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01459-8>
- [6] Wicaksono, W.A., Jones, E.E., Casonato, S., et al. (2017) Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit, Using Endophytic Bacteria Recovered from a Medicinal Plant. *Biological Control*, **116**, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.003>
- [7] Tontou, R., Gaggia, F., Baffoni, L., et al. (2016) Molecular Characterization of an Endophyte Showing a Strong Antagonistic Activity against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Plant & Soil*, **405**, 97-106. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2624-0>
- [8] Di, L.G., Evangelisti, M., Mancuso, F., et al. (2015) Isolation and Partial Characterization of Bacteriophages Infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Causal Agent of Kiwifruit Bacterial Canker. *Journal of Basic Microbiology*, **54**, 1210-1221. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300951>
- [9] Frampton, R.A., Taylor, C., Holguin Moreno, A.V., et al. (2014) Identification of Bacteriophages for Biocontrol of the Kiwifruit Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 2216-2228. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-14>
- [10] Zhang, T., Jiang, Y., Huang, J. and Dong, W. (2013) Isolation and Identification of the Causal Pathogens for Kiwifruit Bacterial Canker and the Isolation of the Antagonistic Endophytic Fungi from Kiwifruit in Sichuan, China. *Journal of Agricultural Science*, **5**, 2415-2419. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n7p262>
- [11] 魏海娟, 刘萍, 杨燕, 吴云锋. 多羟基双萜醛提取物对猕猴桃溃疡病菌的抑制作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(1): 126-130+136.
- [12] 张爱萍, 张晓晓, 吴林娜, 等. 西瓜噬酸菌趋化性及鞭毛素基因 $\Delta cheA\Delta fliC$ 双突变体构建及功能[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(11): 1838-1850.
- [13] Zhang, Y., Chao, W., Jiang, W., et al. (2013) The HD-GYP Domain Protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Regulates Synthesis of Extracellular Polysaccharides That Contribute to Biofilm Formation and Virulence on Rice. *PLoS ONE*, **8**, e59428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059428>
- [14] Gao, M., Niu, J., Zhao, S.P., et al. (2012) Characterization of *Erysiphe Necator* Responsive Genes in Chinese Wild *Vitis quinquangularis*. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 11497-11519. <https://doi.org/10.3390/ijms130911497>
- [15] 井赵斌. 猕猴桃抗溃疡病转录组分析和基因功能注释[J]. 分子植物育种, 2021, 19(6): 1830-1838.
- [16] Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nature*

Protocols, **3**, 1101. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

- [17] Ke, X.W., Yin, Z.Y., *et al.* (2014) Transcriptome Profiling to Identify Genes Involved in Pathogenicity of *Valsa mali* on Apple Tree. *Fungal Genetics and Biology*, **68**, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.004>
- [18] Saminathan, T., Bodunrin, A., Singh, N.V., *et al.* (2016) Genome-Wide Identification of MicroRNAs in Pomegranate (*Punica granatum* L.) by High-Throughput Sequencing. *BMC Plant Biology*, **16**, Article No. 122. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0807-3>