

Desenvolvimento vegetativo das colônias em *Aspergillus nidulans* é controlado por genes regulados por metilação

Vegetative development of colonies in *Aspergillus nidulans* is regulated by methylated genes

Fabio dos Santos Barros¹ , Izabel Aparecida Soares² , Gisele Arruda³ 
Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha⁴ 

Grandes avanços têm sido alcançados no conhecimento dos mecanismos genéticos de controle dos processos de desenvolvimento dos mais variados organismos. Nas últimas décadas, uma nova abordagem tem sido tomada para o estudo do controle da expressão gênica no contexto da Epigenética. Este trabalho avaliou a presença de genes regulados por metilação no controle do ciclo vegetativo e da morfologia da colônia em *Aspergillus nidulans*. Conídios de 5 dias foram inoculados em placas com meio mínimo suplementado e meio mínimo suplementado com adição de 5-azacitidina. Para análise do ciclo vegetativo foram feitas medidas diárias do diâmetro das colônias e observou-se a morfologia das colônias, a coloração de conídios e a coloração do reverso das placas. Em presença do desmetilante, as colônias apresentaram muitos setores com excesso de melanina e diminuição da quantidade de conidióforos. Foi possível observar que em *A. nidulans* existem genes para o desenvolvimento vegetativo que podem ser regulados por metilação, como os genes para produção e secreção de melanina. Também foram observados genes que são metilados ocasionalmente e de forma transitória, como os genes para coloração de conídios.

Palavras-chave: Desenvolvimento vegetativo. Produção de melanina. Coloração de conídios. 5-azacitidina. Epigenética.

Great advances have been made in understanding the genetic mechanisms that control developmental processes in a wide variety of organisms. In recent decades, a new approach has been taken to the study of gene expression control in the context of Epigenetics. This work evaluated the presence of methylation-regulated genes involved in the control of the vegetative cycle and colony morphology in *Aspergillus nidulans*. Five-day-old conidia were inoculated onto plates containing supplemented minimal medium and supplemented minimal medium with the addition of 5-azacytidine. For analysis of the vegetative cycle, daily measurements of colony diameter were performed, and observations were made regarding colony morphology, conidial coloration, and the reverse coloration of the plates. In the presence of the demethylating agent, the colonies exhibited many sectors with excess melanin and a reduction in the number of conidiophores. It was possible to observe that in *A. nidulans* there are genes related to vegetative development that can be regulated by methylation, such as those involved in the production and secretion of melanin. Genes that are occasionally and transiently methylated were also observed, such as those controlling conidial coloration.

Keywords: Vegetative growth. Melanin production. Conidia color. 5-azacytidine. Epigenetics.

Autor Correspondente:

Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha

E-mail:

clmscrocha@gmail.com

Endereço: Rua Clementina Basseto, 412 apto 23. CEP 87030-110 - Maringá – PR.

Declaração de Interesses: Os autores certificam que não possuem implicação comercial ou associativa que represente conflito de interesses em relação ao manuscrito.

¹ Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Doutorado - MS.

² Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza - PR.

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, Campus Francisco Beltrão - PR.

⁴ Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá – PR.

INTRODUÇÃO

A. nidulans é um fungo filamentosso homotático, geralmente haploide, com oito cromossomos (1). Seu ciclo de vida compreende três fases: ciclo vegetativo, ciclo assexuado ou conidiogênese, ciclo sexual ou ascosporigênese (2).

Em condições normais, primeiramente ocorre o desenvolvimento vegetativo, 12 horas após ocorre o início da conidiogênese para formação dos conidióforos e conídios, e mais tardiamente, o ciclo sexual, com a formação do cleistotécio e ascósporos (3,4).

O ciclo vegetativo em geral ocorre a partir da germinação de esporos (conídios e ascósporos). O tubo germinativo apresenta crescimento apical, com mitose dos núcleos mais próximos da ponta e periodicamente formação de septos e ramificações, originando as hifas (5). Em meio sólido, estas hifas crescem e ramificam-se de forma subapical, originando uma colônia com crescimento radial (2,6,7).

O desenvolvimento vegetativo ocorre durante todo o ciclo de vida da colônia. Ele é coordenado por grande número de genes que controlam processos como: a absorção de nutrientes e água do meio; a multiplicação dos núcleos por mitoses; as vias biossintéticas; a construção de parede e de septos; e a resposta a fatores ambientais como osmolaridade, disponibilidade de nutrientes, água e oxigênio; variação de temperatura e presença de inibidores químicos e biológicos. O crescimento das hifas também é controlado por um sofisticado mecanismo de regulação que estabelece relação do ciclo vegetativo com a conidiogênese e com o ciclo sexual (8).

A regulação epigenética do silenciamento de genes é um importante mecanismo para controle da transcrição sendo mediada, pelo menos em parte, pela estrutura local da cromatina e proteínas associadas. A regulação da modificação da cromatina é feita particularmente por meio de processos como metilação, ubiquitinação, acetilação e fosforilação, podendo afetar profundamente a expressão gênica (9).

Em procariontes a função da metilação é bem compreendida, sendo integrante do sistema que protege o organismo de DNAs exógenos (10).

Nos promotores dos genes de eucariotes existem sítios específicos de metilação denominados de ilhas CpG. No entanto, em eucariotes, apenas uma fração das regiões CpGs encontram-se metiladas (11).

Em plantas, o processo de metilação também está envolvido em diversos mecanismos regulatórios, como o correto balanceamento de ploidia e o silenciamento de sequências repetidas de DNA, assim como possui um importante papel no desenvolvimento do endosperma em plantas superiores (12,13).

Os fungos representam um grupo heterogêneo no que diz respeito à modificação do DNA por metilação. Os níveis de metilação em fungos variam de índices indetectáveis até níveis que se assemelham aos encontrados em plantas superiores e em vertebrados (14).

RIP (*repeat-induced point mutation*) foi descrito inicialmente em *Neurospora crassa*. Envolve a metilação de sequências gênicas repetidas seguida de mutação. Esse processo também é responsável pela inativação de múltiplas cópias de elementos de transposição (15).

Foram fornecidas evidências genômicas da presença de RIP em ascomicetos filamentosos, com identificação de mutações características em regiões duplicadas. Esses

achados sugerem que o RIP pode atuar como mecanismo de proteção genômica em diferentes espécies de fungos (16).

O artigo apresenta análise comparativa entre fungos ascomicetos, mostrando que o RIP é amplamente distribuído e contribui para a variação e evolução genômica. Identificaram diferentes padrões de atuação do RIP em grupos distintos de fungos filamentosos. (15).

MIP (*methylation induced premeiotically*) envolve o silenciamento por metilação, de múltiplas cópias de DNA repetitivo, mas sem causar mutação (17). Em *Aspergillus nidulans* o panorama ainda não é completamente elucidado em relação aos processos de regulação de genes por metilação (14).

GIS (*gene inactivation system*) foi descrito como um sistema de inativação gênica dependente de metilação em *Aspergillus nidulans*, atuando durante a meiose em linhagens com duplicações cromossômicas. Nesse sistema, diferente de RIP, não ocorre mutação (18).

Lee (19) não detectou metilação do DNA ou MIP nas linhagens testadas, mas não descartou a possibilidade de que as enzimas responsáveis pelo processo de metilação possam estar presentes ao menos transitoriamente durante o ciclo sexual, um estágio em que os baixos níveis de metilação do DNA são difíceis de serem detectados.

No sentido de ampliar o conhecimento sobre os processos de metilação em fungos filamentosos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de genes regulados por metilação no controle do ciclo vegetativo em *A. nidulans*.

METODOLOGIA

Foram utilizadas linhagens de *A. nidulans* que apresentam, regularmente, tanto o ciclo assexuado quanto o sexual: *biA1methG1*, MSE (Master Strain E), *brlA42* e *MoC*. Os meios de cultura foram preparados segundo Pontecorvo et al. (2) e Clutterbuck (16).

Para a análise do ciclo vegetativo foram inoculados conídios dormentes de colônias de cinco dias de crescimento no centro de placas de Petri contendo meio mínimo suplementado sólido (controle) e meio mínimo suplementado sólido com adição de 0,0073% (w/v) 5-azacitidina (tratamento). Diariamente o diâmetro das colônias foi medido para aferir a velocidade de crescimento vegetativo.

A análise da morfologia das colônias foi realizada observando-se a forma das colônias, bordos e rugosidades, coloração dos conídios e coloração do reverso da placa.

O teste de tempo de atividade do agente desmetilante foi feito preparando-se placas de Petri contendo meio mínimo suplementado sólido (controle) e meio mínimo suplementado sólido com adição de 0,0073% (w/v) 5-azacitidina (tratamento), deixando-as em estufa em condições idênticas às de cultivo. A cada 48 horas, placas eram retiradas da estufa e cada uma das linhagens era inoculada em uma placa com e uma sem desmetilante. Após 10 dias de incubação a 37°C as placas foram analisadas para observação da capacidade de 5-azacitidina promover alterações morfológicas já observadas em experimentos anteriores.

Para avaliar possíveis diferenças na velocidade de crescimento vegetativo entre as condições controle e tratamento (5-azacitidina), a velocidade de crescimento diária foi calculada como a variação do diâmetro das colônias entre dias consecutivos para cada

condição, considerando as médias agrupadas de todas as linhagens testadas. As velocidades médias diárias das duas condições foram comparadas por meio do teste t pareado de Student, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os dados de diâmetro das colônias, obtidos diariamente para as quatro linhagens de *Aspergillus nidulans* (brIA42, MoC, biA1methG1 e MSE) sob as condições de controle e tratamento com 5-azacitidina, foram analisados para identificar diferenças na velocidade de crescimento vegetativo entre as condições experimentais.

A análise estatística foi realizada utilizando o software BioEstat versão 5.3. Inicialmente, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Para a comparação entre os grupos controle e tratamento em cada tempo experimental, utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises.

RESULTADOS

Todas as linhagens testadas responderam ao agente desmetilante e apresentaram alterações no padrão de desenvolvimento do ciclo vegetativo. As colônias que cresceram na presença de 5-azacitidina apresentaram bordos irregulares e rugosidades na superfície das colônias, enquanto que as colônias submetidas à condição controle apresentaram bordos regulares e uniformes bem como superfície lisa.

As colônias da condição de tratamento produziram uma maior quantidade de melanina no micélio vegetativo em relação ao controle, conforme observado no reverso das placas (Figura 1). Nas colônias controle a melanina foi depositada de forma regular seguindo o padrão de crescimento radial formando halos, enquanto nas colônias tratadas o excesso de melanina estava presente em setores.

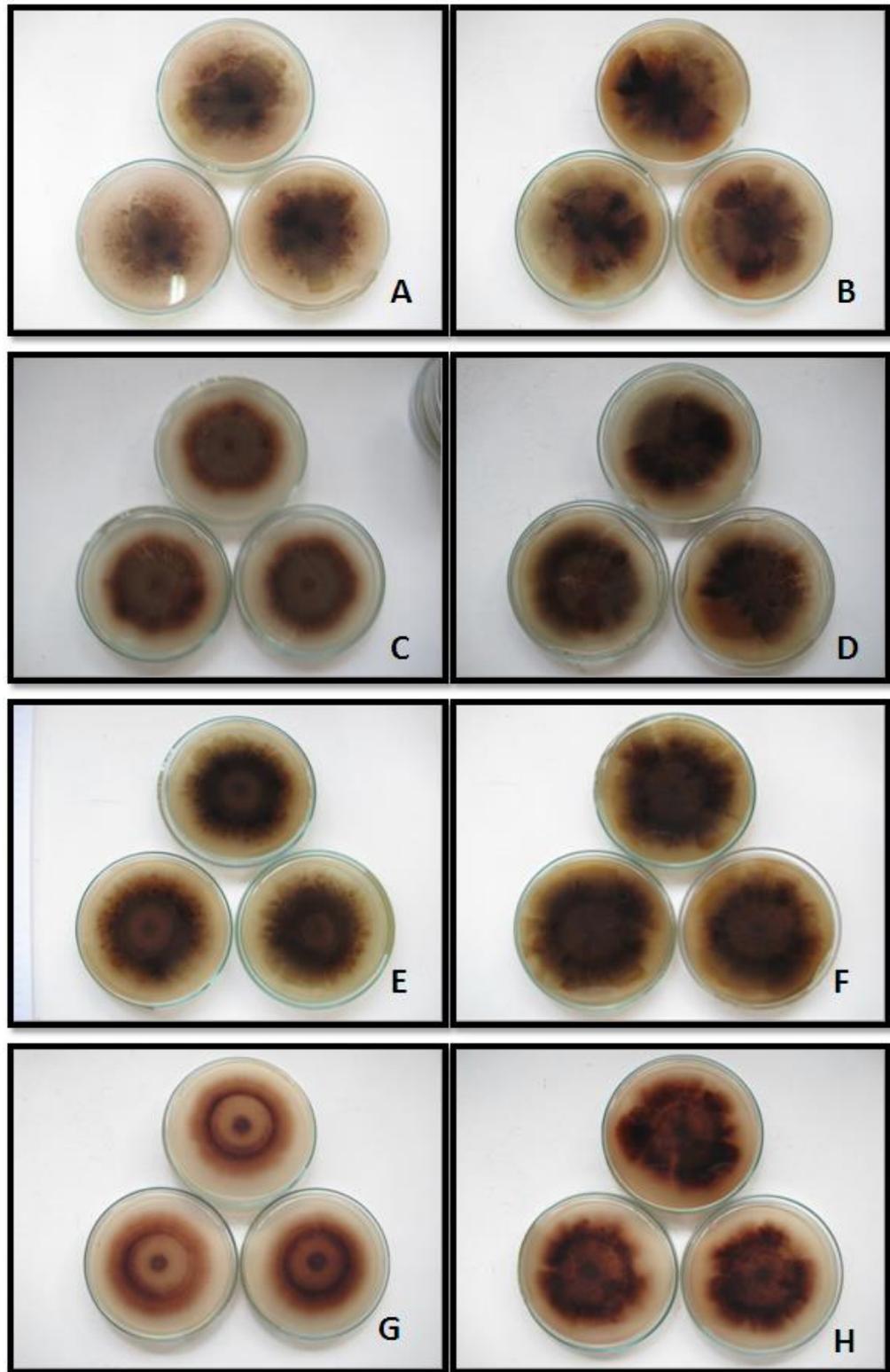


Figura 1 - Reverso das colônias da condição de controle e tratamento após 12 dias de crescimento a 37°C. A - *briA42* Controle; B - *briA42* Tratamento; C - *MoC* Controle; D - *MoC* Tratamento; E - *biA1methG1* Controle; F - *biA1methG1* Tratamento; G - MSE Controle; H - MSE Tratamento.

O teste do tempo de atividade da 5-azacitidina demonstrou que a ação desmetilante permanecia até entre o quinto e sétimo dia.

A velocidade de crescimento vegetativo na maioria das linhagens foi menor na condição de tratamento até o sexto dia. A partir deste momento as colônias tratadas tiveram

um desenvolvimento maior que as controles. A linhagem MSE apresentou esta mesma inversão de velocidade, só que mais tardiamente, no nono dia (Figura 2).

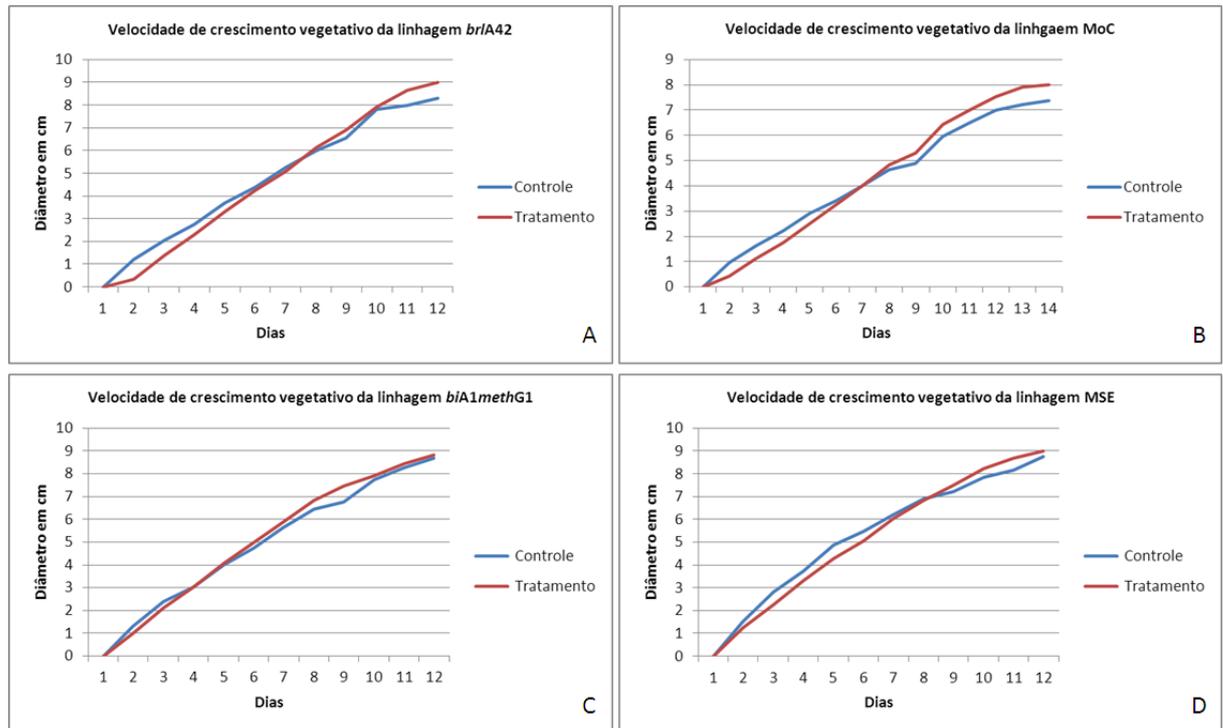


Figura 2 - A: Velocidade de crescimento da linhagem *brIA42*. B: Velocidade de crescimento da linhagem *MoC*. C: Velocidade de crescimento da linhagem *biA1methG1*. D: Velocidade de crescimento da linhagem MSE.

Nos gráficos de velocidade de crescimento (Figuras 2A, 2B e 2C), observou-se que, até o sexto dia de cultivo, as colônias submetidas ao tratamento com 5-azacitidina apresentaram diâmetro significativamente menor em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). A análise estatística demonstrou um ponto de interseção entre os grupos próximo ao sétimo dia, após o qual houve uma inversão e a velocidade do grupo tratamento foi maior do que o controle, embora não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$). Para a linhagem MSE, tal padrão não foi observado, ocorrendo no nono dia, sendo esta excluída da análise estatística comparativa. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório inicial do agente desmetilante é compensado após a sua inativação, permitindo a recuperação e até mesmo o aumento do crescimento nas colônias tratadas.

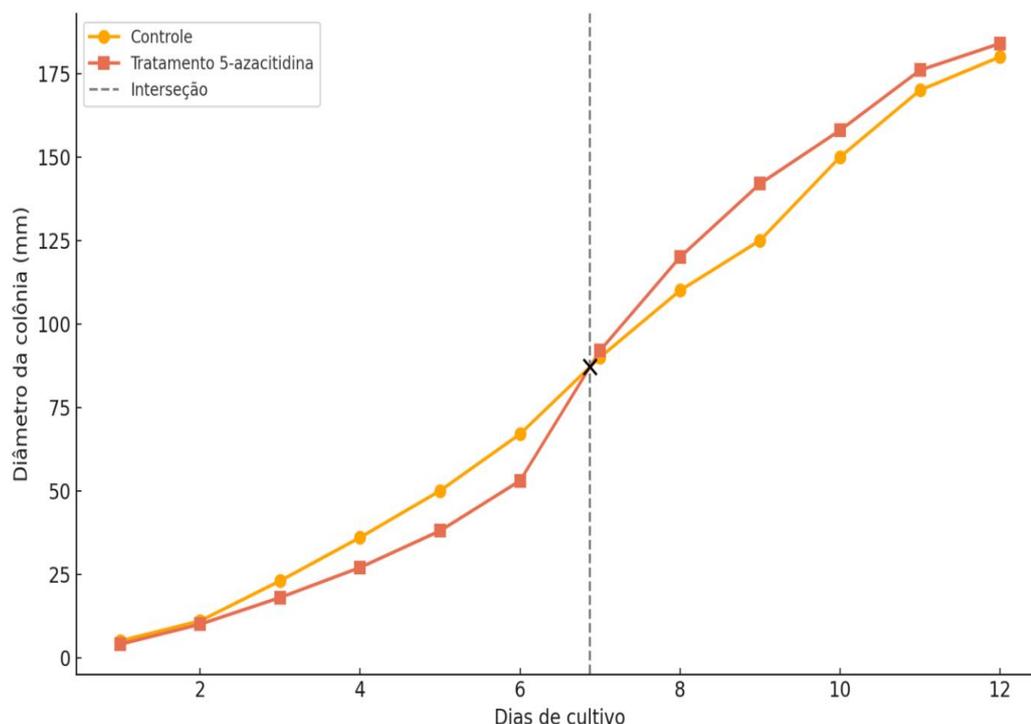


Figura 3 - Velocidade de crescimento das colônias (diâmetro médio em mm) nos grupos controle e tratamento com 5-azacitidina ao longo de 12 dias de cultivo. O ponto de interseção entre as curvas foi identificado em aproximadamente 6,88 dias de cultivo (linha tracejada), indicando o momento em que o crescimento do grupo tratamento igualou ou superou o do grupo controle. Até esse ponto, o tratamento apresentou crescimento significativamente menor ($p < 0,05$). Após a interseção, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Valores expressos como média (\pm desvio padrão).

As linhagens com conídios verdes *biA1methG1*, *brlA42* e *MoC* apresentaram setores com conídios amarelos e brancos nas placas com o agente desmetilante. Estes conídios, quando repicados em placas sem 5-azacitidina originaram colônias com conídios verdes.

DISCUSSÃO

Todas as linhagens avaliadas mostraram respostas no desenvolvimento, em relação à exposição ao agente desmetilante 5-Azacitidina. Isto sinaliza que este fungo pode possuir genes previamente metilados e que ao serem desmetilados provocaram alterações morfológicas nas colônias.

Selker et al. (20) descreveram um mecanismo relacionado ao controle de sequências duplicadas no genoma em *Neurospora crassa* denominado RIP e Castro-Prado e Zucchi (19) descreveram um sistema similar em *Aspergillus nidulans* que foi denominado GIS, também relacionado à inativação de sequências duplicadas no genoma, entretanto por um processo diferente do descrito em *Neurospora crassa* porque não ocorre mutação.

Apesar da comprovação da existência de mecanismos de metilação para controle de sequências duplicadas, não há relatos sobre a metilação de genes como forma de regulação da expressão gênica em *Aspergillus nidulans*.

A produção de melanina parece estar associada à proteção dos organismos contra o estresse causado pelo ambiente. Fungos que produzem mais melanina se mostram mais resistentes a temperaturas extremas, enzimas hidrolíticas, toxicidade de metais pesados, drogas antimicrobianas e luz ultravioleta do que aqueles não melanizados (21,29).

Em todas as linhagens analisadas neste trabalho foi observado aumento acentuado na produção de melanina, quando submetidas ao tratamento (Figura 1: B, D, F e H) em relação à condição controle (Figura 1: A, C, E e G).

Ao contrário do que ocorre nas colônias submetidas à limitação nutricional ou aumento de osmolaridade, em que a resposta morfológica é homogênea na colônia, a resposta a 5-azacitidina ocorreu com a formação de setores. Este resultado é característico de eventos genéticos de mutação ou de expressão gênica, como os epigenéticos que ocorrem apenas em alguns núcleos do micélio e crescem na colônia de forma clonal. Essa expressão é permanente ao longo das divisões nucleares durante o desenvolvimento do setor. Desta forma, isto pode indicar que genes responsáveis pela produção de melanina são passíveis de metilação.

Outro aspecto importante na morfologia destes setores hiper produtores de melanina no tratamento, foi a durabilidade dessa expressão que começou próximo do inóculo nas primeiras 24 horas da colônia e permaneceu constante até o final do crescimento vegetativo, mesmo depois da inativação do agente desmetilante. Este resultado demonstra que estes genes não apenas podem ser metiláveis mas reguláveis por metilação em resposta a fatores ambientais. Esta afirmação é corroborada pelo fato do fungo *Aspergillus nidulans* ser capaz de produzir diferentes quantidades de melanina dependendo das condições do ambiente (23,25). Desta forma, a regulação destes genes por metilação pode ser vantajosa para a colônia uma vez que por se tratar de um processo reversível a colônia pode alterar o padrão de metilação desses genes para melhor se ajustar às condições do meio externo.

Recentemente, foi reconhecido que a metilação do DNA em *A. nidulans* não está restrita ao controle de sequências repetitivas, mas pode envolver genes funcionais relacionados à biossíntese de melanina e à regulação de vias metabólicas específicas (30).

A relação entre mecanismos epigenéticos e a plasticidade fenotípica em *A. nidulans* também foi evidenciada pela análise do metiloma e pela observação de que modificações locais e temporárias de metilação podem ocorrer em resposta a estímulos ambientais, modulando rapidamente a expressão gênica (31). Tal plasticidade representa um importante mecanismo adaptativo, conferindo vantagem evolutiva em ambientes dinâmicos (32).

As relações entre os ciclos vegetativo-conidiogênese e conidiogênese-ciclo sexual em *Aspergillus nidulans* são complexas e altamente reguladas. Clutterbuck (33) classificou os genes importantes para a diferenciação do conidióforo em 4 grupos: o primeiro grupo inclui os genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetativo, sendo denominados genes “de suporte”; o segundo grupo, ditos “estratégicos”, abrange os responsáveis pela decisão de partir do ciclo vegetativo, para o assexual ou sexual; o terceiro,

dos genes “táticos”, reúne os genes reguladores da conidiogênese, bem como os que codificam para todas as funções essenciais para a diferenciação de cada tipo celular que compõe o conidióforo; o quarto grupo engloba genes “auxiliares” cuja função é dar acabamento aos processos de diferenciação, como pigmentos dos conidióforos e dos conídios, substâncias adicionais a serem estocadas nos conídios e componentes de parede dos conídios maduros.

Em algumas placas, ocorreu a presença de setores fortemente melanizados que apresentaram também diminuição da conidiogênese, aumento na produção de hifas aéreas e ausência de estruturas do ciclo sexual. Esses setores apontam para uma inibição da conidiogênese não em decorrência da desmetilação de genes envolvidos neste ciclo, mas sim provavelmente como consequência da carência de oxigênio produzida pela ativação da melanização das hifas vegetativas em resposta ao desmetilante.

Os resultados obtidos por Griffith (34) corroboram essa hipótese. Segundo este trabalho, a melanização do micélio confere-lhe rigidez e impermeabilidade, o que dificulta as trocas com o meio, de nutrientes e oxigênio, ambos vitais para a conidiogênese.

Uma outra hipótese relaciona a regulação da produção de melanina com o desenvolvimento da conidiogênese. São conhecidos, pelo menos, 2 tipos de moléculas que são primeiramente secretadas para o meio para depois induzir as hifas próximas a desenvolverem conidióforos - fator *psiA* e o produto do gene *acoD* (4; 35-37). É possível que a produção de melanina provoque uma diminuição na síntese do fator *psiA* por competição, uma vez que ambas as vias utilizam compostos fenólicos (38). Desta maneira, os genes para melanização do micélio vegetativo seriam considerados genes de suporte, tanto quanto os genes para produção de nutrientes e síntese de parede.

O teste de durabilidade da ação do agente desmetilante demonstrou que este permanece com atividade até entre o quinto e o sétimo dia de desenvolvimento da colônia. Nas colônias da condição tratamento os setores de desenvolvimento que possuíam grande produção de melanina mantiveram o mesmo padrão até o final do desenvolvimento da colônia por volta do décimo segundo dia, demonstrando que a desmetilação dos genes em questão se mantém mesmo após a inativação da 5-azacitidina, não sendo, portanto, um evento transitório.

A desmetilação de genes também afetou o crescimento vegetativo das linhagens. As colônias da condição tratamento apresentaram diminuição significativa da velocidade de crescimento nos primeiros dias do desenvolvimento da colônia, porém em torno do sétimo dia, período que coincide com a perda da atividade do desmetilante, as velocidades entre a condição tratamento e controle se equipararam, e após este período houve uma inversão no padrão e a condição tratamento passou a ter uma velocidade de crescimento levemente maior. Estes resultados não permitem concluir se a diminuição da velocidade de crescimento observada na condição tratamento, está relacionada diretamente a desmetilação de genes ou apresenta-se como reflexo da desregulação epigenética causada pela desmetilação global do DNA. Tal fato pode explicar a inversão do padrão de crescimento com o término do efeito do agente desmetilante quando os genes diversos, antes desmetilados, puderam ser metilados novamente contribuindo para a recuperação do padrão de crescimento normal da colônia.

Um resultado inesperado (metilação ao invés de desmetilação) foi o aparecimento de setores com conídios com colorações branca e amarela em linhagens tipicamente verdes como *biA1methG1*, *brlA42* e *MoC*. A coloração dos esporos em *A. nidulans* é regulada geneticamente de forma que o gene *w* é responsável pela capacidade da linhagem expressar seu fenótipo colorido, sendo que o alelo w^+ confere a presença de pigmentação enquanto o alelo w^- confere o caráter ausência de pigmentação (branco). O gene *y*, por sua vez, é responsável pela síntese do pigmento verde a partir do amarelo a ser depositado na parede dos conídios, de forma que o alelo y^+ condiciona a produção de pigmento verde enquanto o alelo y^- condiciona a produção de pigmento amarelo (2,39).

Desta forma os setores brancos e amarelos só podem ser explicados por mutação ou metilação do gene w^+ nos setores brancos e do gene y^+ nos setores amarelos. Há, no entanto, um detalhe importante capaz de justificar o efeito metilante do agente desmetilante - todos estes setores, nas diferentes linhagens, foram formados após cinco dias de crescimento da colônia, coincidindo com a inativação do agente desmetilante. É possível que com o término da ação do agente desmetilante a maquinaria de metilação volte a operar normalmente, e inclusive a metilar genes que não são normalmente regulados por metilação, mas são passíveis de metilação.

A metilação dos genes para cor pode ser comprovada por dois resultados: primeiro, nenhum setor se manteve até o final do crescimento da colônia; segundo, ao transferir-se os setores brancos e os amarelos para meio completo sólido sem o agente desmetilante, as colônias cresceram com conídios verdes, descartando a possibilidade de mutação e corroborando com a hipótese de metilação temporária.

CONCLUSÃO

Os presentes resultados permitem concluir que em *A. nidulans* pode existir regulação por metilação de genes “de suporte” (por exemplo, genes para produção de melanina).

Este trabalho também demonstrou que além de genes regulados por metilação, podem existir genes que não são obrigatoriamente metilados durante o desenvolvimento, mas que são passíveis de metilação em determinadas situações, como é o caso dos genes para coloração de conídios.

A grande contribuição deste trabalho foi demonstrar a presença de regulação por metilação no desenvolvimento, em diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans* sem duplicações, apresentando este fungo que é considerado como modelo para estudos em diversas áreas da Genética, como excelente instrumento também para estudos em Epigenética.

REFERÊNCIAS

(1) ELLIOT, C.G. The cytology of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v. 1, p. 462-476, 1960.

(2) PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. v. 5, p. 141-238, 1953.

- (3) CLUTTERBUCK, A.J.; TIMBERLAKE, W.E. Genetic regulation of sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In: RUSSO, V.E.A.; BRODY, S.; COVE, D.; OTTOLONGHI, S. **Development**. London: Spring-Verlog, 2005. p. 103-118.
- (4) ADAMS, T.H.; HIDE, W.A.; YAGER, L.N.; LEE, B.N. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 3827-33, 1992.
- (5) MORRIS, N.R. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**. v. 26, p. 237-54, 1976.
- (6) AXEROLD, D.E.; Kinects of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**. v. 73, p. 181-184, 1972.
- (7) MORRIS, N.R.; XIANG, X.; BECKWITH, S.M. Nuclear migration advances in fungi. **Trends Cellular Biology**. v.5, p. 278-282, 1995.
- (8) TIMBERLAKE, W.E.; CLUTTERBUCK, A. J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. ed. *Aspergillus: 50 years on*. London: Elsevier, 1994. p. 383-427.
- (9) SHERMAM, J. M.; PILLUS, L. An uncertain silence. **Trends in Genetics**, v.13, p. 308-313, 1997.
- (10) BICKLE TA, KRÜGER DH. Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev*. 1993 Sep;57(3):434-50. **PMID:** 8246847.
- (11) SZYF, M.; ELIASSON, L.; MANN, V.; KLEI, G.; RAZIN, A. Cellular and viral DNA hypometilation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 8090-8094, 1985.
- (12) HUH. J.H; BAUER. M.J; HSIEH. T.; FISCHER. R.L. Cellular Programming of Plant Gene. **Cell**, v. 172, p. 735-744, 2008.
- (13) ZHANG, M.; KIMATU, J. N.; XU. K.; LIU. B. DNA cytosine methylation in plant development. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 37 n. 1, p. 1-12, 2010.
- (14) ANTEQUERA, F.; TAMAME, M.; VILLANUEVA, J.R.; SANTOS, T. DNA methylation in the fungi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 8033-8036, 1984.
- (15) WANG, X. et al. RIP mutation in *Neurospora crassa*: Genome-wide analysis and evolutionary implications. **Genome Biology**, 21, 89, 2020.
- (16) CLUTTERBUCK, A.J. Genomic evidence of RIP (repeat-induced point) mutation in filamentous ascomycetes. **Molecular Microbiology**, 40(2), 367–377, 2001.
- (17) MALAGNAC, F. et al. A gene essential for de novo methylation and development in *Ascobolus immersus*. **EMBO Journal**, 16(14), 4421–4430, 1997.

(18) PRADO, M.A.A.C.; ZUCCHI, T.M.A.D. A gene activation system (GIS) acting in meiosis of a duplicated strain of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Genetics**, 19(1), 17–25, 1996.

(19) LEE, D.W.; FREITAG, M.; SELKER, E.U.; ARAMAYO, R.. A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, v. 3, p. 2531, 2008.

(20) SELKER, E. U.; CAMBARERI, E. B. JENSENS, B. C.; HAACK, K. R. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell**, v.51, p. 741–752, 1987.

(21) ZHADANOVA, N.N.; BORISYUK, L.G.; ARTZATBANOV, V.Y. Occurrence of the K type of life strategy in some melanin- containing fungi under experimental conditions. **Folia Microbiologica**, v. 35, p. 423–430, 1990.

(22) BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 411–451, 1986.

(23) FOGARTY, R.V.; TOBIN, J.M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme Microbial Technology**, v. 19, p. 311–317, 1996.

(24) BUTLER, M.J.; DAY A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1115–1136, 1998.

(25) JACOBSON, E.S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 708–717, 2000.

(26) GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus Neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v. 39, p. 353-357, 2001.

(27) GÓMEZ, B.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 16, p. 91–96, 2003.

(28) DADACHOVA E.; BRYAN, R.A.; HUANG, X.; MOADEL, T.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. **PLoS ONE**, v. 2, n. 5, p. 457, 2007.

(29) SINGARAVELAN, N.; GRISHKAN, I.; BEHARAV, A., WAKAMATSU, K.; ITO ,S.; NEVO, E. Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at “evolution canyon”. Mount Carmel, Israel. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, e2993, 2008.

(30) CHANG, P., GERSTEN, K.M., & SCHMITT, K. Genome-wide analysis of DNA methylation in *Aspergillus* species reveals epigenetic regulation of secondary metabolite gene clusters. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 12(3), jkac006. 2022 <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac006>.

(31) ZHOU, J., WANG, X., HE, Y., LI, T., & YU, J. DNA methylation and its roles in fungal development and pathogenesis. **Frontiers in Genetics**, 12, 622639. 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.622639>.

(32) Song, Y., Chen, J., Wang, Z., & Sun, Z. Epigenetic memory and plasticity in filamentous fungi. **Mycology**, 11(2), 82–91. 2020. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1689650>.

(33) CLUTTERBUCK, A.J. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In: PATEMAN, J.A.; SMITH, J.E. (ed). **Genetics and physiology of Aspergillus**. New York: Academic Press, 1977. p. 305-17.

(34) GRIFFITH, G.H.; JENKINS, G.I.; MILNER-WHITE, E.J.; CLUTTERBUCK, A.J. Homology at the amino acid level between plant phytochromes and a regulator of asexual sporulation in *Emmericella* (= *Aspergillus*) *nidulans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, p. 252-256. 1994.

(35) CHAMPE, S. P.; RAO, P.; CHANG, A. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1383-1387, 1987.

(36) MAZUR, P.; MEYERS, H.V.; NAKANISHI, K; EL-ZAYAT, E.A.A.; CHAMPE, S.P. Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites in *Aspergillus nidulans*, **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 3837-3840, 1990.

(37) MAZUR, P.; NAKANISHI, K; EL-ZAYAT, E.A.A.; CHAMPE, S.P. Structure and synthesis of sporogenic psi factors from *Aspergillus nidulans*. **Journal of the chemical society, chemical communications**, v. 20, p.1486-87,1991.

(38) BUTNICK, N.Z.; YAGER, L.N.; HERMANN, T.E.; KURTZ, M.B.; CHAMPE, S.P. M5tants of *Aspergillus nidulans* blocked at early stage of sporulation secretes an unusual metabolite. **Journal of Bacteriology**, v. 160, p. 533-34, 1984b.

(39) CLUTTERBUCK, A. J. Absence of laccase from yellowspored mutants of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 70, p. 423-435, 1972.

Recebido: 26 de junho de 2016

Aprovado: 11 de julho de 2025



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.