

## 한국산개구리 (*Rana coreana*) 정소주기에 관한 연구

신 정 민 · 고 선 근<sup>1,\*</sup>

호남대학교 대학원 생물학과, <sup>1</sup>호남대학교 생물학과

### A Study on the Testicular Cycle of Korean Brown Frog (*Rana coreana*)

Jung-Min Shin and Sun-Kun Ko<sup>1,\*</sup>

Graduate school, Honam University, Gwangju 506-714, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Honam University, Gwangju 506-714, Korea

**Abstract** - In order to determine the testicular cycle of the Korean brown frog, *Rana coreana*, the gonadosomatic index (GSI) and the changes of germ cells in testis for adult males were investigated throughout the year. The study indicated that the spermatogenesis in the seminiferous tubule of testis began in August and became most active in the month of September, and the GSI was recorded the highest and the cross area of seminiferous tubule was the widest on this period. Furthermore the seminiferous tubules at the post spawning stage appeared in testis during February, and the spermatogenesis was quiescence period of time from March to July and the GSI and the cross area of seminiferous tubule were found to be the lowest. Based on these observations, we suggest that, GSI of male Korean brown frog changes significantly between July to August, indicating the testicular cycle with discontinuous spermatogenic process, and the breeding season was confirmed to be February.

**Key words** : testicular cycle, spermatogenesis, *Rana coreana*

## 서 론

개구리류의 정소주기는 세정관내에 존재하는 생식세포들의 변화와 그 구조를 관찰하여 정자형성과정을 조사하여 파악한다(Iwasawa and Asai 1959; Rastogi 1976). 개구리 정소의 세정관내 정자형성과정의 양상은 개체들의 서식지 기후와 종(species)에 따라 큰 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(Kera and Iwasawa 1981; Bentley 1982; Yoneyama and Iwasawa 1985). 열대지방 및 아열대

지방에 서식하는 종들은 연중 정자형성과정이 진행되어 연속형(continuous type)으로 분류되며 이러한 유형은 남부유럽에 서식하는 유럽참개구리(*Rana esculenta*)가 대표적으로 알려져 있다. 온대지방에 서식하는 종의 경우 계절적 변화와 함께 정자형성과정이 진행되는데 일부 종은 번식기 이후 일정 기간 동안 생식적으로 정지기(quiescent period)를 갖는 불연속형(discontinuous type)으로서 북개구리(*Rana temporaria*)가 대표적으로 알려져 있으며 이와는 달리 온대지방에 서식하는 일부 종에서는 정자형성과정이 계속 진행되다가 생식세포들의 분열이 일정 시기에 억제되는 잠재적 연속형(potentially continuous type)으로 분류되며 북부유럽에 서식하는 유럽참개구리(*Rana esculenta*)가 이러한 정자형성주기를 나타내어 개

본 논문은 신정민의 석사학위 논문을 보완, 수정하여 작성되었음.  
\*Corresponding author: Sun-Kun Ko, Tel. 062-940-5432,  
Fax. 062-940-5207, E-mail. sunkun@honam.ac.kr

구리류의 정소내 정자형성주기의 유형은 3가지가 존재하는 것으로 알려져 있다 (van Tienhoven 1983). 국내에 서식하고 있는 개구리 중 참개구리 (*Rana nigromaculata*) (Ko et al. 1997; Ko et al. 1998), 움개구리 (*Rana rugosa*) (Ko et al. 1997; Ko et al. 1998), 황소개구리 (*Rana catesbeiana*) (Kim and Ko 1998)는 정소주기중 유사분열에 의한 제1 정원세포(primary spermatogonia), 제2 정원세포(secondary spermatogonia)를 포함한 낭(cyst)은 존재하나 감수분열이 진행되는 제1 정모세포(primary spermatocyte)를 포함한 낭들의 증가현상이 나타나지 않는 시기가 존재하여 잠재적 연속형으로 진행되고 북방산개구리 (*Rana dybowskii*) (Ko et al. 1993; Ko et al. 1997; Ko et al. 1998)의 경우 제1 정원세포의 일부만이 존재하는 일정 기간의 정지기를 갖는 불연속형을 나타내는 정소주기에 관한 연구가 진행된 바 있다. 본 연구는 한국산개구리 (*Rana coreana*)의 정소내에서 일어나는 정자형성과정이 시기에 따른 변화가 어떻게 진행되는가를 알아보기 위해 세정관의 생식세포 수 및 생식세포 낭 수의 변화를 연중 조사하고 세정관을 단위로 분열중인 생식세포와 정자의 분포 양상의 변화를 조사하여 한국산개구리의 정소주기를 파악하고자 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

한국산개구리는 한국양서파충류 증·양식연구소에서 실제 사육된 개체를 매월 일정시기에 3~5마리를 공급받아 실험에 사용하였다. 동물 저울(triple beam balance, OHAUS: GT480)을 이용하여 체중을 측정하고 정소를 채취하여 화학천칭(Denver instrument CO., AA-250: GT4800)

으로 정소의 무게를 측정 후 3% formalin에 고정하였다. Gonadosomatic index (GSI)의 연중변화 양상을 조사하기 위해 정소무게 값을 체중으로 나누어 100을 곱하여 구하였다. 세정관의 넓이와 낭 내 생식세포 핵의 직경은 AM-423x Dino-Eye와 Dinocapture 2.0 program (ANMO)를 이용하여 값을 구하였다.

### 2. 정소 내 구조변화 조사

3% formalin 용액에 고정된 정소를 paraplant에 포매하여 정소의 단축방향으로 5~6  $\mu\text{m}$ 의 두께로 세절한 후 Harris hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하면서 세정관 낭 내에 존재하는 생식세포군들을 Rastogi (1976), Mathews (1986)의 방법에 따라 제1 정원세포, 제2 정원세포, 제1 정모세포, 제2 정모세포(secondary spermatocyte), 정세포(spermatid)로 나누어 이들의 변화 양상을 연중 조사하였다. 또한 정소의 세정관내 구조변화를 연중 조사하여 정소주기를 파악하기 위해 Nagahama (1986)와 Matsuyama et al. (1991)의 분류방법에 따라 세정관내의 생식세포와 생식세포들을 포함한 낭, 정자의 분포 양상을 관찰하여 세정관의 변화를 5단계로 분류하였다. 미성숙단계(stage I)는 세정관내에 유사분열이 진행되는 제1 정원세포와 제2 정원세포가 존재하며 감수분열이 진행된 생식세포가 거의 존재하지 않는 시기로 정하였다. 정자형성단계는 생식세포들의 분포양상에 따라 2단계로 나누어 모든 발생단계의 생식세포들이 존재하는 시기로 세정관내에 강소(lumen)가 형성되지 않고 일부의 정자들만 존재하는 전기 정자형성단계(stage II)와 모든 발생단계의 생식세포들이 관찰되며 세정관내 강소에 존재하는 정자가 거의 관찰되지 않는 후기 정자형성단계(stage III)로 정하였다. 정자이동단계(stage IV)는 완성된 정자들이 세정관의 강소와 생식세포 낭 부위로 이동되는 시

**Table 1.** Maturity stages of testis in *R. coreana*

Maturity stage of testis	Histological appearance
I. Immature	Gonadal cysts are filled with spermatogonia cells and the number of cysts increases steadily. Spermatocytes and sperms are not observed in seminiferous tubules.
II. Early spermatogenesis	Spermatogenic cells of all developing stages and few sperms appear, but seminiferous lumen is not formed yet. Number of spermatocyte and spermatid increases but spermatogonia decrease.
III. Late spermatogenesis	All developing spermatogenic cells are present abundantly and the lumens are already formed into seminiferous tubules. However, sperms do not move into lumen.
IV. Spermiation	Lumens are filled with sperms, and a few of the developing gonadal cysts remain in seminiferous tubules.
V. Post-spawning	Most of sperms disappeared and the some residual sperms are found in the seminiferous lumen. Some of new developing primary spermatogonia cells begin to appear.

기로 정하였다. 정자배출 후 단계 (stage V)는 세정관내의 잔류 정자들과 제1 정원세포들이 관찰되는 시기로 정하여 매달 각 개체 정소의 세절된 부분 중앙의 세정관을 포함하여 이를 중심으로 상하좌우 각각 1개씩 모두 5개의 세정관을 무작위로 선택하여 검경하였다 (Table 1).

### 3. 통계처리

생식소 무게 및 GSI (생식소무게/체중×100)와 생식세포들의 연중변화 검정은 one way analysis of variance (ANOVA)에 이은 Duncan's multiple range test로 수행하였다.

## 결 과

### 1. 정소 내 구조변화 조사

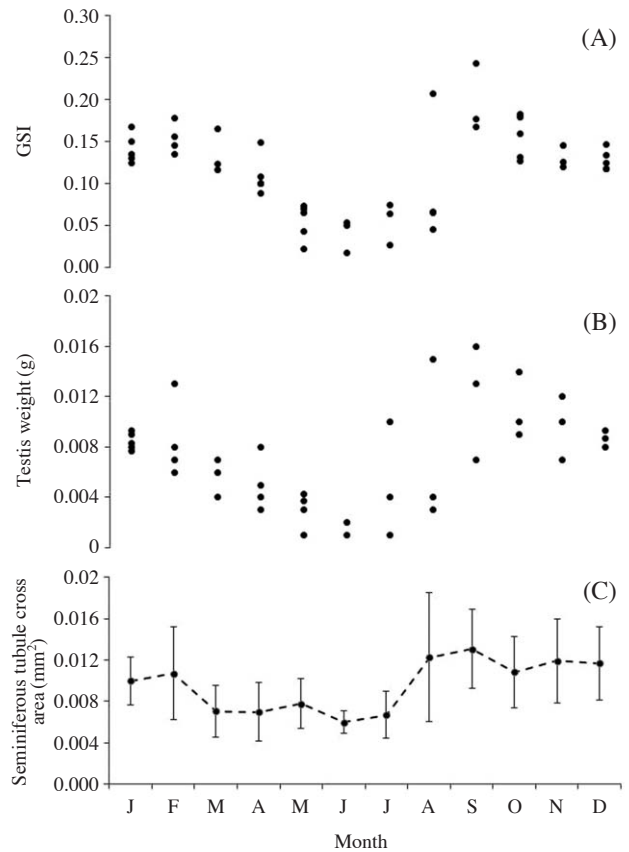
한국산개구리의 세정관 낭 내에 존재하는 생식세포의 수와 핵의 직경을 측정하여 각 단계를 분류하였다 (Rastogi 1976; Mathews 1986). 제1 정원세포의 경우 낭 내에 1개의 세포만이 존재했으며 핵의 직경이 10~13 μm를 나타냈다. 제2 정원세포는 낭 내에 2~8개의 세포가 관찰되었으며 핵의 직경은 8~12 μm를 나타냈다. 제1 정모세포는 9~19개의 세포가 존재했으며 핵의 직경은 5~7 μm를 나타냈다. 제2 정모세포는 17~32개의 세포가 관찰되었으며 핵의 직경은 2~4 μm로 나타났다. 정세포의 경우 하나의 낭 내에 33~64개의 세포가 관찰되었으며 핵의 직경은 1~2 μm를 나타냈다 (Table 2).

### 2. GSI, 정소 무게, 세정관의 단면적 변화

한국산개구리의 GSI 변화를 조사한 결과 3월 (0.135±0.26)부터 점차 감소하기 시작하여 7월 (0.055±0.026)까지 매우 낮은 수준을 유지하다가 8월 (0.138±0.114)부터 급격히 증가하기 시작하여 9월 (0.196±0.041)에 최대치를 나타내었으며 이후 11월 (0.130±0.013)부터는 다시 1월 (0.128±0.032)~2월 (0.154±0.019)의 수준을 나타내었다 (Fig. 1A, p<0.05). 정소의 절대무게도 유사한 결과를 나타내었으며 8월~10월 (0.007~0.014) 사이에는 5월~7월 (0.002~0.003)에 비해 거의 3.5배 정도로 크기가 증가하였다 (Fig. 1B, p<0.05). 세정관의 단면적은 8월 (0.012±0.006)에 증가하기 시작하여 (Fig. 3A 참조) 9월 (0.013±0.004)에 가장 넓은 것으로 나타났으며 (Fig. 3B 참조) 10월 (0.011±0.003)부터 다시 감소하여 11월 (0.012

**Table 2.** Characteristics of spermatogenic stages in male frogs of *R. coreana*

Spermatogenic stage	Number of cell	Nnuclear diameter
Primary spermatogonia (PSG)	1 (cell/cyst)	10~13 μm
Secondary spermatogonia (SSG)	2~8 (cell/cyst)	8~12 μm
Primary spermatocytes (PSC)	9~19 (cell/cyst)	5~7 μm
Secondary spermatocytes (SSC)	17~32 (cell/cyst)	2~4 μm
Spermatids (ST)	33~64 (cell/cyst)	1~2 μm



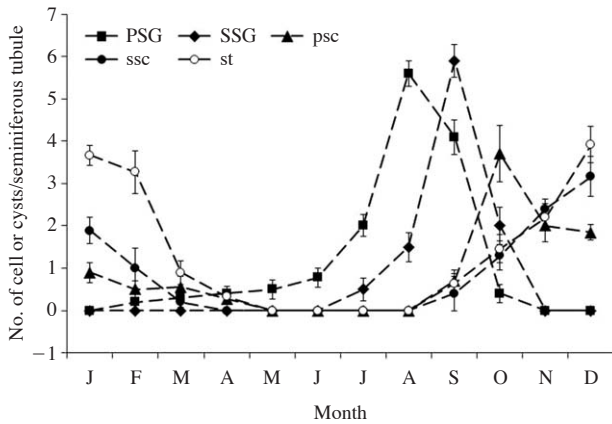
**Fig. 1.** Annual changes in Gonadosomatic index (GSI) (A) and Testis weight (B), Seminiferous tubule cross area (C) in *R. coreana*. Gonadosomatic index (GSI) (A) and Testis weight (B), Seminiferous tubule cross area (C) of individual frogs were plotted in the figure.

±0.004) (Fig. 3C 참조)부터는 번식기인 2월 (0.011±0.004) (Fig. 3D 참조)과 유사한 넓이를 유지하여 GSI 변화와 유사한 증감현상을 나타냈다 (Fig. 1C, p<0.05).

### 3. 정자 분포 및 분열중인 생식세포에 따른 정소주기 분석

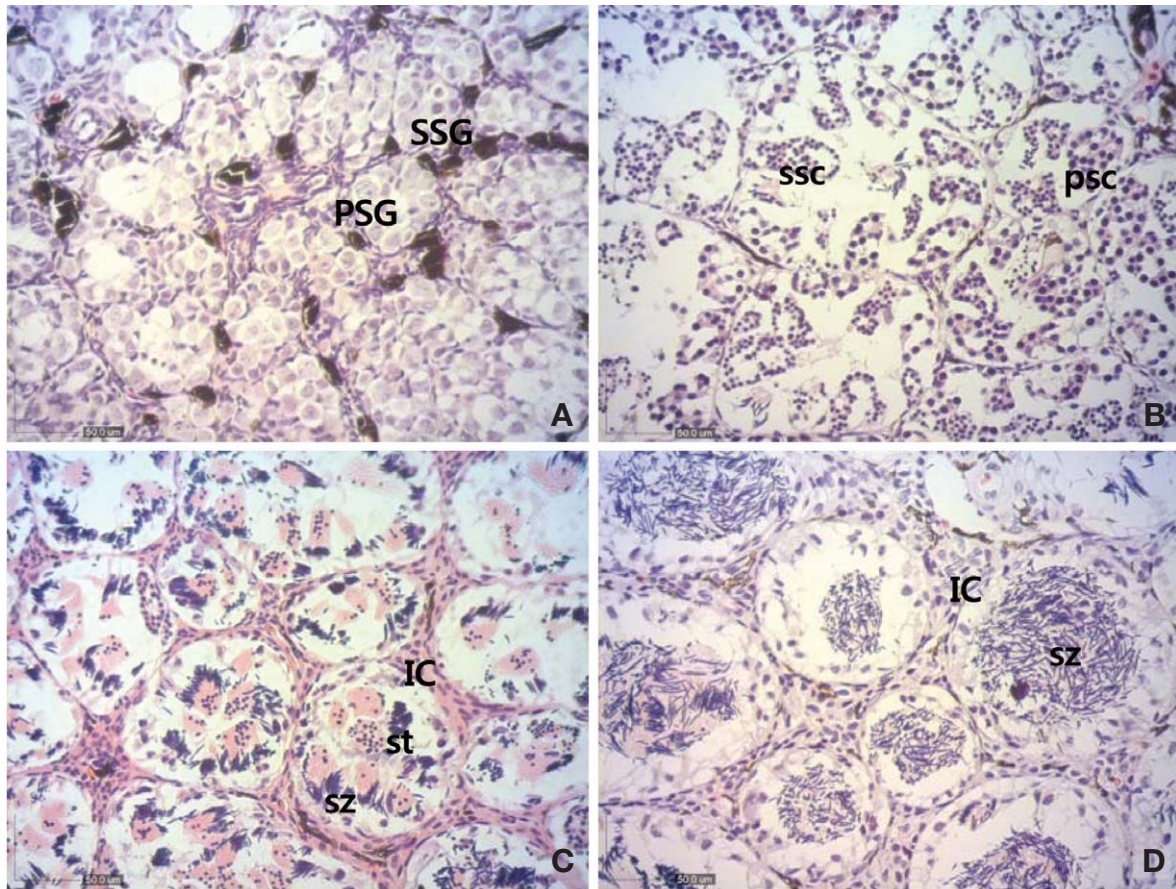
1월의 정소에서는 각 세정관에서 제1 정원세포가 관



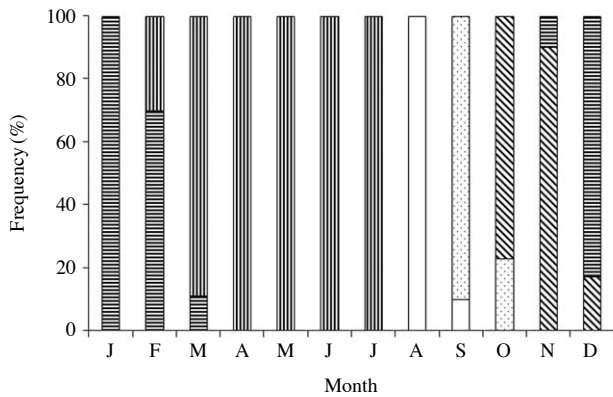


**Fig. 2.** Seasonal variations in cell number or number of cysts of different spermatogenic stages of *R. coreana*. Each point in the figure represents average (mean  $\pm$  SE) number of cells or cysts per seminiferous tubule (n=15, 5 cross sections, 3 animals). PSG: primary spermatogonia, SSG: secondary spermatogonia, psc: primary ptermatocyte, ssc: secondary spermatocyte, st: spermatid.

찰되지 않았으나 2월부터 제1 정원세포가 일부의 세정관에서 관찰되기 시작하여 6월에는 2개 정도로 증가하였으며 8월에 약 6개로 최대값을 나타낸 후 유의하게 감소하기 시작하여 11월부터는 관찰되지 않았다. 제2 정원세포는 1월에서 6월까지 존재하지 않았으며 7월에 일부의 세정관에서 출현하여 8월에는 약 2개 정도를 나타내다가 9월에 약 6개 정도로 급격히 증가하였으며 10월에는 이 생식세포들이 2개 정도로 줄어들었고 11월에는 확인할 수 없었다. 제1 정모세포들을 간직한 낭들도 9월에 각 세정관에서 약 1개 정도가 나타나기 시작하였으며 10월에는 약 4개 정도로 증가하여 최대치를 이루다가 11월부터 2개로 감소하기 시작했고 3월부터 8월까지 전혀 관찰되지 않았다. 제2 정모세포낭은 3월부터 8월까지 전혀 나타나지 않다가 10월에 각 세정관에서 출현하기 시작하여 12월에는 3개 정도로 가장 많은 숫자를 나타내었고 이후 점차적으로 감소하였다. 정세포의 낭은 9월에 출현하기 시작하여 11월에는 각 세정관에서



**Fig. 3.** Photographic illustration of testis showing the main characteristics of the seminiferous tubules at different developmental stages in *R. coreana* (A: August, B: September, C: November, D: February, PSG: primary spermatogonia, SSG: secondary spermatogonia, psc: primary spermatocyte, ssc: secondary spermatocyte, st: spermatid, sz: spermatozoa, IC: interstitial cell). Scale: 50  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Annual changes of spermatogenic stages in *R. coreana*. Spermatogenesis in the seminiferous tubules was determined and then divided into five classes of spermatogenic stages according to Table 2. □: immature, ▨: early spermatogenesis, ▩: late spermatogenesis, ▧: spermiation, ▦: post-spawning.

2개 정도 존재하였으며 12월에는 4개 정도로 최대치를 나타내다가 이후 점차 감소하여 3월부터 8월까지 정세포들의 낭은 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 2).

한편, 세정관내의 생식세포 및 낭의 분포와 정자들의 존재양상을 중심으로 정소주기를 조사한 결과 8월의 정소에서는 제1 정원세포와 제2 정원세포의 낭들만 관찰되었고 다른 발달중인 생식세포는 전혀 존재하지 않아 미성숙단계 (stage I) 상태를 나타냈으며 (Fig. 3A) 전기 정자형성단계 (stage II)는 9월에 90%의 비율을 나타내었으며 10월에는 23%의 비율을 유지하였다(Fig. 3B). 후기 정자형성단계 (stage III)는 10월부터 시작되어 11월에 90%의 비율로 존재하다가 12월에는 17% 정도로 감소하였다(Fig. 3C). 정자이동단계 (stage IV)는 11월부터 일부 나타나기 시작하여 12월, 1월에 83~100%의 비율로 가장 높게 나타났다(Fig. 3D). 정자배출 후 단계 (stage V)는 2월부터 30%의 비율로 나타나기 시작하여 7월까지 100% 비율로 존재하였다. 따라서 한국산개구리의 정소주기 중 유사분열이 진행되어져 제1 정원세포와 제2 정원세포의 낭만이 형성되어지는 미성숙단계는 8월에 전반적으로 관찰되었고 정자형성은 9월에 활발하게 진행되었으며 정자 이동단계는 11월부터 존재하기 시작하여 이듬해 1월에 가장 활발한 것으로 나타났다. 정자배출 후 단계는 2월부터 관찰되기 시작하여 7월까지 존재하였다(Fig. 4).

## 고 찰

양서류의 정자형성과정은 감수분열이 시작되는 제1 정

모세포의 출현으로 시작되며 어류 및 양서류들은 세정관내에 존재하는 제1 정원세포로부터 분열되는 생식세포들이 제2 정원세포에 이르면 하나의 낭을 형성하여 낭내의 생식세포들은 동시에 분열되며 분열 양상은 서식지의 환경과 종에 따라 다른 것으로 알려져 있다(van Tienhoven 1983). 한국산개구리를 대상으로 한 본 연구에서도 제2 정원세포로부터 낭이 형성되는 것을 확인하였으며 정자형성은 8월부터 시작되어 9월에 가장 활발하게 진행되고 3월~7월 사이에는 제1 정원세포 이후의 생식세포분열과정이 진행되지 않는 것을 알 수 있었다(Figs. 2, 3A). 즉, 이 시기는 제1 정원세포의 유사분열이 억제되어 제2 정원세포의 분열이 일어나지 않아 정자형성과정이 멈춘 상태로 여겨지며 이와 같이 정자형성과정이 일정시기에만 일어나는 유형의 번식활동을 하는 양서류는 온대지방에서 서식하는 일부의 종에서 확인되어져 이러한 유형의 정자형성과정을 불연속형이라고 부른다. 이러한 불연속적 정자형성과정은 정소주기 중 일정 기간에만 세정관내에 정자들이 존재하다가 정자형성의 정지기를 거쳐 정자형성 개시기가 되면 정소의 무게가 급격히 증가하는 특징을 나타낸다는 보고가 있다(Delgado *et al.* 1989). 한국산개구리도 정자형성 개시기인 9월이 정지기인 7월에 비해 약 3.5배 정도로 정소 무게가 증가함을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1) 정자형성과정이 재개됨과 동시에 GSI도 역시 크게 증가하는 현상을 확인할 수 있었다. 또한, 9월에 정자형성이 가장 활발한 것으로 나타났다(Fig. 1) 이 시기에 세정관의 단면적도 가장 넓게 나타났고 정소 무게도 연중 최고치를 나타내 북방산개구리의 결과(Ko *et al.* 1993)와 유사하게 나타났다. 반면 정자형성 정지기(3~7월)에는 GSI, 정소 무게 및 세정관의 단면적 모두 낮은 값을 나타냈다(Fig. 1). 이러한 여러 사실로부터 한국산개구리의 정소내 정자형성주기는 불연속형으로 판단되었다. 한국산개구리의 정소에서 정자형성은 8월에 미성숙 단계를 나타냈으며 9월에 제1 정모세포의 낭 수가 증가하여 정자형성이 활발하게 진행되었다. 정자이동과정은 11월부터 시작되어 12~2월에 가장 활발하게 진행되었으나 3월에는 정자의 수가 급격하게 감소하면서 일부의 잔류정자들만이 관찰되었다(Figs. 3, 4). 본 결과를 통해 한국산개구리 정소주기의 특징을 요약해 보면 GSI는 연중 크게 변하며 정자형성은 9월에 가장 활발하게 진행되고 3~7월 사이에는 정자형성이 거의 정지되는 “불연속형”이며 야외관찰시 암컷 한국산개구리가 겨울인 2월에 산란하는 것(Lee 2012)과 수컷 개구리의 정소 내 정자배출 후의 세정관이 출현하는 현상이 일치하여 한국산개구리의 번식기는 2월로 확인되었다.

## 적 요

한국산개구리 (*Rana coreana*)의 정소주기를 파악하기 위해 수컷 성체를 대상으로 gonadosomatic index (GSI)와 정소 내 생식세포의 변화를 연중 조사하였다. 정소의 세정관내 정자형성은 8월부터 시작되어져 9월의 정소에서 가장 활발하게 진행되었으며 이 시기에 GSI의 값이 가장 컸고 세정관의 단면적도 가장 넓게 나타났다. 2월의 정소에서는 정자배출 후 단계의 세정관들이 출현하였으며 이후 3월~7월까지 일정기간동안 정자형성이 정지되었고 GSI와 세정관의 단면적도 최저치를 나타내었다. 본 결과들로 보아 한국산개구리 수컷의 GSI는 7월에서 8월 사이에 유의하게 변화했고 정자형성과정도 불연속적으로 진행되는 정소주기를 나타내며 번식기는 2월로 확인되었다.

## REFERENCES

- Bentley PJ. 1982. Comparative Vertebrate Endocrinology. 2nd Ed. pp.338-365. Cambridge University Press. Cambridge.
- Delgado MJ, P Gutierrez and M AlonsoBedate. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. Gen. Comp. Endocrinol. 73:1-11.
- Iwasawa H and O Asai. 1959. Histological observations on the seasonal change of the testis and the thumb pad in the frog, *Rana nigromaculata*. J. Fac. Sci., Nigata Univ., Ser. II. 2: 213-218.
- Kera Y and H Iwasawa. 1981. Functional histology of the testis in the process of sexual maturation in the frog, *Rana nigromaculata*. Zool. Mag. 90:6-14.
- Kim HS and SK Ko. 1998. Distribution, food habit and seasonal cycles of Germ cell activity in the introduced Bullfrog, *Rana catesbeiana* in Korea. FRI J. For. Sci. 57:165-177.
- Ko SK, JW Kim and HB Kwon. 1993. Seasonal cycles in testicular activity in the Frog, *Rana dybowskii*. Korean J. Zool. 36:580-587.
- Ko SK, JW Kim and HB Kwon. 1997. Testicular cycles in the Korean Frogs: annual spermatogenic patterns, seasonal changes in the steroidogenic competence, and responsiveness to gonadotropins *in vitro*. Korean J. Biol. Sci. 1:99-105.
- Ko SK, HM Kang, WB Im and HB Kwon. 1998. Testicular cycles in three species of Korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa* and *Rana dybowskii*. Gen. Comp. Endocrinol. 111:347-358.
- Lee JH. 2012. Effect of the Fungicide Tebuconazole on the Embryo Development of Asian Toad (*Bufo bufo gargari-zans*) and Korean Brown Frog (*Rana coreana*). pp.4-19. Master's degree dissertation. Dept. of Biology, Graduate school of honam univ., Gwang-ju. (In Korean)
- Mathews WW. 1986. Atlas of Descriptive Embryology. Forth Ed. pp.50-52. Macmillan Pub. Co. New York.
- Matsuyama M., S Adachi, Y Nagahama, C Kitajima and S Matsura. 1991. Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. Japan. J. Ichthyol. 37:381-390.
- Nagahama Y. 1986. Vertebrate Endocrinology. pp.399-437. Academic Press. New York.
- Rastogi RK. 1976. Seasonal cycle in anuran (amphibia) testis: the endocrine and environmental controls. Bull. Zool. 43: 151-172.
- Van Tienhoven A. 1983. Reproductive physiology of vertebrates (2nd edition). pp.137-249. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Yoneyama H and H Iwasawa. 1985. Annual changes in the testis accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. Zool. Sci. 2:229-237.

Received: 9 May 2014

Revised: 11 June 2014

Revision accepted: 13 June 2014