

光因子对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 雌蛾性信息素产生及其求偶行为的影响

刘云国¹, 许少甫², 杜家纬²

(1. 湖南大学环境工程系, 长沙 410082; 2. 中国科学院上海昆虫所, 上海 200025)

摘要:分为 3 部分: 第 1 部分为光因子对棉铃虫雌蛾求偶行为的影响; 第 2 部分为光因子对棉铃虫雌蛾性信息素(Z-11-16:Ald)含量的影响; 第 3 部分为光因子对棉铃虫雌蛾脑因子活性的影响。研究结果表明: 用非正常光周期、间隔光照、不同光质处理棉铃虫雌蛾后, 求偶峰值下降, 求偶节律混乱, 性信息素含量下降, 脑因子活性受到抑制。主要研究目的是探讨一种不使用或少使用农药的新型生态防治方法。

关键词:棉铃虫; 求偶峰值; 求偶节律; 性信息素; 脑因子

Effects of light factors on sex pheromone produce and femal's calling behavior of *Helicoverpa armigera*

LIU Yun-Guo¹, XU Shao-Pu², DU Jia-Wei² (1. Hunan University Environment Engineering department, Hunan 410082; 2. Shanghai Institute of Entomology, Chinese Academy of Science)

Abstract: The effects of light factors on the calling behavior, sex pheromone titer and the activity of brain suboesophageal ganglia (Br-SOG) of female cotton bollworm, *Helicoverpa aramigera*, were investigated. Unusual photoperiod, exposure to light during scotophase and red, orange, yellow, green, blue, black, violet and white color light were used to treat female cotton bollworms. The results showed that on these factors, the calling peak value decreased, calling rhythm was disrupted, sex pheromone titer decreased, the activity of Br-SOG was inhibition. These results are useful to explore a new ecological approach for controlling insect pests not relying on or little relying on pesticides.

Key words: *Helicoverpa armigera*; calling peak value; calling rhythm; sex pheromone, Br-SOG

文章编号: 1000-0933(2001)01-0112-05 中图分类号: Q964, Q968.1 文献标识码: A

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 是一种世界性害虫, 分布于北纬 50° 至南纬 50°。在我国重要产棉区为害猖獗。为防治棉铃虫, 不得不使用化学农药, 但由于长期使用, 不仅使棉铃虫产生了抗药性, 而且也污染了环境。为寻找一种既不污染环境又能有效消灭害虫的新型防治措施, 国内外专家在高效低毒农药、生物防治、物理防治、性信息素干扰交配和诱捕等方面做过大量研究^[1~4], 但迄今为止仍未达到人类可以接受的水平。为了这一研究目的, 作者从生态学角度对棉铃虫雌蛾的求偶行为和性信息素滴度进行了详尽的研究。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料和实验室条件

1996 年 5 月从河南棉田采回棉铃虫, 在实验室用棉铃虫半人工配方饲料饲养。实验室环境条件: 室温 25 C ± 1 C, 相对湿度 85% ± 5%, 光周期 14L(h, Light): 10D(h, Dark), 光源为普通白炽灯。

1.2 实验方法

基金项目: 中澳国际合作研究项目

收稿日期: 1999-01-28; 修订日期: 1999-12-29

本研究得到中国科学院上海昆虫研究所化学生态国家重点实验室的老师和同学们的大力帮助, 借此谨表衷心感谢。

作者简介: 刘云国 (1955~), 男, 湖南常德市人, 博士, 副教授。主要从事化学生态和污染生态教学与研究。

1.2.1 光周期处理 把当天羽化的棉铃虫雌蛾每只置于 1 个马灯罩内,12 只雌蛾为 1 组,用光照强度为 120Lx 的 12 种非标准光周期(0L:24D、2L:22D、4L:20D、6L:18D、8L:16D、10L:14D、12L:12D、16L:8D、18L:6D、20L:4D、22L:2D、24L:0D)处理雌蛾,并以标准光周期(14L:10D)为对照,从第 3 天和第 4 天暗时相后 30min 开始观察雌蛾的求偶行为,每 30min 1 次,每天 20 次。雌蛾求偶行为以产卵器伸出腹部为准。

1.2.2 间隔光照处理 在标准光周期暗期,按 2.0D:0.5L、1.5D:0.5L、1.0D:0.5L、0.5D:1.0L、0.5D:1.5L、0.5D:2.0L 的间隔光照(120Lx)打破雌蛾求偶的暗时相。例如,2.0D:0.5L 间隔光照是指进入光周期暗期 2h 后,光照 0.5h,如此交替进行。其它间隔光照处理同理,余下的同 1.2.1。

1.2.3 光质处理 在光周期暗期,按 7 种方法打破暗时相。A:7 种有色光(红、橙、黄、绿、蓝、青、紫)和白色光,0.5D:0.5L 间隔光照,光强为 120Lx;B:4 种有色光(橙、黄、绿、蓝)和白色光,0.5D:0.5L 间隔光照,240Lx;C:4 种有色光(橙、黄、绿、蓝)和白色光,0.5D:1.0L 间隔光照,240Lx;D:在暗时相 5h 后,7 种有色光(红、橙、黄、绿、蓝、青、紫)和白色光,0.5D:1.0L 间隔光照,120Lx;E:在暗时相 5h 后,7 种有色光(红、橙、黄、绿、蓝、青、紫)和白色光,2.5D:2.5L 间隔光照,120Lx;F:在暗时相 5h 后,7 种有色光(红、橙、黄、绿、蓝、青、紫)和白色光,2.5D:2.5L 间隔光照,240Lx;G:在光周期暗时相 2h 15min 后,4 种有色光(橙、黄、绿、蓝)和白色光,0.75D:0.25L 间隔光照,240Lx,其它同 1.2.1。

1.2.4 性信息素腺体提取物的制备和分析 选出雌蛾在非标准光周期、不同间隔光照和不同光质条件下求偶率低的 24L:0D 光周期;0.5D:2.0L 间隔光照;方法 A-G 橙色光、橙色光、橙色光、绿色光、绿色光、绿色光、橙色光几种处理,测定性信息素主成分 Z-11-16:Ald 的含量。对照为 14L:10D 光周期。在黑暗 8h(对照),取 20 只雌蛾,用虹膜剪沿第 8 节剪下腺体,分别将腺体放入微型尖底指形管中,室温下置于含 13:Ac(1ng/ μ l)重蒸正己烷中(10 μ l),浸泡 2h,然后去除产卵器备用。其它处理条件的取样和制备方法与对照相同。

本研究采用 HP-5890 毛细管色谱仪,氢焰离子化检测,无分流进样装置,配有微机处理机,HP-5890 毛细管色谱仪的柱为 HP-5(0.2mm \times 25m)。

色谱条件:起始温度 100 $^{\circ}$ C,升温速率 10 $^{\circ}$ C/h,终止温度为 250 $^{\circ}$ C,进样器温度为 220 $^{\circ}$ C,检测温度为 250 $^{\circ}$ C,起始时间为 2min,在 250 $^{\circ}$ C 保持 10min。用 13:Ac(1ng/ μ l)进行内标定量。

1.2.5 去头雌蛾和脑因子的制备 在雌蛾羽化 4h 后的当天,去头后放入羽化笼中,置于实验室内备用。解剖第 3 黑暗期 6~8h 未交配对照雌蛾和经 120Lx \times 0.5D:2.0L 间隔光照处理过的第 3 天相应时刻未交配雌蛾,把脑子置于昆虫林格氏生理盐水中匀浆离心(每个脑因子 30 μ l 林格氏生理盐水溶液),取 30 μ l 上述匀浆离心液注射到第 3 天无头雌蛾第 5~6 节节间腹部,4h 后,剪取腺体,操作技术同性信息素。另取 30 μ l 昆虫林格氏生理盐水注射到第 3 天无头雌蛾的第 5~6 节节间腹部,作为参照,检验生理盐水对性信息素的影响。

2 结果与分析

2.1 光周期对雌蛾求偶的影响

2.1.1 对雌蛾平均求偶峰值的影响 鳞翅目夜蛾科的昆虫在羽化后开始求偶,2~3d 达到性成熟,这种现象持续数天^[5],求偶高峰多出现在第 3~4 天,同一天内出现在黑暗后 8h 左右^[6]。雌蛾在 12 种非正常光周期条件下,求偶峰值均低于对照。下降率从小到大依次为:16L:8D(19%)、12L:12D(29%)、6L:18D(29%)、10L:14D(43%)、4L:20D(52%)、20L:4D(52%)、8L:16D(57%)、22L:2D(57%)、18L:6D(62%)、0L:24D(62%)、2L:22D(81%)、24L:0D(100%),其中下降率最低的是 16L:8D(19%)光周期,其次是 12L:12D(29%)光周期,最高的是连续 7d 光照(100%)。说明雌蛾要表现出正常的求偶行为不仅需要一定时数的光照,而且更需要一定时数的黑暗,也表现出增加或减少光周期的黑暗时间,均能引起求偶峰值下降。在连续 7d 光照下雌蛾根本不表现出求偶行为,说明连续 7d 的 120lx 光照能完全抑制雌蛾求偶行为,但在连续 7d 黑暗条件下,雌蛾虽能求偶,但求偶峰值并不高。一方面说明在连续 7d 黑暗条件下对雌蛾求偶行为所固有的内禀节律干扰较小,也说明雌蛾获得的求偶信号是黑暗而不是光照。

2.1.2 对雌蛾平均求偶节律的影响 在正常条件下,雌蛾第 3~4 天各观察时刻的平均求偶率绝大多数

高于 12 种非正常光周期处理条件,且具有良好的求偶节律性,而在处理条件下,雌蛾的求偶节律性差,表现出在与对照条件相似时,求偶节律也与对照相似,差异较大时,求偶节律差异性增大的规律。方差分析和多重比较 Q 检验表明(原始数据进行 $\log(X+1)$ 转换,下同);不仅对照与 2L:22D、4L:20D、8L:16D、20L:4D、22L:2D、24L:0D 光周期期间存在显著差异,而且非正常光周期之间也存在显著差异,说明用非正常光周期处理雌蛾后,对求偶节律有较大影响,且不同处理条件,对雌蛾影响力度不同。如连续 7d 24L:0D 光周期处理,雌蛾在 7d 中均不求偶,但在 12L:12D 和 16L:8D 光周期条件下,雌蛾求偶节律性与对照较类似。

2.2 间隔光照对雌蛾求偶的影响

2.2.1 对雌蛾平均求偶峰值的影响

非正常光周期对雌蛾求偶影响的研究表明:雌蛾要表现出正常求偶生理节律性,不仅需要一定时数的光照,而且更需要一定时数的黑暗。用光强为 120Lx 的 6 种间隔光照打破雌蛾求偶暗时相,干扰求偶行为,结果表明:雌蛾第 3~4 天平均求偶峰值分别为 $79.0 \pm 5.7(2.0D:0.5L)$ 、 $87.5 \pm 6.4(1.5D:0.5L)$ 、 $54.0 \pm 5.7(1.0D:0.5L)$ 、 $54.0 \pm 5.7(0.5D:1.0L)$ 、 $12.5 \pm 6.4(0.5D:1.5L)$ 、 $4.0 \pm 5.7(0.5D:2.0L)$,对照为 87.5 ± 6.4 ,均低于对照,其中,0.5D:1.5L 和 0.5D:2.0L 间隔光照对雌蛾求偶峰值影响最大。说明不同间隔光照对雌蛾求偶峰值的影响程度与间隔光照的光期持续时间有着密切关系,在同一黑暗时间、同一光照强度条件下,影响程度随间隔光照的光期时间延长而增大,同时也说明间隔光照对雌蛾求偶影响需要有一段时间光照才能表现出良好的抑制效果。

2.2.2 对雌蛾平均求偶节律的影响

用光强为 120Lx 的 6 种间隔光照打破雌蛾求偶暗时相后,第 3~4 天各观察时刻求偶率均值低于对照,但不同间隔光照对求偶影响效果存在较大差异。按 2.0D:0.5L 间隔光照打破时,因打破暗时相的光照时间较短,黑暗时间较长,在暗时相的后半期,特别是在间隔光照的暗期,雌蛾的求偶率较高,甚至在个别时刻求偶率还接近对照,但在间隔光照的光期,求偶率比较低,求偶节律波动较大,说明间隔光照能抑制雌蛾求偶行为。改用 1.5D:0.5L 和 1.0D:0.5L 间隔光照处理后,对求偶的影响效果增加。而采用 0.5D:1.0L、0.5D:1.5L、0.5D:2.0L 3 种间隔光照处理,由于间隔光照的光期时间延长,黑暗时间缩短,各观察时刻求偶率急剧下降,求偶节律性极差,特别是 0.5D:2.0L 间隔光照处理,求偶率几乎下降到零。由此可见,间隔光照的光照时间和黑暗时间长短是一个很关键的因子。方差分析和多重比较 Q 检验表明:对照与 0.5D:1.0L、0.5D:1.5L、0.5D:2.0L、1.0D:0.5L 间隔光照存在显著差异,而与 2.0D:0.5L、1.5D:0.5 的间隔光照差异不显著。

2.3 光质对雌蛾平均求偶节律的影响

用方法 A 处理后,雌蛾求偶节律性变差,整个求偶过程呈锯齿状,在间隔光照的光期,求偶率显著下降,在间隔光照的暗期,求偶率回升,7 种单色光和白色光均表现出类似的规律。方差分析和多重比较 Q 检验表明对照与处理差异显著,说明各单色光和白色光对求偶节律有较大影响。提高光照强度,改用方法 B 后,尽管间隔光照时间相同,但求偶率明显下降,整个求偶过程基本无峰谷之分,说明间隔光照的光照强度是一个关键因子。方差分析和多重比较 Q 检验表明对照与 4 种有色光和白色光差异显著。延长间隔光照时间(方法 C),对雌蛾求偶的影响效果进一步增大,说明延长间隔光照的光照时间是另一关键因子。方差分析和多重比较 Q 检验表明对照与 4 种有色光和白色光差异显著。

对雌蛾求偶行为的观测表明:雌蛾大多在暗时相 5h 后开始大量求偶,所以在暗时相 5h 后,用方法 D 处理雌蛾。处理后求偶率虽有所下降,但下降幅度低于前 3 种处理方法,说明间隔光照的初始光照时间也是干扰求偶行为的一个关键因子。提前初始光照时间有利于打破雌蛾求偶生理节律,提高干扰效果,推迟初始光照时间对求偶的影响力度下降。可以认为进入暗期后 5h 内,是棉铃虫雌蛾获得求偶信息,作出求偶反应的重要阶段,要获得好的干扰效果,必须提前初始光照时间。方差分析和多重比较 Q 检验表明对照与红色、黄色、绿色、青色和白色 5 种光质差异显著,与橙色、蓝色和紫色 3 种光质差异不显著,说明不同光质之间对雌蛾求偶行为的影响有一定差异。用方法 E 处理雌蛾后,求偶率在暗时相 1/4~3/4 这段时间里比较低,但在最后 1/4 这段时间里求偶率比较高,此段时间恰好是雌蛾在正常条件下求偶的高峰时期,说明如果要获得好的干扰效果,必需在求偶高峰期采用高强度光照打破黑暗,这是提高干扰雌蛾求偶行为的重要手段。采用方法 F 处理雌蛾后,除求偶下降率略低于方法 E 外,其它均相似,这就进一步说明间隔光照

的初次光照时间和光照强度是干扰雌蛾求偶的重要因子。用方法 G 处理雌蛾后,求偶率绝大多数低于对照,再次说明提前打破求偶暗时相,增加打破黑暗的光强的重要作用。

2.4 光周期、间隔光照和光质对雌蛾性信息素含量的影响

2.4.1 雌蛾性信息(Z-11-16:Ald)含量变化 Z-11-16:Ald 是棉铃虫雌蛾性信息主要成分,在信息素组分中占 90% 以上,所以选择 Z-11-16:Ald 作为性信息素示踪物,研究不同处理条件对雌蛾性信息素含量影响^[7]。在标准光周期下,雌蛾第 3 天黑暗后 2h、4h、6h、8h、10h(光期)的性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量的测定结果如表 1 所示。

表 1 在标准光周期不同黑暗时刻棉铃虫雌蛾的 Z-11-16:Ald 含量(ng/♀)

Table 1 female's Z-11-16:Ald titer in *H. armigera* on different dark period of normal photoperiod

黑暗时间(h) Dark period	2	4	6	8	10
含量 Titer(ng/♀)	26.7±17.9	40.7±33.6	52.2±38.3	104.0±70.0*	10.8±10.6
雌蛾 Female(只)	18	23	24	18	18

* 因组间差异太大,去除了一个最高值和一个最低值。

从表 1 可以看出雌蛾进入黑暗后开始释放性信息素,随着黑暗时数的增加,性信息素含量也逐渐增加,8h 时,主成分 Z-11-16:Ald 含量达到最大值,10h 时(光期)信息素含量迅速下降。

2.4.2 处理雌蛾性信息素(Z-11-16:Ald)含量 为了便于与对照雌蛾性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量最大值进行比较,在处理的第 3 天,对照雌蛾进入黑暗 8h,剪取各种处理雌蛾腺体,测定性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量,结果如表 2 所示。

表 2 在不同处理条件下棉铃虫雌蛾的 Z-11-16:Ald 含量(ng/♀)*

Table 2 Female's Z-11-16:Ald titer in *H. armigera* on different dispose of condition

处理条件 Dispose of condition	对 照	24L:0D	0.5D:2.0L	A(橙色光)	B(橙色光)
	Comparison			Orange	Orange
含量 Titer(ng/♀)	104.0±70.0	10.7±14.5	20.1±23.0	11.2±7.0	7.1±4.9
雌蛾数 Female(只)	18	20	18	20	20
下降率 Downtrend(%)	0.0	89.7	80.7	89.2	92.9
处理条件 Dispose of condition	C(橙色光)	D(绿色光)	E(绿色光)	F(绿色光)	G(橙色光)
	Orange	Green	Green	Green	Orange
含量 Titer(ng/♀)	6.7±4.6	18.8±11.5	7.0±4.1	8.6±5.9	3.0±3.0
雌蛾数 Female(只)	18	19	19	20	18
下降率 Downtrend(%)	93.6	81.9	93.2	91.7	97.1

从表 2 可知,用不同条件处理棉铃虫雌蛾后,性信息素主成分 Z-11-16:Ald 的含量下降非常明显,说明上述处理条件能比较显著地抑制雌蛾体内性信息素产生。在相同条件下,光照强度增大,性信息素主成分含量下降幅度也随之增大,如 A(120Lx,0.5D:0.5L)和 B(240Lx,0.5D:0.5L);E(黑暗 5h 后,240Lx,2.5D:2.5L)和 F(黑暗 5h 后,120Lx,2.5D:2.5L);间隔光照的光照时间延长,性信息素含量下降幅度也增大,如 B(240Lx,0.5D:0.5L)和 C(240Lx,0.5D:1.0L),说明间隔光照的光照强度增加,光照时间延长,有利于抑制棉铃虫雌蛾性信息素的产生。

2.5 间隔光照对雌蛾脑因子的影响

在棉铃虫雌蛾脑中存在一种因子控制着性信息素的产生,这种脑因子由雌蛾在黑暗期释放到血淋巴中,并诱导性信息素腺体产生性信息素,因而被认为雌蛾脑因子活性是产生性信息素的关键。因为 Z-11-16:Ald 是性信息素主成分,所以此作为雌蛾性信息素的跟踪目标。测定结果如表 3 所示。

在去头雌蛾中,性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量是相当低的(1.28±0.63(ng/♀))^[7],说明把雌

蛾的头去掉后,能显著地抑制雌蛾体内性信息素产生。将 30 μ l 正常雌蛾脑匀浆(相当于 1 头雌蛾的脑)直接注射到无头雌蛾腹部 4h 后,性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量恢复到 32.2ng/♀,而把 30 μ l 处理雌蛾脑匀浆和 30 μ l 生理盐水直接注射到无头雌蛾腹部 4h 后,性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量只恢复到 5.4 \pm 5.0ng/♀和 2.9 \pm 2.3ng/♀,与对照相比,分别下降了 83.2%和 91.0%。说明在暗时相用 120Lx 光强,按 0.5D:2.0L 间隔打破雌蛾求偶暗时相,雌蛾脑因子活性降低是导致了性信息素主成分 Z-11-16:Ald 含量的下降。

3 讨论

用 5mg 性信息素 Z-11-16:Ald 诱到了雄蛾^[8],说明性信息素对雄蛾的引诱存在一个量的问题,也就是说与性信息素含量的大小有关。研究结果表明经处理后的雌蛾,求偶率下降,求偶节律混乱,求偶姿态不典型,性信息素含量下降非常明显,说明处理条件不仅影响了雌蛾的正常求偶行为,也抑制了雌蛾体内性信息素主成分的产生。雌蛾求偶行为的变化和性信息素主成分含量的下降对雄蛾的性引诱、雌雄蛾之间化学信息通讯联系、雌雄交配等均会有很大的影响,从而使雌蛾繁殖率降低,可达到不使用或少使用农药,就能防治害虫的目的。这是一种防治害虫的新思想,是一种全新的生态防治方法。影响效果可通过风洞和田间实验进行进一步的研究。

脑因子由雌蛾在黑暗期释放到血淋巴中,通过血淋巴运输脑因子^[9,10],诱导性信息素腺体产生性信息素,不能在光期雌蛾的血淋巴中保持活性。在光照期,雌蛾并不释放脑因子,在黑暗期雌蛾释放的脑因子进入光期后,活性迅速降低。从而可以推论导致性信息素含量恢复值下降的主要原因很有可能是间隔光照激活了雌蛾血液中某种蛋白质或酶的活性,使血淋巴释放一种让脑因子活性下降的灭活因子,也可能是间隔光照让雌蛾脑部受到了间隔光照的感官刺激后,大脑神经系统发出一个命令,使生物节律发生混乱,误认为是非求偶和释放性信息素的时间。是否存在这种灭活因子,大脑神经系统是否发出该命令,均值得进一步研究。

参考文献

- [1] 杜家纬. 昆虫信息素及其应用. 北京:中国林业出版社, 1988.
- [2] 董红,刘孟英. 鳞翅目昆虫信息素生物合成活化神经肽(PBAN)的研究进展. 生命科学, 1996, **8**: 26~31.
- [3] 浙江农业大学. 农业昆虫学. 上海:上海科学出版社, 1987.
- [4] Raina A K, Davis J C and Stadelbacher E A. Sex pheromone production and calling in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of temperature and light. *Environ. Entomol.*, 1991, **20**(5): 1451~1456.
- [5] 高桥正三. 昆虫行为. 日本京都:株式会社化学同人, 1988.
- [6] 兀文琪,等. 棉铃虫雌蛾求偶活动和性信息素产生的日周期性. 上海:上海科学技术出版社. 昆虫学研究集刊, 1991, **10**: 57~62.
- [7] Zhu Xiangxiang, Xu Shaopu *et al.* Effect of brain on sex pheromone production of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Kexue Tongbao*, 1987, **33**: 1474~1476.
- [8] Gothilf S, *et al.* Efficacy of Z-11-hexadecenal and Z-11-tetradecenal as sex attractants for *Helicoverpa armigera* on two different dispensers. *J. Eco. Entomol.*, 1979, **72**: 718~720.
- [9] Jacquin E, *et al.* Control of the pheromone biosynthesis in the moth *Mamestra Brassicae* by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1994, **21**: 81~89.
- [10] Ramaswamy S B, *et al.* Pheromonotropic and pheromonostatic activity in moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1994, **25**: 301~316.

表 3 在不同处理条件下棉铃虫雌蛾脑因子活性对性信息素恢复的影响

Table 3 The resurrection of sex pheromone titer in *H. armigera* for female, s brain suboesophageal ganglia (Br-SOG) on different dispose of condition

处理条件 Dispose of condition	雌蛾数(只) Female	Z-11-16:Ald 含量 (ng/♀)	下降率(%) Downtrend
正常雌蛾脑匀浆 ^①	20	32.2 \pm 15.7	—
处理雌蛾脑匀浆 ^②	20	5.4 \pm 5.0	83.2
林格式生理盐水 ^③	7	2.9 \pm 2.3	91.0

①Normal female, s Br-SOG; ②Dispose female, s Br-SOG;

③Physiological saline.