

ヒノキ採種園におけるアイソザイム 変異およびクローンの同定

清藤 城 宏

Isozyme Variation Identification of the Clone in
a Hinoki (*Cyamaecyparis obtusa*) Seed Orchard

— Kunihiro SEIDO

Summary : The 33 clones making the yamanashi prefectural hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) seed orchard were investigated to estimate genetic variations and identify the clones at isozyme loci. 15 loci in 13 enzyme systems were analyzed in this study. The mean of observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.25 and 0.26 respectively. This value of numbers is more than that of the natural stand in Mt. Fuji. Cluster analysis was made to clarify the relationship of each clone. The clones were classified into 4 groups. They were close genetically. Identification of the clone could identify the 31 clones (94%) at 8 loci (*Amy*, *6Pg-2*, *Got*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Pgm*, *Pgi*, *Mr*) in 7 enzyme systems. Five clones of them had the rare gene, namely Kajikazawa 8 (*Got^r/Got^r*), Nojiri 1 (*Dia-1^r/Dia-1^r*), Agematu 8 (*Pgi^r/Pgi^r*), Nojiri 7 (*Pgm^b/Pgm^b*) and Tokyo 4 (*Amy^b/Amy^b*).

要旨 : 山梨県のヒノキ採種園を構成している33クローンの遺伝変異とクローン同定をアイソザイムテクニックによって明らかにした。13酵素種15遺伝子座により分析した。ヘテロ接合体率は $H_o = 0.25$ 、 H_e は0.26であった。富士山天然林に比較して高かった。クラスター分析により近縁関係の解析をおこなった。4つの遺伝的に近い関係のグループに分ける事が出来た。クローン同定は7酵素種8遺伝子座(*Amy*, *6Pg-2*, *Got*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Pgm*, *Pgi*, *Mr*)により31クローン(94%)の同定が出来た。レアージーンを保持する5クローンが見つかった。すなわち、鵜沢8号(*Got^r/Got^r*)、野尻1号(*Dia-1^r/Dia-1^r*)、上松8号(*Pgi^r/Pgi^r*)、野尻7号(*Pgm^b/Pgm^b*)、東京4号(*Amy^b/Amy^b*)である。

I はじめに

わが国においては昭和30年代に精英樹選抜による育種事業が開始されて以来、精英樹による採種園・採穂園が造成され、現在本格的な優良種苗の量産体制に入ってきている。採種園は人為的に作られた遺伝子プールである。したがって採種園を構成するクローン群の遺伝的多様性は天然林に比較して人為的選択が遺伝的多様性にどう影響を与えるのか興味のあるところである。また、遺伝子型を明らかにすることによりクローンの同定は可能となるか、外部飛来の混入はどの程度か、花粉

飛散を推定するレアージーン(rare gene)があるか、それにより自殖率が把握されるか、次代の遺伝的多様性はどうか変化するのか、また採種園の遺伝的管理をどうおこなうか等、採種園には多くの興味ある遺伝的問題が潜んでいる。アイソザイム技術は、このような採種園の遺伝・育種にまつわる問題に対して答えることが出来る有用な武器である。

今回は12酵素種14遺伝子座をもちいて山梨県の採種園を対象に、構成クローン群の遺伝子型を明らかにし、遺伝的変異、クローン同定について若干の考察をおこなった。

II 材料と方法

山梨県の採種園を構成している精英樹は33クローンである。これらの精英樹クローンについて針葉を成長休止期に採取し、 -40°C で冷凍保存したものを逐次実験に用いた。山梨県の構成クローンは山梨、長野、神奈川、東京、茨城と関東林木育種基本区から広く集められたもので図-1に示したとおりである。冷凍庫からサンプルを取り出し、1サンプルにつき100mg秤量し、それを乳鉢に入れ、液体チッ素を注ぎパウダー状になるまで手早くすりつぶした。さらに1時間前に用意して冷蔵庫に入れておいた抽出液を0.95ml加え、かくはんし、シャーベット状にとけはじめたら1.5mlのマイクロチューブに入れ、水中で冷却状態にして置き、順次20サンプル分同様にして用意した。なお、抽出液は表-1のとおりである。抽出液は、水、1.EXT、2.EXT、3.EXTの順に加え、それにPVPを1.2g加えラップして冷蔵庫に置き、4.EXTは冷凍庫から出し一緒に冷蔵庫に入れ、抽出時に1.0ml加えたものである。

遠心条件は、 0°C 、15,000rpmで15分、遠心後得られた上清だけを新たなマイクロチューブにあげ、さらに30分再遠心し、その上清液を泳動用試料として用いた。

電気泳動は上記試料10 μl を平板ポリアクリルアミド垂直電気泳動法を用いた。ゲルは7.5%分離ゲル、3.75%濃縮ゲルを使用した。

電気泳動は 4°C 、12.3mA/cm²の条件で約150分間おこなった。染色は白石の方法(白石、1987)に従っておこなった。

実験で分析をおこなった酵素種は、パーオキシダーゼ(POD)、アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PG)、ディアフォラーゼ(DIA)、エステラーゼ(EST)、ホスホグルコムターゼ(PGM)、グルコースイソメラーゼ(PGI)、グルコキナーゼ(GK)、メナディオクレダクターゼ(MR)、アミラーゼ(AMY)、ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)、シキミ酸脱水素酵素(SHD)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の13酵素種である。

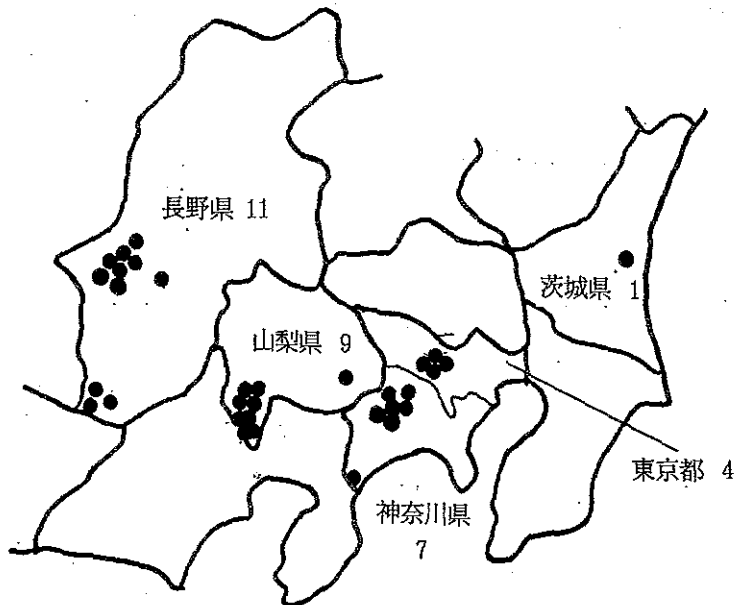


図-1 山梨県の採種園構成クローンの選抜地
The locations of plus-tree selections consisting the seed orchard

表-1 抽出液の調整
Composition of extract solutions

1. EXT : 1M Tris-HCl, pH7.5		
H ₂ O		100 g
Present pH7.5 crystal		16.9 g
Glycerol		12.6 g
2. EXT : 60% Glycerol		
H ₂ O		40 g
Glycerol		75.6 g
3. EXT : 15% Tween80		
H ₂ O		85 g
Tween		15.7 g
4. EXT : 200mM Dithiothreitol		
H ₂ O		10.5 g
Dithiothreitol		30mg

III 結果と考察

1) 採種園の遺伝的変異

採種園の遺伝的変異量について、表-2に示した。ここでは平均ヘテロ接合体の割合を計算した。平均ヘテロ接合体率は、多型的遺伝子座の割合と共に集団の遺伝変異を定量的に表現する尺度である。山梨県の実測値、期待値はそれぞれ0.25、0.26であった。筆者は富士山のヒノキ天然林の遺伝変異について述べた(清藤、1992)。15酵素種17遺伝子座でHo 0.19、He 0.22であった。また、内田ら(Uchida et al., 1991)は10酵素種、13遺伝子座により静岡県3集団を調べ、Ho、Heはそれぞれ0.217、0.227であった。酵素種、遺伝子座の数が異なるので単純に比較は出来ない。そこで富士山のデータ(清藤：1992)を本分析に用いた遺伝子座にあわせて再計算して比較した。結果を表-3に示す。

結果では採種園の構成クローン群のほうがHo、Heとも高い値を示し、天然林よりも遺伝的多様性を内在している結果を示したことになる。2遺伝子座で富士山青木ヶ原のヘテロ接合体率を算出

表-2 山梨県のヒノキ採種園における各遺伝子座のヘテロ接合体率の割合
Estimation of allele frequencies and heterozygosities at each isozyme loci
in the Yamanashi prefectural Hinoki(*Chamaecyparis obtusa*) seed orchard

Locy	Pod	Got	6Pg-1	6Pg-2	Dia-1	Dia-2	Est	Pgm	Pgi	Gk	Mr	Amy	Lap	Shd	Gdh	平均
Clone	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	
Allele	a	.89	.21	1.00	.55	.01	.29	.55	.82	.27	.98	.45	.45	.03	.06	1.00
	b	.11	.79		.45	.99	.71		.18	.73	.02	.55	.15	.97	.94	
	c												.40			
	o						.45									
Homozygote	26	21	33	19	32	18	18	23	17	32	25	14	31	29	33	
Heteozgote	7	12		14	1	15	15	10	16	1	8	19	2	4		
Hetero zygosities	Ho	.21	.36	0	.42	.03	.45	.30	.48	.03	.24	.62	.06	.12	0	<u>.25</u>
	He	.20	.33	0	.50	.03	.49	.30	.40	.03	.49	.58	.07	.11	0	<u>.26</u>

註) Ho : Observed heterozygosity He : Expected heterozygosity

表-3 天然林と採種園の平均ヘテロ接合体率
Average heterozygosity in the natural stand and the seed orchard

population	heterozygosity	
	observed(Ho)	expected(He)
Natural stand	0.21	0.24
orchard	0.25	0.26

したデータ（清藤ら、1987）と白石らのそれと（Shiraisi, 1987）を比較した場合、富士山青木ヶ原は、全国6地域の天然林に比べてヘテロ接合体率は高くなかった。富士山集団の遺伝的変異の狭さと考えられるが、今回の林分は富士山の限られたサイズの集団であるので、採種園構成クローンのほうが選抜母集団が広いので値が大きくなった

とも考えられる。鈴木ら（鈴木ほか、1989）は採種園において著しく低い結果を述べ、その原因として選抜により対象形質以外でも遺伝変異量が減少したこと、また採種園の設計にあたってクローンの選びだすランダム性に問題があったことを指摘している。ただし、このデータであつた遺伝子座は単型的遺伝子座に偏っている点もヘテロ接合体率低く算出した原因と考えられる。白石ら（Shiraisi et al., 1987）は11の人口林で調べ、天然林と比較し、人口林では天然林に比べ著しく低く、人口林の林分間で差がなかったことから、天然林が高い変異量を内在し、人口林の場合は極限られた地域から種苗が全国に供給させていることを指摘している。アカマツの精英樹をしらべた報告では0.35（Na'ien, 1989）と高い遺伝変異を保持している例もあるので、採種園が天然林の消失している分を保持している可能性もある。天然

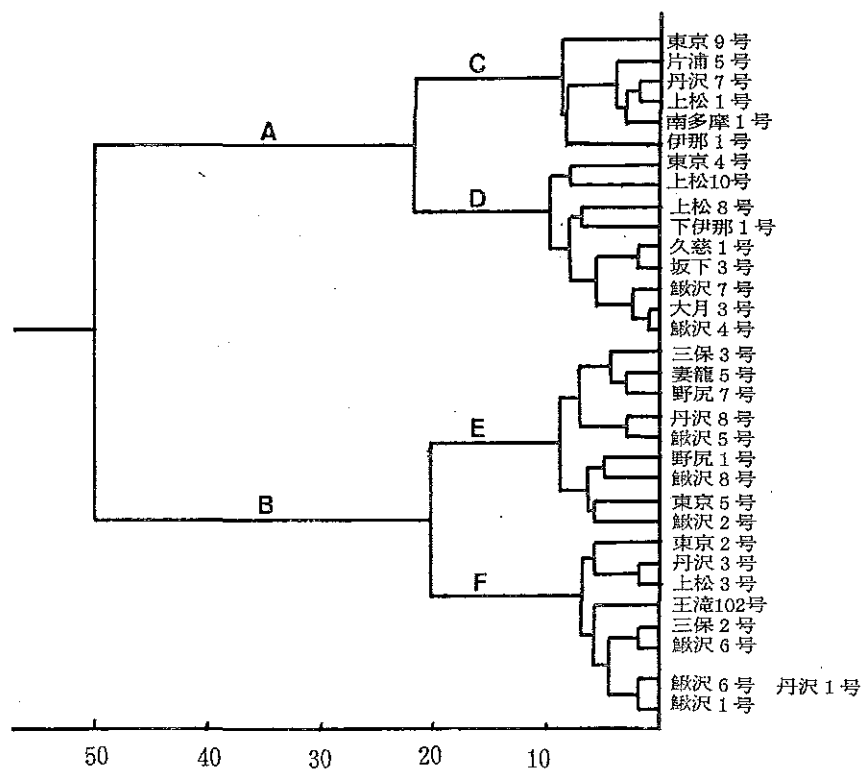


図-2 構成クローンの15遺伝子座による群平均法による樹形図
Dendrogram of consisting plus trees obtained from the cluster analysis (group average method) based on 15 isozyme loci

林の有利性の論議と同時に、こうした人口林の種苗源である精英樹の遺伝的な多様性についても十分に検討する必要がある。

構成クローンの各遺伝子座における遺伝子型を表-4に示す。クローン間の近縁性を群平均法のクラスター分析によっておこなった。非類似度はユークリッド平方距離によった。結果を図-2に示す。距離50の水準でAの15クローン、Bの18ク

ローンの2つに分かれた。さらに20の水準では各グループがさらにC、D、E、Fの2つずつに分かれ、それぞれのグループのクローンは遺伝的に近い関係にあることを示唆している。全国の広い地域から選抜された精英樹クローンならびに各地の天然林をこのようなクラスター分析や数量化三類により解析することによって近縁性の位置づけが明らかにされると考えられる。

表-4 ヒノキ精英樹クローンの各遺伝子座における遺伝子型
Genotype of each plus trees at each loci

No.	Clone	Pod	Got	6Pg-1	6Pg-2	Dia-1	Dia-2	Est	Pgm	Pgi	Gk	Mr	Amy	Lap	Shd	G6p	Gdh
1	鍛沢1号	a/a	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	a/b	a/a	a/b	a/b	b/b	b/b		a/a
2	鍛沢2号	a/a	a/b	a/a	b/b	b/b	a/b	a/a	a/b	b/b	a/a	a/a	c/c	b/b	b/b	a/a	a/a
3	鍛沢3号	a/a	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/b	a/a	b/b	b/b		a/a
4	鍛沢4号	a/a	a/b	a/a	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	a/a	a/c	b/b	b/b	a/b	a/a
5	鍛沢5号	a/a	a/b	a/a	b/b	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b		a/a
6	鍛沢6号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/a	a/a	b/b	b/b	a/b	a/a
7	鍛沢7号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	o/o	a/b	a/b	a/a	a/a	a/c	b/b	b/b	a/a	a/a
8	鍛沢8号	a/b	a/a	a/a	b/b	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	a/a	a/b	a/c	b/b	b/b		a/a
9	大月3号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	a/a	a/c	b/b	b/b	a/b	a/a
10	伊那1号	a/b	b/b	a/a	b/b	b/b	a/a	o/o	a/a	a/b	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	a/b	a/a
11	南多摩1号	a/a	a/b	a/a	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b	a/a	a/a
12	下伊那1号	a/b	a/b	a/a	a/b	b/b	b/b	o/o	a/b	b/b	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	a/b	a/a
13	野尻1号	a/b	a/b	a/a	a/b	a/b	b/b	a/a	a/b	a/b	a/a	a/a	a/c	b/b	b/b	a/b	a/a
14	野尻7号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	b/b	b/b	a/a	a/b	c/c	b/b	b/b		a/a
15	上松1号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b	a/b	a/a
16	上松3号	a/a	b/b	a/a	b/b	b/b	a/b	a/a	a/b	b/b	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b		a/a
17	上松8号	a/b	a/b	a/a	a/b	b/b	b/b	o/o	a/b	a/a	a/a	b/b	a/c	a/b	a/b		a/a
18	上松10号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/a	o/o	a/b	b/b	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b		a/a
19	坂下3号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	a/a	b/b	a/c	b/b	b/b	a/a	a/a
20	久慈1号	a/a	b/b	a/a	b/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	b/b	a/c	b/b	b/b		a/a
21	妻籠5号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	a/b	a/b	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	a/a	a/a
22	丹沢1号	a/a	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/b	a/a	b/b	b/b	b/b	a/a
23	丹沢3号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	a/a	a/b	a/b	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b		a/a
24	丹沢7号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b	a/b	a/a
25	丹沢8号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	a/a
26	東京2号	a/b	b/b	a/a	a/b	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/b	a/b	b/b	a/b		a/a
27	東京4号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	a/a	a/a	b/c	b/b	b/b	a/a	a/a
28	東京5号	a/b	a/b	a/a	a/a	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/a	c/c	b/b	b/b	b/b	a/a
29	片浦5号	a/a	b/b	a/a	a/b	b/b	a/b	o/o	a/b	b/b	a/a	a/b	a/b	b/b	b/b		a/a
30	三保2号	a/a	a/b	a/a	b/b	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/a	a/a	b/b	b/b	b/b	a/a
31	三保3号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/b	a/c	b/b	b/b		a/a
32	王滝102号	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	a/a	a/a	a/b	a/b	b/b	a/b	a/a
33	東京9号	a/a	b/b	a/a	b/b	b/b	b/b	o/o	a/a	b/b	a/a	a/a	a/a	b/b	a/b		a/a

2) 精英樹クローンの同定

各精英樹クローンの表-4の遺伝子型の分析結果をもとに、クローン同定が可能かどうかを明らかにするため、同じ遺伝子型で並べ変えて比較検討した。その結果を表-5に示す。クローンの識別が出来なかったのは飯沢3号と丹沢1号だけで、識別は94%であった。奥泉ら(奥泉ほか、1990)は、6酵素6遺伝子座で栃木県の採種園構成クローンを識別した。この結果では、3クローン(12%)のみの識別であった。変異の少ない遺伝子座では識別能力が低いことを示していた。今回のように変異のある遺伝子座を多くもちいれば、高い確立で識別できることが示唆された。ここでは結局7酵素種・8遺伝子座(*Amy*, *6pg-2*, *Got*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Pgm*, *Pgi*, *Mr*)により31クローンの識別が出来た。識別にデータベースを用いればスピードアップすることが出来る。この場合変異の多い遺伝子座からしばっていけば抽出回数を少なくしてしかも能率的に行う事が出来る。今回の遺伝子型の結果から単独で識別出来るクローンがみつかった。飯沢8号(*Got^a/Got^a*)、野尻1号(*Dia-1^a/Dia-1^a*)、上松8号(*Pgi^a/Pgi^a*)、野尻7号(*Pgm^b/Pgm^b*)、東京4号(*Amy^b/Amy^b*)の5クローンである。こうしたレアージーン(rare gene)は、自殖、花粉の飛散動態の研究等の有効なマーカーとして、今後供試出来ることがわかった。

ご指導賜った森林総合研究所生態遺伝学研究室・北村系子嬢、また、惜しまず御協力くださった山梨県林業技術センター・田中格氏、相沢武夫氏には心からお礼申し上げます。

引用文献

- Na'iem Mohammad, T. Yosihiko, K. Uchida, T. Nakamura and K. Ohba : Inheritance of Isozyme Variants of Megagametophyte of Japanese Red Pine Plus Tree Clones in Eastern Japan, Tsukuba Univ. For. No.5, 49-140, 1989
- 奥泉久人・北村系子・白石 進 : アイソザイムを用いた、スギ、ヒノキの林業用品種の同定、林木の育種特別号'90、16-20、1990
- 白石 進 : アイソザイム分析法—その実験と林木育種への利用—
(1) 林木の育種143、34-38、1987
- Shiraishi, S., Kaminaka, H., and Ohyama, N. : Genetic variation and differentiation recognized at two allozyme loci in hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). J. Jpn. For. Soc. 69 : 88-93, 1987
- 鈴木賢二・奥泉久人・白石 進 : 栃木県におけるヒノキ採種園の構成クローンの遺伝変異、100回日林論297-298、1989
- 清藤城宏・鈴木賢二・白石 進 : 富士山青木ヶ原におけるヒノキ天然林のアイソザイム変異、日林誌69(9)379-361、1987
- 清藤城宏 : ヒノキ針葉におけるアイソザイム変異および天然林のアイソザイム変異、山梨林技報、18、1992

表-5 ヒノキ精英樹クローンの遺伝子型による同定
Identification based on genotype of each plus trees

No	Clone	Pod	Got	6Pg-2	Dia-1	Dia-2	Est	Pgm	Pgi	Mr	Amy	Lap	Shd
1	鯨沢 1号	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	a/b	a/b	a/b	b/b	b/b
3	鯨沢 3号	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	b/b	b/b
22	丹沢 1号	a/a	a/b	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/a	b/b	b/b
2	鯨沢 2号	a/a	a/b	b/b	b/b	a/b	a/a	a/b	b/b	a/a	c/c	b/b	b/b
30	三保 2号	a/a	a/b	b/b	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	b/b
5	鯨沢 5号	a/a	a/b	b/b	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	b/b	c/c	b/b	b/b
11	南多摩 1号	a/a	a/b	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	b/b	b/b	a/b	b/b	b/b
4	鯨沢 4号	a/a	a/b	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	a/c	b/b	b/b
24	丹沢 7号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	b/b	a/b	b/b	b/b
19	坂下 3号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	b/b	a/c	b/b	b/b
7	鯨沢 7号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	o/o	a/b	a/b	a/a	a/c	b/b	b/b
6	鯨沢 6号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	b/b
9	大月 3号	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	a/a	a/c	b/b	b/b
29	片浦 5号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	o/o	a/b	b/b	a/b	a/b	b/b	b/b
23	丹沢 3号	a/a	b/b	a/b	b/b	a/b	a/a	a/b	a/b	b/b	a/b	b/b	b/b
25	丹沢 8号	a/a	b/b	a/b	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b
21	妻籠 5号	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	a/a	a/b	a/b	b/b	c/c	b/b	b/b
14	野尻 7号	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	a/a	b/b	b/b	a/b	c/c	b/b	b/b
27	東京 4号	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	o/o	a/a	a/b	a/a	b/c	b/b	b/b
15	上松 1号	a/a	b/b	a/a	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	b/b	a/b	b/b	b/b
32	王滝102号	a/a	b/b	a/a	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	a/a	a/b	a/b	b/b
31	三保 3号	a/a	b/b	a/a	b/b	a/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/c	b/b	b/b
18	上松 10号	a/a	b/b	a/a	b/b	a/a	o/o	a/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b
33	東京 9号	a/a	b/b	b/b	b/b	b/b	o/o	a/a	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b
20	久慈 1号	a/a	b/b	b/b	b/b	b/b	o/o	a/a	a/b	b/b	a/c	b/b	b/b
16	上松 3号	a/a	b/b	b/b	b/b	a/b	a/a	a/b	b/b	b/b	a/b	b/b	b/b
8	鯨沢 8号	a/b	a/a	b/b	b/b	b/b	a/a	a/a	a/b	a/b	a/c	b/b	b/b
28	東京 5号	a/b	a/b	a/a	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	a/a	c/c	b/b	b/b
17	上松 8号	a/b	a/b	a/b	b/b	b/b	o/o	a/b	a/a	b/b	a/c	a/b	a/b
12	下伊那 1号	a/b	a/b	a/b	b/b	b/b	o/o	a/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b
13	野尻 1号	a/b	a/b	a/b	a/b	b/b	a/a	a/b	a/b	a/a	a/c	b/b	b/b
26	東京 2号	a/b	b/b	a/b	b/b	b/b	a/a	a/a	b/b	a/b	a/b	b/b	a/b
10	伊那 1号	a/b	b/b	b/b	b/b	a/a	o/o	a/a	a/b	b/b	a/a	b/b	a/b