

## 황소개구리 (*Rana catesbeiana*)와 참개구리 (*Rana nigromaculata*) 정자의 미세구조

이 정 훈\*, 박 기 룡  
경남대학교 자연과학대학 자연과학부

### Sperm Ultrastructure of *Rana nigromaculata* and *Rana catesbeiana*

Jung-Hun Lee\* and Ki-Ryong Park

Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Kyungnam University,  
Masan 631-701, Korea

(Received November 16, 2005; Accepted December 13, 2005)

#### ABSTRACT

The sperm morphology of two Korean frogs, *Rana catesbeiana* and *R. nigromaculata* (Ranidae) was studied with the light microscope, scanning and transmission electron microscopes. Sperm heads of the *R. catesbeiana* and *R. nigromaculata* were long cylinder shapes. In the total length of *R. nigromaculata* sperm (51.2  $\mu\text{m}$ ) was longer than those of *R. catesbeiana* (44.6  $\mu\text{m}$ ). Both *R. catesbeiana* and *R. nigromaculata* had the long head and principal piece, and short middle piece, but the neck was undeveloped. The axonemal structures contain a 9+9+2 arrangement of microtubules. The number of mitochondria in middle piece have less than mammalian sperm, which irregular surrounded the axone of the middle piece. In conclusion, *R. catesbeiana* and *R. nigromaculata* shared many similar features in sperm heads, neck, middle piece, and a site of mitochondria and axial structure, and it suggests that these species should be closely related.

**Key words :** *Rana catesbeiana*, *Rana nigromaculata*, Sperm morphology, Ultrastructure

#### 서 론

양서강의 유미류 정자는 긴 침체와 perforatorium, 잘 발달된 경부, axial rod와 편모에 얇은 파동막 (undulating membrane)을 갖는 것이 일반적인 특징이

다 (Kim et al., 1995; Lee & Kwon, 1996). 반면에 무미류 정자들은 침체와 perforatorium 그리고 미성숙한 경부에 ring 구조를 갖고 있으며, 파동막이라 불리는 얇은 세포질막과 axial rod를 보유한 편모를 갖고 있다는 점에서 다른 척추동물과 차이가 있다 (Burgos & Fawcett, 1956; Sandoz, 1974; Furieri, 1975; Rastogi et

본 연구는 2004년도 경남대학교 학술논문공개 연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

본 논문은 2005년 한국전자현미경학회 추계학술대회에 발표된 논문임.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Jung-Hun Lee, Division of Natural Science, College of Natural Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea. Ph.: (055) 249-2243; FAX: (055) 244-6504; E-mail: jhlee@kyungnam.ac.kr

al., 1988; Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995).

무미류 정자의 미세구조에 관한 연구로는 Burgos & Fawcett (1956)가 *Bufo arenarum* 정자의 미세구조를 처음으로 보고 한 이후, 무당개구리과(Discoglossidae)의 *Discoglossus pictus* (Sandoz, 1974)와 *Bombina variegata* (Furieri, 1975) 및 *Bombina orientalis* (Kwon & Lee, 1995; Lee & Kwon, 1996), 두꺼비과(Bufonidae)의 *Bufo bufo gararizans* (Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995), 청개구리과(Hylidae)의 *Hyla japonica* (Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995), 피파과(Pipidae)의 *Xenopus laevis* (Bernardini et al., 1986), 개구리과(Ranidae)의 *Rana nigromaculata*와 *Rana dybowskii* 및 *Rana rugosa* (Kwon & Lee, 1995), *Rana catesbeiana* (Sprando & Russell, 1988) 등이 보고되어져 있으며, 한국산 참개구리, 옴개구리 산개구리 3종에 대한 정소주기(Ko et al., 1998)와 참개구리 정자의 내부구조에 대한 단편적인 보고를 제외하고는 이들 종에 대한 정자의 비교연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 양서류(Amphibia) 개구리목(Salientia) 개구리과(Ranidae)의 황소개구리(*Rana catesbeiana*)와 참개구리(*Rana nigromaculata*)에 대한 정자의 형태적 특징을 통하여 다른 무미류 종과 어떠한 차이점이 있는가를 알아보고 특히, 이들 종들의 유연관계를 고찰하고자 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

본 연구의 실험재료는 황소개구리(*Rana catesbeiana*), 참개구리(*Rana nigromaculata*), 2종의 수컷으로서 2004년 5월과 6월에 거쳐 경남 무학산 만날재와 우포늪에서 각각 채집하였다(Table 1).

각각의 종들은 채집 즉시 실험실로 운반한 다음 이들 각 종의 개체들은 ether로 마취 후 즉시 정소를 적

출하여 미리 준비 해 둔 깨끗한 슬라이드 위에 정소 조직을 올려놓은 다음 해부현미경(Model: SM-10) 하에서 핀셋으로 정소조직을 파쇄하여 나온 부유물질을 슬라이드 상단에 도말하고, 10분 정도 방치한 다음 즉시 3%-glutaraldehyde(4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 용액에 30~60분간 고정하였다. 고정 후 20분 정도 공기 건조(air dry)시킨 후 상등액은 Millonig's Buffer(4°C, pH 7.4)로 수세한 다음 alcohol 농도 상승(70, 80, 90, 100%) 순으로 각각 10분씩 탈수하여 광학현미경(Nikon, LH-M100C-1)으로 정자의 구조를 관찰하였다. 광학현미경 사진 촬영이 끝난 프레파라트는 이온 증착기(Ion coater; Giko., IB-3)에서 금으로 3분 정도 코팅 한 다음 주사 전자 현미경(ESI SX-40)으로 관찰 하였다. 정자의 미세구조 관찰을 위하여 각 종들의 정소조직들은 3%-glutaraldehyde(4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 수용액에 24시간 담가둔 후 동일한 완충액으로 수세한 다음 세절하여 다시 3%-glutaraldehyde(4°C, pH 7.4, Millonig's Buffer) 수용액으로 2시간 전 고정 하였고, 전 고정이 끝난 조직편 들은 완충액으로 수세한 다음 1.33%-OsO<sub>4</sub>용액에 2시간 후 고정 하였다. 고정이 끝난 조직편 들은 다시 완충액으로 2-3회 수세 한 다음 알코올 농도 상승(70, 80, 90, 100%) 순으로 탈수 하였고, 최종 propylene oxide로 치환한 다음 Epon 812로 포매하여 굳혔다. 포매가 끝난 조직편들은 ultramicrotome(MT 6000; Sorvall, Dupont)을 이용하여 60~90 nm의 초박 절편을 얻어 uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 이중 염색하여 투과전자현미경(TEM, H-600, Hitachi)으로 관찰 하였다.

## 결 과

황소개구리와 참개구리의 정자 크기와 형태적 특징

**Table 1.** Date examined, localities and number of individual in two species of Korean frogs, *Rana catesbeiana* and *Rana nigromaculata*

Species	Date examined	Localities	No. of individual
<i>Rana catesbeiana</i>	May 13, 2004	Upo-nŭp, Ch'an-gryōng-gun, Kyungnam	2
	Jun. 7, 2004	Upo-nŭp, Ch'an-gryōng-gun, Kyungnam	2
<i>Rana nigromaculata</i>	May 28, 2004	Mannaljei, Mt. Muhak, Masan, Kyungnam	3
	Jun. 7, 2004	Mannaljei, Mt. Muhak, Masan, Kyungnam	2

**Table 2.** Comparison of spermatozoa of *Rana catesbeiana* and *R. nigromaculata*

Species	Head ( $\mu\text{m}$ )				Tail ( $\mu\text{m}$ )		
	Total length	Width	Nuclear length	Shape	Total length	Middle piece length	Principal piece length
<i>Rana catesbeiana</i>	13.8	1.2	13.0	long-cylinder	30.8	1.2	29.6
<i>Rana nigromaculata</i>	15.8	1.2	14.8	long-cylinder	35.4	0.8	34.6

을 알아 보기 위하여 광학 및 전자현미경(주사형 및 투과형 전자현미경)으로 관찰한 결과는 다음과 같았다(Table 2, Fig. 7).

### 1. 황소개구리의 정자

황소개구리의 정자 전체길이는  $44.6 \mu\text{m}$  정도로서, 정자머리의 길이는  $13.8 \mu\text{m}$ , 정자의 핵은  $13.0 \mu\text{m}$ 을 차지하고 있었으며, 정자머리의 중심 폭은  $1.2 \mu\text{m}$ 이었다. 그리고 정자머리의 형태는 긴 원통형을 취하고 있었으며(Figs. 1, inset a, 2), 정자꼬리는 중편부( $1.2 \mu\text{m}$ )와 주편부( $29.6 \mu\text{m}$ )로 구성되어 있었으며, 정자꼬리의 전체길이는  $30.8 \mu\text{m}$ 이었다(Table 2, Fig. 1, inset b). 첨체(Acrosome)는 핵의 전방부에 볼록렌즈 모양을 취하고 있으며, 첨체내부에는 크고 작은 공포(vacuole)가 내재되어져 있고(Fig. 4). 핵질은 매우 균질한 상태로 되어져 있었다. 경부(Neck)는 잘 발달되어져 있지 않고 이중소관으로 구성된 축사(Axon)가 중편부에서 주편부로 뻗어져 있었다(inset a in Fig. 2). 중편부는 매우 짧고, 미토콘드리아 수는 다른 무미류 중에 비해 매우 적으며 축사를 중심으로 다소 불규칙하게 감겨져 있었다(Fig. 2, inset b, c). 축사구조는 9+2구조로 구성되어져 있었다(inset d in Fig. 2).

### 2. 참개구리의 정자

참개구리의 정자 전체길이는  $51.2 \mu\text{m}$ 이었다. 정자머리의 길이는  $15.8 \mu\text{m}$ , 정자의 핵은  $14.8 \mu\text{m}$ 이었고, 정자머리의 중심 폭은  $1.2 \mu\text{m}$ 이었다. 그리고 정자머리의 형태는 황소개구리와 동일하게 긴 원통형을 취하고 있었으며(Fig. 3, inset a, b), 정자꼬리 역시 황소개구리와 마찬가지로 중편부( $0.8 \mu\text{m}$ )와 주편부( $34.6 \mu\text{m}$ )로 구성되어 있었다. 그리고 정자꼬리의 전체길이는  $35.4 \mu\text{m}$ 이었다(Table 2, Fig. 3). 첨체는 핵의 전방

부에 불규칙하게 돌출되어져 있으며, 첨체내부에는 아주 큰 공포가 내재되어져 있었으며(Inset a in Fig. 4), 핵질은 매우 균질한 상태로 되어져 있으나 글리코겐 과립을 갖는 크고 작은 공포가 내재되어져 있었다(Fig. 4). 경부는 황소개구리와 마찬가지로 잘 발달되어져 있지 않으며, 이중소관으로 구성된 축사(Axon)가 중편부에서 주편부로 뻗어져 있었다(Fig. 5). 중편부 역시 황소개구리와 마찬가지로 매우 짧으며, 미토콘드리아 수는 황소개구리와 마찬가지로 다른 무미류 중에 비해 매우 적고, 축사를 중심으로 불규칙하게 감겨져 있었다(Figs. 5, 6). 축사구조 역시 황소개구리와 마찬가지로 9+2구조로 구성되어져 있었다(Fig. 7).

## 고 찰

대부분의 무미류 정자들은 대개 첨체와 perforatorium, 미성숙한 경부에 ring 구조물, 그리고 파동막이라 불리는 얇은 세포질막과 axial rod를 보유한 편모를 갖고 있다는 점에서 다른 척추동물과 차이가 있다(Burgos & Fawcett, 1956; Sandoz, 1974). 그러나 본 연구에서 황소개구리와 참개구리 두 종 모두는 긴 원통형의 정자두부와 볼록렌즈상의 첨체 및 미발달된 경부를 갖는다는 점에서는 일반 유미류의 특징을 가지나 이들 두 종 모두 파동막을 가지고 있지 않는다는 점에서 차이가 있다. 조류 정자에 있어서, 참새목의 정자는 일반적으로 편모가 나선막(Humphrey, 1972) 혹은 파동막(Henley et al., 1978)이라 불리는 구조물이 외형을 나선의 형태로 싸고 있는 것이 특징적이긴 하나(Asa & Phillips, 1987) 양서류에서 파동막이라고 불리는 편모구조와는 차이가 있다(Burgos & Fawcett, 1956). 이러한 파동막의 존재는 생물 종들의 진화 단계를 특징 지을 수 있는 중요한 증거로서 뿐만 아

나라 종을 구별하는데도 중요한 key가 되며, 이러한 정자의 형태적 특징은 종의 유연관계를 밝히는데 매우 중요한 역할을 담당하리라 여겨진다. 또한 고등한 척추동물의 정자에서 어떤 형질들은 하등한 척추동물의 정자가 갖는 원시적인 특징을 여전히 보유하고 있는데, 이러한 형질은 체외수정과 체내수정을 행하는 생물종과의 관계를 모색하는데 많은 유익한 정보를 제공해 주리라 여겨진다.

한편, 참개구리와 옴개구리 및 산개구리 3종에 대한 각각의 정소의 특징, 그리고 정자형성주기에 미치는 호르몬과의 관계를 비교분석하였는데, 정자형성은 광주기와 기온, 먹이, 장우량 등의 거시적 환경요소에 의해 결정되어지는 것으로 추론하였고, 이러한 정소주기와 기상 변화는 개구리의 미시적 서식환경에도 많은 영향을 미치는 것으로 추론하였다(Ko et al., 1998). 따라서 이러한 거시적-미시적 환경적 요소가 정자형성 뿐만 아니라 정소주기가 번식시기를 결정하는데 중요한 요인이 됨을 시사해 준다.

첨체의 모양이나 그 구성 물질에 있어서, 황소개구리와 참개구리는 첨체내부에 크고 작은 공포(vacuole)가 산재해 있었던 반면에, 청개구리(Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995)는 전자밀도가 높은 물질로 가득 채워져 있었다. 핵질에 있어서, 황소개구리와 참개구리 두 종 모두는 균질한 상태를 나타내었으며, 이는 산개구리(*Rana dybowskii*), 옴개구리(*Rana rugosa*)와도 같은 결과를 나타내고 있으나(Kwon & Lee, 1995), 핵 안에는 글리코겐 과립을 갖는 크고 작은 공포가 내재되어져 있는 점에서는 산개구리와 옴개구리와는 다소 차이를 나타내었다.

경부는 무미류 정자에서 보여주는 특징과 마찬가지로 황소개구리와 참개구리 모두 잘 발달되어져 있지 않은 반면에 두꺼비의 경우에는 잘 발달된 경부와 경부내 물질이 axial rod 축에 접선방향으로 신장되는 양상은 Bufo 또는 Bufonidae의 특징으로 간주하였다(Kwon et al., 1993). 또한 황소개구리와 참개구리 정자는 이중소관으로 구성된 축사(Axon)가 중편부에서 주변부로 뻗어져 있었으며, 이들 두 종 모두 중편부가 청개구리에 비해 매우 짧고, 미토콘드리아 수 역시 매우 적으며, 축사를 중심으로 불규칙하게 감겨져 있다는 점에서 청개구리 정자와는 다소 차이를 나타내었

다.

꼬리에 있어 유미류와 무리류 정자의 차이점은 그 구성요소는 같지만 axial rod와 축사의 배열에서 다소 차이를 보인다. 무미류(무당개구리과, Discoglossidae)는 중심에 위치한 axoneme와 정자꼬리의 바깥쪽에 있는 axial rod로 되어 있는 반면에 유미류는 중심에 위치한 axial rod와 그 주위에 axoneme가 나선형으로 주행하고 있고, 무미류는 marginal filament가 없는 반면에 유미류는 axonemal doublet no. 8과 연관되어 나타난다는 점이다(Baker & Bieseles, 1967).

Ring 구조는 모든 유미류에서 관찰되며, axial rod를 따라서 신장된 것과 신장되지 않은 것의 2가지 양상으로 대별되는데, 신장된 ring 구조는 *Amphiuma tridactylum*와 *A. mems* 등의 고등 유미류에서 관찰되는 반면에, 신장되지 않은 ring 구조는 도롱뇽을 포함한 *Cryptobranchus alleganiensis bishopi* 등이 대체로 하등 유미류에서 보고되어 있는데, ring 구조는 경부와 마찬가지로 유미류의 고등 분류군으로 갈수록 잘 발달되어 나타난다(Baker & Bieseles, 1967).

본 연구에서 황소개구리와 참개구리 두 종 모두는 중편부가 짧는데 이는 체외수정을 행하는 종에서 볼 수 있는 정자의 특징을 잘 반영해 주고 있다. 이상에서 살펴본 바와 같이 황소개구리와 참개구리의 정자의 형태는 매우 유사한 반면에, 기존에 보고된 두꺼비(Kwon et al., 1993; Kwon & Lee, 1995), 산개구리(Kwon & Lee, 1995), 옴개구리(Kwon & Lee, 1995), 청개구리(Lee & Kwon, 1992; Kwon & Lee, 1995) 그리고 무당개구리(Kwon & Lee, 1995)의 정자와는 형태적으로 많은 차이를 나타내는 것으로 미루어 보아 황소개구리와 참개구리의 두 종은 계통학적으로 유연관계가 매우 깊은 군이라 여겨진다.

## 참 고 문 헌

- Asa CS, Phillips DM: Ultrastructure of avian spermatozoa: In: Mohri H, ed, New horizons in sperm cell research, pp. 369-373, New York, Gordon and Breach, 1987.
- Baker KR, Bieseles JJ: Spermateliosis of a salamander *Amphiuma tridactylum* Cuvier. La Cellule 67 : 91-118, 1967.

- Bernardini G, Stipani R, Melone G: The ultrastructure of *Xenopus* spermatozoon. J Ultrastr Mol Res 94 : 188-194, 1986.
- Burgos MH, Fawcett DW: An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum hensel*. J Biophysic Biochem Cytol 2 : 223-253, 1956.
- Furieri P: The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). Monit Zool Ital 9 : 185-201, 1975.
- Henley C, Feduccia A, Cosstello DP: Oscine spermatozoa: A light and electron microscopy study. Condor 80 : 41-48, 1978.
- Humphrey PN: Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non passerine birds. J Reprod Fertil 29 : 327-336, 1972.
- Kim KH, Park WH, Lee YH: Ultrastructure of spermatozoa in urodeles, *Hynobius leechii* (Amphibia: Urodela). Korean J Electron Microsc 25 : 111-121, 1995.
- Ko SK, Kang HM, Im WB, Kwon HB: Testicular cycles in three species of Korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, and *Rana dybowskii*. Gen Comp Endocrinol 111 : 347-358, 1998.
- Kwon AS, Kim HJ, Lee YH: Fine structure of the neck of spermatozoa and spermiogenesis in *Bufo bufo gargarizans* (Amphibia, Anura). Nature Life (Korean) 23 : 95-105, 1993.
- Kwon AS, Lee YH: The fine structure of spermatozoa in *Bombina orientalis* (Anura, Amphibia). Nature Life 22:15-22, 1992.
- Kwon AS, Lee YH: Comparative spermatology of anurans with special references to phylogeny. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine JL ed, Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy, pp.321-332, Mem Mus Nat Hist Nat 1995.
- Lee YH, Kwon AS: Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). Acta zoologica 73 : 49-55, 1992.
- Lee YH, Kwon AS: Ultrastructure of spermatozoa in urodela and primitive anura (Amphibia) with phylogenetic considerations. Korean J System Zool 12 : 253-264, 1996.
- Rastogi RK, Bagnara JT, Iela L, Krasovich MA: Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis; a light and ultrasonic study. J Morph 197 : 277-302, 1988.
- Sandoz D: Development of the neck region and the ring during spermiogenesis of *Discoglossus pictus* (Anura, Amphibia). In: Afzelius BA, ed, The functional anatomy of the spermatozoon, pp. 237-247, 1974.
- Sparando RL, Russell LD: A comparative study of Sertoli cell ectoplasmic specialization in selected non mammalian vertebrates. Tissue cell 19 : 479-493, 1988.

#### < 국문초록 >

본 연구는 개구리과 (Ranidae)에 속하는 황소개구리 (*Rana catesbeiana*)와 참개구리 (*Rana nigromaculata*)에 대한 정자의 형태적 특징을 알아보기 위하여 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 황소개구리와 참개구리의 정자 모두 두부의 형태는 긴 원통형이었다. 정자의 전체길이는 참개구리 (51.2 μm)가 황소개구리 (44.6 μm)보다 더 길며, 이들 두 종 모두는 긴 머리와 매우 짧은중편부 및 아주 긴 주편부를 가지고 있었다. 이들 두 종 모두 핵내에는 글리코젠 과립을 함유하고 있었으며, 경부 (Neck)는 잘 발달되어져 있지 않은 반면, 축사구조는 9+2 구조로 구성되어져 있었다. 중편부의 미토콘드리아 수는 포유동물 정자의 그것에 비해 매우 적으며, 축사를 중심으로 다소 불규칙하게 감겨져 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아, 황소개구리와 참개구리는 정자두부, 경부 및 중편부 그리고 미토콘드리아의 위치와 축사구조가 매우 유사함으로 이들 두 종은 유연관계가 깊은 군이라 여겨진다.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Light micrograph (inset a) and scanning electron micrographs (Fig. 1, inset b) showing the external features of sperm of *Rana catesbeiana*. The sperm head of *R. catesbeiana* had a long-cylinder shape (Fig. 1, inset a) and long tail. Note the middle piece was very short. Asterisks indicate the mitochondrial sheath (inset b). N, nucleus; Mp, middle piece; Pp, principal piece.
- Fig. 2.** Transmission electron micrographs showing the internal features of sperm of *Rana catesbeiana*. The chromatin granules in nucleus became fibrous granules (Fig. 2), Note numerous vacuoles in acrosome (inset a). The number of mitochondria in middle piece have less than mammalian sperm, which irregular surrounded the axone of the middle piece (inset b). Cross section of middle piece (inset c). The axonemal structures contains a 9+9+2 arrangement of microtubules (inset d). A, acrosome; Ax, axon; Cv, clear vacuoles; M, mitochondria; N, nucleus; Vc, vacuole.
- Fig. 3.** Light micrograph (inset a) and scanning electron micrographs (Fig. 3, inset b) showing the external features of sperm of *Rana nigromaculata*. The sperm head of *R. nigromaculata* had a long-cylinder shape (Fig. 3, inset a, b) and long tail as *R. catesbeiana*. Note the middle piece was very short. Asterisks indicate the mitochondrial sheath (Fig. 3). A, acrosome; Mp, middle piece; N, nucleus; Pp, principal piece.
- Fig. 4.** Transmission electron micrographs showing the internal features of sperm of *Rana nigromaculata*. The glycogen granules include in nucleus, but the neck was undeveloped. Note a large of vacuole in acrosome (inset a). A, acrosome; M, mitochondria; N, nucleus; Gc, glycogen granules.
- Figs. 5–6.** High magnified view of longitudinal (Fig. 5) and cross (Fig. 6) sections of the middle piece. The mitochondria was irregular surrounded the axone of the middle piece. M, mitochondria; N, nucleus.
- Fig. 7.** Cross section of the principal piece. The axonemal structures contains a 9+2 arrangement of microtubules as *R. catesbeiana*.









