

## مقایسه برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم شناختی فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus, ۱۷۶۸) وحشی و پرورشی

- مهدی عادل۱\*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
- علی صادقی۲: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- محمدرضا ایمانیپور۳: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ابراهیم مسعودی۴: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- محمد فرخی۵: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

### چکیده

طی این مطالعه که به مدت ۲ ماه از فروردین تا اردیبهشت ۱۳۹۶ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهیدمرجانی گرگان صورت پذیرفت خصوصیات حرکتی (طول دوره تحرک و درصد تحرک اسپرم)، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم و برخی از خصوصیات بیولوژیکی اسپرم شامل شاخص‌های پلاسمای سمینال (ترکیبات یونی و آلی) در ۸ مولد وحشی و ۸ مولد پرورشی مورد بررسی قرار گرفت. طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در فیل ماهی وحشی به ترتیب  $31 \pm 2/33$ ،  $31 \pm 6/11$ ،  $65 \pm 11/31$ ،  $31 \pm 6/11$ ،  $28 \pm 10/2$  اندازه گیری شد. غلظت‌های یون سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در فیل ماهی وحشی به ترتیب  $47 \pm 9/36$ ،  $40 \pm 9/6$ ،  $44 \pm 7/70$ ،  $15 \pm 10/1$  میلی مول در لیتر و در فیل ماهی پرورشی به ترتیب  $40 \pm 10/29$ ،  $28 \pm 0/3$ ،  $47 \pm 7/76$ ،  $24 \pm 10/12$  میلی مول در لیتر بود. غلظت کلسترول و گلوکز در فیل ماهی وحشی به ترتیب  $77 \pm 8/33$ ،  $12 \pm 2/65$  میلی گرم در دسی لیتر و در فیل ماهی پرورشی به ترتیب  $78 \pm 4/47$ ،  $66 \pm 11/21$  میلی گرم در دسی لیتر بود. هم‌چنین پلاسمای سمینال در فیل ماهی وحشی و پرورشی به ترتیب دارای  $27 \pm 10/1$ ،  $29 \pm 33/1$  گرم در دسی لیتر پروتئین بود. بررسی‌ها نشان داد که بین طول دوره تحرک، درصد تحرک اسپرم و میزان غلظت یون منیزیم در فیل ماهی وحشی و پرورشی اختلاف معنی داری وجود داشت.

**کلمات کلیدی:** فیل ماهی، پارامترهای اسپرم شناختی، پارامترهای بیوشیمیایی



## مقدمه

## مواد و روش‌ها

فیل ماهی از ماهیان غضروفی-استخوانی متعلق به خانواده تاس ماهیان (Acipenseridae) و با نام علمی *Huso huso* Linnaeus, ۱۷۶۸ می‌باشد. فیل ماهی یکی از گونه‌های با ارزش و منحصر به فرد در دنیا است که به علت مرغوبیت خاویار آن در میان تاس ماهیان و هم‌چنین طعم خوب و کیفیت مناسب گوشت، مصرف‌کنندگان بسیاری را به خود اختصاص داده است (Varadi و Ronyai, ۲۰۰۷). در حال حاضر، بازسازی ذخایر فیل ماهی و دیگر گونه‌های ماهیان خاویاری از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی بچه‌ماهیان در رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر انجام شده و با توجه به این‌که امکان مهاجرت این ماهیان به رودخانه، در حال حاضر مهیا نبوده و از طرف دیگر صید تعداد مولدین کافی مورد نیاز در کارگاه‌های تکثیر مورد تضمین نمی‌باشد، در نتیجه پرورش این ماهیان، به‌خصوص جهت تامین مولد مورد نیاز کارگاه‌های تکثیر تنها راه نجات نسل این ماهی پر ارزش، به نظر می‌رسد (Taghavi Motlagh, ۲۰۱۰). از آنجایی‌که اسپرم واجد کیفیت بالا برای صنعت شیلات و مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر شیلاتی حائز اهمیت می‌باشد، لذا ارزیابی کیفیت اسپرم جزء عوامل کلیدی در تولید موفق ماهی در تکثیر مصنوعی محسوب می‌شود (Alavi و همکاران, ۲۰۰۶). فاکتورهایی مانند تعداد اسپرماتوزوآ نسبت به تخمک، طول دوره حرکت اسپرماتوزوآ، ترکیبات یونی و آلی سمن و محیط می‌تواند روی موفقیت لقاح موثر باشد (Cosson و Linhart, ۱۹۹۶). منی یاسمن از اسپرماتوزوآ و پلاسمای سمینال تشکیل شده است. پلاسمای سمینال حاوی ترکیباتی است که بعضی از این ترکیبات از اسپرماتوزوآ نگهداری می‌کنند و بعضی دیگر رابط بین سیستم تولیدمثل و اسپرماتوزوآ می‌باشند (Ciereszko و همکاران, ۲۰۰۹). مطالعه روی شاخص‌های سمن برای فهم فرآیندهای بیوشیمیایی در طی حرکت اسپرماتوزوآ و لقاح، ارزیابی توانایی تولیدمثل در گونه‌های مختلف ماهی و بهبود روش‌های نگهداری کوتاه مدت و بلندمدت سمن ماهیان ضروری می‌باشد (Cosson و Alavi, ۲۰۰۶). ماهیان مولد وحشی و پرورشی، تفاوت‌هایی از نظر پارامترهای اسپرم شناختی و بیوشیمیایی با یکدیگر دارند و با توجه به این‌که پارامترهای ذکر شده روی کیفیت اسپرم و در نهایت درصد لقاح تاثیرگذارند لذا تحقیقات بیش‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد (Rurangwa و همکاران, ۲۰۱۴). لذا این تحقیق برای مقایسه پارامترهای اسپرم شناختی (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره حرکت اسپرم، درصد تحرک اسپرم) و پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم (سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، گلوکز، کلاسترول، پروتئین) فیل ماهی وحشی و پرورشی صورت گرفته است.

اردیبهشت ۱۳۹۶، سمن ۸ مولد وحشی و ۸ مولد پرورشی فیل ماهی نر با استفاده از سرنگ تایگون در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهیدمرجانی گرگان جمع‌آوری گردید. سرنگ‌های حاوی میل، در فلاسک یخ در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر (اسپرماتوکریت، طول دوره تحرک اسپرم و درصد تحرک اسپرم) منتقل گردید. برای اندازه‌گیری درصد و طول دوره حرکت اسپرم از میکروسکوپ فاز کنتراست مجهز به دوربین CCD و متصل به رایانه استفاده شد (Cosson و همکاران, ۲۰۰۰). برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، پس از سانتریفیوژ کردن لوله‌های میکرو محتوی سمن در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در ۵ دقیقه، با استفاده از هماتوکریت خوان درصد اسپرم به پلاسمای سمن تعیین می‌گردد (Fitzpatrick و همکاران, ۲۰۰۵). تراکم اسپرم باروش استاندارد هماسیتومتری با رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۲۰۰۰ با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست زمینه سیاه با درشت‌نمایی ۱۰ اندازه‌گیری می‌شود و با واحد  $\times 10^9$  در هر میلی‌لیتر سمن نوشته می‌شود. هم‌چنین برای بررسی پارامترهای بیوشیمیایی، نمونه‌های سمن درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و در دور ۵۰۰ به مدت ۲ دقیقه و سپس در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ سیگما (Sigma 1-13 England)، سانتریفیوژ شدند. (Barannikova, ۱۹۹۵). بعد از سانتریفیوژ، پلاسمای سمینال که در قسمت بالای ویال قرار گرفته به درون ویال‌های جدید منتقل و نمونه‌ها برای بررسی ترکیبات بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یون‌های سدیم و پتاسیم توسط دستگاه فلیم فتومتر مدل جی وی (Jenway pfp, England) و کلسیم، منیزیم، گلوکز، کلاسترول و پروتئین به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اس ۲۰۰۰ (WPA.S2000) (UV/VIS, Combridge-UK) و با استفاده از کیت‌های کمی پارامترهای بیوشیمیایی سرم یا پلاسما (شرکت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد (Alavi و همکاران, ۲۰۰۶).

**تجزیه آماری:** آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ صورت گرفت. بدین منظور و برای مقایسه هر یک از پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم‌شناختی مشابه در فیل ماهی وحشی و پرورشی از آزمون t استفاده گردید.

## نتایج

نتایج حاصل از مطالعه برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم شناختی در فیل ماهی وحشی و پرورشی در جدول ۱ آمده

است. مطابق جدول، طول دوره تحرک اسپرم، درصد تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت و تراکم اسپرم در فیل ماهی وحشی به ترتیب  $310 \pm 61/65$ ،  $81/11 \pm 6/31$ ،  $2/33 \pm 0/36$  و در فیل ماهی پرورشی به ترتیب  $2/10 \pm 0/28$ ،  $2/26 \pm 0/23$ ،  $65/63 \pm 5/8$ ،  $170/43 \pm 34/61$  می باشد. هم چنین غلظت های یون سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در فیل ماهی وحشی به ترتیب  $99/36 \pm 9/47$ ،  $4/96 \pm 0/40$ ،  $7/75 \pm 0/44$ ،  $4/96 \pm 0/40$ ،  $99/36 \pm 9/47$  میلی مول در لیتر و در فیل ماهی پرورشی به ترتیب  $92/30 \pm 103/91$ ،  $4/81 \pm 5/21$ ،  $6/93 \pm 8/17$ ،  $1/86 \pm 2/64$ ،  $27/30 \pm 36/92$ ،  $45/83 \pm 49/14$ ،  $1/21 \pm 1/45$ ،  $1/94 \pm 2/34$ ،  $1/98 \pm 2/54$ ،  $62/38 \pm 68/84$ ،  $165/39 \pm 175/45$  میلی مول در لیتر بود.

جدول ۱: میانگین و خطای استاندارد میانگین پارامترهای بیوشیمیایی و اسپرم شناختی در فیل ماهی پرورشی و وحشی

پارامتر	وحشی		پرورشی	
	x±SEM	حدود اطمینان (۹۵٪)	x±SEM	حدود اطمینان (۹۵٪)
سدیم (میلی مول/لیتر)	99/36±9/47 <sup>a</sup>	95/53±103/21	98/29±10/40 <sup>a</sup>	92/30±103/91
پتاسیم (میلی مول/لیتر)	4/96±0/40 <sup>a</sup>	4/30±5/41	5/03±0/28 <sup>a</sup>	4/81±5/21
کلسیم (میلی مول/لیتر)	7/75±0/44 <sup>a</sup>	7/40±8	7/76±0/47 <sup>a</sup>	6/93±8/17
منیزیم (میلی مول/لیتر)	1/15±0/15 <sup>b</sup>	0/91±1/40	2/12±0/24 <sup>a</sup>	1/86±2/64
گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)	32/65±2/12 <sup>a</sup>	27/24±38	32/21±1/66 <sup>a</sup>	27/30±36/92
کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)	49/33±8/77 <sup>a</sup>	48/40±50/21	47/47±4/78 <sup>a</sup>	45/83±49/14
پروتئین (گرم/دسی لیتر)	1/10±0/27 <sup>a</sup>	0/91±1/30	1/33±0/29 <sup>a</sup>	1/21±1/45
تراکم اسپرم (×۱۰ <sup>۹</sup> )	2/50±0/36 <sup>a</sup>	2/12±2/87	2/10±0/28 <sup>a</sup>	1/94±2/34
اسپرماتوکریت (/)	2/33±0/31 <sup>a</sup>	1/94±2/68	2/26±0/23 <sup>a</sup>	1/98±2/54
درصد تحرک اسپرم (/)	81/11±6/31 <sup>a</sup>	70/11±91/90	65/63±5/81 <sup>b</sup>	62/38±68/84
طول حرکت اسپرم (s)	310±61/65 <sup>a</sup>	290±330	170/43±34/61 <sup>b</sup>	165/39±175/45

P<0/05 معنی دار در نظر گرفته شده است.

## بحث

حرکت اسپرم و درصد تحرک اسپرم) که مستقیماً روی توانایی لقاح موثرند مشخص شود (Rurangwa و همکاران، ۲۰۱۴). اختلاف زیادی بین تراکم اسپرم در گونه های مختلف وجود دارد. تراکم اسپرم در ماهیان بین  $2 \times 10^6$  تا  $6/5 \times 10^{10}$  عدد در هر میلی لیتر گزارش شده است و میانگین تراکم اسپرم در ماهیان استخوانی از ماهیان خاویاری بیش تر می باشد (Billard و همکاران، ۲۰۱۵). براساس مطالعه انجام شده اسپرماتوزوآ فیل ماهی (*Huso huso*) شبیه اکثر ماهیان تخم گذار در مایع سمینال غیرفعال می باشد (Alavi و همکاران، ۲۰۰۶). ترکیبات پلاسمای سمینال معمولاً مانع حرکت اسپرماتوزوآ در مایع سمینال و لوله اسپرم بر می شود (Billard، ۲۰۱۵). عامل اصلی عدم حرکت اسپرماتوزوآ ماهیان خاویاری در پلاسمای سمینال و لوله های اسپرم بر، به خاطر غلظت یون پتاسیم است که غلظت این یون در پلاسمای سمینال ماهیان خاویاری به  $2/5$  میلی مول در لیتر می رسد (Billard، ۲۰۱۵). با توجه به جدول ۱ میزان یون پتاسیم مایع سمینال در فیل ماهی وحشی و پرورشی به ترتیب  $4/96 \pm 0/40$  و  $5/03 \pm 0/28$  میلی مول در لیتر می باشد. مایع سمینال علاوه بر نقش ممانعت کننده

در تحقیق حاضر میزان طول دوره تحرک اسپرم و درصد تحرک اسپرم در ماهیان وحشی بیش تر از ماهیان پرورشی بود که از این نظر با مطالعات Rideout و همکاران (۲۰۱۲) و Primavera و همکاران (۲۰۱۴) هم خوانی داشت. بررسی آن ها نشان داد که در ماهیان پرورشی مقدار اسپرم، کم تر و نسبت اسپرم های مرده و غیرعادی (ناهنجار) در مقایسه با ماهیان وحشی بیش تر است. هم چنین این تحقیق با مطالعات انجام شده روی کیفیت اسپرم ماهی دم زرد مدیترانه ای پرورشی و وحشی توسط Díaz و García (۲۰۱۵) هم خوانی داشت. ارزیابی کیفیت اسپرم برای بهبود روش های لقاح مصنوعی، نگهداری گامت های نر و مطالعه اثر آلاینده های زیست محیطی روی موفقیت تولیدمثل در ماهیان صورت می پذیرد (Rurangwa و همکاران، ۲۰۱۴). هم چنین ارزیابی سریع کیفیت اسپرم می تواند انتخاب مولد مناسب را برای به دست آوردن اسپرم با کیفیت بالاتر تسهیل نماید که در نتیجه آن، نسل بهتری حاصل خواهد شد. برای این کار می بایست نشانگرهای زیستی کیفی اسپرم (اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، طول دوره



۷. Ciereszko, A.; Glogowski, J. and Dabrowski, K., 2009. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. Cryopreservation in aquatic species. Louisiana: WAS, Baton Rouge. pp: 20-48.
۸. Cosson, J. and Linhart, O., 1996. Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: effects of potassium and pH on motility. *Folia Zool.* Vol. 45, pp: 36-45.
۹. Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C.; Dreanno, C.; Linhart, O. and Suquet, M., 1997. Movements of fish sperm flagella studied by high speed video microscopy coupled to computer assisted image analysis. *Pol Arch Hydrobiol.* Vol. 44, pp: 103-112.
۱۰. Cosson, J.; Linhart, O.; Mims, S.D.; Shelton, W.L. and Rodina, M., 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *Journal of Fish Biology.* Vol. 56, pp: 1348-1367.
۱۱. Fitzpatrick, J.L.; Henry, J.C.; Leily, N.R. and Devlin, R.H., 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masculinize coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture.* Vol. 249, pp: 459-468.
۱۲. García, A. and Díaz, M.V., 2015. Culture of *Seriola dumerilii*. *Cah.Options Méditerran.* Vol. 16, pp: 103-114.
۱۳. Morisawa, M.; Suzuki, K.; Shimizu, H.; Morisawa, S. and Yasuda, K., 2010. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Zool.* Vol. 107, pp: 95-103.
۱۴. Primavera, J.H. and Qunitio, E.T., 2014. Runt-Deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus Monodon*. *Journal of Crustacean Biology.* Vol. 20, pp: 796-802.
۱۵. Rideout, R.M.; Trippel, E.A. and Litvak, M.K., 2012. Relationship between sperm density, spermatozoa, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *Journal of Fish Biology.* Vol. 65, pp: 319-332.
۱۶. Ronyai, A. and Varadi, L., 2007. The sturgeons. pp:95-108. In Nash C.E. and Novotny, A.J., (eds.). *Production of Aquatic Animals.* Elsevier, Amsterdam.
۱۷. Rurangwa, E.; Kime, D.E.; Ollevier, F. and Nash, J.P., 2014. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture.* Vol. 234, pp: 1-28.
۱۸. Secer, S.; Tekin, N.; Bozkurt, Y.; Bukan, N. and Akcay, S., 2004. Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout semen. *Israil.* Vol. 56, pp: 274-280.
۱۹. Taghavi Motlagh, S.A., 2010. Population dynamics of sturgeon in the Southern Part of the Caspian Sea. PhD thesis. University of Wales, Swansea, UK. 300 p.
۲۰. Turner, E. and Montgomerie, R., 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in *Arctic charr*. *Journal of Fish Biology.* Vol. 60, pp: 1570-1579.
۲۱. White, I. and Macleod, J., 2010. Composition and physiology of semen. pp: 135-172. In: Hartman, C.G., *Mechanisms Concerned with Conception.* Pergamon Press, London.
- حرکت اسپرماتوزوای آن‌ها نگهداری می‌کند (Cosson و همکاران، ۲۰۱۰). طبق نتایج Morisawa و همکاران (۲۰۱۰) مایع سمینال ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) حاوی ۲ میلی‌مول در لیتر یون کلسیم، ۰/۸ میلی‌مول در لیتر یون منیزیم، ۸۲/۴ میلی‌مول در لیتر یون پتاسیم و ۷۵ میلی‌مول در لیتر یون سدیم بود که در مقایسه با مایع سمینال فیلماهی وحشی و پرورشی دارای مقادیر بیش‌تری از یون پتاسیم می‌باشد، اما میزان یون سدیم، کلسیم و منیزیم در مایع سمینال فیلماهی وحشی و پرورشی از ماهی کپور بیش‌تر می‌باشد. نقش پروتئین در اسپرم ماهیان ناشناخته می‌باشد (Rurangwa و همکاران، ۲۰۱۴). White و Macleod (۲۰۱۰) عنوان کردند که پروتئین نقش حفاظتی دارد. وجود گلوکز در مایع سمینال ماهیان به انرژی زیاد مصرفی بیضه‌ها در طی تولید اسپرماتوزوای مرتبط می‌شود. تحقیق صورت گرفته نشان داد (جدول ۱) که بین میزان گلوکز فیلماهی وحشی و پرورشی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P < 0.05$ ). کلسترول ممکن است اثر محافظتی در برابر تغییرات محیطی (به‌خصوص درجه حرارت) زمانی که حجم اسپرم افزایش می‌یابد، داشته باشد (Rurangwa و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعه انجام‌شده نشان داد که بین میزان کلسترول فیلماهی وحشی و پرورشی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که فیلماهی وحشی نسبت به فیلماهی پرورشی دارای کیفیت و کمیت اسپرم بالاتری هستند ولی از نظر پارامترهای بیوشیمیایی سمن، به‌جز میزان غلظت یون منیزیم که در فیلماهی پرورشی بیش‌تر از فیلماهی وحشی است، سایر پارامترهای بیوشیمیایی در هر دو اختلاف معنی‌داری را با هم نشان نمی‌دهند.

## منابع

- Alavi, S.M.H.; Cosson, J. and Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. *Journal of Fish Biology.* Vol. 22, pp: 400-405.
- Alavi, S.M.H.; Mojazi, A.B.; Cosson, J.; Karami, M.; Pourkazemi, M. and Akhoundzadeh, M.A., 2006. Determination of some seminal plasms indices, sperm density and motility in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences.* Vol. 5, pp: 19-40.
- Barannikova, I.A., 1995. Measures to maintain sturgeon fisheries under conditions of ecosystem change. In: Proc. Intern. S turg. Symp., Vniro Pub. Vol. 12, pp: 124-130.
- Billard, R., 2015. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev.* Vol. 2, pp: 877-920.
- Billard, R.; Cosson, J.; Percec, G. and Linhart, O., 2015. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture.* Vol. 124, pp: 95-112.
- Billard, R., 2015. Biology and Control of Reproduction of Sturgeons in Fish Farm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences.* Vol. 2, pp: 1-20.

