



中华人民共和国国家标准

GB/T 45060—2024

黑斑侧褶蛙

Black-spotted pond frog



2024-12-31 发布

2025-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本文件起草单位：江苏中洋集团股份有限公司、中国水产科学研究院长江水产研究所、中国科学院昆明动物研究所、上海海洋大学。

本文件主要起草人：朱新鹏、徐进、徐滨、蔡星、涂翰卿、卢立、张林、王丹、刘其根、徐逍、刘大勇。



黑斑侧褶蛙

1 范围

本文件确立了黑斑侧褶蛙[*Pelophylax nigromaculatus* (Hallowell, 1860)]的学名与分类,规定了黑斑侧褶蛙种质鉴定的主要形态构造特征、生长与繁殖、细胞遗传学和生化遗传学特性,描述了相应的检测方法,规定了判定规则。

本文件适用于黑斑侧褶蛙的种质检测和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB/T 18654.6 养殖鱼类种质检验 第6部分:繁殖性能的测定
- GB/T 18654.12 养殖鱼类种质检验 第12部分:染色体组型分析
- GB/T 18654.13 养殖鱼类种质检验 第13部分:同工酶电泳分析
- GB/T 22213 水产养殖术语
- GB/T 25884 蛙类形态性状测定

3 术语和定义

GB/T 22213 和 GB/T 25884 界定的术语和定义适用于本文件。

4 学名与分类

4.1 学名

黑斑侧褶蛙[*Pelophylax nigromaculatus* (Hallowell, 1860)]。

注:别名有黑斑蛙、青蛙、田鸡等。

4.2 分类地位

脊索动物门(Chordata)、两栖纲(Amphibia)、无尾目(Anura)、蛙科(Ranidae)、侧褶蛙属(*Pelophylax*)。

5 主要形态构造特征

5.1 外部形态特征

5.1.1 外形

头部略呈三角形,吻端钝圆;眼大,瞳孔横椭圆形,眼间距小于鼻间距;眼后具一对圆形鼓膜,其直径约为眼径三分之二,雄蛙的鼓膜大于雌蛙;雄蛙有一对颈侧外声囊,外声囊呈浅灰色,雌蛙无声囊。躯干部背面有一对背侧褶,自眼后直至胯部,两背侧褶间有4行~6行长短不一的短肤褶,侧面皮肤有痣粒,腹面皮肤光滑。前肢短小,具4指,无蹼;雄蛙前臂较粗壮,第一指内侧有发达的婚垫,生殖季节显著增

大,雌蛙没有婚垫;后肢长而粗大,胫长小于体长的二分之一,具 5 趾,趾间蹼发达,几乎为全蹼,第四趾蹼达远端关节下瘤,其余趾间蹼达趾端,蹼凹陷较深;关节下瘤稍小,内跖突窄长,有游离的刃状突起,外跖突小,呈圆点状。雄蛙较雌蛙小。

体背颜色趋于多样,呈淡绿色或黄绿色或深绿色或灰褐色等,背、侧面具不规则的黑斑。多数个体自吻端至肛前缘有淡黄色或淡绿色的脊线纹,背侧褶金黄色、浅棕色或黄绿色;四肢背面浅棕色,腹面乳白色。

黑斑侧褶蛙成体的外形示意图见图 1,背面图、腹面图见图 2。

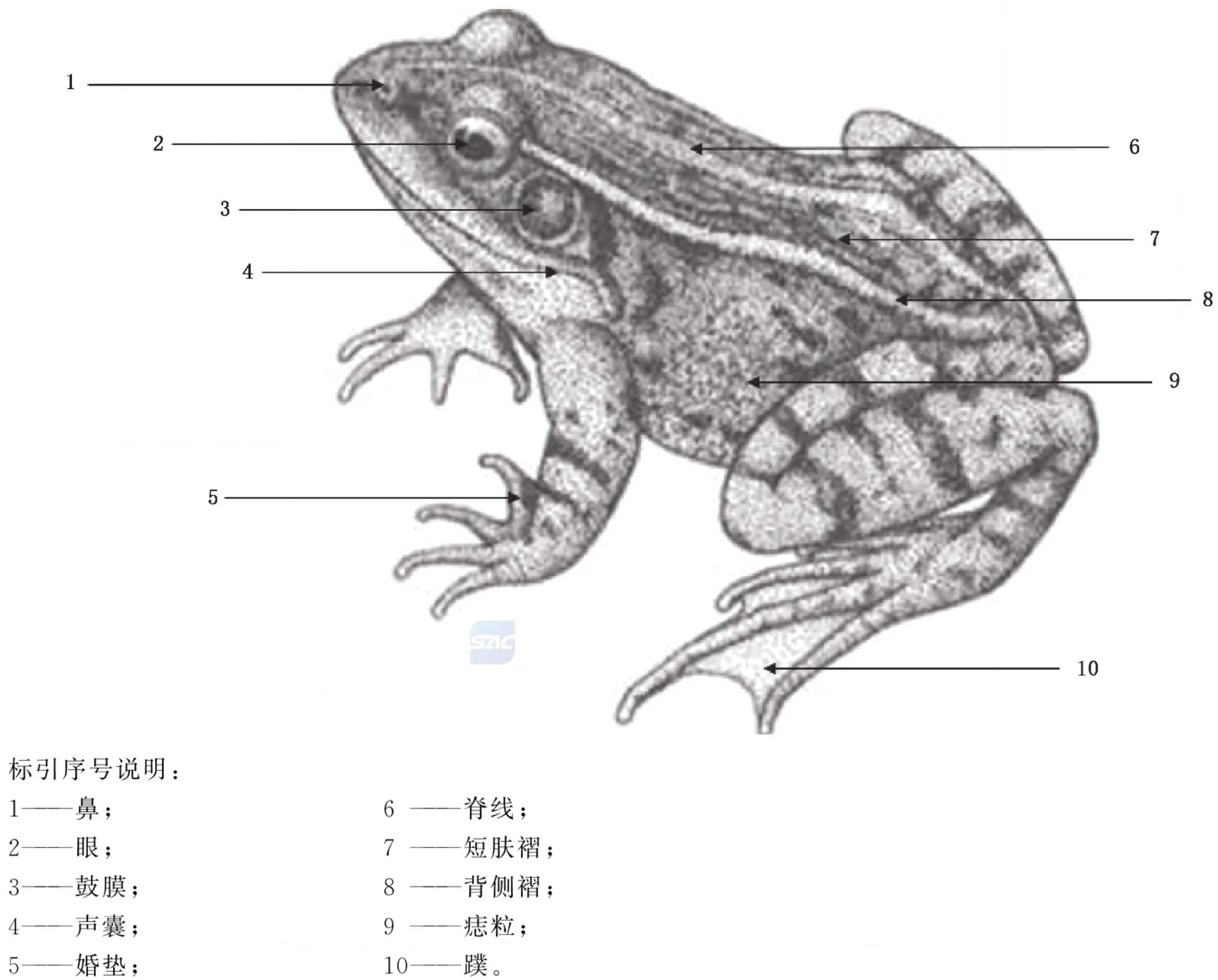


图 1 黑斑侧褶蛙成体外形示意图



图 2 黑斑侧褶蛙成体外形图

5.1.2 可量性状

黑斑侧褶蛙实测可量性状比值见表 1。

表 1 黑斑侧褶蛙实测可量性状比值

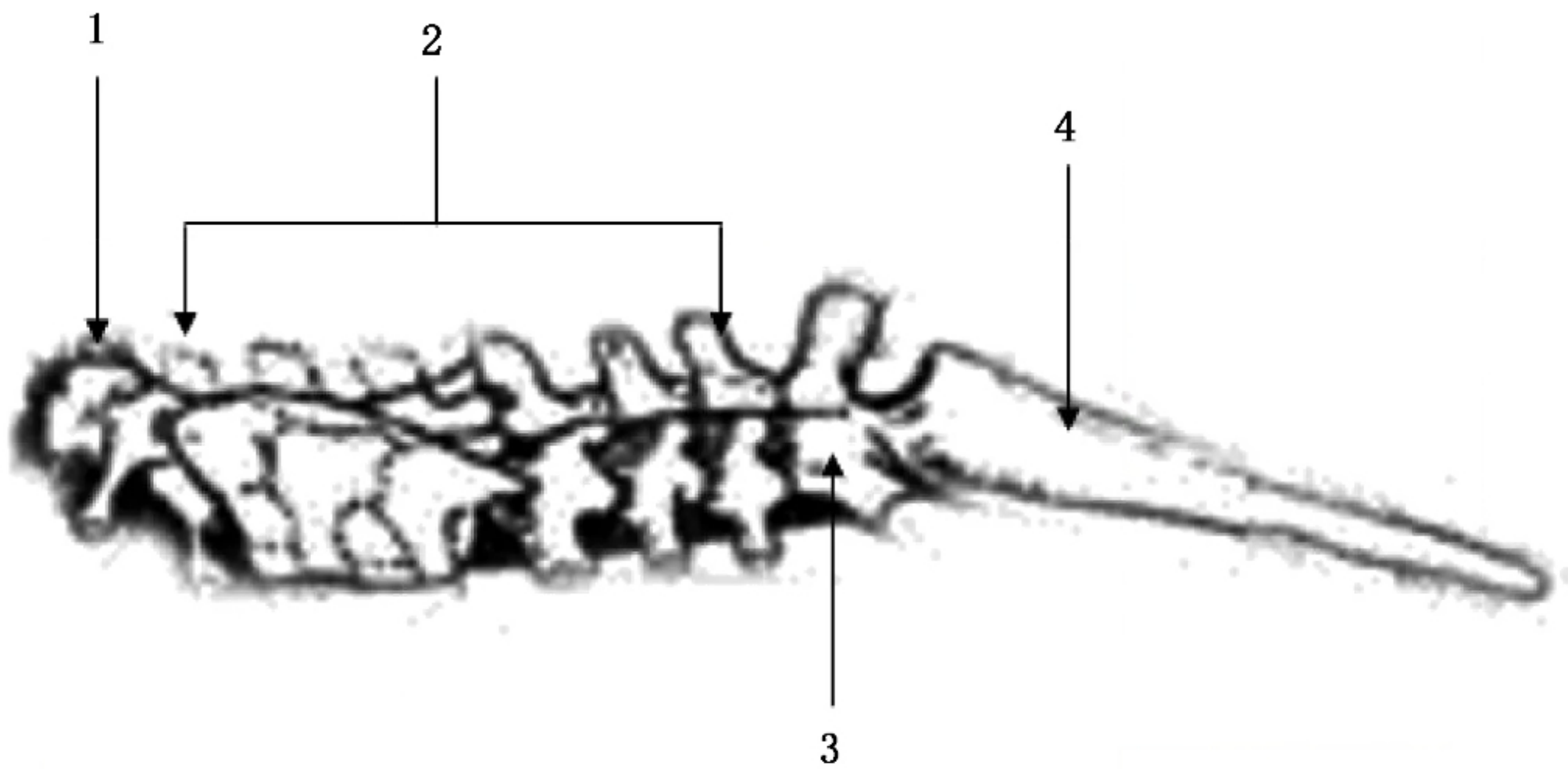
单位为厘米

体长	体长/头长	头宽/头长	鼓膜径/眼径	后肢长/体长	足长/前臂长	跗足长/胫长
5.50~6.00	2.82±0.38	0.90±0.14	0.76±0.04	1.46±0.08	1.18±0.08	1.34±0.15
6.00~6.50	2.88±0.27	0.91±0.07	0.75±0.05	1.51±0.12	1.30±0.05	1.45±0.07
6.50~7.00	2.99±0.21	0.90±0.07	0.75±0.06	1.42±0.11	1.29±0.10	1.44±0.09
7.00~7.50	3.01±0.15	0.91±0.07	0.74±0.07	1.39±0.11	1.32±0.12	1.46±0.09
7.50~8.00	3.06±0.14	0.91±0.08	0.75±0.05	1.40±0.12	1.28±0.03	1.41±0.06

5.2 内部构造特征

5.2.1 脊椎

脊椎骨 10 块,包括颈椎 1 块、躯椎 7 块、荐椎 1 块、尾杆骨 1 节,黑斑侧褶蛙的脊椎骨示意图见图 3。



标引序号说明：
1——颈椎；
2——躯椎；
3——荐椎；
4——尾杆骨。

图 3 黑斑侧褶蛙的脊椎骨示意图

5.2.2 生殖系统

- 5.2.2.1 成熟雄蛙有一对橙黄色、卵圆形的精巢,左右输精管末端独立开口于泄殖腔。
- 5.2.2.2 成熟雌蛙有一对囊状结构的卵巢,平常卵巢浅黄色,生殖期为灰黑色;左右输卵管末端独立开口于泄殖腔。

6 生长与繁殖

6.1 生长

黑斑侧褶蛙体长和体重的实测值见表 2。

表 2 黑斑侧褶蛙的体长和体重实测值

体长/cm	5.50~6.00	6.01~6.50	6.51~7.00	7.01~7.50	7.51~8.00
体重/g	26.50~32.20	26.70~41.20	29.80~50.80	35.80~58.20	50.10~66.00

6.2 繁殖

6.2.1 性成熟年龄

雌雄蛙性成熟年龄为 1 周年。

6.2.2 产卵季节

北方地区为 5 月—7 月，中部地区为 4 月—6 月，南部地区为 3 月—5 月。

6.2.3 产卵水温

适宜产卵水温为 21 ℃~27 ℃。

6.2.4 产卵类型

产粘性卵，卵黏成单层或团状卵块，具胶质外膜；一次性产卵，每年产卵 1 次。卵球形，卵径 1.2 mm~1.5 mm，动物极深棕色，植物极淡黄色。

6.2.5 绝对怀卵量

绝对怀卵量 670 粒~6 300 粒。

7 细胞遗传学特性

体细胞染色体数： $2n=26$ ，核型公式： $18m+6sm+2st$ ；染色体臂数(NF)：50。染色体组型见图 4。



标引符号说明：
m ——中部着丝点染色体；
sm ——亚中部着丝点染色体；
st ——亚端部着丝点染色体。

图 4 黑斑侧褶蛙染色体组型图

8 生化遗传学特性

脾脏乳酸脱氢酶(LDH)(4 条带)电泳图及扫描图见图 5。

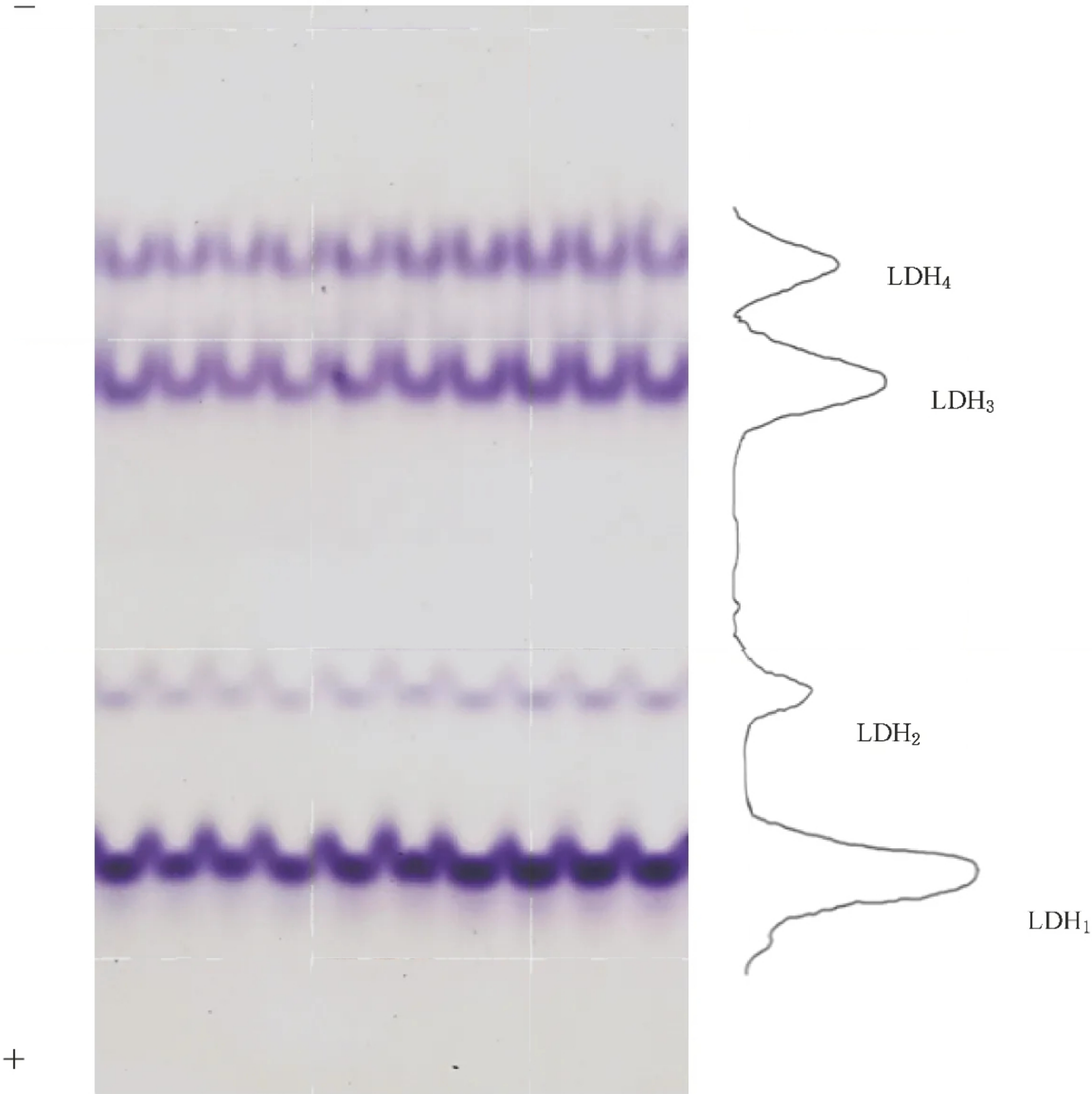


图 5 黑斑侧褶蛙脾脏 LDH 同工酶谱带和扫描图

9 检测方法

9.1 抽样

随机抽取蛙池或蛙田,生物学检测样本不少于 30 只,繁殖检测雌、雄蛙样本各不少于 15 只。

9.2 主要形态构造特征测定

9.2.1 外部形态特征

9.2.1.1 外形观察

自然光下观察。

9.2.1.2 可量性状的测定

按 GB/T 25884 的方法进行测定。

9.2.2 内部构造特征

9.2.2.1 脊椎骨的测定

解剖、蒸煮剔肉,取整条脊椎骨,观察脊椎骨数量。

9.2.2.2 生殖系统的检测方法

自然光下观察,辨别雌雄,剖开腹腔观察生殖系统各器官的形态特征。

9.3 生长与繁殖

9.3.1 性成熟年龄鉴定

9.3.1.1 取样与制片

取黑斑侧褶蛙第2趾骨,洗净晾干。将材料放入80%(体积分数)乙醇中硬化10 h~15 h,在3%硝酸溶液中脱钙24 h左右,使其软化,石蜡切片。

9.3.1.2 观察年龄

在显微镜(10×20)下可观察到黑色狭窄带与淡红色宽带间隔的排列,黑色带即为年轮标志,年轮示意图见图6(白色箭头所示为年轮)。

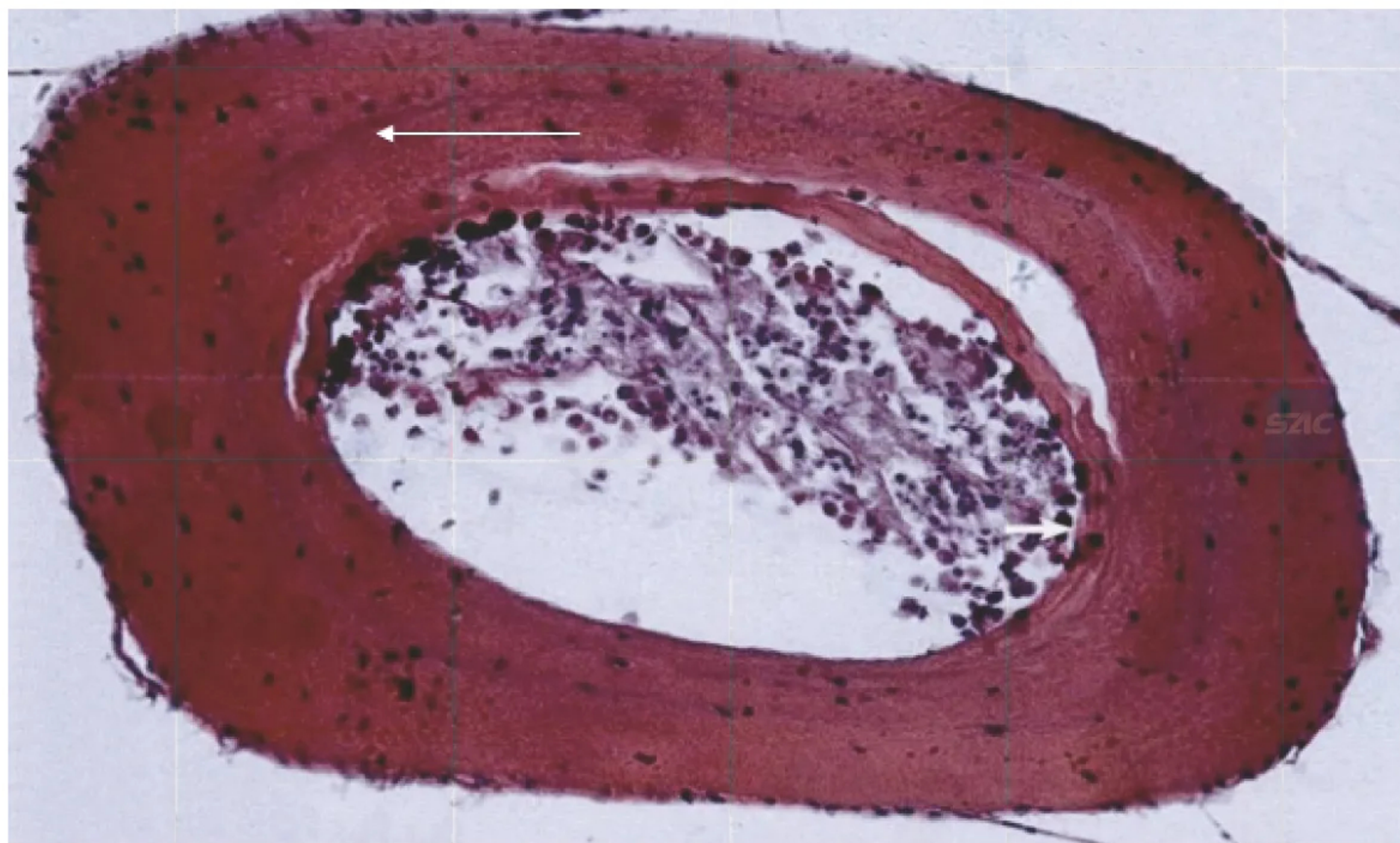


图6 年轮示意图

9.3.2 生长的测定

按GB/T 25884的方法测量。

9.3.3 绝对怀卵量的测定

解剖取出卵巢,按GB/T 18654.6的方法测定。

9.4 细胞遗传学特性测定

9.4.1 样品制备

向黑斑侧褶蛙活体腹腔注射0.9%NaCl配制的0.1%植物血凝集素(PHA)溶液,剂量 $5\mu\text{g/g}$ ~ $10\mu\text{g/g}$ 黑斑侧褶蛙体重;12 h后腹腔注射0.9%NaCl配制的 $1\,000\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素溶液,剂量 $2.5\mu\text{g/g}$ ~ $5\mu\text{g/g}$ 黑斑侧褶蛙体重;注射秋水仙素溶液3 h后,解剖黑斑侧褶蛙,取出股骨和胫骨,用0.9%NaCl反复洗涤,用剪刀剪碎骨头,放入加了0.9%NaCl的研钵中捶打,用100目(筛网孔径为0.15 mm)尼龙纱绢过滤,取滤液待用。

9.4.2 低渗

将滤液移入离心管 1 000 r/min 离心 8 min,除上清后用 0.075 mol/L 氯化钾溶液低渗处理 50 min~60 min,再 1 000 r/min 离心 8 min,取沉淀待用。

9.4.3 固定

将沉淀加 1 mL 固定液(甲醇:冰乙酸为 3:1,现配现用),预固定 3 min~4 min,随后 1 000 r/min 离心 8 min(以下时间同)后固定。重复固定 3 次,每次 20 min。

9.4.4 染色染色体标本的制片、染色、计数与组型分析

按 GB/T 18654.12 的方法执行。

9.5 生化遗传学特性测定

9.5.1 样品的制备与保存

解剖活体,取脾脏,样品的制备和保存按 GB/T 18654.13 的方法执行。

9.5.2 电泳分离

采用聚丙烯酰胺凝胶(凝胶溶液的配制见附录 A 中表 A.1)垂直电泳,分离胶浓度为 7.5%(配制方法见 A.2),电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸,用溴酚蓝作指示剂。每个胶孔加样 20 μ L;先用 280 V 电压进行电泳,使样品尽快进入凝胶孔,电泳 10 min,调至 220 V,于 4 $^{\circ}$ C 下电泳至溴酚蓝到达距胶前沿 1 cm 处停止。

9.5.3 染色、退色、扫描及分析结果

按 GB/T 18654.13 的方法执行。



10 判定规则

10.1 当检测结果符合第 5 章要求时,可判定该物种。当外部形态特征符合本文件规定,而可量性状不符合本文件规定或与本文件规定有明显差异时,则应结合其他指标综合判定。

10.2 当出现下列情况之一,需增加检测其他章节要求内容,依据检测结果对物种进行综合判定:

- a) 必要时,检测第 7 章或第 8 章的内容;
- b) 第三方提出要求检测第 6 章全部或部分内容时;
- c) 全项检测时。

附 录 A
(资料性)
凝胶溶液的配制

A.1 凝胶溶液的配制

凝胶溶液的配制见表 A.1。

表 A.1 各种凝胶溶液的配方

溶液	配制方法
凝胶缓冲液	取 Tris[$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$]36.3 g 蒸馏水溶解,用浓盐酸调 pH 为 8.9,加蒸馏水定容至 100 mL,4 ℃ 贮存
凝胶储液	取丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)33.3 g, N,N' -亚甲基双丙烯酰胺($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)0.9 g,蒸馏水溶解并定容至 150 mL,4 ℃ 贮存
过硫酸铵溶液(AP)	取过硫酸铵[(NH_4) $_2$ S $_2$ O $_8$]1.5 g,蒸馏水溶解并定容至 100 mL。现配现用

A.2 凝胶的制备

用 7.5%凝胶液制成聚丙烯酰胺垂直板凝胶,该凝胶液配方见表 A.2。

表 A.2 7.5%凝胶液制备配方

溶液	体积
凝胶缓冲液/mL	25.0
凝胶储液/mL	16.8
AP/mL	2.4
TEMED(四甲基乙二胺, $\text{C}_5\text{H}_{16}\text{N}_2$)/ μL	37.8
蒸馏水/mL	5.8

