

한국산개구리(*Rana coreana*) 난소주기에 관한 연구^{1a}

신정민² · 고선근^{3*}

A Study on the Ovarian Cycle of Korean Brown Frog (*Rana coreana*)^{1a}

Jung-Min Shin², Sun-Kun Ko^{3*}

요 약

한국산개구리(*Rana coreana*)의 난소주기를 파악하기 위해 암컷 성체를 대상으로 gonadosomatic index(GSI)와 난소 내 여포난자의 크기와 난황축적 정도를 기준으로 발달과정을 연중 조사하였다. 난소무게와 GSI는 3월부터 5월까지 가장 낮게 나타났으며 모든 여포난자들은 난황축적 전단계의 상태로 존재하여 난황형성이 중단된 것으로 판단된다. 난소무게와 GSI가 증가하기 시작한 6월의 난소에서는 난황축적 전기단계의 여포난자가 출현하였고 8월에는 난황축적 중기단계와 난황축적 전단계의 여포난자가 존재하여 난소무게와 GSI도 증가하여 나타났다. 이러한 현상은 이 시기에 난황축적 현상이 활발하게 진행되는 것을 의미하며 난소무게와 GSI가 높게 나타난 9월에서 11월까지는 난황축적 중기단계의 여포난자들과 난황축적이 거의 완성된 난황축적 후기단계의 여포난자들이 존재하였다. 동면중인 12월부터 난황축적을 마치고 성장이 완료된 여포난자들이 출현하였으며 2월의 난소에서는 성장이 완료된 여포난자가 전체적으로 존재하여 여포난자의 성장기에는 난소내의 모든 여포난자들이 동시적(synchronized)으로 진행되지 않고 각각의 여포난자에 따라 진행되다가 배란시기에 성장이 완료된 상태를 유지하는 난소주기를 나타내었다.

주요어: 생식소 주기, GSI, 양서류

ABSTRACT

In order to determine the ovarian cycle of Korean brown frog, *Rana coreana*, the developmental stage based on the gonadosomatic index (GSI), size of follicle oocytes in ovary and vitellogenesis for adult females were investigated all around the year. The weight of ovary and GSI were the lowest from March to May, and all follicle oocytes existed in the pre-vitellogenic form, indicating that the vitellogenesis was suspended. The follicle oocytes in early-vitellogenic stage appeared in ovary during June when the weight of ovary and GSI started to increase, and the follicle oocytes in mid-vitellogenic and pre-vitellogenic stages existed during August and the weight of ovary and GSI also increased. This indicates that vitellogenesis has been carried out actively during this period. The follicle oocytes in mid-vitellogenic stage and late-vitellogenic stage when the vitellogenesis was also completed existed between September and November. Post-vitellogenic follicle oocytes after vitellogenesis started to

1 접수 2014년 5월 22일, 수정(1차: 2014년 6월 17일), 게재확정 2014년 6월 18일

Received 22 May 2014; Revised (1st: 17 June 2014); Accepted 18 June 2014

2 호남대학교 대학원 생물학과 Dept. of Biology, Graduate school of Honam Univ., Gwangju 506-714, Korea (sjm8832@naver.com)

3 호남대학교 생물학과 Dept. of Biology, Honam Univ., Gwangju 506-714, Korea (sunkun@honam.ac.kr)

a 이 논문은 신정민의 석사학위 논문을 보완 수정하여 작성되었음.

* 교신저자 Corresponding author: sunkun@honam.ac.kr

appear from December in hibernation, and the full grown follicle oocytes existed during February, indicating the ovarian cycle that all follicle oocytes in ovary are developed separately, not synchronized, during the growing period of follicle oocytes and the post-vitellogenic follicle oocytes are maintained the ovulation period.

KEY WORDS: GONADAL CYCLE, GSI, AMPHIBIAN

서 론

대부분의 양서류는 난생(oviparous)으로 번식하며(Degani *et al.*, 1997) 서식지 기후와 종(species)에 따라 다양한 생식 주기가 나타내는 것으로 알려져 있다(Kera and Iwasawa, 1981; Bentley, 1982; Iwasawa and Yoneyama, 1985). 열대나 아열대 지역에 서식하는 종들은 연중 여러 차례 번식이 가능하며 온대지역의 대부분 종들은 봄철이나 여름에 산란을 한다(Goin *et al.*, 1978). 우리나라의 양서류들은 겨울잠에서 깨어난 이른 봄이나 초여름에 산란하는 종들(spring or early summer breeder)이며 야외 관찰을 통해 볼 때 종에 따라 산란시기와 기간이 각각 다르게 나타나 이러한 현상은 암컷의 난소내 여포난자의 성장과 성숙에 대한 시기와 양상이 서로 다를 수 있다. 이들 양서류의 난소주기(ovarian cycle)는 난소내 여포난자의 크기와 색소분포의 변화 양상을 관찰하여 여포난자의 발달과정을 분석하여 파악할 수 있다(Iwasawa and Asai, 1959; Rastogi, 1976; Polzonetti - Magni *et al.*, 1990). 성장 과정 중에 있는 개구리의 여포난자는 estradiol-17 β 의 도움으로 난자 내에 난황 단백질이 축적된다고 알려져 있다. 즉 뇌하수체호르몬이 여포세포를 자극하여 estradiol 등의 생성을 촉진하면 이 호르몬이 간세포를 자극하여 난황단백질의 합성을 촉진하고 이것이 난소로 이동되어 여포난자에 축적되어 여포난자의 크기가 점차적으로 변화되어지는 것으로 알려져 있다(Wallace *et al.*, 1974, Follett and Redshaw, 1974). 본 연구에서는 한국산개구리(*Rana coreana*) 암컷의 난소내 여포난자를 크기와 색소 분포를 기준으로 여포난자를 구분하여 이들의 성장단계의 변화양상을 연중 조사하여 난소주기를 파악하고자한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 서식지 기후조건

한국산개구리는 한국양서·파충류 중·양식연구소(충남 보령)에서 매월 일정시기에 3~5마리를 공급받았으며 총 50마리를 대상으로 실험에 사용하였다. 이들의 서식지 기후조

건을 조사하기 위해 기상연보 (Korea Meteorological Administration, 2012)를 활용하여 해당지역의 강수량과 기온, 낮의 길이를 구하였다.

2. 체중, 난소 무게, GSI 산출

동물 저울(triple beam balance, OHAUS: GT480)을 이용하여 각 개체들의 체중을 측정 후 난소를 채취하여 화학천칭(Denver instrument CO., AA-250: GT4800)으로 난소의 무게를 측정하였으며 gonadosomatic index(GSI)는 난소 무게 값을 체중으로 나누어 100을 곱하여 구하였다.

3. 여포난자의 크기 측정

복강에서 난소를 적출하여 AR용액(NaCl, 6.6/l; CaCl₂, 0.15g/l; KCl, 0.15g/l)으로 헹구어 혈액을 제거하였으며, AR용액이 들어있는 배양접시에 난소를 놓은 뒤 포셉(watch maker's forcep)을 사용해 전체 난소에서 여포난자들을 무작위로 취하였다.

각 발달단계의 여포난자 직경은 AM-423x Dino-Eye와 Dinocapture 2.0 program(ANMO)를 이용하여 측정하였다.

4. 여포 난자의 발달 단계 구분과 난소주기분석

여포 난자의 발달단계는 Dumont(1972)의 방법에 따라 각 단계의 여포난자 직경과 난황형성 정도를 기준으로 하여 다섯 단계로 나누었다. 여포 난자내 난황축적이 진행되지 않고 세포질이 투명한 상태를 나타내며 직경이 0.17-0.45mm 이내로 난황축적 이전 상태를 A단계로 정하였으며, 여포 난자에 난황축적이 시작되어 전체적으로 노란색을 띠며 직경이 0.53-0.76mm 이내로 난황축적 초기단계를 B단계로 정하였다. 여포 난자에 난황 축적량이 증가하여 갈색을 띠기 시작하나 동물극과 식물극의 구분은 되지 않는 직경은 0.73-1.51mm 이내로 난황형성의 중간단계를 C단계로 정하였다. D단계는 여포난자의 동물극과 식물극이 뚜렷하게 구분되어 갈색과 흰색으로 나뉘어 보이며 성장이 거의 이루

Table 1. Characteristics of the follicles at different development stages in *Rana coreana*

Class	Diameter(mm)		Discription
	(n=100) Range	Mean±SEM	
A	0.17-0.45	0.31±0.14	Pre-vitellogenic oocyte Transparent cytoplasm, white and small follicular oocyte
B	0.53-0.76	0.64±0.11	Early-vitellogenic oocyte Yellowish follicular oocyte with yolk
C	0.73-1.51	1.12±0.39	Mid-vitellogenic oocyte Light-brown follicular oocytes, animal and vesital poles are not distinguished
D	0.76-1.83	1.29±0.54	Late-vitellogenic oocyte Animal and vegetal hemispheres become differentiated clearly and delineated at equator
E	1.23-1.86	1.55±0.31	Post-vitellogenic oocyte Full grown follicular oocytes later or after hibernation (in breeding season)

어진 상태로 직경은 0.76-1.83mm 이내로 난황축적의 후기 단계로 정하였다. D단계보다 어두운 갈색을 띠고 여포난자의 성장단계 중 가장 크고 번식기에 주로 관찰되어지며 직경이 1.23-1.86mm이내의 여포난자를 E단계로 정하였다 (Table 1). 매달 일정시기에 전체 난소에서 여포 난자들을 무작위로 취하여 해부현미경(Nicon, 20x)으로 관찰하면서 여포난자들을 발달단계에 따라 구분한 후 단계별 비율을 조사한 후 연중 변화양상을 분석하여 난소주기를 파악하였다.

5. 통계처리

난소 무게 및 GSI(난소무게/체중×100)와 여포난자들의 연중 변화검정은 One-way analysis of variance (ANOVA)에 이은 Duncan's multiple range test를 통해 유의성 검정을 실시하여 $p<0.05$ 를 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 서식지 연중 기후 변화

개구리 서식지의 계절 변화에 따른 환경 요인을 조사하기 위하여 기온과 낮의 길이 및 강수량의 연중 변화를 기상청의 2012년 월별 평균자료를 참고하였다. 보령의 겨울철(12~2월) 평균온도는 $-0.8\sim-1.4^{\circ}\text{C}$ 였으며 여름철(6~8월)의 평균온도는 $22.9\sim26.8^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. 강수량은 7~9월에 200mm 이상을 기록했으나 이 시기 이외에는 100mm 이하를 나타냈다. 낮의 길이는 1월에는 약 10시간을 기록하였고 이후 점차 낮의 길이가 길어져 여름철인 6월에는 14.6시간으로 가장 길었으며 겨울철인 12월에는 9.7시간으로 가장 짧았다(Figure 1).

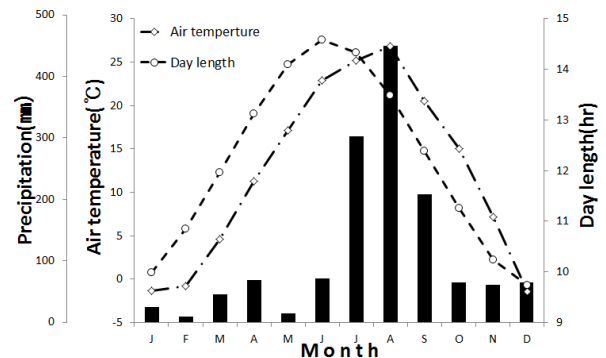


Figure 1. Air temperature, precipitation and day length in Boryeong area in 2012.

2. 체중과 난소의 무게, GSI의 연중변화

매월 3~5마리의 개구리를 취하여 체중과 난소무게에 따른 GSI를 산출하여 연중 변화를 조사하였다. 난소의 무게와 GSI가 1월과 비교하였을 때 2월부터 낮아지는 경향을 나타내었으며 이후 3월부터 7월까지 연중 최저치를 나타내었다 ($p<0.05$, $F=15.316$, $DF=11$, $n=50$; $p<0.05$, $F=14.775$, $DF=11$, $n=50$). 난소의 무게와 GSI는 3월부터 7월에 비해 8월부터 급격히 증가하여 1월에 최대치를 나타내었으며 ($p>0.05$, $F=15.316$, $DF=11$, $n=50$; $p>0.05$, $F=14.775$, $DF=11$, $n=50$) 난소의 무게와 GSI는 거의 일치하여 연중 변화하는 양상을 나타내었다. 2월에 난소무게와 GSI가 1월에 비해 낮게 나타나는 현상으로 보아 암컷들은 2월에 배란이 시작되어 배란을 마친 개체와 아직 배란 전인 개체가 같은 시기에 존재함을 의미하며 이들 값이 낮아지기 시작한 것은 일부개체들의 난소에서 배란 직전의 상태로 성장한 여포난자들이 산란되어 난소내에 난황형성이 시작되기 전의 여포난자들만이 남아있기 때문이다(Figure 2).

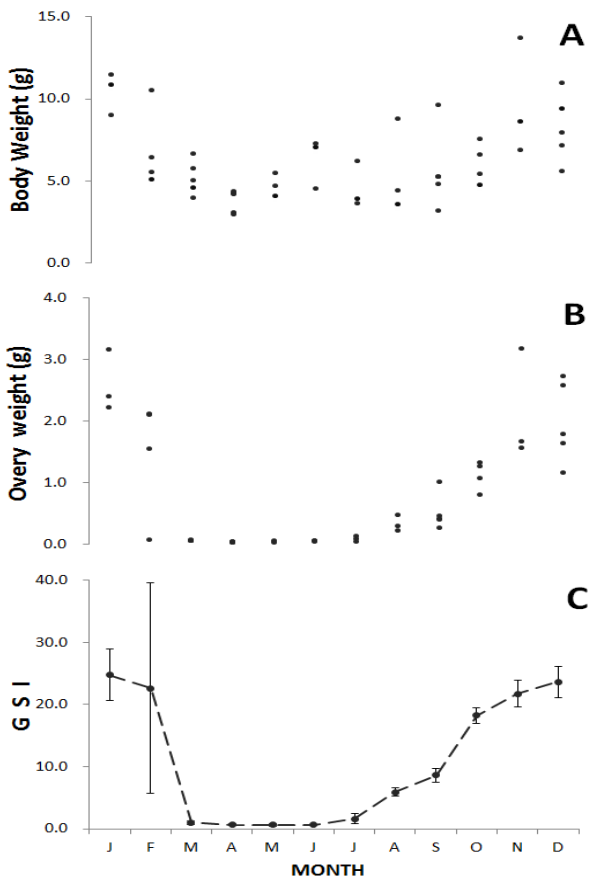


Figure 2. Annual changes in body weight (A), Ovary weight (B) and gonadosomatic index (GSI) (mean±SD) (C) in *Rana coreana*. Frogs were collected per month throughout the year. body weight (A), ovary weight (B) and GSI (C) of individual frogs were plotted in the figure.

3. 난소주기분석

난소 내 여포난자의 성장변화에 따른 난소주기를 파악하기 위해 여포난자의 난황축적에 의한 피질색소 변화와 난자의 직경 등을 기준으로 성장 단계를 다섯 단계로 나누어 그 비율을 연중 조사하였다(Table 1). A class에 해당하는 여포난자들은 난소 내에 1월부터 12월까지 연중 존재하였으며 B class의 여포난자들은 6월부터 9월까지 존재하는 기간 중 7월에 가장 높은 비율로 존재하였고(34%) 9월에 가장 낮은 비율을 나타냈다(2%). C class에 해당하는 여포난자들은 8월부터 10월까지 존재하였고 성장이 거의 이루어진 D class에 해당하는 여포난자들은 9월부터 이듬해 1월까지 존재하였다. E class인 여포난자들은 12월부터 나타나기 시작하여 이듬해 1월에 가장 높은 비율로 존재하였다.

이러한 사실들을 계절별로 살펴보면 봄(3~5월)에는 A class의 여포난자만이 존재하였고 여름(6~8월)에는 A, B, C class의 여포난자가 존재하였다. 가을(9~11월)에는 A, C, D class의 여포난자가 존재했고 겨울(12~2월)에는 A, D,

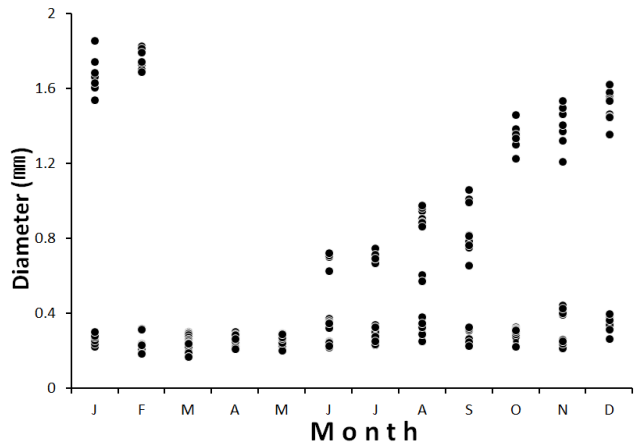


Figure 3. Seasonal changes of follicle diameter of *Rana coreana*. Follicle diameter was measured through Jan.~Dec. 2012. Each dot in the figure represents diameter of one follicle (20 follicles/animal, 3~5 animals).

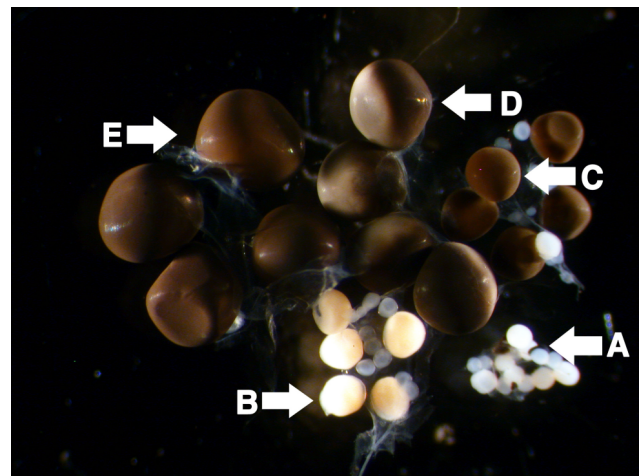


Figure 4. Photographic illustration of ovary showing the main characteristics of the follicles at different developmental stages in *Rana coreana*(Stage A; Transparent cytoplasm white and sall follicular oocytes, Stage B; Yellowish follicular oocytes, Stage C; Light-brown follicular oocytes, animal and vegetal poles are not distinguished, Stage D; Animal and vegetal hemispheres become differentiated clearly and delineated at equator, Stage E; Full grown follicular oocytes in breeding season)

E class의 여포난자가 존재하는 양상을 나타냈다(Figure 3).

고 찰

계절적 번식활동은 하등동물에서 잘 알려져 있으며 (Chieffi and Pierantoni, 1987) 양서류 중 온대지방에 서식하는 종들은 계절적 변화에 따라 정자 및 난자를 형성하여 연중 일정시기에 번식기를 갖는 것으로 알려져 있다 (Delgado *et al.*, 1989, Too *et al.*, 1995). 따라서 개구리와 같이 계절적 생식을 하는 동물들의 생식세포형성의 연중 주기변화에 개체의 gonadosomatic index(GSI)는 생식활동의 중요한 지표가 된다.

한국산개구리의 난소무게와 GSI는 3월부터 5월까지 연중 가장 낮게 존재하였으며 이때의 모든 여포난자들은 난황축적 전단계(A class)의 상태로 나타나 이 시기에는 난황형성이 중단된 것으로 판단된다. 난소무게와 GSI가 증가하기 시작한 6월의 난소에서는 난황축적 전기단계(B class)의 여포난자가 출현하였으며 이후 8월에는 난황축적 중기단계(C class)의 비율이 높게 나타나 난소무게와 GSI도 증가하여 나타났다. 이러한 현상은 이 시기에 난황축적 현상이 활발하게 진행되는 것을 의미하며 난소무게와 GSI가 높게 나타난 9월에서 11월까지의 A, C class와 난황축적 후기단계(D class)의 여포난자들이 관찰되어져 거의 난황축적이 완성되어져 가는 것으로 여겨진다. 동면중인 12월부터 난황축적을 마치고 성장이 완료된 (E class) 여포난자들이 출현하였으며 2월의 난소에서는 성장이 완료된 (E class) 여포난자가 전체적으로 존재하여 여포난자의 성장기에는 난소내의 모든 여포난자들이 동시적(synchronized)으로 진행되지 않고 각각의 여포난자에 따라 진행되다가 배란시기 근처에서 성장이 완료된 상태를 유지하는 것으로 생각된다. 2월에 일부 개체의 난소에서 E class의 여포난자가 존재하지 않고 A class의 여포난자만 존재하고 수란관을 통과중인 여포난자가 관찰되어 배란이 이루어졌음을 알 수 있었다. 이는 야외 관찰에서 포접중인 한국산개구리가 관찰되고 이들의 알덩이가 관찰되어진 사실과 일치하여 한국산개구리의 번식기는 2월임을 확인할 수 있었다.

대부분의 척추동물에서 번식주기를 조절하는 요인으로 일정 주기를 나타내는 낮의 길이와 온도가 번식기 등을 조절하는 가장 중요한 환경요인으로 거론되어지고 있다(Norris and Jones, 1987). 한국산개구리를 대상으로 한 본 연구에서 연중 낮의 길이도 길고 기온도 가장 높게 나타난 8~9월에 여포난자내의 난황축적이 가장 활발하게 진행되어져 난황축적 중기단계인 C class의 여포난자들의 비율이 높게 나타났다. 그러나 기온이 낮고 낮의 길이가 짧은 동면기 11월에는 난황축적 후기단계인 D class의 비율이 높아 난황축

적과정이 완성되어져 나타나 낮의 길이와 온도 등의 환경적 요인과 한국산개구리의 난소주기와 비교적 일정한 관계는 확인할 수 있었으나 난자성장과정에 대한 환경적 요인과의 관계를 규명하기에는 난점이 있다. 따라서 여포난자의 성장과정과 환경적 요인과의 관계를 규명하기 위해 각 발달단계의 여포난자를 대상으로 환경적 조절요인과 estradiol의 호르몬적 조절요인에 의한 여포난자의 발달과정을 파악하는 구체적인 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Korea Meteorological Administration. (2012). Annual Climatological Report. Korea Meteorological Administration, Seoul, Korea. 190-192pp
- Bentley P. J. (1982) Comparative Vertebrate Endocrinology, 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 338-365.
- Chieffi G. and R. Pierantoni (1987) Regulation of ovarian steroidogenesis. In Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. Springer US. pp. 117-144
- Delgado M. J., P. Gutierrez and M. AlonsoBedate (1989) Seasonal cycles in testicular activity in the frog. *Rana perezi*. Gen. Comp. Endocrinol. 73, 1-11.
- Dumont J. N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): 1. Stages of the oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morph. 136, 153-180.
- Follett B. K. and M. R. Redshaw (1974) The physiology of vitellogenesis. Physiology of the Amphibia, 2, 219.
- Goin C. J., O. B. Goin and G. R. Zug (1978) Introduction to Herpetology. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 3. 378
- 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(6), 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.
- Norris D. O. and R. E. Jones (1987) Hormones and reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles. In: J. M. Whittier and D. Crews Seasonal reproduction; pattern and control. Plenum Press. New York. pp. 283-314.
- Polzonetti-Magni A., R. Curini, O. Carnevali, C. Novora, M. Zerani and A. Gobbetti (1990) Overin development sex steroid hormones during the reproductive cycle of *Rana esculenta* complex. Zool Sci. 7, 265-271.
- Rastogi R. K. (1976) Seasonal cycle in anuran(amphibia) testis: the endocrine and environmental controls. Bull. Zool. 43, 151-172.

- Wallace R. A. and G. W. Bergink (1974) Amphibian vitellogenin: properties hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. *Amer. Zool.* 14, 1159-1175
- Yoneyama H. and H. Iwasawa (1985) Annual changes in the testis accessory sex organs of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Zool. Sci.* 2, 229-237.
- Yoo M. S., C. H. Ra, J. Y. Kim, S. G. Kang and H. B. Kwon (1995) Reproductive cycle and maturation induction of oocytes in *Rana rugosa*. *Korean J. Zool.* 38, 96-105