

УДК 597.851(576.354.4)

СРАВНЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ГЕМИКЛОНАЛЬНОГО МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА *PELOPHYLAX ESCULENTUS* И РОДИТЕЛЬСКОГО ВИДА *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (AMPHIBIA, ANURA)

А.О. Вегерина, О.В. Бирюк, Д.А. Шабанов

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков, 61077 Украина
E-mail: anastasia.vegerina@gmail.com; mykhailova.o.v@gmail.com; d.a.shabanov@gmail.com

Сравнение устойчивости сперматогенеза у гемиклонального межвидового гибрида *Pelophylax esculentus* и родительского вида *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura). Вегерина А.О., Бирюк О.В., Шабанов Д.А. — Представлены результаты кариологического изучения клеток зародышевой линии самцов межвидовых гибридов *Pelophylax esculentus* и одного из его родительских видов, *P. ridibundus*. Анеуплоидные клетки были зарегистрированы как у гибридов, так и у особей родительского вида, однако средняя встречаемость сперматоцитов I с неправильным количеством бивалентов существенно выше у *P. esculentus*. Диапазон изменений доли нормальных клеток у особей в пределах выборки гибридов варьирует значительно шире, чем у *P. ridibundus*. Мы сделали вывод об относительной неустойчивости механизма гемиклонального наследования, которая приводит к затруднениям сперматогенеза и снижению эффективности воспроизводства межвидовых гибридов.

Ключевые слова: *Pelophylax esculentus*, сперматогенез, нарушения, анеуплоидия, гемиклональность.

Comparison of spermatogenesis stability in hemiclinal interspecific hybrid *Pelophylax esculentus* and parental species *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura). Vegerina A.O., Biriuk O.V., Shabanov D.A. — The article presents the results of karyological study of male germline cells of interspecific hybrid *Pelophylax esculentus* and one of its parental species *P. ridibundus*. Aneuploid cells were detected in both, hybrids and parental species individuals, but the average frequency of spermatocytes I with the wrong number of bivalents is significantly higher in *P. esculentus*. The range of changes in the normal cells proportion among the individuals in the sample of hybrids varies significantly wider than among *P. ridibundus*. We have concluded that the comparative instability of hemiclinal inheritance mechanism leads to difficulties in spermatogenesis and reduction of the interspecific hybrids reproductive efficiency.

Key words. *Pelophylax esculentus*, spermatogenesis, abnormalities, aneuploidy, hemiclinality.

Введение

В гибридогенный комплекс зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) входят два родительских вида: прудовая лягушка, *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) и озерная лягушка, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), а также их гибриды (Berger, 1964). Для обозначения межвидовых гибридов по ряду причин используется название, аналогичное видовому — съедобная лягушка, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758). Как правило, у *P. esculentus* в гаметы переходит только

один родительский геном, который без рекомбинации (клонально) наследуется в ряду поколений (Tunner, 1974). Такое воспроизводство называется гемиклональным (Plötner, 2005). В типичном случае *P. esculentus* обитают и воспроизводятся совместно с представителями одного или обоих родительских видов, образуя гемиклональные популяционные системы, ГПС (Шабанов, Литвинчук, 2010). Для региона, названного Северско-Донецким центром разнообразия зеленых лягушек, характерны ГПС, состоящие из диплоидных и триплоидных *P. esculentus*, а также *P. ridibundus* (Шабанов, Литвинчук, 2010). *P. lessonae* в этом регионе отсутствует, и все ее геномы передаются через межвидовых гибридов, *P. esculentus*.

Гемиклональное воспроизводство гибридов обеспечивается специфическим характером гаметогенеза, который, по сути, является аномальным (при сравнении с типичным, характерным для представителей родительских видов). Геномы родительских видов *P. esculentus* complex отличаются настолько, что типичный мейоз у гибрида оказывается невозможным. Адаптация, позволяющая обойти это затруднение, заключается в том, что из клеток зародышевой линии ещё до начала мейоза удаляется один из родительских геномов. В серии цитогенетических исследований с применением флуоресцентной микроскопии австрийские авторы Х. Туннер и С. Хеппих-Туннер показали, что удаление неклонального генома происходит во время митотических делений клеток зародышевой линии. После этого клональный геном удваивается (дублируется), причем этот процесс протекает до вступления клеток в мейоз или же у самок может происходить уже в ходе мейоза (Tunner, Herrlich-Tunner, 1991). У триплоидных особей гаметогенез протекает аналогично, за исключением стадии удвоения (Vinogradov et al., 1991; Plötner, 2005). Вследствие таких аномальных процессов у гибридных лягушек, по сравнению с представителями родительских видов, воспроизводство сталкивается с рядом трудностей, к числу которых относятся нарушения развития гонад, аномалии личиночного развития, появление мозаичных особей, уменьшение жизнеспособности и продолжительности жизни (Berger, 2008; Михайлова и др., 2011).

Особенности гаметогенеза представителей Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек изучались с применением различных методик, в том числе при помощи проточной ДНК-цитометрии суспензии сперматозоидов (Боркин и др., 2005); получения метафазных пластинок из разрушенных клеток (Сурядная, 2003; Манило и др., 2007); при помощи электрофоретического анализа суспензии половых клеток (Межжерин и др., 2007; Морозов-Леонов и др., 2009). Работы по изучению овогенеза *P. esculentus* проводили также при помощи маркеров хромосом типа ламповых щеток и методики FISH (Dedukh et al., 2015). Кроме прочего, для изучения сперматогенеза применяли кареоанализ в давленных препаратах (Михайлова и др., 2011). На основании результатов перечисленных работ можно утверждать, что во многих клеточных линиях гибридов гаметогенез, который можно считать для них нормальным (с учетом его аномальности по сравнению с типичным случаем рекомбинантного наследования), нарушается. Следствием таких нарушений является появление значительного количества анеуплоидных и полиплоидных клеток зародышевой линии (вероятнее всего, в подавляющем большинстве не доходящих до стадии зрелых гамет). Это означает, что у *P. esculentus* в связи с гемиклональным наследованием процесс образования гамет протекает неустойчиво. Однако полученные результаты носят описательный характер, количественный учет нарушений в ходе гаметогенеза, который позволил бы оценить груз гемиклональности, до настоящего момента не производился.

На основании вышесказанного можно утверждать, что сравнение устойчивости сперматогенеза у диплоидных межвидовых гибридов зеленых лягушек

(*P. esculentus*) и родительских видов гибридогенного комплекса представляет значительный интерес. В связи с этим, задачей данной работы стало описание и подсчет аномальных митотических и мейотических пластинок в семенниках гибридов *P. esculentus* и одного из родительских видов *P. ridibundus*. Для этого мы применяли метод карิโอанализа по препаратам раскапанных клеток.

Материал и методы

Мы исследовали выборку из 23 особей зеленых лягушек, в которую входили 10 диплоидных самцов *P. esculentus* и 13 самцов *P. ridibundus* из Северско-Донецкого центра разнообразия — *P. esculentus* complex. Лягушек отловили с июня по октябрь 2013 г. в окрестностях с. Гайдары, с. Гениевка и с. Сухая Гомольша Змиевского района Харьковской области, а также в черте города Харькова (улица Тимуровцев). Видовую принадлежность лягушек определяли по комплексу внешних признаков (Шабанов и др., 2006). Для особей, собранных в черте города, состав генома был определен с помощью проточной ДНК-цитометрии, которая выполнялась Ю.М. Розановым и С.Н. Литвинчуком в ЦИН РАН (г. Санкт-Петербург). Для проведения кариологического анализа у животных были взяты фрагменты кишечника и семенники. Для косвенного определения ploидности у зеленых лягушек получали и исследовали мазки крови согласно опубликованной методике (Бондарева и др., 2012).

Каждая исследуемая особь за сутки до забоя получала внутривенную инъекцию 0,04% водного раствора колхицина по 0,1–0,3 мл (в зависимости от массы). Полученные в ходе вскрытия материалы промывали, разрезали на фрагменты и помещали в гипотонический раствор (0,07M KCl), на 20 мин. Затем раствор заменяли фиксатором Карнуа (3 части метанола и одна часть ледяной уксусной кислоты), при этом смену фиксатора производили трижды через каждые 30 мин. Из фиксированных материалов приготавливали кариологические препараты методом раскапывания. Для этого фрагмент ткани переносили в 70% раствор уксусной кислоты, где он мацерировался до образования суспензии клеток. Полученную суспензию наносили на нагретые до 60°C на нагревательном столике предметные стекла при помощи пастеровской пипетки в виде капель диаметром 1 см. Нанесенные капли немедленно забирали пипеткой, в результате чего на стеклах оставалось небольшое количество отдельно лежащих клеток. Препараты высушивали и помещали в термостат при температуре 37°C на 3 недели.

Окончательное определение ploидности проводили с помощью подсчета хромосом (26 для диплоидов или 39 для триплоидов) в не менее чем семи метафазных пластинках из соматической ткани каждой особи. В случае, когда метафазных пластинок, пригодных для подсчета в них хромосом, было недостаточно, ploидность определяли на основании числа ядрышек в ядрах не менее, чем 20 клеток. Для этого нами было использовано окрашивание нитратом серебра (серебрение) — метод, применяемый для обнаружения района ядрышкового организатора (РЯО, сайты 18S + 28S рДНК) в метафазных хромосомах, а также ядрышек в интерфазных ядрах соматических клеток (Birshtein, 1984; Schmid, 1982). В результате серебрения ядрышки становятся отчетливо видны как темные участки: два в ядрах диплоидных особей, и, соответственно, три — в ядрах триплоидных (Вегерина и др., 2013). Окрашенные нитратом серебра препараты помещали в 2% раствор красителя Гимзы, а затем промывали в дистиллированной воде и высушивали. Все изученные нами особи оказались диплоидными.

На полученных препаратах семенников выбирали клетки, находящиеся на разных стадиях митотического или мейотического деления. Пригодные для анали-

за пластинки микроскопировали с увеличением в 160, 640 и 1600 раз с масляной иммерсией и фотографировали при помощи цифровой USB-камеры для микроскопа (ScienceLab View.7). На полученных фотографиях производили подсчет структур в пластинках на стадиях метафазы митоза, а также стадии диакинеза и метафазы I мейоза, в которых количество и структура хромосом или бивалентов видны наиболее отчетливо.

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программы Statistica.

Результаты и обсуждение

В семенниках зеленых лягушек нами было зарегистрировано значительное количество анеуплоидных клеток, то есть клеток, имеющих количество хромосом, не кратное гаплоидному набору. Анеуплоидные клетки мы наблюдали на разных стадиях гаметогенеза, причем как у гибридных особей, так и у особей родительских видов. Число хромосом в таких клетках колебалось в очень широких пределах. В то время как диплоидный набор у зеленых лягушек составляет 26 хромосом (рис. 1), мы регистрировали гипогиплоидные (меньше 13), гипергаплоидные (больше 13), гиподиплоидные (меньше 26) и гипердиплоидные (больше 26) пластинки (рис. 2). Наличие гипогиплоидных, гипергаплоидных и гиподиплоидных пластинок частично можно было бы объяснить потерями при изготовлении карио-

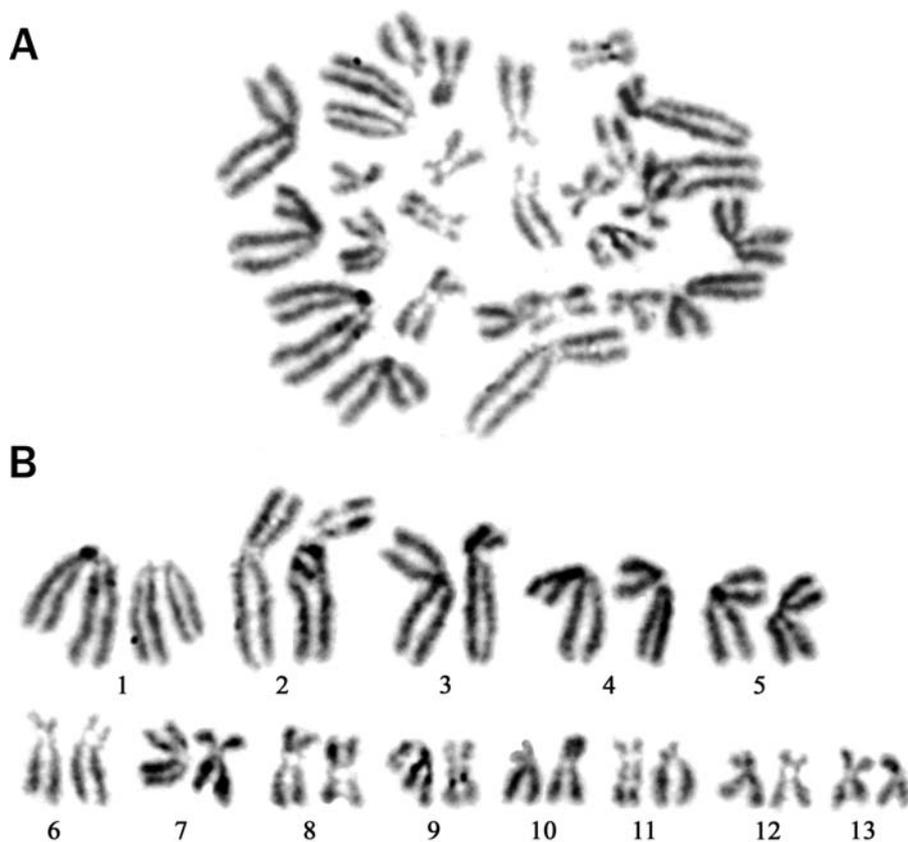


Рис. 1. Сперматогоний диплоидного самца *P. esculentus*. 2n метафаза митоза, 26 хромосом: А — метафазная пластинка; В — кариограмма.

Fig. 1. *P. esculentus* diploid male's spermatogonia. 2n metaphase of mitosis, 26 chromosomes: А — metaphase plate; В — karyogram.

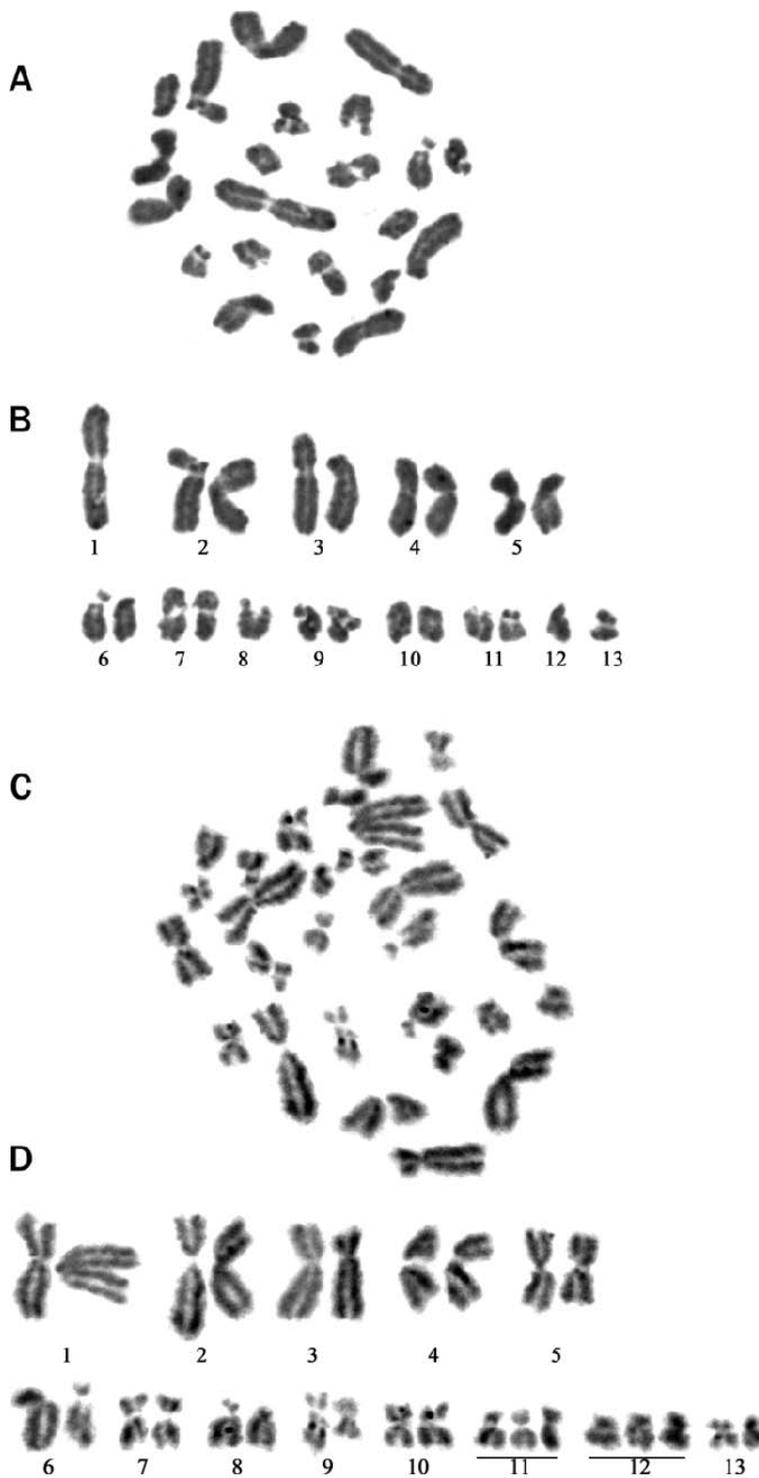


Рис. 2. Анеуплоидные сперматогонии диплоидных самцов *P. esculentus*. Гиподиплоидный набор хромосом на стадии метафазы митоза, 22 хромосомы: А — метафазная пластинка; В — кариограмма. Гипердиплоидный набор хромосом на стадии метафазы митоза: С — метафазная пластинка; D — кариограмма.

Fig. 2. Aneuploid spermatogonia of *P. esculentus* diploid males. Hyperdiploid chromosome set in metaphase of mitosis, 22 chromosomes: A — metaphase plate; B — karyogram. Hypodiploid chromosome set in metaphase of mitosis, 28 chromosomes: C — metaphase plate; D — karyogram.

логических препаратов методом раскапывания или, иначе говоря, списать на ошибку метода. Впрочем, следует учесть, что в использованном нами варианте кареоанализа проходило раскапывание не свободно взвешенных метафазных пластинок (что повышает вероятность потери части хромосом или наложения пластинок), а целых клеток, что резко уменьшает вероятность ошибок. Еще сложнее было бы объяснить ошибкой метода появление гипердиплоидных пластинок. Их наличие прямо указывает на нарушения в характерном для *P. esculentus* механизме гаметогенеза. Наконец, следует указать, что характер пространственного распределения хромосом указывает на то, что увеличение пloidности происходило в результате нарушений расхождения, а не наложения разных пластинок.

В мейозе мы также наблюдали анеуплоидные и удвоенные наборы бивалентов и, кроме того, нарушения в образовании самих бивалентов — униваленты, количество которых, в свою очередь, также могло быть некрatным гаплоидному набору (рис. 3). Следует отметить, что другими авторами, изучавшими самок *P. esculentus*, также были отмечены как анеуплоидные клетки среди оогониев (Tunner, Heppich-Tunner, 1991), так и ооциты, содержащие униваленты, удвоенное число бивалентов и даже биваленты и униваленты одновременно (Dedukh et al., 2015). В семенниках трех диплоидных самцов *P. esculentus* помимо анеуплоидных пластинок были найдены полиплоидные — $3n$ и $4n$ пластинки (рис. 4). Следует подчеркнуть, что у этих особей в соматических тканях наблюдали только диплоидные наборы хромосом и размер эритроцитов также колебался в пределах, соответствующих размерам диплоидных клеток (Бондарева и др., 2012).

В целом зарегистрированная для *P. esculentus* картина аномалий соответствовала результатам предыдущих исследований, проведенных нами с использованием иного метода (Михайлова и др., 2011). Кроме того, эти результаты совпадают с данными других авторов по лягушкам из Харьковской области (Сурядна, 2005; Манило и др., 2007, Dedukh et al., 2015), а также перекликаются с данными, полученными при изучении популяций зеленых лягушек из западной Европы (Günther, 1975; Tunner, Heppich-Tunner, 1991).

В семенниках *P. ridibundus* аномальные клетки с неправильным количеством структур встречались реже, чем у гибридных особей. Все зарегистрированные нарушения *P. ridibundus* были аналогичны описанному выше для *P. esculentus*. У одного из самцов озерной лягушки нами была зарегистрирована полиплоидная клетка с хромосомным набором, превышающим триплоидный ($n = 47$). Вероятно,

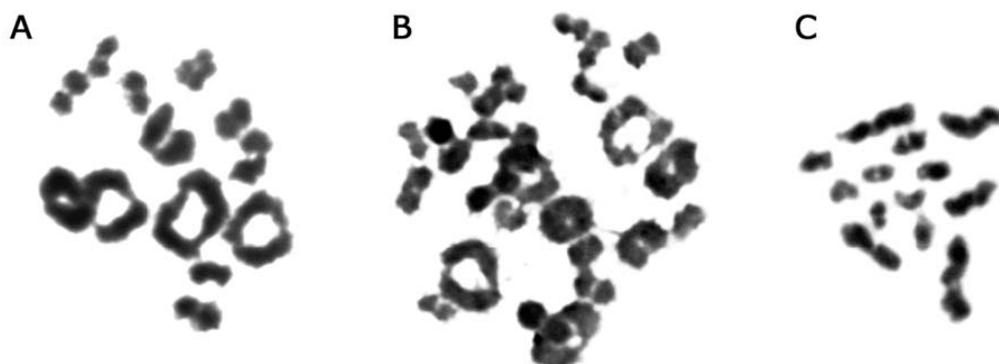


Рис. 3. Сперматоциты I диплоидных самцов *P. esculentus*: А — профазы I мейоза, 13 бивалентов (норма); В — профазы I мейоза, 26 бивалентов; С — 13 унивалентов.

Fig. 3. *P. esculentus* diploid male's spermatocytes I: А — prophase I of meiosis; 13 bivalents (normal); В — prophase I of meiosis, 26 bivalents; С — 13 univalents.



Рис. 4. Сперматогония диплоидного самца *P. esculentus*. Метафаза митоза, 51 хромосома (норма — $4n = 52$), одна хромосома из 5-й пары отсутствует: А — метафазная пластинка; В — кариограмма.

Fig. 4. *P. esculentus* diploid male's spermatogonia. Metaphase of mitosis, 51 chromosomes (normal — $4n = 52$), one chromosome in 5-st pair have been lost: А — metaphase plate; В — karyogram.

это была тетраплоидная пластинка, понесшая потери. Подобное отклонение от нормы у *P. ridibundus* регистрировалось и описывалось ранее другими авторами (Günther, 1975; Манило, Радченко, 2010).

Проведенный с помощью U-критерия Манна-Уитни анализ различий между выборками гибридов и особей родительского вида по количеству нормальных клеток (с количеством бивалентов равным тринадцати) показал, что отличие этих выборок является значимым ($p = 0,0015$). Отчетливо видно (рис. 5), что средняя доля нормальных сперматоцитов от их общего количества для изученных особей *P. ridibundus* (0,86) более, чем в полтора раза превышает таковую для *P. esculentus* (0,51), причем диапазон изменений этой доли у особей съедобных лягушек значительно шире. В целом доля нормальных сперматоцитов I среди всех изученных пластинок *P. ridibundus* составила 0,75, а для *P. esculentus* — 0,40. Более низкая общая доля нормальных клеток *P. ridibundus* среди изученных нами клеток (0,75) отличается от средней доли таких клеток, установленных нами для этого вида (0,86). Это отличие является следствием того, что мы более тщательно исследовали особей родительского вида с повышенной частотой аномалий в кариотипах: от каждой такой особи мы изучили большее количество клеток.

На рисунке 6 показано распределение частот встречаемости сперматоцитов I порядка с определенным числом бивалентов. Хорошо видно, что встречаемость клеток с неправильным количеством бивалентов существенно выше для *P. esculentus*. При этом пределы, в которых изменяется количество структур в сперматоцитах, у съедобных лягушек несколько шире, чем у озерных. Вероятно, значительная доля таких аномальных клеток на последующих этапах сперматогенеза отсеивается. Возможно, впрочем, что часть этих клеток может пройти все стадии гаме-

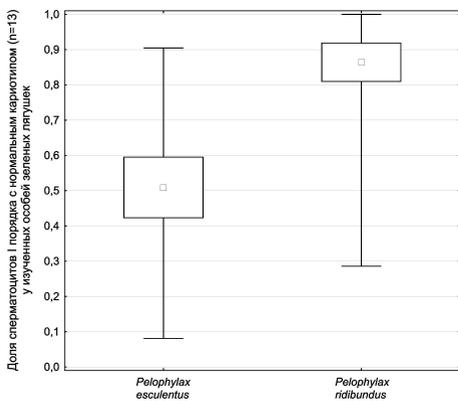


Рис. 5. Средние значения и доверительные интервалы долей сперматозоидов I порядка с нормальным количеством бивалентов ($n = 13$).

Fig. 5. Mean values and confidence intervals of spermatocytes I with a normal amount of bivalents ($n = 13$) share.

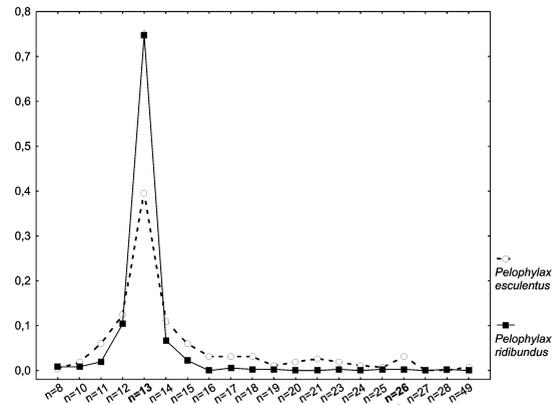


Рис. 6. Распределение частот встречаемости различных наборов бивалентов во всей изученной совокупности клеток *P. ridibundus* и *P. esculentus*.

Fig. 6. The arrangement of different bivalent sets frequencies of occurrence in the totality of *P. ridibundus* and *P. esculentus* cells studied.

тогенеза, давая начало анеуплоидным сперматозоидам. Интересно также наличие небольшого пика у *P. esculentus* для $n = 26$. Это означает, что в семенниках диплоидных гибридов образуется некоторое количество тетраплоидных клеток, которые затем могли бы привести к образованию диплоидной спермы. Несмотря на более чем десятилетнюю историю изучения Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек, до сих пор остается невыясненным вопрос, в результате каких скрещиваний в нем возникают триплоидные *P. esculentus*. Образование диплоидными гибридными самцами диплоидной спермы является одним из потенциальных объяснений феномена появления триплоидов.

Таким образом можно заключить, что гемиклональность у межвидовых гибридов зеленых лягушек является менее устойчивым механизмом наследования, чем образование рекомбинантных гамет, характерное для представителей родительских видов. Относительная неустойчивость гаметогенеза гибридов должна приводить к снижению эффективности их воспроизводства. Однако следует принять во внимание, что, даже с учетом описанных аномалий, гемиклональное наследование как естественно возникающий способ преодоления гибридной стерильности обеспечивает массовое воспроизводство *P. esculentus* при скрещивании с родительскими видами.

По мнению авторов, апробированный в этой работе методический подход нуждается в применении к более широкому материалу. Желательно оценить долю аномалий в ходе сперматогенеза у другого родительского вида, *P. lessonae*. Интерес представляет выяснение того, как соотносится уровень аномалий при сперматогенезе у гибридов F1, возникающих от скрещивания родительских видов, и у гибридов, передававших клональный геном в значительном количестве поколений. Можно предположить, что уровень аномалий гаметогенеза у родительских видов, обитающих в ГПС вместе с гибридами, будет отличаться от такового у представителей того же вида, происходящих из обычных моновидовых популяций, и не контактирующих с гибридами.

- Бондарева А.А., Бибик Ю.С., Самило С.М., Шабанов Д.А. Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Сер. біологія. — 2012. — Вип.15, № 1008. — С. 116–123. — [http:// batrachos.com /](http://batrachos.com/) Бондарева_2012_ Цитогенетические
- Боркин Л.Я., Зиненко А.И., Кориунов А.В. и др. Массовая полиплоидия в гибридогенном комплексе *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) на Востоке Украины // Мат. I конф. Українського Герпетологічного Товариства. — К.: Зоомузей ННПМ НАНУ, 2005. — С. 23–26. — [http:// batrachos.com /](http://batrachos.com/) Боркин_др_2005_ Полиплоидия
- Вегерина А.О., Мелешко Е.В., Пырина И.С. и др. Определение соотношения диплоидов и триплоидов среди метаморфов зеленых лягушек в Северско-Донецком центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Сер. біологія. — 2013. — Вип.18, № 1079. — С. 107–113. — [http:// batrachos.com /](http://batrachos.com/) Вегерина_др_2014_ Метаморфи1.
- Манило В.В., Радченко В.И., Кориунов А.В. Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl esculenta*) из Харьковской области Украины // Наук. вісник Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 21. — С. 68–73.
- Манило В.В., Радченко В.И. Кариологическое исследование *Pelophylax ridibundus* (Anura, Amphibia) восточной части Украины // Збірник праць Зоологічного музею. — 2010. — № 41 — С. 111–121.
- Михайлова О.В., Кечеджи А.Е., Шабанов Д.А. Изучение сперматогенеза у диплоидных *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) при помощи кареоанализа в раздавленных препаратах // Праці Українського герпетологічного товариства. — 2011. — № 3. — С. 120–127. — [http:// batrachos.com /](http://batrachos.com/) Михайлова_др_2011_ Сперматогенез_диплоидов
- Михайлова О.В., Усова О.С., Шабанов Д.А. Як оцінити популяційний вантаж, що пов'язаний з геміклональною гібридизацією в популяційних системах *Pelophylax esculentus* complex? // Біологія та валеологія. — Вип. 13 — Харків : ХДПУ, 2011. — С. 44–50.
- Морозов-Леонов С.Ю., Межжерин С.В., Некрасова О.Д. и др. Наследование родительских геномов гибридной формой *Rana "esculenta"* (Amphibia, Ranidae) // Генетика. — 2009. — Том 45, № 4. — С. 488–495.
- Сурядная Н. Н. Материалы по кариологии зеленых лягушек (*Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, *Rana esculenta*) с территории Украины // Вестн. зоол. — 2003. — 37, № 1. — С. 33–40.
- Шабанов Д.А., Зиненко А.И., Кориунов А.В. и др. Изучение популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) в Харьковской области: история, современное состояние и перспективы // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. — 2006. — Вип.3, №729. — С. 208–220.
- Шабанов Д.А., Лутвинчук С.Н. Зеленые лягушки: жизнь без правил или особый способ эволюции? // Природа. — 2010. — № 3 (1135). — С. 29–36. — [http:// batrachos.com /](http://batrachos.com/) Лягушки
- Dedukh D., Mazepa G., Shabanov D. et al. Optional endoreplication and selective elimination of parental genomes during oogenesis in diploid and triploid hybrid european water frogs // Plos One. — 2015. — 10, N 4. — P. 1–19.
- Berger L. Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species? // Ann. Zool. PAN. — 1964. — 22, N 13. — P. 245–261.
- Berger L. European green frogs and their protection. — Poznan : Fundacja Biblioteka Ekologiczna, 2008. — 72 p.
- Birstein V.J. Localization of NORs in karyotypes of four *Rana* species // Genetica. — 1984. — N 64. — P. 149–154.
- Günther R. Untersuchungen der meiose bei mänchen von *Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam. und der bastardform „*Rana esculenta*“ L. (Anura) // Biologisches Zentralblatt. — 1975. — 94, N 3. — S. 277–294.
- Plötner J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche. — Bielefeld : Laurenti-Verlag, 2005. — 161 S.
- Schmid M. Analysis of the Structure and Variability of NORs in Anura // Chromosoma. — 1982. — N 87. — P. 327–344.
- Tunner H. G. Die Klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // Z. zool. Syst. und Evolut.-forsch. — 1974. — 12, N 4. — S. 309–314.
- Tunner H.G., Heppich-Tunner S. Genome Exclusion and Two Strategies of Chromosome Duplication in Oogenesis of a Hybrid Frog // Naturwissenschaften. — 1991. — 78. — P. 32–34.
- Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R., Rosanov J.M. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry // Genome. — 1991. — 33. — P. 619–627.