

丝状真菌基因组学研究进展

汪天虹, 钟耀华, 王晓利

山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

[摘要] 介绍了真菌, 尤其是丝状真菌在基因组学 (包括比较基因组学) 和功能基因组学 (包括转录组学、蛋白质组学、代谢物组学) 等研究领域的进展情况。

[关键词] 真菌; 比较基因组学; 转录组学; 蛋白质组学

[中图分类号] Q93

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)11-0048-05

Progress of Studies on Fungal Genomics

WANG Tianhong, ZHONG Yaohua, WANG Xiaoli

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: This paper reviews the recent progress of studies on fungal genomics, especially on filamentous fungal genomics, including comparative genomics, and functional genomics including transcriptomics, proteomics and metabolomics.

Key Words: fungus; comparative genomics; transcriptomics; proteomics

CLC Number: Q93

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)11-0048-05

由于真菌对人类社会生活和经济生活的重要性, 对真菌的研究已有悠久的历史, 其中酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 等一直被作为模式菌株进行研究。近年来, 随着丝状真菌分子遗传学、分子生物学等新理论、新技术, 尤其是基因组学和生物信息学等研究的快速发展, 进一步拓宽了对真菌, 尤其是丝状真菌的研究和利用范畴。

真菌为低等真核生物, 在自然界分布广泛, 已发现的真菌多达 150 万种。丝状真菌 (filamentous fungi) 通常指那些菌丝体比较发达而又不产生大型子实体的真菌, 在自然条件下常引起食物、工农业产品的霉变和植物的真菌病害。真菌被广泛用于各种食物、药物、调味剂、酶制剂、饲料等的生产。某些丝状真菌与农业生产密切相关, 它们能引起农作物疾病, 也能用于对病害进行生物防治。真菌的这种代谢多样性使对其研究充满了挑战性, 同时又具有极高的理论价值和应用潜力。

1 真菌基因组学研究现状

基因组学是指对生物的基因组 DNA 序列, 以及用于获得基因序列的方法进行研究的一门科学。截至目前为止, 在公共数据库中已经对 272 种真核生物全基因组开展了基因组计划 (其中 20 种完成, 80 种正在组装, 172 种正在进行)。在真菌基因组研究中, 第一个取得突破的是 1997 年酿酒酵母基因组测序的完成, 此后酿酒酵母基因组研究一直处于遥遥领先的地位, 并以它作为起点, 不断开发、完善、探索着真菌基因组学的研究方法与技术。粟酒裂殖酵母基因组序列于 2000 年公布。丝状真菌的遗传、形态等较酵母复杂, 遗传体系发展也相对缓慢。尽管如此, 自 2001 年两个重要的模式菌株粗糙脉孢菌 (*N. crassa*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 基因组序列测序完成后, 对其基因组水平的分析也已历时数年。2000 年, 由美国 Whitehead 生物医学研究所发起的真菌基因组行动 (fungal genome initiative), 讨论并确定了对真菌基因组测序的优先次序。2002 年 2 月, 他们发表了第一份关于计划测序的真菌物种的白

收稿日期: 2007-04-23

基金项目: 国家重点基础研究规划项目 (2003CB716006, 2004CB719702), 国家自然科学基金项目 (30470052, 30670029)

作者简介: 汪天虹, 女, 济南市山大南路 27 号山东大学微生物技术国家重点实验室, 教授, 研究方向为微生物遗传与分子生物学;

E-mail: wangtianhong@sdu.edu.cn

皮书。在选定的 15 种真菌中,有 7 种已得到美国国家人类基因组研究中心资助。2003 年 6 月,真菌基因组行动发表了第二份白皮书,列出了 44 种真菌作为测序的目标,强调对其中 10 个相关属的物种,即青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)、组织胞浆菌(*Histoplasma*)、球孢子菌(*Coccidioides*)、镰刀菌(*Fusarium*)、脉孢菌(*Neurospora*)、假丝酵母(*Candida*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)、隐球酵母(*Cryptococcus*)和锈病菌(*Puccinia*)优先进行测序。有关计划的细节可以查阅网址 www.broad.mit.edu/annotation_fungi/fgi/history.html。目前,7 种真菌基因组测序工作已经组装完成,41 种真菌基因组序列正在组装,29 种真菌基因组测序工作正在进行。其中许多为植物和人类致病菌,如白色念珠菌(*Candida albicans*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)等。

2004 年,美国 Duke 大学基因组科学和政策协会(IGSP)及 Basel 大学的遗传学者公布了植物致病霉菌棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)的全基因组序列。该霉菌感染导致棉花和柑橘类致病,使农作物蒙受损失。越来越多的真菌基因组计划的完成,为开展真菌比较基因组学、蛋白质组学、代谢组学等研究创造了条件。例如在细胞生物学中,许多基础研究都依赖酵母菌而进行。通过与霉菌基因组序列的比较,可以清楚地显示 *S. cerevisiae* 基因的演化过程^[1-2]。此外,对感染性微生物基因的理解,可以使研究人员进一步了解致病霉菌的致病机理。

最近,关于真菌基因组的综述文章大多集中在食品工业应用^[3]、病理性^[4-5]、抗真菌药物发现^[6]、揭示与真菌同源的人类基因^[7]以及农业领域真菌基因组学^[8]等研究领域。

2 比较基因组学

比较基因组学(Comparative Genomics)是基于基因组图谱和测序基础上,对已知基因和基因组结构进行比较,从而了解基因的功能、表达机理和物种进化的学科。随着可知基因组数量的不断增加,比较基因组学也可应用于基因鉴别及基因表达的调控元件或同线性区域的研究。

真核微生物基因组的大小从 6 000 个基因(如 *S. cerevisiae*)到 10 000 个基因(如 *Aspergillus* sp.)以上。酵母和丝状真菌在初级代谢方面有很多共同之处。但在次级代谢方面,与酵母相比丝状真菌更显活跃和多样化。因此,在丝状真菌的刺激代谢过程中很可能涉及许多其他基因的存在。因此,通过对酵母、丝状真菌代谢性状和代谢组学的比较研究,会对以前研究较少

的丝状真菌的中心代谢和调节有更详细的了解。由于新化合物往往可以作为生物技术的目标产物,因此真菌次级代谢物即真菌化学多样性的研究,对功能基因组学是重要的。利用代谢物轮廓对酵母和丝状真菌进行鉴定和分类,在此基础上进行功能分析和综合研究,有助于进行有效的数据处理,确定种的核心概念,以及进行智能筛选。比较基因组学研究中的一个非常有效的途径是采用直接融合质谱(direct infusion Mass Spectrometry, diMS)与自动化数据处理相结合,但是要绘制完整的代谢轮廓图常需要几种不同分析技术的结合使用^[9]。

N. crassa 在形态和进化上比 *S. cerevisiae* 更复杂。Braun 等^[10]将 *S. cerevisiae* 与 *N. crassa* 进行了全基因组范围的比较,通过对 GenBank 蛋白数据库的比较,发现 *N. crassa* 比 *S. cerevisiae* 具有更多的孤儿基因(“orphan” genes);认为 *N. crassa* 形态上的复杂性反映了新基因的获得或者保存,这也与有更大的基因组相对应;发现部分 *N. crassa* 基因在其他生物中存在同源物,而在 *S. cerevisiae* 中未发现同源基因的存在,原因可能是 *S. cerevisiae* 缺失了相应的基因。令人惊奇的是, *S. cerevisiae* 丢失的部分基因的功能与基本的细胞过程有关,例如涉及到转译和离子(特别是钙离子)平衡。Braun 等还发现, *N. crassa* 的一些基因在 GenBank 中的非真菌生物中不存在,推断这些基因产物可能是真菌所特有的蛋白质。

Yoder 等^[4]比较了 *S. cerevisiae*、4 种丝状真菌与其他各种模式生物基因组的大小。较之大多数真核生物,真菌的基因组基因密度高、重复序列少,这些特点使真菌基因组实用而有效。

基因组的比较可用来有效地说明真菌的生活方式,如对繁殖方式的选择。例如,传统上认为白色念珠菌(*C. albicans*)缺乏有性循环,但最近发现 *C. albicans* 具有与 *S. cerevisiae* 交配基因同源的序列,能够起始交配过程,但不能完成。如果构建对应的交配型菌株与之结合,则可以进行有性发育^[11]。用 500 个已知的酵母交配必需基因序列对 *C. albicans* 基因组数据库进行搜索,发现与激素应答有关的基因在 *C. albicans* 中都存在,只是某些减数分裂必需基因丢失了,这也许能够解释 *C. albicans* 进行无性繁殖的原因^[4]。

比较基因组学可以促进以下领域的研究:系统发生学(通过基因组比较)、靶药物研究(通过害虫的特异靶位点)、鉴别基因(通过保守序列),以及通过质疑了解相关基因的功能。例如,通过比较宿主与病原菌或病原菌与类似病原菌却无病原活性的生物的基因组,就可以得知抗菌活性的靶位点。探索和鉴定新的抗真菌剂特异位点可用来进行药物设计。通过搜索与寄生或病原活性相关的重要的基因家族,以及比较在其他生物中存在的这些基因,就可以鉴定化学抑制的特异位点。

许多研究者已将这一点作为比较基因组学的重点^[12]。表征药理靶向的一个更为综合的方法,可能涉及到对潜在靶位点进化分析的系统发生学。Firon 和 d'Enfert^[6]综述了一些识别人类病原真菌的关键基因的方法,如转座子突变和转录后基因沉默。他们主张对病原真菌生长的关键基因的特征进行研究,认为这既是开发新的抗菌药物的重要步骤,也是研究真菌生物多样性的关键环节。

3 功能基因组学

功能基因组学的最终目的是确定基因组中每一个基因的功能。确定基因功能的传统方法是对突变株进行筛选,这种方法对真菌来说是有效的。近年来,已经构建了对 *S. cerevisiae* 每个开放阅读框架逐个进行基因敲除的突变株。*C. albicans* 由于不能进行有性繁殖和具有二倍染色体性质,以及缺乏有效的随机插入突变方法等原因,致使对其基因功能的鉴别困难。De Backer 等^[13]进一步发展了以反义抑制为基础的功能基因组学研究方法,采用人为基因抑制的方法鉴别对病原菌生长重要的基因产物。功能基因组学极大地促进了食品、医药、工业、致病等相关真菌的研究。功能基因组学研究可以帮助人类解决诸如工业真菌大规模发酵条件的优化,或从整体角度研究真菌毒素等问题。

功能基因组学可以进一步分为 3 个领域:转录组、蛋白质组和代谢物组。这 3 个领域是利用高通量研究方法在细胞内不同层面上进行研究探索。3 个组之间关系紧密,又相互影响。例如,遗传修饰可以在转录组水平对基因表达产生全局性影响,也可以在转录组水平鉴别进行遗传操作的新目标;在蛋白质组水平可以研究大量蛋白质的分泌机制,对异源蛋白表达的应答反应,蛋白质的翻译后修饰和蛋白质之间的相互作用;代谢物组研究可以鉴别新的有用的代谢产物,了解代谢物的流向和途径等。最终,可以通过改变遗传型和/或环境促进生物过程。

转录组学分析的常用方法有寡核苷酸阵列、cDNA 阵列、EST(Expressed Sequence Tag, EST)分析、基因表达的系列分析和差异显示等。蛋白质组学分析常用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳、质谱分析、同位素亲和标签(isotope-coded affinity tags)等技术;而代谢物组学分析常用气相色谱-质谱联用、液相色谱-质谱联用,以及核磁共振波谱测定技术等。

细胞内的代谢网络繁杂,若要探讨细胞中所有组分之间的相互作用和相互影响,如在代谢流中存在的高度反馈效应或研究不同途径之间复杂的信号传导,分析其转录组、蛋白质组和代谢物组是非常重要的。整合分析这些结果非常耗费时间和精力,因此新兴的生物信息学作为一种工具在研究功能基因组学过程中是

必须的。如 Jensen 等人近期拟合了新的公式来预测蛋白质的功能^[14]。

3.1 转录组分析

整个转录组的分析依赖于完整的基因组序列的可用性,*S. cerevisiae* 在此领域已有良好的开端。这些方面的进展已有综述^[15]。其他真菌随着基因组测序的完成,相应转录组的分析也在进行。如 Mata 等^[16]人利用 DNA 微阵列研究了裂殖酵母 *S. pombe* 减数分裂和孢子形成中 99% 以上基因的表达模式。他们发现 2 个 Atf(aflatoxin, 黄曲霉毒素) 样的转录激活因子对晚期基因表达和孢子形成很重要,并且鉴别了几十个可能的 Atf 目标基因。

还有一些方法可以用于不需要明了整个基因组序列的情况下研究大部分转录组。近几年,已有多个 EST 计划正在进行。美国生物技术信息国家中心 EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) 已包含 123 533 个真菌的 EST 序列,但尚未覆盖所有的 EST 计划。EST 序列计划的应用已有综述文章发表^[17],主要集中在植物致病真菌。大量的 EST 序列计划提供了很多有价值的信息。Chamberg 等^[18]在对纤维素酶生产菌株瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)的研究中,把获得的 *T. reesei* EST 序列采用微阵列进行分析,阐明了既可好氧也可厌氧生长的微生物 *S. cerevisiae* 与好氧生长的降解纤维素微生物 *T. reesei* 之间最根本的区别。通过 EST 和 cDNA 微阵列分析,发现 *T. reesei* 编码三羧酸循环酶和电子传递链蛋白的基因是以有利于丙酮酸经三羧酸循环氧化,而不是经发酵还原为乙醇的方式进行程序性表达的。此外,研究结果显示,乙醛可被转化为乙酸而不是乙醇,这样就阻止了进行厌氧代谢所必须的 NAD⁽⁺⁾ 的再生。研究还指出,葡萄糖控制的调节机制很可能是进化压力的目标,引导代谢物流进行的是呼吸代谢而不是发酵。这一发现对于开展纤维素降解微生物转化纤维素生物质为燃料的代谢工程具有重要的启迪意义。在此研究中,第一次应用了典型的功能基因组工具,解释了 *S. cerevisiae* 与其他普通工业应用真菌的基本区别,以及这两种微生物整体基因调控的差别。

最近的研究表明,微阵列技术正逐渐成为研究 *S. cerevisiae* 之外其他真菌基因表达的一种普遍性方法。例如,在丝状真菌中存在多种几丁质合成酶,对几丁质合成酶结构和功能分析结果认为,几丁质合成酶的多样性与丝状真菌形态的多样性有关。Chigira 等^[19]用 2 070 条序列的 cDNA 点阵列阐释了来自 *A. oryzae* 中 5 个几丁质合成酶基因 *chsZ*, *chsY*, *chsA*, *chsB* 和 *chsC* 的表达模式,显示了 cDNA 阵列这种新技术在丝状真菌研究中的应用潜力。例如丝状真菌大规模培养中,某些特定的形态学特征与黏度、搅拌和物质传递等问题有关,而这些参数反过来又影响产率。因此,对决定形态的基因转录调节的了解,有助于发展一些用于

优化液体发酵状态下真菌形态的策略。微阵列技术等高通量研究方法对于探索这些复杂的相互作用是非常适合的。

采用 cDNA 微阵列和表达序列标签技术, Maeda H 等^[20]对米曲霉 (*A. oryzae*) 能量代谢和水解酶相关基因进行了转录分析。研究结果显示, 糖解途径 (EMP) 和三羧酸循环 (TCA) 的大多数代谢基因在葡萄糖丰富和葡萄糖匮乏两种条件下都以高水平转录, 但在所选用的 3 种培养基中, 麦麸培养物水解酶类基因表达水平最高, 同时糖解途径和三羧酸循环相关基因表达水平最低。因此认为在麦麸培养基上代谢基因的低水平表达可能减弱了葡萄糖阻遏, 结果导致水解酶类的高表达。

3.2 蛋白质组分析

蛋白质组学研究方法包括同位素标记亲和标签 (isotope-coded affinity tagging)、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 2-D PAGE) 和质谱测定的结合应用、蛋白质阵列, 以及其他研究蛋白质相互作用的方法如双杂交体系等相关技术。所有这些技术都已应用于模式微生物 *S. cerevisiae*。2-D PAGE 与质谱测定相结合的方法, 也已用于其他真菌, 工作重点主要集中于人类致病菌, 如 *A. fumigatus* 和 *C. albicans*。

Lim^[21]报道了产纤维素酶的真菌 *T. teesei* 在纤维素酶诱导培养基和纤维素酶抑制培养基中产细胞壁结合蛋白的情况, 发现了一种数据库中原来的新的丝状真菌细胞壁主要蛋白。蛋白质组学的方法也用于分析链球菌所产刀球朊毒素 A 对 *A. nidulans* 生产蛋白质的影响。结果发现, 与普通代谢途径相关的甘油醛脱氢酶, 以及与性分化起始相关的 CpcB 蛋白被下调, 而两种以前未被报道过的蛋白质被上调, 一种是与假丝酵母中镉诱导同源的蛋白质, 另一种是与土曲霉 (*A. terreus*) 烯酰基转移酶 LovC (LovC 与次级代谢产物洛伐他汀生物合成有关) 同源的蛋白质^[22]。

3.3 代谢物组分析

代谢物组学是应用高通量的方法分析尽可能多的代谢产物。就真菌而言, 此领域研究尚处于婴儿时期, 即使对 *S. cerevisiae* 也仅有少量研究论文发表。尽管如此, 把代谢物组学引入真菌研究领域的第一篇文献说明了此研究方法的威力, 用代谢物组学的数据阐明了沉默突变表现型^[23]。由于代谢物组代表了一个活细胞信息流中整体的数据, 因此分析代谢物组通常难以直接确定基因功能。不过, 最近一个结合计算机虚拟筛选 (*in silico*) 途径分析代谢物组的新型工程正在展开, 以期有助于解决这个复杂的难题^[24]。

4 结论与展望

真菌种类繁多、分布广泛, 甚至在某些海洋环境和极端环境下也有真菌存在。对真菌基因组学的了解和应用, 有助于人们理解不同生境下真菌的生理特性、形

态差异、进化和代谢多样性。进行整个基因组范围内的比对, 在功能基因组学水平进行深入研究, 有助于发掘未知功能的独特基因, 了解复杂行为形成的机理, 推动重大的研究领域例如繁殖方式的选择、顶端生长、感光作用、基因沉默、孢子生成、致病机制、宿主-真菌相互作用等的发展。在基因组水平上对传统难题进行新的综合性全面解读, 是当代微生物遗传学与分子生物学研究中极具挑战性的问题。迅速发展的高通量方法应用于真菌基因组学研究, 将大大推动此研究领域的快速进展。

参考文献 (References)

- [1] THOMSON N, SEBAIHIA M, CERDENO-TARRAGA A, *et al.* The value of comparison [J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(1):11-2.
- [2] DIETRICH F S, VOEGELI S, BRACHAT S, *et al.* The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome [J]. Science, 2004, 304:304-307.
- [3] HOFMANN G, MCINTYRE M, NIELSEN J. Fungal genomics beyond *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14(2):226-231.
- [4] YODER O C, TURGEON B G. Fungal genomics and pathogenicity [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4 (4): 315-321.
- [5] BOS J I B, ARMSTRONG M, WHISSON S C, *et al.* Intraspecific comparative genomics to identify avirulence genes from *Phytophthora* [J]. New Phytol, 2003, 159: 63-72.
- [6] FIRON A, D'ENFERT C. Identifying essential genes in fungal pathogens of humans [J]. Trends Microbiol, 2002, 10: 456-462.
- [7] ZENG Q, MORALES A J, COTTAREL G. Fungi and humans: closer than you think[J]. Trends Genet, 2001, 17: 682-684.
- [8] YARDEN O, EBBOLE D J, FREEMAN S, *et al.* Fungal biology and agriculture: revisiting the field [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2003, 16: 859-866.
- [9] SMEDSGAARD J, NIELSEN J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics[J]. J Exp Bot, 2005, 56(410): 273-86.
- [10] BRAUN E L, HALPERN A L, NELSON M A, *et al.* Large-scale comparison of fungal sequence information: mechanisms of innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genome Res, 2000, 10(4): 416-30.
- [11] MAGEE B B, MAGEE P T. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains[J]. Science, 2000, 289:310-313.
- [12] KESSLER M M, WILLINS D A, ZENG Q, *et al.* The use of direct cDNA selection to rapidly and effectively identify genes in the fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Fungal Genet Biol, 2002, 36: 59-70.
- [13] De BACKER M D, NELISSEN B, LOGGHE M, *et al.* An antisense-based functional genomics approach for

- identification of genes critical for growth of *Candida albicans*[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(3): 235-41.
- [14] JENSEN L J, GUPTA R, BLOM N, *et al.* Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features [J]. J Mol Biol, 2002, 319: 1257-1265.
- [15] HORAK C E, SNYDER M. Global analysis of gene expression in yeast[J]. Funct Integr Genomics, 2002, 2: 171-180.
- [16] MATA J, LYNE R, BURNS G, *et al.* The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast [J]. Nat Genet, 2002, 32: 143-147.
- [17] SKINNER W, KEON J, HARGREAVES J. Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences[J]. Curr Opin Microbiol, 2001, 4: 381-386.
- [18] CHAMBERGO F S, BONACCORSI E D, FERREIRA A J, *et al.* Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using Expressed Sequence Tag (EST) analysis and cDNA microarray[J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 13983-13988.
- [19] CHIGIRA Y, ABE K, GOMI K, *et al.* *chsZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*[J]. Curr Genet, 2002, 41(4): 261-267.
- [20] LIM D, HAINS P, WALSH B, *et al.* Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach[J]. Proteomics, 2001, 1: 899-909.
- [21] MAEDA H, SANO M, MARUYAMA Y, *et al.* Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65(1): 74-83.
- [22] MELIN P, SCHNURER J, WAGNER E G. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic *concanamycin A*, produced by *Streptomyces species*[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 267: 695-702.
- [23] RAAMSDONK L M, TEUSINK B, BROADHURST D, *et al.* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 45-50.
- [24] FORSTER J, GOMBERT A K, NIELSEN J. A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 79: 703-712.

(责任编辑 王 芷)

·科技智力游戏·

如果将本栏目正确答案连同期刊所附调查表寄至本刊编辑部,您将有可能会获得自下期至2008年底的《科技导报》一套。

轻松一刻——九宫填数

该游戏的填数规则为:①在9×9的大九宫格内,出题者已给出若干数字,其他宫位的数字空留,需要读者根据逻辑推理填写剩下空格里的数字;②填满数字的大九宫里,数字之间的关系必须满足:每一行与每一列都有1~9的数字,每个实线所标3×3的小九宫格里也有1~9的数字,且每个数字在每行、每列及每个小九宫格里只能出现一次,即既不能重复也不能缺少;同时在9×9大九宫格的两条对角线上,均有1~9的数字,且只能出现一次。答案请见下期。

(供稿 李建才 责任编辑 赵佳)

九宫1 难度系数 ◆◆◆◆◇◇

5	7	4	6	2	3	9	8	1
2	1	9	8	5	4	7	6	3
3	6	8	1	7	9	5	4	2
4	3	5	2	1	8	6	7	9
6	9	1	7	3	5	8	2	4
7	8	2	4	9	6	3	1	5
1	5	7	9	6	2	4	3	8
8	2	3	5	4	7	1	9	6
9	4	6	3	8	1	2	5	7

上期答案

3	6	5	8	1	4	7	9	2
1	8	9	7	2	3	5	6	4
2	7	4	9	5	6	3	8	1
8	1	3	6	4	5	9	2	7
4	9	6	3	7	2	1	5	8
5	2	7	1	8	9	4	3	6
6	5	8	4	3	1	2	7	9
7	4	2	5	9	8	6	1	3
9	3	1	2	6	7	8	4	5

九宫1 难度系数 ◆◆◆◆◇◇

5	8	9	6
3	4	9	7
2	4		
4			5
6			9
7		9	
2	5	1	8
6	3	5	2

九宫2 难度系数 ◆◆◆◆◇◇

1	5	7	9
6	4	2	3
9			7
4	5		7
7	8		6
6			5
1	8	5	9
9	7	1	6