

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (12):1621-1627; 4 December 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

小麦条锈菌Ⅱ类几丁质合成酶基因 *PstChs Ⅱ* 的克隆及表达特征

梁晓飞¹, 刘博¹, 朱琳

(西北农林科技大学植物保护

摘要:【目的】克隆小麦条锈

【方法】利用 RT-PCR 和 PCR
列进行分析,运用实时荧光
基因 (GenBank 登录号 GQ3
Ⅱ蛋白 C 端含有 7 个跨膜
与小麦秆锈菌的 *PgtChs Ⅱ*
门真菌同源序列的相似度
在其他发育阶段表达基本
PstChs Ⅱ 的克隆与表达分析

关键词:小麦条锈菌;几丁
中图分类号:Q814 文商

由小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis*) 引起的小麦条锈病是我国一。小麦条锈菌夏孢子附着孢,附着孢从气孔侵入,间菌丝、吸器母细胞、吸器吸器从活的寄主细胞吸收主后一般 24 h 形成初生吸在在叶肉细胞间扩展,接种小麦叶片中形成肉眼可见的锈斑,侵染后期形成病原菌形成产孢结构,8 d 开始在小麦叶片表明形成零星孢子堆,10 d 后开始产生大量孢子。细胞壁的正常合成与调控对病原菌完成这一复杂的分化过程十分重要。研究表明锈菌细胞壁的结构与成分在不同发育时期并不相同^[1-2],侵染结构细胞壁表面几丁质的去乙酰化修饰还可能是病原菌逃避寄主天然防御反

同发育时期的表达水平。同的生物信息学软件对序表达水平。【结果】*PstChs Ⅱ* 编码 908 个氨基酸。*PstChs Ⅱ* “DXD”等 motifs,蛋白序列蛋白亚家族,与担子菌亚期明显上调(约 10 倍),而在发芽管细胞壁的合成;功能奠定了基础。

胞壁的重要成分,几丁质锈菌维持致病性的重要前菌中几丁质的合成与调控

葡萄糖胺 (GlcNAc) 经 β -1,3- 聚物,在真菌中它与葡聚糖是细胞壁的基本骨架,维持着细胞壁的结构。几丁质是由质膜上的几丁质合成酶 (*chitin synthase*) 以胞质侧的 UDP-N-乙酰葡萄糖为底物合成的^[5]。*Chs* 属多基因家族蛋白,其成员均含有保守的催化结构域和多个跨膜区。目前大致分为 2 个家族 7 个亚家族^[6]。其中家族 1 包括 I、II、III 3 个亚家族,家族 2 包括 IV、V、VI、VII 四个亚家族。与家族 1 成员相比,家族 2 成员除催化结构域外都还含有细胞色素 b5 结构域 (cytochrome

基金项目:国家“973”项目 (2006CB101901); 教育部长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT0558); 教育部科学技术研究重点项目 (107104); 国家自然科学基金资助项目 (30671350); 高等学校学科创新引智计划资助项目 (307049)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87080061; E-mail: Kangzs@nwsuaf.edu.cn

作者简介:梁晓飞 (1986-) 男,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物分子病理学研究。E-mail: xiaofei123@nwsuaf.edu.cn

收稿日期:2009-07-24; 修回日期:2009-08-17

b5-like domain), 而 V、VI、VII 3 个亚家族的成员还含有肌动蛋白头结构域 (myosin-motor head like domain)。酿酒酵母基因组中有 3 个 Chs 基因, 分属 I、II、IV 亚家族。丝状真菌基因组中则通常含有多个 Chs 基因, 不同成员可能参与真菌不同发育阶段几丁质的合成。

除小麦秆锈菌 (*Puccinia graminis*) 和小麦白粉菌 (*Blumeria graminis*) 外, 目前专性寄生菌中的 Chs 还未见报道。本研究克隆到一个小麦条锈菌的 II 类 Chs 基因 *PstChs II*, 利用其在夏孢子、芽管、侵染寄平, 这将为进一步研究该条锈菌致病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

供试条锈菌为条中 3 麦品种为水源 11, 均由西北植物免疫实验室提供。小花盆中, 待其第一叶充分道^[7]进行接种。分别于接和 196 h 剪取接种叶片, 条锈菌夏孢子的萌发和芽道^[8], 萌发时间为 8 h。

1.2 条锈菌基因组 DNA 合成

条锈菌基因组 DNA 的^[9]。采用 Biozol 试剂 (子、芽管以及接种叶片不^[9]cDNA 的合成按照 Invitroq transcriptase 试剂盒操作说 oligo d (T)₈。

1.3 *PstChs II* 的 cDNA 序列与基因组序列的克隆

在本实验室构建的小麦条锈菌夏孢子萌发 cDNA 文库和小麦条锈菌与小麦亲和互作 cDNA 文库中找到两个与小麦秆锈菌 *PgtChs II* 相似度较高的 EST 序列 zyh5158 (GenBank 登录号 ES322019.1) 和 mjb3246 (Genbank 登录号 GR303896)。根据 EST 序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 对引物 P1F/P1B、P2F/P2B、P3F/P3B, 以 196 h 的 cDNA 为模板扩增得到 3 个 PCR 产物, 克隆测序获得基因 *PstChs II* 的 cDNA 全长, 根据获得的 cDNA 序列进一步设计 4 条引物 P2aS、P2aAs、P2bS、P2bAs, 用 P1F/P1B、P2F/

P2aAs、P2aS/P2bAs、P2bS/P2B、P3F/P3B 引物对以条锈菌的基因组 DNA 为模板扩增得到 5 个 PCR 产物, 克隆测序后获得基因 *PstChs II* 的基因组全长。PCR 扩增所用引物见表 1, 引物与 EST 位置见图 1。

表 1 用于 *PstChs II* 基因 PCR 扩增和实时荧光定量 PCR 分析的引物

Table 1 Primers used for *PstChs II* amplification and real-time PCR

Primer	Sequence (5'→3')
P1F	CAACCTCAGCACAAACGAGCGAGCAA
	:AAAAGTTTAGTAG
	CTTTTGGCGATGT
	:ATGACAGCCACT
	ATCTACGGCAGC
	AAGAGTAGAGAATG
	ACTCAACCTGGAG
	ACAAGCACCG
	TCGCTGATATCTT
	:CGACAGTGAAGT
	:AATACGAAGATGC
	TTACCACAT
	:CTACGAG

bi. nlm. nihgov/) 的 ORF erved domain database 等 页测、蛋白相似性比对、基 或预测等分析, 利用 EBI 的 p //www. ebi. ac. uk/Tools/ II 与 *PgtChs II* 基因内含子 ttp //www. ch. embnet. org/ l) 进行蛋白跨膜区预测; w. cbs. dtu. dk/services/ t. ims. u-tokyo. ac. jp/form. 肽与亚细胞定位; 利用 Mega3.0、Dnaman 等软件进行蛋白的多重序列对位和系统进化树构建。蛋白序列分析中构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 序列来源于 broad institute (http //www. broad. mit. edu/), 具体编号为 AnChsC (class I):An4566.3; AnChsA (class II):An7032.3; AnchsB (class III):An4367.3; AnchsD (class IV): An1555.3; AncsmA (class V):An6318.3; AncsmB (class VI):An6317.3; AnChsG (class VII):An1046.3; 其余物种序列来源于 GenBank。

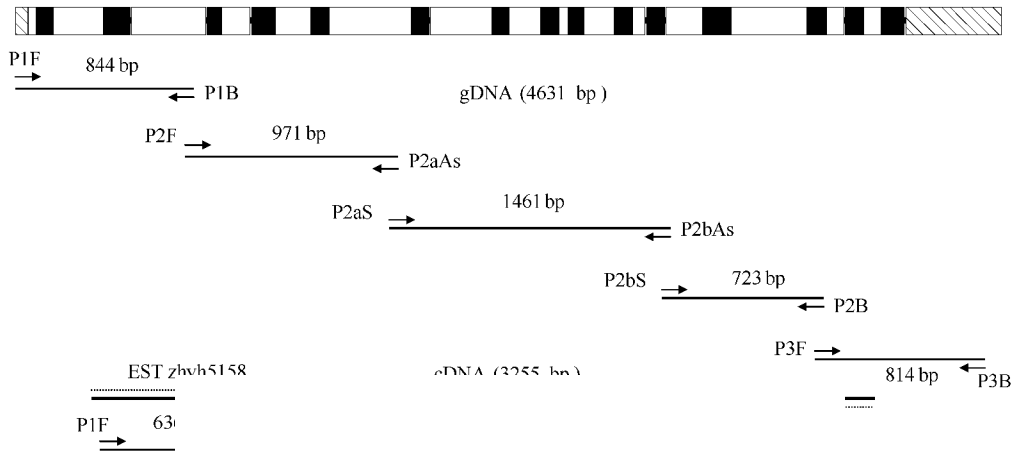


Fig. 1 Schematic representation of *PstChs II* gene structure. Exons and introns are indicated by white and grey boxes, respectively. The exons corresponding PCR products. EST zhvh5158 and EST mjb3246 are shown as horizontal lines with arrows indicating their positions relative to the cDNA.

presented in grey boxes. The exons corresponding PCR products. EST zhvh5158 and EST mjb3246 are shown as horizontal lines with arrows indicating their positions relative to the cDNA.

1.5 *PstChs II* 的实时荧光

选用小麦条锈菌 β -tubulin 为模板进行 *PstChs II* 的实时定量 PCR 分析。反应体系为 20 μ L，其中 cDNA 模板 1 μ L，ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 试剂盒 (Applied Biosystems) 反应液 10 μ L，引物 0.1 μ L，ROX 1 μ L，10 \times TaqMan buffer 2.5 μ L，MgCl₂ 0.2 μ L，引物，补水至总 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min，95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，共 40 个循环。反应结束后分析荧光 PCR 产物电泳确认扩增产物。分析实验数据，确定基因的扩增效率。每个反应点设 3 个重复，在同一个批次内进行。基因的 PCR 反应。

2 结果和分析

2.1 *PstChs II* 基因组 DNA 与 cDNA 的克隆

利用 P1F/P1B、P2F/P2B、P3F/P3B 3 对引物以 196 h 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，分别得到 3 个长度为 844 bp、971 bp、1461 bp 的 PCR 产物，克隆测序获得 3255 bp 的 cDNA 序列。以小麦条锈菌基因组 DNA 为模板，利用 P1F/P1B、P2F/P2aAs、P2aS/P2bAs、P2bS/P2B、P3F/P3B 五对引物分别扩增，获得了长度为 844 bp、971 bp、1461 bp、723 bp、814 bp 的

4631 bp 的基因组序列。基因组序列编码区长 2788 bp 和 15 个内含子，对应 cDNA 62-2788 bp，编码 908 个氨基酸。小麦秆锈菌 (*Puccinia striiformis*) 和小麦籽粒锈菌 (*Puccinia striiformis*) 分别为 94%、68%、66%、

编码区 DNA 的序列比较。基因组 DNA 长 4004 bp，同样包含 15 个内含子，位置与 *PstChs II* 完全一致，长度为 3255 bp，编码 911 个氨基酸。与 *PstChs II* 相比，*PgtChs II* 的 GC 含量分别为 43% 和 38%，*PgtChs II* 分别为 47%、37%。与 *PgtChs II* cDNA 编码序列相比，*PstChs II* 缺少其 376-378 位的 AGG 和 406-408 位的 AAC 氨基酸密码子，从而在对应 *PgtChs II* 蛋白的 126 位和 136 位氨基酸处分别缺失一个精氨酸残基和一个天冬酰胺残基。

PstChs II 与 *PgtChs II* 在外显子区核苷酸序列相似度为 84%，而各个内含子的相似度从 40% 到 62% 不等，平均为 47%。*PstChs II* 内含子长度介于 71 ~ 131 bp 之间，总长度 1390 bp；*PgtChs II* 内含子长度介于 64 ~ 146 bp 之间，总长度为 1271 bp。两个基因 15 个内含子中第 3、5、6、7、8、9、13、15 位的长度差

异在 10 bp 以内,其余 7 个的差异大于 10 bp,其中第 2、4、12、14 位的差异分别为 49 bp、30 bp、28 bp 和 58 bp。

2.3 PstChs II 编码蛋白的序列分析

PstChs II 编码蛋白等电点为 6.95,分子量为 102.62 kDa;蛋白序列不含信号肽,有 7 个跨膜区,定位于细胞质膜上;蛋白在跨膜区前的序列比较保守,含有 Chitin-synthase I N (pfam08407,162-239 位氨基酸)

Chitin_synthase I (pfam01644,240-402 位氨基酸)和 Chitin_synthase C (cd04190,236-557 位氨基酸)等保守结构域,可能与催化活性相关;蛋白还含有多个 Chs 的保守 motifs (图 2),其中“QXRRW” motif (546-550 位氨基酸)存在于所有已知的 Chs 蛋白中,“GXGPL” motif (476-480 位氨基酸)在 II 类 Chs 和大多数 I 类 Chs 中存在,“DXD” motif (385-387 位氨基酸)是 Chs 的重要金属离子结合位点。

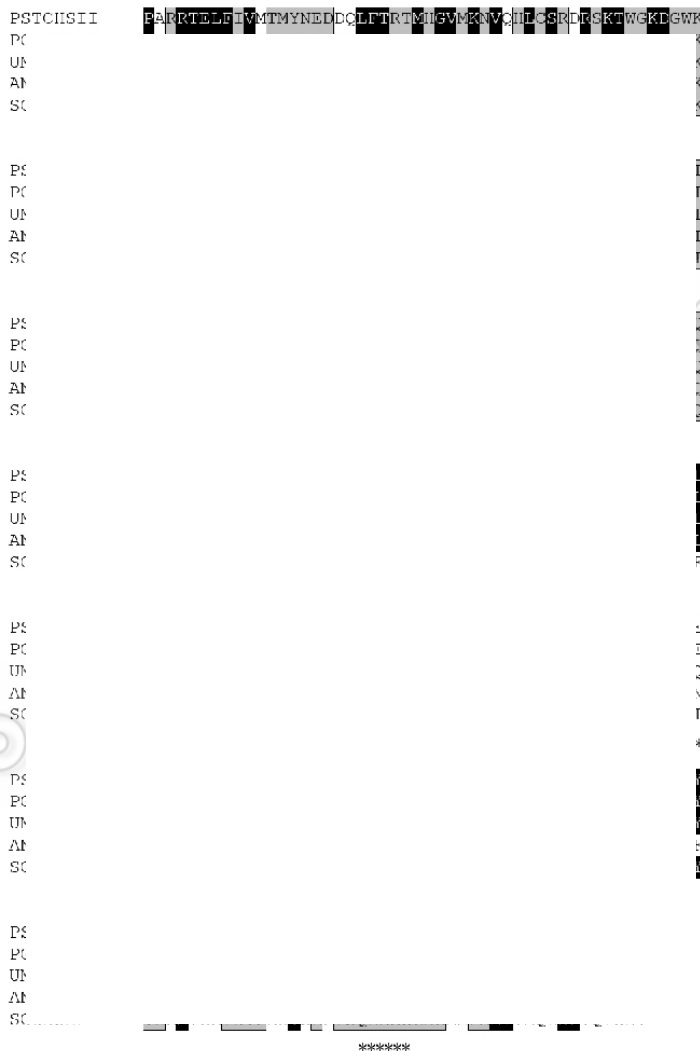


图 2 PstChs II 与其他真菌 Chs II 保守区 (对应 PstChs II 228-571 氨基酸)的氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of PstChs II and other fungal Chs II proteins in the conserved region (amino acids 228-571 in PstChs II). Amino acid residues identical among five proteins are shaded in light grey while residues identical among three or four of the sequences are shaded in black. Identified conserved motifs are marked by asteroids. PGT: *Puccinia graminis* (Genbank: ABB70407.1), UM: *Ustilago maydis* (Swiss-Prot: Q99127.2), AN: *Aspergillus nidulans* (Swiss-Prot: P30584.2), SC: *Saccharomyces cerevisiae* (Genbank: AAA34493.1).

PstChs II 与 *Aspergillus nidulans* 7 个亚家族 Chs 蛋白的序列相似性结果表明: PstChs II 与 class I 和 class II 的 AnChsC 和 AnChsA 相似性最高,相似程度分别为 45% 和 44%,而与 III、IV、V、VI、VII 亚家族蛋白的相似性较低,相似程度分别为 33%、34%、11%、

10%、11%、11%。

为进一步确认 PstChs II 所属蛋白亚家族,选择了 17 个来自担子菌亚门和子囊菌亚门的 I 类和 II 类 Chs 与 PstChs II 进行了蛋白序列对位,并根据蛋白的保守区段 (对应 PstChs II 的 162-573 位氨基酸)

利用邻接法 (neighbor joining method) 构建了系统进化树 (图 3)。系统进化树上, *PstChs II* 与担子菌亚门小麦秆锈菌 (*Puccinia. graminis*) 的 *PgtChs II*、玉米瘤黑粉菌 (*Ustilago. maydis*) 的 *UmChs4*、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 的 *CnChs8* 距离最近, 它们

与其他 II 类 *Chs* 共同构成了一大分支, 而 I 类 *Chs* 则构成了另一分支。这表明 *PstChs II* 属于 II 类 *Chs* 蛋白亚家族。 *PgtChs II*、*UmChs4*、*CnChs8* 均可能是 *PstCh* 的同源蛋白, 它们间的相似性远高于 *PstChs II* 与子囊菌亚门 II 类 *Chs* 的相似性。

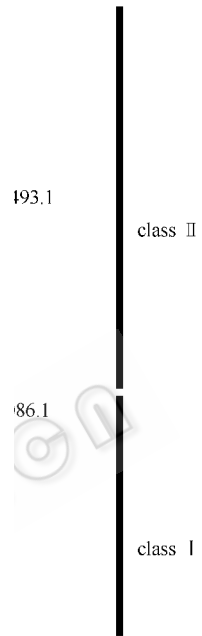
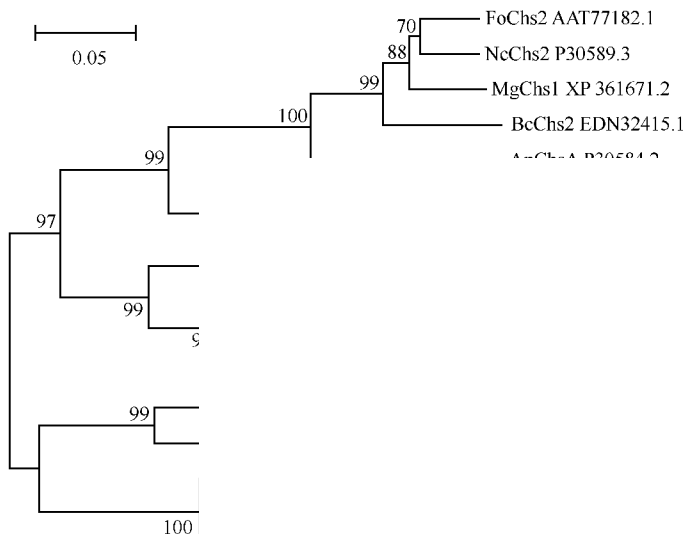


Fig.3 Phylogenetic tree of *PstChs I* bootstrap values are shown at the nod *nidulans* ; *Sc* : *Saccharomyces cerevisi*

bers are shown at the branches and *lc* : *Botrytis cinerea* ; *An* : *Aspergillus* *gt* : *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* .

2.4 *PstChs II* 的表达分析

实时荧光定量 PCR 分 管以及菌丝扩展 (72 hpi ,1 hpi) 等致病过程不同阶段 显示, *PstChs II* 在芽管中明 期表达水平基本恒定。与 量在芽管中高出 10 倍左右 120 h、168 h 下降至 1/3 水

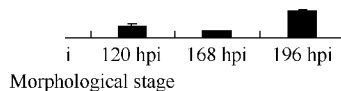


图 4 不同发育时期 *PstChs II* 基因表达水平的实时 荧光定量 PCR 分析

Fig.4 Real-time PCR analysis of the expression of *PstChs II* at different morphological stages. β -tubulin is chosed as the reference gene and SP is used as a calibration for relative quantification. 72 hpi and 120 hpi represent the stage of infection hypha expansion while 168 hpi and 196 hpi correspond to the sporulation process. SP : urediospore ; GT : germ tube ; hpi : hours post inoculation .

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 和 PCR 首次克隆到了一个 小麦条锈菌的 *Chs* 基因。 *PstChs II* 在 N 端含有 II 类 *Chs* 保守的 Chitin synth_1N、Chitin synth_1 和 Chitin synth_C 结构域及 “QXRRW”、“GXGPL”、“DXD”等 motifs, 在 C 端含有 7 个跨膜螺旋区。 *PstChs II* 与 *PgtChs II* 仅相差 2 个氨基酸, 序列相似性达到了 94% , 在系统进化树上与已知的 II 类 *Chs* 同处一大 分支, 表明蛋白属于 II 类 *Chs* 蛋白亚家族。 *PstChs II* 与 *PgtChs II* 两个基因内含子的数目和位置完全

一致, 但核苷酸序列的相似程度仅为 47% , 远低于 外显子区的 84% , 有些内含子的长度差异还十分明 显, 这可能与进化过程中 *Chs II* 内含子外显子所受

选择压力的差别有关。

Chs 作为几丁质合成的关键酶是真菌中普遍存在的一类保守蛋白,对于病原真菌正常的生长分化和侵染寄主十分重要,目前已证明稻瘟菌中^[01]的 *Chs7*、玉米瘤黑粉菌中^[01]的 *Chs5*、*Chs6*、*Chs7*、*Mcs1*、尖镰孢菌中^[02-13]的 *ChsV*、*ChsVb*、灰霉病菌中^[04]的 *Bchs3a* 等都是参与病原菌致病过程的关键基因。

Zhang 等的研究显示, *BgChs1* 和 *BgChs2* 均受分生孢子萌发的诱导,并且 Chs 的底物类似物抑制剂尼可霉素 Z (nikkomycin Z) 和多成附着孢芽管的畸形膨大初生芽管和附着孢芽管的本研究中 *PstChs II* 在夏孢子管延伸时细胞壁几丁质的

对寄主防御反应的逃

利侵染寄主的重要前提^[06]

酶来降解侵染病原菌的细

破坏病原菌细胞结构的完

寡糖激发子而激发寄主的

性寄生菌则可以通过在侵

避开几丁质酶的认识和降

丁质脱酰酶 (Chitin Deacety

生的,由于锈菌中的壳聚糖

菌丝、吸器母细胞等侵染锈

菌中参与壳聚糖形成的后

特异表达^[07]。本研究中

水平明显高于夏孢子、菌

时期的表达水平,可能不是

Chs。Broeker 等报道了小麦

基因:*PgtChs II*、*PgtChs III a*

PgtChs V^[08]。五个基因在

达,*PgtChs III a*、*PgtChs III b*

水平显著高于其他基因,有

可能在壳聚糖合成中比较

重要。Broeker 等认为 *PgtChs III a*、*PgtChs III b*

的非特异表达可能与 mRNA

的预先转录有关。早期研究

表明锈菌在夏孢子成熟过

程中就会转录孢子萌发、

芽管生长、附着孢发育等

过程所需的 mRNA^[09]。

PstChs II 在小麦条锈菌致

病过程中特别是夏孢子

萌发中的作用还有待进一

步研究。由于目前小麦

条锈菌缺乏稳定的遗传转

化体系,直接研究基因的功能

还存在较大的困难。下一

步可以考虑借助玉米瘤

黑粉菌 (*Ustilago. maydis*)

这一转化体系完善的模式

担子菌进行基因的功能验证,目前已有利用小麦

叶锈菌 MAPK 基因 (*Puccinia. triticina*) 成功互补玉米瘤黑粉菌 (*Ustilago. maydis*) 同源基因的报道^[01]。

参考文献

- [1] 康振生,李振岐,庄约兰,等.小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究.真菌学报 (*Acta Mycologica Sinica*),1994,13 (1):52-57.
- [2] 康振生,李振岐,庄约兰,等.小麦条锈菌主要结构中糖基种类的细胞化学定位研究.真菌学报 (*Acta Mycologica Sinica*),1994,13 (1):58-64.
- [3] U,Moerschbacher BM,et al. The role of chitin synthase in the conversion of surface-exposed walls of plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*,2006,28 (8):799-806.
- [4] Prieto JM,Ruiz-Medrano R. The relationships of chitin synthases in *Ustilago maydis*. *MS Yeast Research*,2002,1 (4):103-112.
- [5] 10 常温致病新菌系的发现. *Journal of Northwest Agriculture*,2007,37 (6):487-499.
- [6] 小麦条锈菌 cDNA 文库 (STs) 分析. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica Sinica*),2004,32 (4):33-38.
- [7] 小麦条锈菌基因组 DNA 的构建. *西北农林科技大学学报 (Science Edition)*,2004,32 (4):33-38.
- [8] Saubach D,James L,anke H,et al. The *Magnaporthe grisea* class V II chitin synthase is required for normal appressorial development and function. *Molecular Plant Pathology* 2009,10 (1):81-94.
- [9] Weber I,Eckhard DA,Thines E,et al. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* 2006,18:225-242.
- [10] Madrid MP,Pietro AD,Roncero MI. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defense compounds. *Molecular Microbiology* 2003,47 (1):257-266.

- [13] Martín-Urdiroz M, Roncero MI, González-Reyes JA, et al. ChsVb a class V II chitin synthase involved in septation is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 2008, 7 (1):112–121.
- [14] Soulié MC, Perino C, Piffeteau A, et al. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (8):1310–1321.
- [15] Zhang ZG, Hall A, Perfect M, et al. Differential expression of two *Blumeria graminis* chitin synthase genes. *Molecular Plant Pathology* 2001, 1 (2)
- [16] Heath MC. Signaling between resistant or susceptible host. *Plant Cell* 2006, 18 (7):1713–1720.
- [17] Eckardt NA. Chitin Signaling in the Perception of Fungal Pathogens and Rhizobacterial Symbionts. *The Plant Cell* 2008, 20 (2):241–243.
- [18] Broecker K, Fehser S, Moerschbacher BM. Survey and expression analysis of five new chitin synthase genes in the biotrophic rust fungus *Puccinia graminis*. *Current Genetics*, 2006, 50 (5):293–305.
- [19] Staples RC, App AA, Ricci P. DNA Synthesis and nuclear division during formation of infection structures by bean rust uredospore germlings. *Archives of Microbiology*, 1975, 104 (2):123–127.
- g R, et al. Complementation of mutants by a wheat leaf rust gene; potential for functional analyses. *Plant Microbe Interaction* 2007, 20 (1):1–10.

Cloning and expression analysis of a chitin synthase gene *PstChs II* from the rust fungus *Puccinia striiformis*

Xiaofei Liang¹, Bo Liu¹, Lin Kang^{1,2*}
(¹ College of Plant Protection, Yangling University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: [Objective] To clone and analyze its expression pattern. [Methods] We isolated the gene from *Puccinia striiformis* by using different bioinformatic tools, and analyzed its structure with different bioinformatic tools. [Results] The coding region of *PstChs II* (Genbank accession no. GQ381234) contained 908 amino acids. *PstChs II* showed 7 transmembrane regions and several conserved motifs. It belonged to the class II sub-family of chitin synthase genes in ascomycetes. *PstChs II* expression analysis showed that it might be involved in the cell wall synthesis process.

PstChs II served as a good foundation for further analyzing the role of this gene in the pathogenesis process.

Keywords: *Puccinia striiformis*; chitin synthase; gene clone; expression analysis

PstChs II from the rust fungus *Puccinia striiformis*

Lin Kang^{1,2*}
College of Plant Protection, Yangling University, Yangling, Shaanxi, 712100, China

and to analyze its expression pattern. [Methods] We isolated the sequences with different bioinformatic tools. [Results] The coding region of *PstChs II* contained 908 amino acids. *PstChs II* had 7 transmembrane regions and several conserved motifs. *PstChs II* belonged to the class II sub-family of chitin synthase genes in ascomycetes. *PstChs II* expression analysis showed that it might be involved in the cell wall synthesis process.

PstChs II served as a good foundation for further analyzing the role of this gene in the pathogenesis process.

Keywords: *Puccinia striiformis*; chitin synthase; gene clone; expression analysis

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (2006CB101901), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Ministry of Education of China (IRT0558)), the Key Project of Chinese Ministry of Education (107104), the National Natural Science Foundation of China (30671350), and the 111 Project from the Ministry of Education of China (B07049)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87080061; E-mail: Kangzs@nwsuaf.edu.cn

Received 24 July 2009/Revised 17 August 2009