



中华人民共和国国家标准

GB/T 19163—2010
代替 GB 19163—2003

牛 蛙

Bull frog

2011-01-10 发布

2011-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB 19163—2003《牛蛙》。

本标准与 GB 19163—2003 相比主要变化如下：

- 标准性质改为推荐性；
- 增加了牛蛙年龄鉴定方法；
- 增加了引用标准 GB/T 18654.1、GB/T 18654.2、GB/T 18654.12、GB/T 25884；
- 删除了原标准的附录 A。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会淡水养殖分技术委员会归口。

本标准起草单位：湖南农业大学、湖南生物机电学院。

本标准主要起草人：王晓清、王宇、肖克宇、何湘蓉、詹炜。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 19163—2003。

牛 蛙

1 范围

本标准确立了牛蛙(*Rana catesbeiana* Shaw)的名称与分类、主要形态构造特征、生长与繁殖、遗传学特性、检测方法及结果判断。

本标准适用于牛蛙的种质检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 18654.1 养殖鱼类种质检验 第1部分:检验规则
- GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第2部分:抽样方法
- 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 25884 蛙类形态性状测定

3 术语和定义

GB/T 25884 确立的术语和定义适用于本标准。

4 名称与分类

4.1 学名

牛蛙(*Rana catesbeiana* Shaw)。

4.2 分类地位

无尾目(Anura)、蛙科(Ranidae)、蛙属(*Rana*)。

5 主要形态构造特征

5.1 外部形态特征

5.1.1 外形

身体粗短,头部宽而扁,略呈三角形,1对圆形鼓膜位于眼后方,鼓膜颜色与头部背面颜色基本一致,沿眼后到鼓膜上方有明显的皮肤褶。皮肤较光滑,背部略显粗糙,有极微细的肤棱。前肢4指,无蹼,指序为Ⅱ、Ⅰ、Ⅳ、Ⅲ,雄蛙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;后肢特别发达,5趾,全蹼,蹼不完全达趾端,趾序为Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅲ、Ⅳ。

体色随栖息环境、年龄、性别、营养状况而异。通常头部为绿色,背部为绿褐色、黄褐色或黑褐色,有深浅不一的不规则状斑块或斑纹,腹部为灰白色,有暗灰色斑纹。成熟雄蛙下颌部为金黄色,雌蛙则与腹部颜色一致。

牛蛙外部形态见图1。

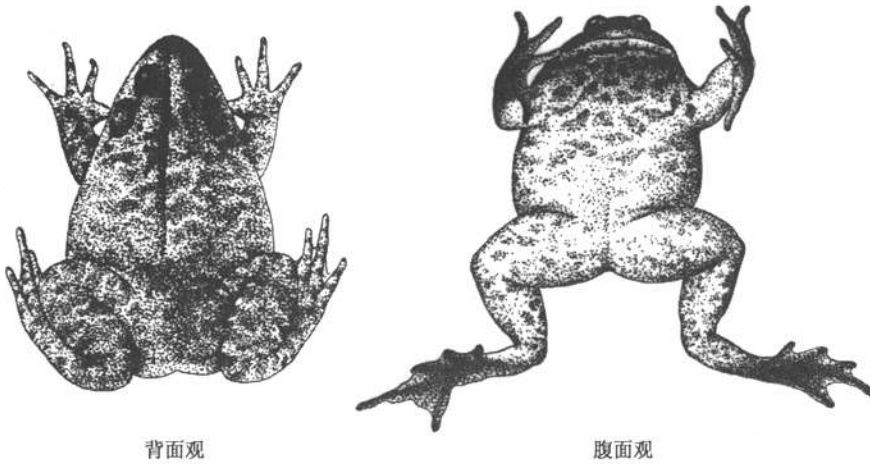


图 1 牛蛙外形(♂)

5.1.2 可量性状

对于体长 10.3 cm~16.1 cm, 体重 175.2 g~548.7 g 的牛蛙, 实测性状比例值见表 1。

表 1 实测可量性状比例值

性别	体长/头长	头宽/头长	鼓膜径/眼径	后肢长/体长	足长/前臂长	IV趾长/ IV-V趾蹼宽
♀	3.093±0.247	1.162±0.096	0.942±0.098	1.467±0.078	1.609±0.119	1.770±0.242
♂	2.981±0.243	1.168±0.089	1.338±0.154	1.475±0.102	1.613±0.115	1.708±0.244

5.2 内部构造特征

5.2.1 声囊

雄蛙咽部有 1 对内声囊, 开口于口咽腔; 雌蛙无声囊。

5.2.2 脊椎

颈椎骨 1 枚、躯椎骨 7 枚、荐椎骨 1 枚、尾杆骨 1 枚。属前凹后凸的参差型椎体。

5.2.3 生殖系统

成熟雄体有一对浅黄色卵圆形的精巢, 保留有退化状态的缪勒氏管。成熟雌体有一对囊状结构的卵巢, 卵巢内含有淡黄色的早期卵和动物极为黑色、植物极为乳白色的成熟卵或接近成熟卵。

生殖腺的前方各有一个指状脂肪体, 性成熟前为白色或淡黄色, 性成熟后为黄色, 大小随季节及营养状况等因素变化。

6 生长与繁殖

6.1 生长

养殖条件下牛蛙体长、体重的实测值见表 2。

表 2 养殖条件下牛蛙的体长、体重实测值

体长/cm	4.63± 0.31	7.21± 0.43	10.20± 0.47	12.24± 0.28	13.47± 0.39	14.33± 0.29	14.96± 0.35	15.58± 0.42	16.15± 0.52
体重/g	11.09± 0.80	42.43± 4.61	115.73± 15.02	202.40± 17.56	294.45± 17.77	373.82± 21.15	441.32± 28.26	500.84± 34.13	546.55± 38.97

6.2 繁殖

6.2.1 性成熟年龄

性成熟年龄为 2 龄。

6.2.2 产卵季节

北方地区为 5 月份~8 月份,湖南、湖北等省为 4 月份~9 月份,广东、福建等省为 3 月份~11 月份,适宜产卵水温 20℃~30℃。

6.2.3 产卵次数与类型

性成熟雌蛙每年可产卵 1 次~2 次,并以春季产卵为主。卵球形,卵径 1.2 mm~1.5 mm,动物极深黑色,植物极乳白色,产出的卵外包胶质膜,相互粘连成单层或团状卵块。

6.2.4 怀卵量

性成熟雌蛙生殖季节卵巢系数为 12.6%~27.6%,绝对怀卵量 $(5.0 \pm 0.77) \times 10^4$ 粒,相对怀卵量 (106.7 ± 8.69) 粒/g。

7 遗传学特性

7.1 细胞遗传学特性

牛蛙体细胞染色体数: $2n=26$,臂数(NF):52,核型公式: $2n=22m+4sm$ 。

牛蛙染色体组型见图 2。



图 2 牛蛙染色体组型图

7.2 生化遗传学特性

牛蛙心机的乳酸脱氢酶(LDH)同工酶电泳酶谱见图 3,酶带扫描图见图 4。

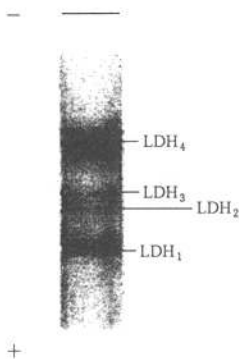


图 3 牛蛙心肌 LDH 同工酶电泳酶谱

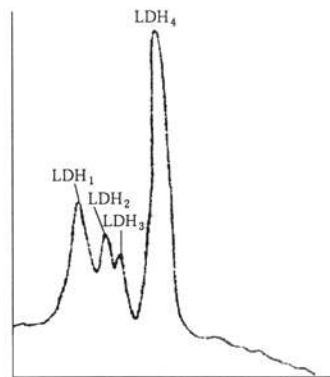


图 4 牛蛙心肌 LDH 同工酶酶带扫描图

8 检测方法

8.1 抽样

按 GB/T 18654.2 的规定执行。

8.2 年龄鉴定

8.2.1 取样

剪取牛蛙第2趾骨,清洗晾干。

8.2.2 操作步骤

将材料放入80%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,然后按常规石蜡切片方法制片。

8.2.3 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,1个年轮记为1龄,2个年轮记为2龄,依此类推。

8.3 生物学性状测定

按GB/T 25884的规定执行。

8.4 繁殖力的测定

在繁殖季节,解剖未产卵的雌亲蛙,取出卵巢,用电子秤称重,再称取1.0 g卵,2个样品,分别计数每克卵的平均卵粒数。卵巢中所含的全部卵粒数即为绝对怀卵量,单位体重(g)所含的卵粒数为相对怀卵量。

8.5 染色体的测定

8.5.1 标本制备

术前8 h~12 h腹腔注射质量分数为0.1%的植物血凝素(PHA)0.5 mL~1.0 mL(每100 g体重),术前4 h~6 h腹腔注射秋水仙素溶液(每克体重10 μg~15 μg);解剖牛蛙,从股骨和胫骨中取骨髓放入质量分数为0.4%的氯化钾(KCl)溶液中,37℃水浴15 min~20 min。以1 000 r/min离心10 min,弃其上清液,加1 mL固定液(甲醇:冰乙酸为3:1),4℃条件下固定20 min,重复固定2次。再加少量固定液,制取细胞悬液;取细胞悬液滴片,在酒精灯上文火烘干,浸没在吉姆萨(Giemsa)工作液(配制按GB/T 18654.12的规定执行)中染色30 min,用蒸馏水冲去多余染液,空气干燥制片。

8.5.2 染色体计数和组型分析

按GB/T 18654.12的规定执行。

8.6 生化遗传分析

8.6.1 试样的制备与保存

解剖牛蛙,取心肌,用生理盐水洗去血液后称重、切碎,按质量体积比1:5加生理盐水低温匀浆,4℃条件下以12 000 r/min离心10 min。取上清液加入等量40%的蔗糖溶液,摇匀后作好标记置于-25℃冰箱中保存。

8.6.2 电泳分离

用水平平板电泳仪及质量分数为6%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用溴酚蓝作指示剂。加样前,50 mA预电泳30 min;加样后,稳压280 V,电泳80 min~90 min,至溴酚蓝到达距胶前沿1 cm处停止。

8.6.3 染色固定

电泳结束后,取凝胶放入预先配好的染色液中,37℃温浴10 min~30 min,至条带清晰,倾出染色液,用固定液(按甲醇:乙酸:水的体积比为45:12:43配制)终止反应。

同工酶染色液配制见附录A。

8.6.4 扫描测定

用激光扫描仪对电泳图谱进行扫描分析。

9 结果判断

按GB/T 18654.1的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
同工酶染色液的配制

A.1 磷酸盐缓冲液(0.5 mol/L)的配制

取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)6.8 g 溶于约 80 mL 蒸馏水中,以氢氧化钠(NaOH)溶液(2 mol/L)调节 pH 至 7.4,再用蒸馏水定容至 100 mL。

A.2 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)贮液(mg/mL)的配制

取 50 mg 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)定容于 50 mL 蒸馏水中,4 ℃ 保存。

A.3 辅酶 I (NAD)贮液(mg/mL)的配制

取 100 mg 辅酶 I (NAD)定容于 10 mL 蒸馏水中。

A.4 吩嗪甲酯硫酸盐(PMS)贮液(mg/mL)的配制

取 50 mg 吩嗪甲酯硫酸盐(PMS)定容于 50 mL 蒸馏水中,4 ℃ 暗处保存。

A.5 氯化钠(NaCl)溶液(0.1 mol/L) 的配制

取氯化钠 584 mg 定容于 100 mL 蒸馏水中。

A.6 氯化镁(MgCl_2)溶液(0.005 mol/L)的配制

取氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)100 mg 定容于 100 mL 蒸馏水中。

A.7 乳酸钠溶液(1 mol/L)的配制

取 DL-乳酸钠 9.35 mL(浓度 600 mg/mL)加蒸馏水至 50 mL。

A.8 染色液的配制

取磷酸盐缓冲液(A.1)7.5 mL,加氯化硝基四氮唑蓝溶液(A.2)7.5 mL、辅酶 I 溶液(A.3)3.0 mL、吩嗪甲酯硫酸盐溶液(A.4)0.75 mL、氯化钠溶液(A.5)3.0 mL、氯化镁溶液(A.6)3.0 mL、乳酸钠溶液(A.7)3.0 mL,混匀即成。
