# Silindrospermopsin Genleri İçin Dâhili Çoğaltma Kontrollerinin (Dçk) Tasarımı ve Sınırlayıcı Parça Uzunluk Çeşitliliği (Spuç) Testinin Geliştirilmesi

\*Mete Yılmaz<sup>1,2</sup>, Edward J. Phlips<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Forest Resources and Conservation, Program in Fisheries and Aquatic Sciences, University of Florida, 7922 N.W. 71<sup>st</sup> Street, Gainesville, FL, USA, 32653

> <sup>2</sup> Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 35100, Bornova, İzmir Türkiye 'E mail: mete.yilmaz@ege.edu.tr

Abstract: Design and Testing of Internal Amplification Controls (IAC) and Development of a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Assay for Cylindrospermopsin Genes. Environmental DNA may contain impurities that inhibit downstream molecular applications. Use of an internal amplification control (IAC) is one way to detect inhibition of the polymerase chain reaction. We describe a strategy to design these amplification controls for the most commonly tested cylindrospermopsin genes cyrB and cyrC. We demonstrate PCR inhibition from DNA of samples collected from lakes Dora, Griffin, Crescent, Buffalo Bluff and George in Florida, USA by use of these internal controls. Further cleaning of DNA from impurities resulted in detection of cyrB and cyrC genes in samples from lakes Crescent, Buffalo Bluff and George. Comparison of restriction digests of cyrB fragments from lake samples, Aphanizomenon ovalisporum and Cylindrospermopsis raciborskii suggested the former cyanobacterium as the likely source of cylindrospermopsin in these samples.

Key Words: Aphanizomenon ovalisporum, Cylindrospermopsis, cylindrospermopsin, internal amplification control, restriction fragment length polymorphism.

Özet: Çevre örneklerinden elde edilen DNA sonraki moleküler işlemleri engelleyen yabancı maddeler içerebilir. Dâhili çoğaltma kontrollerinin (DÇK) kullanımı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR)'unu engelleyen bu maddeleri tespit etmenin yollarından biridir. Çalışmada, bu çoğaltma kontrollerinin en yaygın kullanılan silindrospermopsin genleri *cyrB* ve *cyrC* için kullanılması konusunda bir yöntem geliştirilmiştir. DÇK'ların kullanımı ile A.B.D'nin Florida eyaletinde bulunan Dora, Griffin, Crescent, Buffalo Bluff ve George Gölleri'nden toplanan örneklere ait DNA'ların PCR'ı engellediği gösterilmiştir. DNA'ların engelleyici maddelerden temizlenmesi sonrası Crescent, Buffalo Bluff ve George Gölleri'nde *cyrB* ve *cyrC* genleri tespit edilmiştir. Göl örnekleri, *Aphanizomenon ovalisporum* ve *Cylindrospermopsis raciborski*'ye ait *cyrB* genleri için geliştirilen Sınırlayıcı Parça Uzunluk Çeşitliliği (SPUÇ) analizi bu örneklerde silindrospermopsin üreten siyanobakterinin *A. ovalisporum* olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aphanizomenon ovalisporum, Cylindrospermopsis, silindrospermopsin, dâhili çoğaltma kontrolü, sınırlayıcı parça uzunluk çeşitliliği.

## Giriş

Silindrospermopsin (SİN) farklı siyanobakteri türleri tarafından oluşturulabilen, memeli canlılarda karaciğer (hepatotoksik), hücreler (sitotoksik) ve DNA (genotoksik) üzerinde toksik etkiler gösteren bir maddedir (Falconer ve Humpage 2006). Fare deneylerinde toksinin en önemli etkisi karaciğerde görülmüş, bu toksin izole edilmiş hayvan hücrelerinde protein sentezini geri dönüşümsüz olarak engellemiştir (Froscio ve diğ. 2003). İlk defa Avustralya'da *Cylindrospermopsis raciborskii*'de tespit edilmiş (Ohtani ve diğ. 1992), sonraki yıllarda dünyanın çeşitli yerlerinden izole edilen *Umezakia natans* (Harada ve diğ. 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker ve diğ. 1997, Yilmaz ve diğ. 2008), *Raphidiopsis curvata* (Li ve diğ. 2001), *Anabaena lapponica* (Spoof ve diğ. 2006), *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel ve diğ. 2006), *Lyngbya wollei* (Seifert ve diğ. 2007) ve Oscillatoria PCC 6506'da (Mazmouz ve diğ. 2010) bulunmuştur. SİN biyosentezini sağlayan on bir genin dizileri ve önerilen biyosentetik aşamalar Mihali ve diğ. (2008) tarafından bildirilmiştir. Bu genler arasında amidinotransferaz (*cyrA*), poliketid sentazlar (ör: *cyrC*), peptid sentetazlar (ör: *cyrB*'nin bir kısmı) vardır. CyrA enzimi arjininden bir guanidino grubu alarak glisin ile birleştirir ve guanidinoasetatı oluşturarak silindrospermopsin sentezini başlatır. Daha sonra bu guanidinoasetat CyrB'nin peptid sentetaz kısmındaki adenilasyon bölümü tarafından aktif hale getirilir ve CyrB/ CyrC benzeri enzimler tarafından poliketid eklemelerinde kullanılır (Mihali ve diğ. 2008).

Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR) ve takip eden gen dizilerinin belirlenmesi işlemleri siyanobakteri kültürleri ve çevre örneklerinde toksin genlerinin belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır (Yilmaz ve diğ. 2008, 2009). Ancak göl ve nehir örneklerinden gelen hümik maddelerle kontamine olmuş DNA'nın PCR analizini engellemesi sık rastlanılan bir durumdur (Pan ve diğ. 2002, Yilmaz ve diğ. 2009). PCR reaksiyonlarının başarısı kullanılacak pozitif ve negatif kontrollerle test edilebilir. Fakat bunlar çevre örneklerinden gelebilecek engelleyici maddelerin (inhibitörlerin) varlığı konusunda bir bilgi vermez (Yilmaz ve diğ. 2009). Bu inhibitörlerin varlığını test etmenin bir yolu her PCR tüpü içine dâhili çoğaltma kontrollerinin (DÇK) ilave edilmesidir (Abdulmawjood ve diğ. 2002, Hoorfar ve diğ. 2004). Agaroz jel elektroforezinden sonra DÇK bandının görülmemesi inhibitörlerin olduğunu veya PCR kimyasal/ solüsyonlarında problem olduğunu gösterir. Rekabetçi (Kompetitif) DÇK çoğaltılması hedeflenen genle aynı primerleri kullanırken, rekabetçi olmayan (nonkompetitif) DÇK farklı bir primer seti kullanır (Hoorfar ve diğ. 2004). Hedef gen ve DÇK için aynı PCR koşullarının kullanılması ve farklı primer setlerinin çıkarabileceği sorunların önüne geçmesi sebebiyle rekabetçi DÇK tercih sebebidir (Hoorfar ve diğ. 2004).

Bu calısmada iki silindrospermopsin geni icin rekabetci bir DCK tasarlanmıştır. DCK'ların gen dizisi hedef genlerle aynıdır, ancak hedef gen dizilerinin bir kısmı PCR mutajenezi ile kesilmiştir. Böylece hem hedef gen hem de DÇK aynı jel üzerinde görüntülenebilmiştir. Ayrıca bu çalışmada çevre edilen örneklerinden elde karışık total DNA içinde Cylindrospermopsis raciborskii ve Aphanizomenon ovalisporum gibi iki önemli SİN üreticisinin cyrB gen dizilerini ayırt etmek amacıyla bir Sınırlayıcı Parça Uzunluk Çeşitliliği (SPUÇ) (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) analizi geliştirilmiştir.

### Materyal ve Yöntem

A. ovalisporum FAS-AP1, C. raciborskii QHSS/NR/Cyl03 ve FAS-C1 ile Microcystis aeruginosa PCC 7806 siyanobakteri suşları daha önce anlatıldığı gibi yetiştirilmiş ve hasat edilmiştir (Yilmaz ve diğ. 2008). Su örnekleri A.B.D.'nin Florida eyaletinde bulunan Dora, Griffin, Crescent, Buffalo Bluff ve George Gölleri'nden suyun 0-3 m derinliğini örnekleyen dikey sırıklarla toplanmıştır (Yilmaz ve diğ. 2009, Yilmaz ve Phlips, 2011).

Siyanobakteri kültürleri ve göl örneklerinden genomik DNA Tillett ve Neilan (2000)'nin XS metodu ile izole edilmiştir. Çevre örneklerinin genomik DNA'larından PCR'ı engelleyen maddelerin uzaklaştırılması için Yilmaz ve diğ. (2009)'da bildirilen XS-PEG metodu kullanılmıştır. Göl örnekleri ve siyanobakteri kültürlerinde cyrC geninin 612 baz çiftlik (bç) kısmı ve cyrB geninin 597 bç'lik kısmı bir Biometra (Biometra GmbH i. L.,Goettingen, Germany) Isil döngü cihazında çoğaltılmıştır (Schembri ve diğ. 2001). Kısmi cyrC geninin çoğaltılması için M5a (Yilmaz ve Phlips 2011b) ve M4 (Schembri ve diğ. 2001) primer çifti kullanılmış; cyrB geni ise M13 ve M14 primer çifti ile çoğaltılmıştır (Schembri ve diğ. 2001). Her 50 µl'lik PCR reaksiyonu 10-20 ng genomik DNA, her primerden 20 pmol (MWG-Biotech Inc., NC, USA), her bir deoksinükleosid trifosfattan 200 µM (Fisher Scientific Company L.L.C, PA,USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, yeşil veya renksiz 5X tampon solüsyonundan 10 µl ve 2 ünite GoTag DNA

polimeraz (Promega, WI, USA) içermiştir. Her iki genin çoğaltılması da şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Genomik DNA'ların 95 °C'de 3 dakika denatürasyonunu takiben tüpler 30 defa tekrarlanmak üzere 95 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika bekletilmiştir. Son DNA uzatma basamağı 72 °C'de 5 dakika devam etmistir. PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jellerde yürütülmüş, etyidum bromid ile boyanmış ve UV aydınlatması ile görüntülenmiştir. Kısmi cyrC ve cyrB genleri için DÇK tasarımı Wilson ve diğ. (2000)'de RNA polimeraz geni için anlatıldığı şekilde yapılmıştır. DÇK tasarımı toksin genleri için kullanılan primerlerin DÇK'ları da çoğaltacağı şekilde yapılmıştır (Şekil 1). CyrC- DÇK'nın üretimi için, 33 bazlık cyrC-INT (5'-TGGAATCCGGTAATTGGTCTCAGTTCATCAAGC)

tasarlanmıştır. CyrC-INT'in 3' ucundaki 20 bazlık kısım (altı cizili) cyrC geninde M4 primerinin 220 bç aşağısında yer alan bölgevle avni gen dizisine sahiptir. cvrC-INT'in 5' ucundaki 13 bazlık fazlalık M4 primerinin 3' ucundaki bölgeyle aynı gen dizisine sahiptir. M5a ve cyrC-INT primerleri A. ovalisporum FAS-AP1 genomik DNA'sını kullanarak ilk PCR'da kullanılmış, çoğaltılan ürün agaroz jelden saflaştırılarak M4 ve M5 primerleri ile ikinci PCR'da kalıp olarak kullanılmıştır. 392 bç'lik DÇK agaroz jelden saflaştırılmıştır. cyrB geni için olan DÇK da benzer şekilde üretilmiştir. 33 bazlık cyrB-INT (5'-TGATAGCCACGAGCTTTTCTGAAAGAGGTTGGC) cvrB geninde M13 primeri bölgesinin 206 bç aşağısındaki 19 bç'lik kısımla (altı çizili) aynı diziye sahip olacak şekilde dizayn edilmistir. cvrB-INT'in 5' ucundaki 14 bazlık fazlalık M13 primerinin 3' ucundaki kısımla aynı gen dizisine sahiptir. CyrB-INT ve M14 ilk PCR'da kullanılmış, bunların saflaştırılan ürünleri M13 ve M14 primer çiftiyle ikinci PCR'da kullanılarak 391 bç'lik DÇK elde edilmiştir. PCR koşulları yukarıda cyrB ve cyrC genleri için verilenle aynıdır. Üretilen DÇK parçaları SİN genleri için uygulanan PCR'larda her tüpe ilave edilerek PCR'nin başarısı takip edilmiştir. DÇK, cyrC ve cyrB gen parcaları agaroz jellerden Qiaguick MinElute jel özütleme seti (Qiagen, CA, USA) kullanılarak saflastırılmıştır. DNA miktarlarının hesaplanması Quant-iT dsDNA HS analiz seti ve Qubit florometre (Invitrogen, CA, USA) ile yapılmıştır.

Her bir SPUÇ analizinde (50 µl) 1.5 ünite *Ncil* enzimi (New England Biolabs, USA), ürünle sağlanan tampon solüsyon ve 150 ng saflaştırılmış *cyrB* PCR ürünü kullanılmış; tüpler ısıl döngü cihazında 37 °C'de gece boyu bekletilmiştir.



Şekil1. Silindrospermopsin genleri cyrB ve cyrC için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ilave edilecek DÇK'ların tasarım stratejisi.

### Bulgular

Her tüpte *A. ovalisporum* FAS-AP1 genomik DNA'sından eşit miktarlarda kullanılmış; cyrB-DÇK ve cyrC-DÇK optimizasyonu için olan PCR reaksiyonlarında üç farklı DÇK miktarı test edilmiştir (10, 20, 30 femtogram). Her örnek için beklenen boyutta PCR bantları hem genler hem de DÇK'lar için elde edilmiştir (Şekil 2). Takip eden PCR reaksiyonlarında 10 fg DÇK kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil2. Farklı miktarlardaki (10, 20, 30 fg) DÇK'lar ile PCR sonuçları. A. ovalisporum genomik DNA'sı cyrC (A) ve cyrB (B) genlerinin çoğaltılması için kullanılmıştır. Boyut belirleyici DNA BB ile gösterilmiştir.



Şekil3. Crescent ve Buffalo Bluff göl örnekleri için cyrC-DÇK'nın PCR'da test edilmesi. *C. raciborskii* FAS-C1 ve *M. aeruginosa* PCC 7806 cyrC geni için negatif kontroller olarak kullanılmış; *A. ovalisporum* FAS-AP1 ve *C. raciborskii* QHSS/NR/Cyl03 pozitif kontroller olarak kullanılmıştır. Boyut belirleyici DNA BB ile gösterilmiştir.

Şekil 3'de Florida'da St. Johns Nehir sistemi içinde bulunan Crescent ve Buffalo Bluff Gölleri'nden alınan iki örneğin *cyrC* geni için PCR sonuçları görülmektedir. Bu gen SİN üretmeyen *C. raciborskii* FAS-C1 ve *M. aeruginosa*'da tespit edilmemiştir. Ancak cyrC-DÇK, 400 bç'lik PCR bantlarından da anlaşılacağı üzere, her iki örnekte de başarıyla çoğaltılmıştır. Gerek *cyrC* gerekse DÇK'lar SİN üreten *A. ovalisporum* FAS-AP1 ve *C. raciborskii* QHSS/NR/Cyl03'te çoğaltılmıştır (Yilmaz vd. 2008). Göl örneklerinde tespit edilemeyen DÇK'lar PCR'ı engelleyen maddelerin kanıtıdır.

Crescent ve Buffalo Bluff göl örneklerine ilave olarak beş diğer Florida gölünden XS metodu ile izole edilen DNA'lar da PCR'da SİN geni için engellemeye uğramıştır (veri gösterilmemiştir). Yilmaz ve diğ. (2009)'da verilen XS-PEG metodu bu göl örneklerinden gelen engellemeyi uzaklaştırmıştır. XS-PEG metodu ile DNA izolasyonu sonrası Crescent, Buffalo Bluff ve George Gölleri'nde *cyrB* ve *cyrC* genleri tespit edilirken, Dora ve Griffin Gölleri'nde bu genlere rastlanmamıştır (Şekil 4).



Şekil4. PCR engelleyicileri uzaklaştırıldıktan sonra göl örneklerinde *cyrC* (A) ve *cyrB* (B) genleri için PCR sonuçları. *A. ovalisporum* FAS-AP1 ve *C. raciborskii* QHSS/NR/Cyl03 pozitif kontroller olarak kullanılmıştır. Boyut belirleyici DNA BB ile gösterilmiştir.

A. ovalisporum ve C. raciborskii cyrC gen dizileri arasındaki yüksek benzerlik (>%99) iki türü ayırt etmede sınırlayıcı enzimlerin kullanılmasına imkân vermemiştir. Ancak iki türün cyrB gen dizileri benzerliği daha düşüktür (% 96,4) (Yilmaz ve diğ. 2008). C. raciborskii ve A. ovalisporum cyrB gen dizilerinin çeşitli sınırlayıcı enzimlerle in siliko analizi sonucu (http://tools.neb.com/NEBcutter2/) Ncil enziminin farklı uzunlukta parcalar olusturacağı tespit edilmistir. Bu enzimle C. raciborskii cyrB geninden 329 bç, 234 bç ve 51 bç'lik üç parça, A. ovalisporum'dan 319 bç ve 278 bç'lik iki parça elde edilmesi beklenir. Gen dizileri bilgisinden beklenen gen parçalarının, Ncil muamelesi ve agaroz jel elektroforezi sonrası elde edilen bant boyutları ile uyumlu olduğu Mayıs görülmüştür (Şekil 5). 2007'de St. Johns ekosistemindeki Crescent, Buffalo Bluff ve George Gölleri'nden toplanan örneklerden elde edilen cyrB gen parçaları saflaştırıldıktan sonra Ncil ile muamele edilmiştir. Her üç örneğin de agaroz jeldeki parça boyutları A. ovalisporum ile aynı iken C. raciborskii'den farklıdır (Şekil 5).



Şekil 5. CyrB gen parçalarının Ncil enzimi ile SPUÇ analizi. Boyut belirleyici DNA BB ile gösterilmiştir. C. raciborskii cyrB geninin Ncil ile muamelesinden sonra oluşan 51 bç'lik parça düşük konsantrasyonundan ötürü jelde görünmemektedir.

#### Tartışma ve Sonuç

Toksik türlerin keşfi için siyanobakteri türlerinin izolasyonu ve toksinler veya genleri için test edilmeleri en yaygın kullanılan metottur (Li ve diğ. 2001, Yilmaz ve diğ. 2008). Her ne kadar bu yaklaşım toksin biyosentezi ve toksisite mekanizmalarını anlamada önemli basamaklar olsa da (Mihali ve diğ. 2008), doğal ortamdaki toksik türlerin/suşların çeşitliliğini anlamada yetersiz kalırlar (Yilmaz ve diğ. 2009). Çevre DNA'sından doğrudan gen çoğaltmalarını takiben gen dizilerinin belirlenmesi veya SPUÇ toksin üreticilerinin çeşitliliği konusunda daha hızlı ve geniş bir bilgi verebilir (Tringe ve Rubin 2005). Ancak çevre örneklerinden elde edilen DNA'nın PCR'da kullanılması problemli olabilmektedir. Toprak veya sediman örneklerinden elde edilen DNA'nın temizlenmesi üzerine yayınlanmış onlarca makale bunun göstergesidir (Miller ve diğ. 1999, Yilmaz ve diğ. 2009). Toprak ve sedimandaki hümik asitler DNA ile birlikte izole olur ve sonraki moleküler işlemleri engeller (Miller ve diğ. 1999). Akuatik veya karasal bitkilerin bozuşması sonucu benzer bileşikler göl ve

#### Kaynakça

- Abdulmawjood, A., S. Roth, M. Bulte. 2002. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 16, 335-339.
- Banker, R., S. Carmeli, O. Hadas, B. Teltsch, R. Porat, A. Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. J Phycol 33, 613-616.
- Chapman, A. D., C.L. Schelske. 1997. Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. J Phycol 33, 191-195.
- Falconer, I. R., A.R. Humpage. 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. Environ Toxicol 21, 299-304.
- Froscio SM, A.R. Humpage, P.C. Burcham, I.R. Falconer. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environ Toxicol. 18:243-251.

nehirlerde de bulunur (Yilmaz ve diğ. 2009). Florida'daki pek çok göl ve nehir hümik asitlere bağlı olarak yüksek değerlerde renkli çözünmüş organik madde (RÇOM) (colored dissolved organic matter-CDOM) ile tanımlanır (Phlips ve diğ. 2000, Zanardi-Lamardo ve diğ. 2002). DÇK'ların kullanımı Florida göl örneklerinden elde edilen DNA'lardan gelen PCR engelleyicilerinin varlığını ortaya koymamızı sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar özellikle yüksek RÇOM içeren göl/nehir örneklerinden yapılacak gen çoğaltmalarında DÇK tasarımı ve kullanımının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, PCR engelleyicileri uzaklaştırıldıktan sonra, 7 adet göl örneği SİN biyosentez genleri için taranmıştır. cyrB geni için pozitif olan üç örnek, Ncil muamelesinden sonra, SÍN üreticileri A. ovalisporum ve C. raciborskii'den elde edilen gen parçaları ile karşılaştırılmıştır. C. raciborskii Florida göllerinde en yaygın patlama yapan siyanobakteri türleri arasındadır (Chapman ve Schelske 1997). Diğer ülkelerde SİN ve saksitoksinleri üretmesinden dolayı (Falconer ve Humpage 2006), bu türün yayılımı Florida'da ekosistem sağlığına bir tehdit olarak görülmüştür. Ancak Florida'dan izole edilen C. raciborskii suşlarında bu güne kadar herhangi bir toksin tespit edilmemiştir (Yilmaz ve diğ. 2008, Yilmaz ve Phlips 2011b). Şekil 5'de St. Johns Nehri örneklerinden elde edilen SPUÇ şekilleri A. ovalisporum'la aynı, C. raciborskii'den farklıdır. Bu, A. ovalisporum'un bu sistemlerdeki baslıca SİN üreticisi olduğunu göstermektedir. Bu veriler Yilmaz ve Phlips (2011a)'da tespit edilen ve çevre örneklerinden elde edilen A. ovalisporum benzeri cyrB gen dizileri ile de uyumludur. Denemelerimizde diğer SİN üreticileri Aphanizomenon sp. 10E6 (Stuken ve Jakobsen 2010) ve Oscillatoria sp. PCC 6506 (Mazmouz ve diğ. 2010)'yi kullanamadık. Ancak yayınlanmış cyrB gen dizileri doğrultusunda Ncil enzimi Aphanizomenon sp.'de C. raciborskii ile aynı uzunlukta gen parçaları verecektir. Diğer taraftan Oscillatoria sp.'nin gen dizisinde Ncil için bir kesim yeri yoktur. Dolayısıyla bu enzimle kesim Oscillatoria benzeri gen dizilerini de diğerlerinden ayırt edebilir. Bu çalışmanın sonuçları Ncil analizinin çevre örneklerinden elde edilen cyrB gen parçalarının türler bazında ayırt edilmesinde hızlı ve kolay bir metot olduğunu ortaya koymaktadır.

- Harada, K., I. Ohtani, K. Iwamoto, M. Suzuki, M.F. Watanabe, M. Watanabe, K. Terao, K. 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32, 73-84.
- Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner, P. Fach. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol 42, 1863-1868.
- Li, R. H., W.W. Carmichael, S. Brittain, G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, Y.D. Liu, M.M. Watanabe. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). J Phycol 37, 1121-1126.
- Mazmouz, R., F. Chapuis-Hugon, S. Mann, V. Pichon, A. Mejean, O. Ploux,. 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. Appl Environ Microbiol 76, 4943-9.

- Mihali, T. K., R. Kellmann, J. Muenchhoff, K.D. Barrow, B.A. Neilan. 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. Appl Environ Microbiol 74, 716-722.
- Miller, D. N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl Environ Microbiol 65, 4715-24.
- Ohtani I, R.E. Moore, M.T.C. Runnegar. 1992. Cylindrospermopsin a potent hepatotoxin from the blue green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J Am Chem Soc. 114:7941-7942.
- Pan, H., L.R. Song,Y.D. Liu, T. Borner. 2002. Detection of hepatotoxic Microcystis strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. Arch Microbiol 178, 421-427.
- Phlips, E. J., M. Cichra, F.J. Aldridge, J. Jembeck, J. Hendrickson, R. Brody, R. 2000. Light availability and variations in phytoplankton standing crops in a nutrient-rich blackwater river. Limnol Oceanogr 45, 916-929.
- Preussel, K., A. Stuken, C. Wiedner, I. Chorus, J. Fastner. 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47, 156-62.
- Schembri, M. A., B.A. Neilan, C.P. Saint. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environ Toxicol 16, 413-21.
- Seifert, M., G. McGregor, G. Eaglesham, W. Wickramasinghe, G. Shaw. 2007. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. Harmful Algae 6, 73-80.
- Spoof, L., K.A. Berg, J. Rapala, K. Lahti, L. Lepisto, J.S. Metcalf, G.A. Codd, J. Meriluoto. 2006. First observation of cylindrospermopsin in Anabaena

lapponica isolated from the boreal environment (Finland). Environ Toxicol 21, 552-60.

- Stuken, A., K.S. Jakobsen. 2010. The cylindrospermopsin gene cluster of Aphanizomenon sp. strain 10E6: organization and recombination. Microbiol 156, 2438-51.
- Tillett, D., B.A. Neilan. 2000. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. J Phycol 36, 251-258.
- Tringe, S. G., E.M. Rubin. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. Nature Rev Gen 6, 805-814.
- Wilson, K. M., M.A. Schembri, P.D. Baker, C.P. Saint. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis* raciborskii and design of a species-specific PCR. Appl Environ Microbiol 66, 332-8.
- Yilmaz, M., E.J. Phlips, N.J. Szabo, S. Badylak. 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. Toxicon 51, 130-9.
- Yilmaz, M., E.J. Phlips, D. Tillett. 2009. Improved methods for the isolation of cyanobacterial DNA from environmental samples. J Phycol 45, 517-521.
- Yilmaz, M., E.J. Phlips. 2011a. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. Appl Environ Microbiol 77, 2502-2507.
- Yilmaz M., E.J. Phlips. 2011b. Toxicity and genetic diversity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Florida, USA, Lake Res Man 27:235-244.
- Zanardi-Lamardo, E., C.D. Clark, C.A. Moore, R.G. Zika. 2002. Comparison of the molecular mass and optical properties of colored dissolved organic material in two rivers and coastal waters by flow field-flow fractionation. Environ Sci Technol 36, 2806-2814.