

## POLIMORFISMO DE ISOENZIMAS EM *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (BURSERACEAE) COMO BASE PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

*Cristiane Gouvêa Fajardo*

Bióloga, Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 37200-000, Lavras-MG.  
E-mail: genegoista@yahoo.com.br

*Fábio de Almeida Vieira*

Biólogo, Professor Adjunto, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, 59072-970, Natal-RN.  
E-mail: vieirafa@yahoo.com.br

*Verlândia de Medeiros Moraes*

Eng<sup>a</sup> Florestal, Doutoranda em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró-RN.  
E-mail: verlandiamorais@yahoo.com.br

*Patrício Borges Maracajá*

Eng. Agrônomo, D. Sc., Professor Associado II, do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande - Campus Pombal – PB. E-mail: patriciomaracaja@gmail.com

*Dulcinéia de Carvalho*

Eng<sup>a</sup> Florestal, Professora Adjunta, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 37200-000, Lavras-MG.  
E-mail: dulce@ufla.br

**RESUMO** - Os marcadores moleculares complementam os métodos tradicionalmente empregados no melhoramento, no manejo e na conservação genética de espécies florestais. Entre os marcadores moleculares, as isoenzimas têm sido utilizadas em estudos que envolvem a caracterização genética de populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos, na identificação de espécies e híbridos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para a extração de isoenzimas e seleção de sistemas enzimáticos a serem utilizados nos estudos de diversidade genética em populações naturais da espécie arbórea *Protium spruceanum*. Compararam-se tampões para a extração das enzimas obtidas de folhas e testou-se 14 sistemas enzimáticos, por meio da técnica de eletroforese. Conclui-se que para os estudos de genética de populações de *P. spruceanum*, utilizando-se marcadores isoenzimáticos, o tampão n° 1 de Alfenas, com algumas modificações, é o ideal para a extração das enzimas de tecido foliar da espécie. Os sistemas enzimáticos ADH, GDH, GLDH, GTDH, MDH, PER, SDH e SKDH apresentaram ótima atividade e resolução das bandas passíveis de interpretação, resultando em dez locos polimórficos e 20 alelos.

**Palavras-chave** - Genética de populações, marcadores moleculares, espécie arbórea.

## POLIMORFISMO DE ISOENZIMAS EN *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (BURSERACEAE) COMO BASE PARA ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

**RESUMEN** - Los marcadores moleculares complementan los métodos tradicionalmente empleados en el mejoramiento, en el manejo y en la conservación genética de especies forestales. Entre los marcadores moleculares, las isoenzimas han sido utilizadas en estudios que envuelven la caracterización genética de poblaciones naturales y cultivadas de diversos organismos vivos, en la identificación de especies y híbridos. El objetivo de este trabajo fue establecer protocolos para la extracción de isoenzimas y selección de sistemas enzimáticos a que sean utilizados en los estudios de diversidad genética en poblaciones naturales de la especie arbórea *Protium spruceanum*. Se compararon tampones para la extracción de las enzimas obtenidas de hojas y se probó 14 sistemas enzimáticos, por medio de la técnica de electroforesis. Se concluye que para los estudios de genética de poblaciones de *P. spruceanum*, utilizándose marcadores isoenzimáticos, el tampón n° 1 de Alfenas, con algunas modificaciones, es el ideal para la extracción de las enzimas de tejido foliar de la especie. Los sistemas enzimáticos ADH, GDH, GLDH, GTDH, MDH, PER, SDH y SKDH presentaron óptima actividad y resolución de las bandas sensibles de interpretación, resultando en diez locos polimórficos y 20 alelos.

**Palabras-clave** - Genética de poblaciones, marcadores moleculares, especie arbórea.

## ISOZYMES POLYMORPHISM IN *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (BURSERACEAE) AS BASE FOR GENETIC DIVERSITY STUDIES

**ABSTRACT** - The use of molecular markers variation has a long tradition in population genetics, and more recent application in forest tree improvement, management and conservation genetics. It is known that the isozymes are reliable markers for population genetics studies, species and hybrids identification, because of the rapidity and low economic cost of electrophoretic methods. The aim of this study was to investigate and to select extraction protocols and enzymatic systems of several individuals of the tree *Protium spruceanum* for genetic diversity studies. Extraction protocols and 14 enzymatic systems were analyzed by using the starch gel electrophoresis technique on plant leaves. Among all extraction protocols and enzymatic systems investigated here, the buffer systems n° 1 of Alfenas and ADH, GDH, GLDH, GTDH, MDH, PER, SDH e SKDH enzymatic systems were the most suitable for identifying *P. spruceanum* isozymes. The eight enzyme systems selected showed ten loci that could be interpreted and 20 alleles.

**Key words:** Population genetics, molecular markers, tree species.

### INTRODUÇÃO

A maioria das espécies arbóreas tropicais apresenta um ciclo vegetativo longo e não existe tecnologia silvicultural que permita o cultivo adequado de árvores para constituir os testes genéticos "clássicos" (procedência e teste de progênes). Por estas razões, torna-se necessário desenvolver estudos na área de genética molecular para conhecer, de uma forma precisa e rápida, a estrutura genética das populações (TORGGLER et al., 1995).

Os marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (FALEIRO, 2007; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Dentre todos marcadores moleculares disponíveis na atualidade, as isoenzimas, pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação aos outros marcadores, têm gerado uma gama enorme de informações práticas na identificação de espécies e híbridos de populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos, além de estimativas da diversidade genética entre e dentro das populações (GONZÁLEZ-VARO et al., 2009; VIEIRA e CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando, cada uma das enzimas (MOSS, 1992). O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese em gel de poliacrilamida e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. A premissa básica adotada ao se utilizar dados isoenzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças em nível de sequências de DNA de alelos que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que essas diferenças possuem base genética e sejam herdáveis (MURPHY et al., 1990).

Para a aplicação da técnica de eletroforese de isoenzimas, é necessário realizar a adequação da

metodologia para a espécie que se pretende estudar. Os ajustes visam escolher o tecido vegetal a ser macerado para obtenção das enzimas, o tampão de extração ideal para preservar as propriedades das enzimas extraídas e os sistemas enzimáticos (ALFENAS et al. 1998; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A adequação de todas estas variáveis metodológicas são imprescindíveis por se conseguir resultados satisfatórios nos procedimentos de eletroforese e interpretação do polimorfismo das isoenzimas, que consistem na boa migração das enzimas através da matriz, atividade e resolução de bandas satisfatórias para a análise dos zimogramas (RIBAS e ALFENAS, 2004).

Assim, este trabalho objetivou estabelecer um protocolo para os sistemas enzimáticos a serem utilizados nos estudos de diversidade genética em populações naturais de *Protium spruceanum*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Espécie alvo do estudo

*Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae), conhecida como breu, almecegueira e amescla, é uma planta arbórea secundária, seletiva higrófila e com síndromes de entomofilia e ornitocoria. A espécie é encontrada na região Amazônica, Estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sendo característica de ambientes ripários (OLIVEIRA-FILHO e RATTER, 1995). A árvore é aromática e produz uma resina oleosa conhecida como breu. A utilização desta resina é amplamente difundida e usada na medicina popular, como analgésico, cicatrizante e expectorante, na indústria de verniz, na calafetagem de embarcações e como perfume (MACHADO et al., 2003). O indivíduo adulto apresenta altura entre 8 e 14 metros, copa arredondada e densa. Floresce durante os meses de setembro e novembro com frutificação entre outubro e março. O fruto é uma baga subglobosa, de superfície lisa e brilhante, de cor vermelha contendo de 1 a 2 sementes

envoltas por um arilo fino e adocicado. A espécie é recomendada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação da vegetação de áreas ciliares degradadas (VIEIRA e CARVALHO, 2008).

#### Amostragem

Para a obtenção dos extratos protéicos e posterior análises eletroforéticas dos sistemas enzimáticos, foram coletadas folhas jovens de *P. spruceanum* de 30 indivíduos adultos, que foram utilizadas para a definição do protocolo de extração das enzimas e visualização do polimorfismo entre indivíduos. Para este estudo foi selecionado um fragmento florestal de aproximadamente 1,0 ha no município de Lavras, região do Alto Rio Grande, sul de Minas Gerais. A amostragem dos indivíduos foi aleatória ao longo do fragmento, de forma a abranger toda a área. Os tecidos foliares coletados foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados e colocados em caixa de isopor com gelo. Ao final da coleta, as folhas foram levadas para o Laboratório de Melhoramento Florestal e Recursos Genéticos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo então armazenadas em freezer a -80 °C, de modo a evitar a degradação das enzimas.

#### Extração das enzimas e eletroforese

Foram pesados 200 mg de tecido foliar de cada indivíduo e macerados com areia lavada autoclavada, adicionando-se PVP-P (Polivinilpolipirrolidona) e 1 mL da solução tampão de extração gelada (ALFENAS et al. 1998). A extração de enzimas foi realizada manualmente para cada amostra mediante o uso de almofariz e pistilos de porcelana mantidos resfriados durante o processo. Após a maceração, as amostras foram transferidas para eppendorfs de 1 mL e armazenadas a -80 °C, até o momento das análises eletroforéticas.

Foi utilizada eletroforese de isoenzimas vertical, conduzida em meio suporte de gel de poli(acrilamida) (concentração - 4%, separação - 12,5%). Para a eletroforese foi utilizada amperagem de 10 mA por gel e 300 Volts, tendo a corrida eletroforética duração aproximada de 3 horas, realizada à temperatura de 4 °C. Os procedimentos de preparo do gel, aplicação das amostras e eletroforese seguiram a metodologia descrita por Alfenas et al. (1998).

Foram realizadas eletroforeses para 14 sistemas de coloração (Tabela 1). As revelações dos géis foram baseadas na metodologia descrita por Alfenas et al. (1998).

Tabela 1. Sistemas enzimáticos testados (14 enzimas) e selecionados (em itálico) para *Protium spruceanum*, com base na resolução de bandas passíveis de interpretação

Sistema enzimático	EC*	Sigla	Resolução	Locos/Alelos
<i>Alcool desidrogenase</i>	<i>1.01.01.01</i>	<i>ADH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>
$\alpha$ -esterase	3.01.01.01	$\alpha$ -EST	Não	-
$\beta$ -esterase	3.01.01.01	$\beta$ -EST	Não	-
Fosfatase ácida	3.01.03.02	ACP	Não	-
Fosfatase alcalina	3.01.03.01	AKP	Não	-
<i><math>\beta</math>-galactose desidrogenase</i>	<i>1.01.01.48</i>	<i>GLDH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>
<i>Glucose desidrogenase</i>	<i>1.01.01.47</i>	<i>GDH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>
<i>Glutamato desidrogenase</i>	<i>1.04.01.03</i>	<i>GTDH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>
Glutamato oxaloacetato trasaminase	2.06.01.01	GOT	Não	-
Leucina aminopeptidase	3.04.11.01	LAP	Não	-
<i>Malato desidrogenase</i>	<i>1.01.01.37</i>	<i>MDH</i>	<i>Sim</i>	<i>2/4</i>
<i>Peroxidase</i>	<i>1.11.01.07</i>	<i>PER</i>	<i>Sim</i>	<i>2/4</i>
<i>Sorbitol desidrogenase</i>	<i>1.01.01.14</i>	<i>SDH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>
<i>Xiquimato desidrogenase</i>	<i>1.01.01.25</i>	<i>SKDH</i>	<i>Sim</i>	<i>1/2</i>

\*EC, Enzyme Commission

Detalhes sobre cada uma das enzimas, bem como as soluções e metodologia para revelação podem ser obtidos em Alfenas et al. (1998). Após o surgimento das bandas, os géis foram retirados da solução de revelação, lavados em água corrente e fixados em solução aquosa de glicerol a 10%, por cerca de 24 horas, a 4 °C. Após este período a glicerina foi substituída por uma solução a 65% de álcool etílico, 30% de água e 5% de glicerina, durante 5 minutos.

A secagem dos géis foi efetuada no secador de gel (modelo 583, BioRad). A leitura das bandas nos géis foi feita sobre a superfície de um diafanoscópio.

A identificação das zonas codificadoras dos locos e dos alelos foi feita a partir da região mais catódica para a mais anódica. Assim, em um sistema enzimático em que duas zonas de atividade eram claramente identificadas, a de maior migração no gel recebeu a denominação de loco-

1 e a outra, loco-2. Da mesma forma, procedeu-se em relação aos alelos de cada loco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os testes das soluções de tampão, descritos em Alfenas et al. (1998), utilizadas na extração das enzimas de tecido foliar, definiu-se a solução extratora que melhor assegurou a integridade das enzimas. Foi selecionado o tampão n° 1 apresentado em Alfenas, et al. (1998) e modificado no presente estudo para a espécie *Protium spruceanum* (Tabela 2).

Tabela 2. Solução utilizada para extração das enzimas de tecido foliar em *Protium spruceanum*

Componente	Quantidade	Molaridade
Fosfato de sódio bibásico	0,6 g	34,0 mM
Sacarose	7,0 g	0,2 mM
PVP-40	2,5 g	2,5%
L-ácido ascórbico	100,0 mg	5,7 mM
DIECA	100,0 mg	5,8 mM
Bissulfito de sódio	50,0 mg	2,6 mM
Borato de sódio (bórax)	50,0 mg	2,5 mM
B-mercaptoetanol	0,2 mL	0,2%
Polietilenoglicol-600	1,0 g	1,0%
Água deionizada (ou destilada)	100,0 mL	

Dos 14 sistemas enzimáticos testados para *Protium spruceanum*, oito foram selecionados em função da resolução do padrão de bandas dos locos: álcool desidrogenase (ADH), glucose desidrogenase (GDH),  $\beta$ -galactose desidrogenase (GLDH), glutamato desidrogenase (GTDH), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PER), sorbitol desidrogenase (SDH) e xiquimato desidrogenase (SKDH) (Tabela 1). Os oito sistemas isoenzimáticos selecionados revelaram 24 zonas de atividade (locos), sendo dez passíveis de interpretação e 20 alelos (Tabela 1). As enzimas ADH, GDH, GLDH, GTDH, SDH e SKDH apresentaram uma zona de atividade interpretável (um loco). As enzimas MDH e PER apresentaram duas zonas interpretáveis (dois locos).

Nos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos Fosfatase ácida (ACP), Fosfatase alcalina (AKP), Glutamato oxaloacetato trasaminase (GOT) e Leucina aminopeptidase (LAP) não houve formação de bandas, ou seja, não foram detectadas enzimas nos géis. Por outro lado, foram verificados alguns borrões nos géis, indicando atividade enzimática, sem resolução das bandas. Nos zimogramas dos sistemas isoenzimáticos  $\alpha$ -esterase ( $\alpha$ -EST) e  $\beta$ -esterase ( $\beta$ -EST) houve formação de bandas, indicando atividade enzimática com resolução, entretanto

para apenas poucos indivíduos da amostra. Segundo Ribas e Alfenas (2004), algumas alternativas para obter melhor resolução seria a variação do volume de tampão de extração utilizado em relação à quantidade de tecido macerado, uso de outros tecidos na obtenção das enzimas e outras variáveis que influenciam a migração e resolução das bandas.

Nesse estudo, os oito sistemas enzimáticos selecionados revelaram dez locos e 20 alelos passíveis de interpretação. Alguns estudos com espécies florestais, utilizando dados de marcadores isoenzimáticos, têm usado a partir de quatro locos polimórficos (TELLES et al., 2003; NG et al., 2004). Entretanto, Berg & Hamrick (1997) sugerem um mínimo de dez locos polimórficos nas análises. Portanto, o presente estudo irá apresentar suficiência na amostragem das frequências alélicas com o uso de dez locos polimórficos.

Alguns padrões isoenzimáticos obtidos para *Protium spruceanum* estão representados na Figura 1. Apenas a enzima PER apresentou bandas cromáticas (cor laranja), as demais acromáticas (cor branca, por exemplo, a enzima GTDH na Figura 1). Todas as enzimas apresentaram locos de expressão compatíveis com o das enzimas monoméricas e segregando dois alelos nos locos.

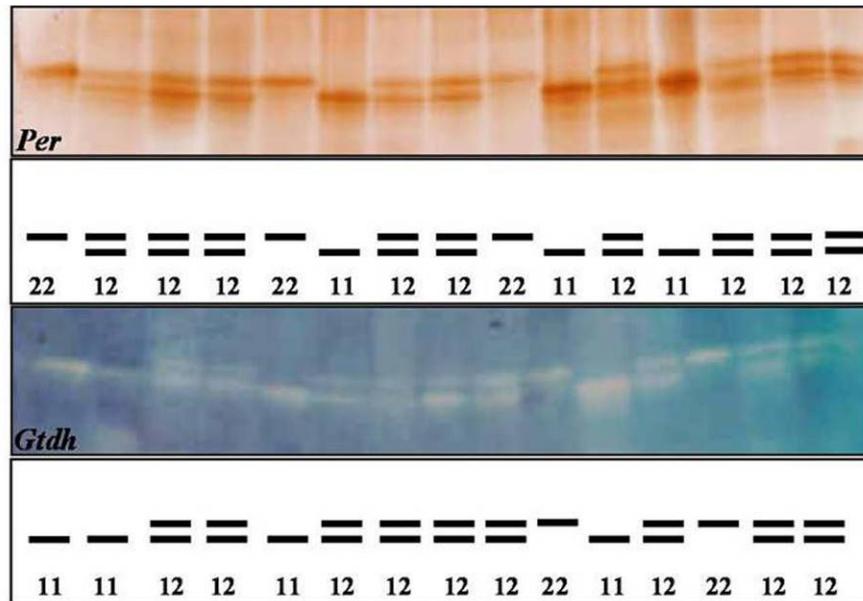


Figura 1. Polimorfismo das enzimas Peroxidase (*Per*) e glutamato desidrogenase (*Gtdh*) juntamente com os zimogramas (ilustrações esquemáticas da designação dos genótipos) para espécie *Protium spruceanum*.

A técnica de isoenzimas apresenta as vantagens de permitir a análise de vários locos simultaneamente e identificar os heterozigotos, a um custo relativamente mais baixo e acessível que o dos marcadores de DNA (ALFENAS et al., 1998). A expressão das isoenzimas é codominante, isto é, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). A partir da leitura dos fenótipos eletroforéticos são estimadas as frequências alélicas e genotípicas, que permitem a avaliação da estrutura genética das populações analisadas, levando a conclusões sobre a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, consequências evolutivas, diferenciação geográfica de populações dentro de espécies, fluxo gênico e taxas de cruzamento (ALFENAS et al., 1998; MOSS, 1992).

Os marcadores isoenzimáticos complementam os métodos tradicionalmente empregados no melhoramento, no manejo e na conservação genética de espécies florestais. Inúmeras investigações com espécies arbóreas nativas têm utilizado esta técnica para estimar os níveis de diversidade genética, o grau de parentesco e a endogamia nas populações naturais (GONZÁLEZ-VARO et al., 2009; VIEIRA e CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Essas informações são de grande aplicabilidade quando se torna necessária a definição de estratégias de conservação dessa variabilidade genética (VIEIRA e CARVALHO, 2008).

## CONCLUSÕES

Para estudos genéticos com a espécie arbórea *Protium spruceanum* utilizando-se marcadores isoenzimáticos o tampão nº 1 descrito em Alfenas, et al. (1998), e modificado no presente trabalho, é o ideal para a extração das enzimas de tecido foliar da espécie. Os sistemas enzimáticos ADH, GDH, GLDH, GTDH, MDH, PER, SDH e SKDH apresentam ótima atividade e resolução das bandas passíveis de interpretação para os estudos de genética de populações da espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo financiamento do projeto (CRA 1770/05). À Dra. Márcia C. O. Moura, pelo auxílio nos procedimentos de eletroforese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, C. A. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, p. 574, 1998.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 102, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.
- GONZÁLEZ-VARO J. P.; ALBALADEJO R. G.; APARICIO A. Mating patterns and spatial distribution of conspecific neighbours in the Mediterranean shrub *Myrtus communis* (Myrtaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 203, p. 207-215, 2009.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 18, n. 4, p. 338-341, July/Aug. 2003.
- MOSS, D. W. **Isoenzymes**. London: Capman & Hall, 1992.
- MURPHY, R. W.; SITES, J. W. Jr.; BUTH, D. G.; HAUFLE, C. H. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: D. M. & MORITZ, C. **Molecular systematics hillis**, (Ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, p. 45-126, 1990.
- NG, K. K. S.; LEE, S. L.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 657-669, Mar. 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of the plant species distributions. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 52, p. 141-194, 1995.
- RIBAS L. A.; ALFENAS A. C. Técnica de extração e eletroforese de isoenzimas de *Anadenanthera peregrina* Speg. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 3, p. 1-5, fev., 2004.
- SILVA, M. S; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Biometria dos frutos e divergência genética em uma população de *Geonoma schottiana* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.1, p. 582-584, 2007.
- SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. VIEIRA, F. A.; NASCIMENTO, L. H.; LIMA, D. C. Estrutura genética e espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. em mata de galeria. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 239-247, jul./set. 2007.
- TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, jan./mar. 2003.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995, p. 186.
- VIEIRA, F.A. & CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 17, p. 2305-2321, 2008.