

A. fistulosum (2n=16), линии CGN 14763; лук репчатый *A. cepa*, сорт Jumbo (полученны из Центра генетических ресурсов, Вагенинген, Нидерланды).

Растительный материал был выращен в пленочной теплице. Семена проращивали в чашках Петри при температуре 24° С.

Получение цитологических препаратов.

Цитологические препараты для флюоресцентной *in situ* гибридизации были приготовлены методом давления.

Предметные стекла обрабатывали 5N HCl в течении 3 часов. Затем промывали в бидистиллированной воде (не менее 3 раз). Перед использованием стекла погружались в спирт на 10 мин. и высушивали на воздухе.

Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге, после 3-5 дней семена обрабатывали α-бромнафталином при 4°С в течение 24 часов. Корешки фиксировали в смеси из этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение часа и хранили при температуре +4°С до использования.

Для приготовления препаратов корешки промывали в бидистиллированной воде 3 раза и в цитратном буфере. Затем обрабатывали в ферментной смеси: целлюлаза Onozuka 2%, пектиназа 5S 2%, мацерозиме 2,5%, драйзелаза 1% в течение 1 часа при 37°С. После этого корешки отмывали в цитратном буфере и готовили давленные препараты в 45% уксусной кислоте.

Для перевода временных препаратов в постоянные использовали метод замораживания – скалывания. Для этого свежеприготовленные препараты замораживали при температуре – 70° С в течение 30 минут. После этого снимали покровное стекло и обрабатывали препарат 96% спиртом в течение 5 минут и высушивали на воздухе. Постоянные препараты хранили при температуре - 20°С до использования.

Выделение ДНК.

ДНК выделяли из молодых листьев по следующему методике: молодые листья растирали в буфере для экстракции (0.35 М сорбитол, 100 мМ трис-HCl, 5мМ ЭДТА, pH 7) на холоду. Центрифугировали 10 мин. 14000 об/мин. Сливали надосадочную жидкость,

добавляли буфер для экстракции, интенсивно встряхивали. Лизировали при 65° С в буфере для лизиса (1 М трис- HCl pH 7.5, 0.5 ЭДТА, 5 М NaCl, 2% СТАВ) с добавлением 5% саркосила. После лизиса, производили очистку смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и центрифугировали при 14 000 об/мин. в течении 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и осаждали ДНК в одном объеме изопропанола. Центрифугировали в 14 000 об/мин. в течение 10 мин., осадок высушивали и растворяли в MQ-воде. Размер выделенной ДНК и степень загрязненности РНК оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

ПЦР-анализ.

На основании данных о нуклеотидной последовательности терминального сателлитного повтора 378 п.н. лука-батона были подобраны и синтезированы следующие праймеры:

34902 5'-ATCGATTCTTCGGACGGCCT-3'
34903 5'-ATCCGCAGGGTGAACATCTGCGG-3'.

Праймеры, обратные выше названным:
34905 5'-AGATGTTGCACCCTTCGGAT-3'
34906 5'-TGGCCGTCGAAGAATCGAT-3'.

Для определения наличия теломерных повторов были использованы праймеры, специфичные для растительного теломерного повтора:

RTELO1 5' TTT AGG GTT TAG GGT TTA GGG
TTT AGG GTT TAG GG 3'
RTELO2 5' CCC TAA ACC CTA AAC CCT AAA
CCC TAA ACC CTA AA 3'

Также праймеры, специфичные для теломерного повтора млекопитающих:

HTELO1 5' TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA
GGG TTA GGG 3'
HTELO2 5' CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC
TAA CCC TAA 3'.

В 25 мкл смеси для ПЦР содержалось:

0,2 мМ каждого нуклеотида

1х буфер для ПЦР

100 нг ДНК-матрицы

20 нг каждого праймера

2,5 U ДНК-полимеразы.

Для мечения продуктов ПЦР использовалась смесь нуклеотидов, содержащая

biotin-11-dUTP или Dig-11-dUTP («Синтол», Москва).

Аmplификацию проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Москва) при следующих параметрах:

Для амплификации сателлитного повтора
 94°C – 2 минуты;
 94°C - 30 с,
 57°C - 30 с,
 72°C - 30 с,
 72°C – 7 мин. } 30 циклов

Для амплификации теломерного повтора
 94°C – 5 минут;
 94°C - 1 мин
 55°C - 40 с
 72°C - 2 мин 30 с } 15 циклов

94°C - 1 мин
 60°C - 40 с
 72°C - 2 мин 30 } с 25 циклов
 72°C – 7 мин.

Продукты ПЦР разделяли в 1,5% агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера размеров использовали «100 bp leader» (Fermentas).

После окрашивания бромистым этидием продукты ПЦР были визуализированы с помощью трансиллюминатора и задокументированы цифровой камерой «NIKON».

Слот-блот гибридизация.

Перенос ДНК осуществляли в 20 X SSC, с помощью вакуумного насоса (Millipore, USA) на мембрану Immobilon-N (Millipore, USA).

В качестве метки использовали зонды, меченные biotin-11-dUTP («Синтол», Москва), полученные методом ПЦР. После гибридизации мембрану промывали в 2x SSC, 0,5% SDS два раза при комнатной температуре. Затем в 0,2 X SSC, 0,5% SDS два раза при комнатной температуре, 0,16 X SSC, 0,5% SDS два раза по 15 минут при 56 С.

После отмывки проводили детекцию в буфере (0,1 М трис-НСl, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 0,1 М NaCl, 0,05% Triton X-100), с добавленным стрептавидином, который ковалентно связан со щелочной фосфатазой.

Для визуализации мембрану инкубировали в субстратном буфере (0.1 М трис – НСl pH 9.5, 0.1 М NaCl, 50 mM MgCl₂) с добавлением NBT и BCIP.

Флюоресцентная in situ гибридизация (FISH)

Флюоресцентную in situ гибридизацию проводили как описано [10]. Зонды, меченные биотином и дигоксигенином, получали с помощью ПЦР. Смеси для мечения были получены коммерчески и содержали Bio-11d-UTP («Синтол», Москва). Гибридизационная смесь содержала 50% деионизированного формамида, 10% декстрансульфата, 2X SSC, 0.25% SDS и 2.5 нг/мкл метки. Для детекции биотина использовали систему стрептавидин-антистрептавидин с красителем Cy3 (Vector Laboratories, Burlingame, Cal., U.S.A.). Дигоксигенин детектировали с помощью системы FITC-антидигоксигенин (Boehringer, Mannheim, Germany). Хромосомы окрашивали с 6 мг/мл DAPI в Vectashield.

Анализ FISH-сигнала был проведен на флуоресцентном микроскопе «Аxiophot» («Zeiss», Германия) с соответствующей системой фильтров. Для анализа изображений, производили фотосъемку на пленку Fuji 400. После проявки пленку сканировали и обрабатывали изображение на компьютере.

Результаты

1. Слот-блот анализ геномной ДНК *A. fistulosum* с теломерным повтором TTAGGG

Для анализа генома *A. fistulosum* на наличие теломерного повтора (TTAGGG)_n, характерного для позвоночных и ранее обнаруженного у некоторых представителей порядка Аспараговых, таких как *Aloe*, *Hyacinthella*, *Othocalis siberica* [11, 12] был использован метод слот-блот гибридизации и флуоресцентной in situ гибридизации. ДНК *A. fistulosum* была перенесена на мембрану и гибридизована с меченым повтором (TTAGGG)_n. В качестве положительного контроля была использована ДНК курицы (Рис. 1).

Слот-блот анализ не выявил наличия этих последовательностей в геноме *A. fistulosum*, также как это было показано ранее для

A. sepa [8]. Флуоресцентная *in situ* гибридизация так же продемонстрировала отсутствие последовательностей повтора (TTAGGG) на хромосомах *A. fistulosum* (Рис. 2)

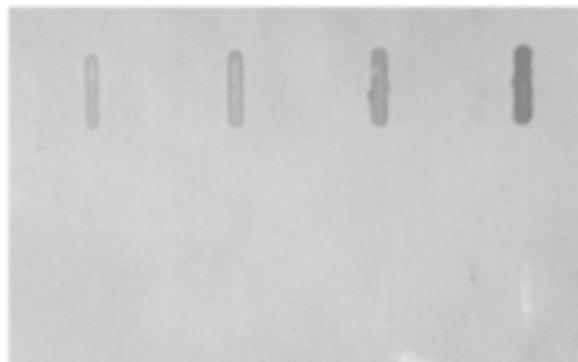
Таким образом, нами показано отсутствие у *A. fistulosum* протяженных участков, содержащих последовательно повторенный повтор TTAGGG, который был недавно обнаружен у высших растений филогенетической ветви Аспараговые.

2. ПЦР анализ геномной ДНК с праймерами на теломерный повтор TTAGGG и TTTAGGG

Данные, полученные в ходе сравнительно недавних исследований, проведенных на представителях филогенетической ветви Аспараговых, позволяют сделать вывод о наличии в геноме целого ряда семейств, теломерного повтора TTAGGG и теломераз, добавляющих этот повтор на окончания хромосом [8, 13]. Однако, у Луковых, в отличие от филогенетически близких родов повтор TTAGGG не детектируется методами на основе ДНК-гибридизации. Нами был использован чувствительный метод одностороннего ПЦР с праймерами комплиментарными повтору TTTAGGG (PTelo1 и PTelo2), и HTelo1 и HTelo2, гибридизующиеся с повтorem TTAGGG.

При использовании одностороннего ПЦР амплификация фрагментов ДНК определенного размера возможна в том случае, если участки с которыми гибридизуются праймеры находятся в инвертированном положении достаточно близко друг к другу. ПЦР с праймерами HTelo1 и HTelo2, а также PTelo1 и PTelo2 выявил наличие в геномах *A. sepa* и *A. fistulosum* последовательностей ДНК, гибридизующихся с праймерами. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР показал наличие в продуктах амплификации несколько четких фрагментов и протяженные «шмеры» (фрагменты ДНК, варьирующей длины) (Рис. 3).

При этом размеры амплифицированных фрагментов ДНК различались у обоих видов и обнаруживали схожесть только при ПЦР с праймером HTelo 2 (Рис. 3, дорожки 2 и 4). При повышении температуры отжига

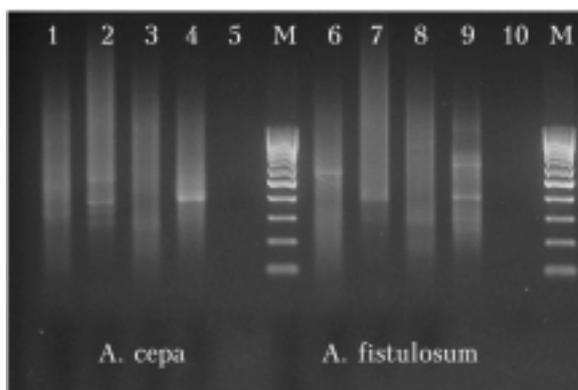


Вверху – контроль (куриная ДНК);
внизу – ДНК *A. fistulosum*

Рисунок 1. Слот-блот гибридизация с меченым повтorem TTAGGG



Рисунок 2. Флуоресцентная *in situ* гибридизация с меченной пробой повтора TTAGGG на хромосомы *A. fistulosum*.



дорожки 1 и 6 с праймером HTelo1,
дорожки 2 и 7 с праймером HTelo2,
дорожки 3 и 8 с праймером PTelo1,
дорожки 4 и 9 с праймером PTelo2,
дорожки 5 и 10 отрицательный контроль,
M-маркер размеров.

Рисунок 3. Результаты ПЦР с теломерными праймерами на ДНК *A. sepa* (дорожки 1, 2, 3, 4) и *A. fistulosum* (дорожки 6, 7, 8, 9).

до 70° С не происходило изменение размеров продуктов амплификации, что указывает на высокую степень гомологии между праймерами и сайтами посадки праймеров (данные не представлены).

Такие результаты могут указывать на то, что короткие участки теломерных повторов обоих типов в прямой и обратной ориентации присутствуют в геноме. Однако, отсутствие сигнала при гибридизации меченного повтора TTAGGG с ДНК *A. fistulosum* указывает на небольшое их количество. Более детальную информацию возможно получить при сиквенировании амплифицируемых продуктов и локализации их на хромосомах *A. fistulosum*.

3. Локализация продуктов амплификации праймеров HTelo1 и HTelo2 на хромосомах *A. fistulosum*.

Для изучения локализации продуктов ПЦР с теломерными праймерами HTelo1 и HTelo2 была использована флуоресцентная *in situ* гибридизация. Продукты амплификации с этими праймерами были помечены и гибридизованы на хромосомы *A. fistulosum*. Продукты амплификации праймера HTelo1 показали теломерную локализацию на некоторых, но не всех хромосомах *A. fistulosum* (рис. 4).

Слабый сигнал указывает на небольшое количество в продуктах амплификации последовательностей, гибридизующихся с окон-

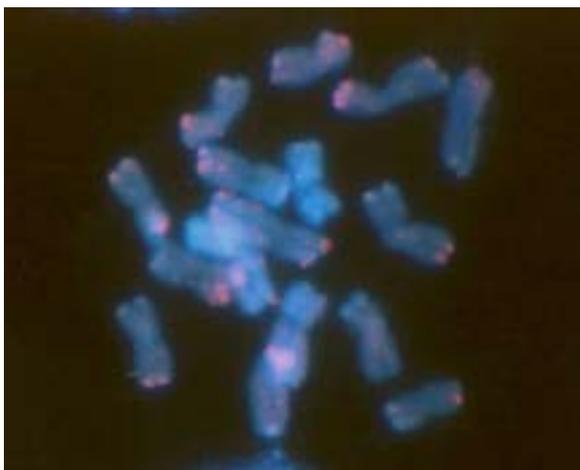


Рисунок 4. Результаты флуоресцентной *in situ* гибридизации продуктов ПЦР праймера HTelo1 на хромосомы *A. fistulosum*.

чаниями хромосом *A. fistulosum*, по этой причине сигнал мог не наблюдаться на окончаниях всех хромосом. Возможно, при ПЦР с праймером HTelo1 амплифицируются единицы сателлитного повтора, присутствующего на концах хромосом *A. fistulosum*.

Однако при использовании в качестве метки единиц сателлитного повтора и продуктов односторонней амплификации с сателлитными праймерами, всегда обнаруживали сигнал в интерстициальном гетерохроматине, а продукты ПЦР с праймером HTelo1 всегда показывали только теломерную локализацию.

При проведении флуоресцентной *in situ* гибридизации с продуктами ПЦР праймера HTelo2 на хромосомы *A. fistulosum* сигнал не детектировался ни в теломерном, ни в интерстициальном положении (данные не представлены). Это указывает на разнородную природу последовательностей в продуктах ПЦР теломерных праймеров HTelo1 и HTelo2.

Поскольку, по результатам слот-блот-гибридизации и флуоресцентной *in situ* гибридизации окончания хромосом *A. fistulosum* не содержат теломерные повторы TTAGGG, характерные для позвоночных, можно говорить о присутствии в теломерной области хромосом неизвестной повторяющейся ДНК.

4. Изучение продуктов амплификации с праймерами HTelo1 и HTelo2

Для анализа нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК, амплифицируемых теломерными праймерами HTelo1 и HTelo2 продукты ПЦР были клонированы. Несколько клонов были отобраны для сиквенирования, так как их размер соответствовал наиболее выраженному фрагменту в продуктах ПЦР.

Как и ожидалось, сиквенированные фрагменты не содержали длинных трактов теломерного повтора TTAGGG (данные не представлены). Кроме того, анализ сиквенированных последовательностей выявил полное отсутствие гомологии не только между продуктами разных праймеров, но и между продуктами амплификации одного праймера. Такие данные указывают на различное

расположение сайтов посадки праймеров и разнородность продуктов амплификации. Для поиска гомологий в базах данных к сиквенированным последовательностям использовали программу BLAST. Однако, последовательностей, гомологичных к сиквенированным, обнаружено не было. Сиквенированные фрагменты показали отсутствие гомологии и с последовательностями, локализуемыми в теломерной части хромосом *A. fistulosum*. Например, не было обнаружено гомологии к сателлитному повтору. Такие данные подтверждают наличие в теломерной области хромосом несателлитной ДНК.

Мы предположили, что при ПЦР с праймером HTelo 1 происходит амплификация фрагментов терминального сателлитного повтора 378 п.н. На это может указывать сигнал на окончаниях хромосом при выполнении флуоресцентной *in situ* гибридизации с мечеными продуктами амплификации этого праймера. Для подтверждения этой гипотезы была использована Саузерн-гибридизация с сателлитным повторм, меченым праймерами 34902 и 34903. Матрицей служила геномная ДНК *A. fistulosum*. Однако, мы не получили достоверный сигнал ни от одной из дорожек, содержащих продукты амплификации, кроме положительного контроля (рис. 5).

Такие результаты могут указывать на амплификацию праймером HTelo 1 неизвестного терминального повтора.

Поскольку последовательности, гибридизующиеся с окончаниями хромосом *A. fistulosum* представлены малым числом копий в продуктах амплификации, их идентификация представляет непростую задачу.

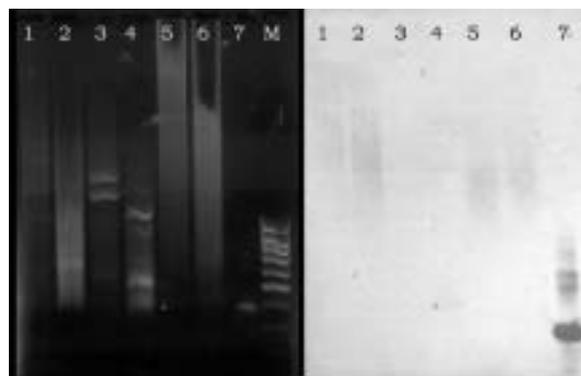
Обсуждение

Используя флуоресцентную *in situ* гибридизацию, Саузерн-гибридизацию, асимметричный ПЦР было показано, что некоторые представители филогенетической ветви Аспараговые, к которым относятся и Луковые, потеряли растительный теломерный повтор ТТАGGG и взамен, на концах хромосом, содержат теломерный повтор, характерный для позвоночных - ТТАGGG [7]. У некоторых представителей семейства Луковых, *Iphenion uniflorum*, *Tulbaghia violacea*, также

был обнаружен теломерный повтор ТТАGGG, характерный для позвоночных [8].

Для обнаружения теломерного повтора ТТАGGG на концах хромосом *A. fistulosum* мы использовали флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) и слот-блот-гибридизацию. При проведении FISH анализа с меченой последовательностью повтора ТТАGGG сигнал не был обнаружен. Учитывая то, что чувствительность FISH метода составляет > 10 тыс.п.н., возможно, что мы не смогли детектировать сигнал из-за того, что протяженность повтора была меньше порога чувствительности метода. Слот-блот-гибридизации также показала отсутствие в геноме *A. fistulosum* теломерного повтора ТТАGGG, характерного для позвоночных и некоторых высших растений. Такие данные соответствуют результатам, которые получила Sykorova и др. [8] при изучении *A. cера*, в геноме которого не было обнаружено теломерных повторов ТТАGGG (характерного для позвоночных), а также ТТАGG (характерного для насекомых), ТТТАGGG (характерного для водорослей), ТТТТGGGG и ТТGGGG (характерных для простейших).

Однако при проведении ПЦР реакций с использованием праймеров, гомологичным к теломерным повторам арабидопсис-типа



В – результаты гибридизации
 1 – продукт ПЦР с праймером HTelo1; 2 – продукт ПЦР с праймером HTelo2; 3 – продукт ПЦР с праймером HTelo1 (*A. cера*); 4 – продукт ПЦР с праймером HTelo2 (*A. cера*); 5 – продукт ПЦР продукт праймера HTelo1 (ДНК курицы); 6 – ПЦР продукт праймера HTelo2 (ДНК курицы); 7 – положительный контроль, продукт ПЦР с праймерами 34902 и 34903.

Рисунок 5. Результаты Саузерн-гибридизации меченного ПЦР терминального сателлитного повтора с продуктами амплификации праймеров HTelo1 и HTelo2. А – результаты электрофореза.

PTelo 1,2 (TTTAGGG) и повтору, характерному для позвоночных HTelo 1,2 (TTAGGG) нами были выявлены четкие фрагменты ДНК и большое количество фрагментов варьирующей длины. Такие данные могут говорить о наличии в геноме коротких участков теломерных повторов обоих типов в прямой и инвертированной ориентации. Однако даже если такие короткие теломерные повторы позвоночных и арабидопсис-типа присутствуют на концах хромосом, они не способны формировать функциональные теломеры. Поскольку, как было показано ранее, мутантные растения арабидопсиса, утратившие теломеразу, и терявшие по 250-500 п.н. за поколение, при длине теломера около 900 п.н. утрачивали жизнеспособность [14].

При клонировании и секвенировании некоторых продуктов ПЦР нами было установлено, что они состоят из разнородных последовательностей, не содержащих повтор TTAGGG. Анализ таких последовательностей показал, что они являются уникальными последовательностями не гомологичными друг другу. Подобные результаты были получены при анализе рода *Cestrum* [15, 16].

При сравнении секвенированных последовательностей с сателлитным повтором нами не обнаружено гомологии. FISH с использованием в качестве пробы смеси продуктов ПЦР с праймером HTelo1 показала строго теломерную локализацию сигнала. Такой результат позволяет выдвинуть две гипотезы: 1) наличие ПЦР продуктов с гомологией к сателлитной ДНК, которые были получены в результате посадки праймеров в теломерной области и амплификации единиц сателлитного повтора или 2) наличие на концах хромосом неизвестного повтора, возможно выполняющего функцию теломерного. Так как сигнал локализовался только в терминальном гетерохроматине, в то время



Рисунок 6. Модель амплификации повтора, заместившего теломерный повтор TTAGGG.

как при гибридизации сателлитного повтора сигнал обнаруживался и в интерстициальном гетерохроматине, то первая гипотеза отвергается.

Такие данные позволяют сделать предположение, что на окончаниях хромосом присутствуют остатки теломерного повтора TTAGGG. Таким образом, у Луковых могло произойти замещение предкового повтора арабидопсис-типа на повтор, характерный для позвоночных. Однако в процессе эволюции произошла утрата и этого повтора. Остатки этого повтора могли послужить сайтами посадки для праймеров и амплифицировать последовательность, заместившую теломерный повтор TTAGGG (рис. 6).

Подтверждением этой гипотезы может служить отсутствие сигнала при гибридизации продуктов ПЦР праймера HTelo2. Связано это с тем, что праймер HTelo1 удлиняется по направлению к теломере, таким образом, позволяя амплифицировать тот повтор, который, возможно, заместил теломерный повтор TTAGGG.

Предполагается, что в результате единственного эволюционного события около 80 млн. лет назад в предковом виде большинства семейств Аспараговых, произошла потеря теломерного повтора, характерного для высших растений. Таким образом, около 6 300 видов (примерно 2,5% покрытосеменных) потеряли повтор TTTAGGG [17]. Однако, у представителей всех семейств, потерявших этот повтор, взамен была обнаружена теломерная последовательность, характерная для позвоночных и показано наличие теломеразы, добавляющей этот повтор на окончания хромосом.

Следует отметить, что не у всех представителей рода *Allium* отсутствуют теломерные повторы известных типов. Так, по результатам слот-блот-анализа у *Allium dregeanum* показано наличие в геноме повтора TTTAGGG, характерного для высших растений [8]. Тем не менее, ни для одного из представителей семейства Луковых не показано наличие теломеразы, восстанавливающей теломерный повтор.

Возможно, в процессе эволюции у Луковых произошла потеря теломерного повто-

ра и функцию защиты теломер стал выполнять сателлитный повтор, обогащенный ретранспозонными последовательностями

[9]. Также, возможно, что произошло замещение этого повтора на другой, неизвестный для других групп организмов.

Список использованной литературы:

1. Zakian V.A. Telomeres: beginning to understand the end // Science. -1995. – Vol. 270. – P. 1601-1607.
2. Heslop-Harrison J.S., Leitch A.R., Schwarzacher T. The physical organization of interphase nuclei // Heslop-Harrison J. S. and Flavell R. B. In The Chromosome – Oxford: BIOS Scientific Publisher, 1993 – P. 221.
3. de Lange T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix // EMBO J. – 1992. -Vol. 11. – P. 717.
4. Егоров Е.Е. Теломеры, теломерная ДНК, хромосомы. // Биологические мембраны. -2001.– №3. – С. 249.
5. Fuchs J., Brandes A., Schubert I. Telomere sequences localization and karyotype evolution in higher plants // Plant Syst. Evol. – 1995. - Vol. 196. – P. 227.
6. Richards E.J. and Ausubel F.M. Isolation of a higher eucariotic telomere from *Arabidopsis thaliana* // Cell. -1988. –Vol. 53. –P. 127.
7. Adams S.P., Hartman T.P.V., Lim K.Y., Chase M.W., Bennett M.D., Leitch I.J. and Leitch A.R. Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5'-(TTTAGGG)_n-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants // Proc. R. Soc. Lond. -2001. –Vol. B268. - P. 1541.
8. Sykorova E., Lim K.Y., Kunicka Z., Chase M.W., Bennett M.D., Fajkus J. and Leitch A.R. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales // Proc. R. Soc. Lond. -2003. – Vol. B270. – P. 1893.
9. Фесенко И.А., Хрусталева Л.И. и Карлов Г.И. Изучение организации сателлитного повтора 378 п.н. в терминальном гетерохроматине *Allium fistulosum*. Генетика. -2001. – N 38: 7.С. 893-903.
10. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., Van Tuyl J.M. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH). // Genome. -1999. – Vol. 42. – P. 681.
11. Weiss-Schneeweiss H., Riha K., Jang C.G., Puizina J., Scherthan H., Schweizer D. Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are maintained by telomerase, which specifically synthesizes vertebrate-type telomere sequences. // The Plant Journal. -2004. – Vol. 37. – P. 484.
12. Weiss H. & Scherthan H. *Aloe* sp. – plant with vertebrate-like telomeric sequence. // Chromos. Res. - 2002. – Vol. 10. – P. 155.
13. Sykorova E., Leitch A.R. and Fajkus J. Asparagales telmerases which synthesize the human type of telomeres. // Plant Mol. Biol. -2006. – Vol. 60, N5. – P. 633-646.
14. Riha K. and Shippen D.E. Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusion in *Arabidopsis*. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -2003. – Vol. 100. – P. 611.
15. Sykorova E., Lim K.Y., Chase M.W., Knapp S., Leitch I.J., Leitch A.R. and Fajkus J. The absence of *Arabidopsis*-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. // The Plant Journal. -2003. Vol.– 34. – P. 283.
16. Sykorova E., Lim K.Y., Fajkus J., Leitch A.R. The signature of the *Cestrum* genome suggests an evolutionary response to the loss of (TTTAGGG)_n telomeres. // Chromosome. – Vol. 112. – P. 164.
17. Fay M.F. et. al. Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. // Wilson K.L. & Morrison D.A. (ed.) In Monocots: systematic and evolution. – Melbourne: CSIRO, 2000. – P. 360.