

## ■ РЕФЕРАТИ СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ В «CYTOLOGY AND GENETICS», № 6, 2021 р.

### THE FEASIBILITY OF MICROALGAE *DUNALIELLA* IDENTIFICATION BASED ON CONSERVED REGIONS OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B AND CYTOCHROME OXIDASE GENES

J. RAZEGHI <sup>1\*</sup>, P.A. PISHTAB <sup>1</sup>,  
P. FATHI <sup>1</sup>, B. PANAH <sup>2</sup>, M.A. HEJAZI <sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz 51666-16471, Iran

<sup>2</sup> Department of Genomics, Branch for Northwest and West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5156915-598, Iran

<sup>3</sup> Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest and West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz 5156915-598, Iran

E-mail: jafar\_razeghi@tabrizu.ac.ir, aminhejazi@abrii.ac.ir

*Classification of unicellular algae at species level has not been successfully characterized with common morphological, physiological, and molecular approaches. In this study, the efficiency of two mitochondrial *cob* and *cox1* genes as new molecular targets for the study of the phylogeny relationships was investigated among twenty isolated *Dunaliella* species from different regions of Iran. First, specific primers were designed based on the conserved regions of the *cob* and *cox1* sequences in *Dunaliella* species and other microalgae, followed by analysis of PCR products. Based on the analysis of amplification products, some isolates were selected for subsequent RFLP and sequencing processes. Findings revealed that *cob* gene was not amplified in the isolates, whereas *cox1* gene was amplified in B60, M12, G3, and CCAP19/18 isolates. RFLP results showed that B60 with 19/18 and G3 with M1.2 had a similar pattern and were grouped in the same clade. Interestingly, the findings on *cox1* gene sequencing demonstrated complete congruence with RFLP results. Although the results of this study highlighted the efficiency of *cox1* gene in determining*

*the phylogeny relationships between *Dunaliella* species, further *cox1* gene sequences and subsequently PCR and RFLP analyses are required to approve the results. Our results open a new avenue on growing bodies of knowledge regarding the phylogeny relationships of *Dunaliella* species and could be suitable in taxonomical studies of other microalgae.*

**Key words:** *cob*, *cox1*, *Dunaliella*, mitochondrial genes, molecular phylogeny.

### МОЖЛИВІСТЬ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРОВОДОРОСТЕЙ *DUNALIELLA* НА ОСНОВІ КОНСЕРВАТИВНИХ ОБЛАСТЕЙ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ЦИТОХРОМУ В І ГЕНІВ ЦИТОХРОМ ОКСИДАЗИ

Наразі не існує успішного опису класифікації одноклітинних водоростей на рівні видів, здійсненого за допомогою традиційних морфологічних, фізіологічних та молекулярних підходів. Мета цього дослідження полягала у вивченні ефективності двох мітохондріальних *cob* та *cox1* генів як нових молекулярних цілей для дослідження філогенетичних відносин між двадцятьма виділеними видами *Dunaliella* з різних регіонів Ірану. Спочатку було створено специфічні праймери на основі консервативних областей послідовностей *cob* і *cox1* у видів *Dunaliella* та інших мікрободоростей, після чого проведено аналіз продуктів ПЛР. На основі аналізу продуктів ампліфікації було вибрано декілька ізолятів для подальших процесів ПДРФ та секвенування. Результати продемонстрували, що ген *cob* не був ампліфікованим в ізолятах, у той час як ген *cox1* був ампліфікованим в ізолятах B60, M12, G3 і CCAP19/18. Результати ПДРФ показали, що B60 з 19/18 та G3 з M1.2 мали подібну картину і були згруповані в одну кладу. Варто відмітити, що результати щодо секвенування гену *cox1* продемонстрували повну конгруентність з результатами ПДРФ. Хоча результати цього дослідження підкреслили ефективність гену *cox1* у визначенні філогенетичних відносин між видами *Dunaliella*, для підтвердження результатів необхідні подальші послідовності гену *cox1*, проведення ПЛР та аналізу ПДРФ. Наші результати відкривають нові шляхи дослідження зростаючих масивів даних щодо філогенетичних відносин між видами *Dunaliella* і можуть бути використані у таксономічних дослідженнях інших мікрободоростей.

© J. RAZEGHI, P.A. PISHTAB, P. FATHI, B. PANAH,  
M.A. HEJAZI, 2021

**Ключові слова:** *cob*, *cox1*, *Dunaliella*, мітохондріальні гени, молекулярна філогенія.

#### REFERENCES

- Endo H, Park EJ, Sato Y, Mizuta H, Saga N. (2009) Intraspecific diversity of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) from Japan, China, and Korea, based on the *cox1* gene and ITS2 sequences. *Fish Sci* 75(2):393–400
- Evans KM, Wortley AH, Mann DG. (2007) An assessment of potential diatom «barcode» genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158(3):349–364
- Ghorbani S, Manaffar R, Tae A, Malekzadeh R. (2013) A study on molecular diversity of *Dunaliella* algae species in some of Urmia Lake's stations. *Iranian J Plant Biol* 5(17):1–8
- Ghorbanzadeh Naghab M, Panahi B. (2017) Molecular characterization of Iranian black cumin (*Nigella sativa* L.) accessions using RAPD marker. *Biotechnologia* 98(2):97–102
- Gomez PI, Gonzalez MA. (2004) Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear *ITS* rDNA sequences. *Aquaculture* 233:149–162
- Hejazi MA, Barzegari A, Gharajeh NH, Hejazi MS. (2010) Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline systems* 6(1):11–41
- Hejazi MA, Khoshrouy R, Hosseinzadeh Gharajeh N, Etemadi MR, Madayen L, Javanmard A. (2016) Conservation and Biodiversity Analysis of the Microalga *Dunaliella* in Shrinking Highly Saline Urmia Lake Based on Intron-sizing Method. *J Agr Sci Tech* 18:1693–1703
- Jolodar A. (2019). Molecular Characterization and Phylogeny Analysis Based on Sequences of Cytochrome Oxidase Gene from *Hemiscorpius lepturus* of Iran. *Iranian J Veter Med* 13(1):59–67
- Kamikawa R, Nagai S, Hosoi-Tanabe S, Itakura S, Yamaguchi M, Uchida Y, Baba T, Sako Y. (2007) Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. *Harmful Algae* 6:413–420
- Le Gall L, Saunders GW. (2010) DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J Phycol* 46(2):374–389
- Moniz MJB, Kaczmarek I. (2010) Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161(1):7–34
- Olmos J, Paniagua J, Contreras R. (2000) Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Lett Appl Microbiol* 30:80–84
- Panahi B, Afzal R, Ghorbanzadeh Neghab M, Mahmoodnia M, Paymard B. (2013) Relationship among AFLP, RAPD marker diversity and Agromorphological traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Progr Biol Sci* 3(1):90–99
- Panahi B, Frahadinan M, Dumas J, Hejazi M. (2019) Integration of cross species RNA-seq Meta-analysis and Machine Learning Models identifies the most important salt stress responsive pathways in microalga *Dunaliella*. *Frontiers in Genetics* 10:752
- Preetha K, John L, Subin CS, Vijayan KK. (2012) Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic biosys* 8(1):27
- Quispe-Tintaya W, White RR, Popov VN, Vijg J, Maslov AY. (2013) Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *BioTechniques* 55:133–136
- Raho N, Rodriguez F, Reguera B, Marin I. (2013) Are the mitochondrial *cox1* and *cob* genes suitable markers for species of *Dinophysis* Ehrenberg? *Harmful Algae* 28:64–70
- Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J. (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (rhodophyta). *Am J Bot* 93(8):1101–1108
- San MD, Gower DG, Zardoya R, Wilkinson M. (2006) A hotspot of gene order rearrangement by tandem duplication and random loss in the vertebrate mitochondrial genome. *Mol Biol Evol* 23:227–234
- Sathasivam R, Praiboon J, Chirapart A, Trakulnaleamsai S, Kermanee P, Roytrakul S, Juntawong N. (2014). Screening, phenotypic and genotypic identification of  $\beta$ -carotene producing strains of *Dunaliella salina* from Thailand. *Ind J Geo-Marine Sci* 43(12):2198–2216
- Saunders GW. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1462):1879–1888
- Smith DR, Lee RW, Cushman JC, Magnuson JK, Tran D, Polle EJ. (2010) The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *BMC Plant Biol* 10:83–96
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei-Mand Kumar S. (2011) MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tempesta S, Paoletti M, Pasqualetti M. (2010) Morphological and molecular identification of a strain

- of the unicellular green algae *Dunaliella* sp. isolated from *Tarquinia salterns*. *Transit Water Bull* 4:60–70
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2: Unit2.
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. (2002) The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage the led to land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17):11275–11280
- Turmel M, Otis C, Lemieux C. (2003) The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *Plant Cell* 15(8):1888–1903
- Wahrmund U, Quandt D, Knoop V. (2010) The phylogeny of mosses – addressing open issues with a new mitochondrial locus: Group I intron *cob*i420. *Mol Phylogenet Evol* 54:417–26
- Wang F, Jia F, Jie W, Bo L, Shulian X. (2014) Phylogenetic and Morphological Investigation of a *Dunaliella* Strain Isolated from Yuncheng Salt Lake, China. *Acta Geologica Sinica (English Edition)* 88(1):106–107
- Zhang H, Bhattacharya D, Maranda L, Lin S. (2008) Mitochondrial *cob* and *cox1* genes and editing of the corresponding mRNAs in *Dinophysis acuminata* from Narragansett Bay, with special reference to the phylogenetic position of the genus *Dinophysis*. *Appl Environ Microbiol* 74(5):1546–1554

Received October 07, 2019

Received April 21, 2020

Accepted November 18, 2021