

Análise da metilação de genes em resposta a Diploidia em *Aspergillus* (=*Emericella*) *Nidulans* (Eidam) Vuill

Analysis of gene methylation in response of Diploidy in *Aspergillus* (=*Emericella*) *Nidulans* (Eidam) Vuill

DOI:10.34117/bjdv8n6-360

Recebimento dos originais: 21/04/2022

Aceitação para publicação: 31/05/2022

Janaína Bosso

Mestre em Biologia Comparada

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Avenida Colombo, 5790, Zona 7, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

E-mail: j_magali@hotmail.com

Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha

Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Avenida Colombo, 5790, Zona 7, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

E-mail: clmsrocha@gmail.com

RESUMO

Epigenética estuda alterações de expressão gênica sem alteração em nucleotídeos da região promotora. A metilação tem sido muito estudada em eucariotos superiores e mais recentemente em fungos. *Aspergillus nidulans* é um fungo filamentosos, homotálico geralmente haplóide. Por meio de cruzamentos com marcadores nutricionais é possível obter linhagens diplóides estáveis. Colônias diplóides apresentam desenvolvimento vegetativo e conidiogênese normalmente como ocorre com as haplóides. O presente trabalho teve como objetivo estudar a metilação de genes em resposta ao excesso de material genético em linhagens diplóides. Linhagens com marcadores conhecidos foram utilizadas para a obtenção dos diplóides *biA1methG1//MSE*, *CLB3//MSE*, *ppy//MSE*, *4//8* e *4//14*. Colônias destes diplóides foram cultivadas para observação da ocorrência espontânea de setores com diferentes morfologias, coloração de conídios, formato dos conidióforos, presença de cleistotécios, indicativos de metilação em resposta a diploidia. Nenhuma das 100 colônias de cada diplóide produziu setores nem de coloração nem de esporulação nem de cleistotécios. Os diplóides foram cultivados com carência de oxigênio para a produção de cleistotécios. Ascósporos de um cleistotécio de cada linhagem foram inoculados para a obtenção de linhagens metiladas por evento pré-meiótico. Destas colônias foram selecionados setores para coloração. As colônias purificadas destes setores mostraram estabilidade de cor e grande parte delas tinham também uma alta produção de cleistotécios em resposta a metilação. Os resultados mostraram que linhagens diplóides ao serem ativadas sofrem metilação em genes para coloração de esporos e para a produção de ciclo sexual.

Palavras-chave: Epigenética, inativação de genes, desenvolvimento das colônias.

ABSTRACT

Epigenetics studies the changes in gene expression without changes the nucleotides in the

promoter region. Methylation has been extensively studied in superior eukaryotes and more recently in fungi. *Aspergillus nidulans* is a filamentous, homotallic fungus usually haploid. Through crosses with nutritional markers it is possible to obtain stable diploid strains. Diploid colonies present vegetative development and conidiogenesis normally like haploids. The present work aimed to study the methylation of genes in response to the excess of genetic material in diploid strains. Strains with known markers were used to obtain diploids *biA1methG1//MSE*, *CLB3//MSE*, *ppy//MSE*, *4//8* and *4//14*. Colonies of these diploids were cultured to observe the spontaneous occurrence of sectors with different morphologies, color of conidia, shape of conidiophores, presence of cleistothecia, indicative of methylation in response to diploidy. None of the 100 colonies of each diploid produced sectors neither for color, nor for sporulation, nor cleistothecium. Diploids were grown with oxygen deficiency for the production of cleistothecia. Ascospores from a cleistothecium of each strain were inoculated to obtain methylated strains due to a pre-meiotic event. From these colonies were selected color sectors. The purified colonies of these sectors showed color stability and most of them also had a high production of cleistothecia in response to methylation. The results showed that, when activated, diploid strains suffer methylation in genes for spore color and for the production of the sexual cycle.

Keywords: Epigenetics, inactivation of genes, colony development.

1 INTRODUÇÃO

O termo Epigenética foi introduzido pelo cientista Conrad Hal Waddington no ano de 1942. Este termo deriva da palavra “epigenesis” utilizado por Aristóteles para descrever um ramo da Biologia que estuda a interação entre os genes e seus produtos para determinar um fenótipo (JABLONKA; LAMB, 2002).

Epigenética é definida por alterações herdáveis na expressão gênica, sem que haja alterações na sequência de bases do DNA e que podem ser reversíveis (WOLFFE; GUSCHIN, 2000; MOMPALER, 2003; CHOUDHURI, 2011).

Alguns mecanismos de alterações epigenéticas conhecidos incluem a metilação do DNA, acetilação, fosforilação e ubiquitinação (SHERMAN; PILLUS, 1997). Estes mecanismos levam ao imprinting genômico, o silenciamento gênico e a mudança na conformação da cromatina e histonas (MOSS; WALLRATH, 2007; RODENHISER; MANN, 2006; SULEWSKA et al., 2007). Segundo Bollati e Baccarelli (2010), os mais conhecidos mecanismos de alterações epigenética são a metilação e a modificação da cromatina.

Na acetilação, ocorre a adição do radical COCH_3 nos sítios das histonas H3 nos locais K9, K14, K18, K23 e K27 (KIMURA, 2013). A acetilação atua sobre os resíduos de lisina, ativando os fatores de transcrição e, conseqüentemente, aumentando a

transcrição de genes (ALLFREY et al., 1964; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

O mecanismo de fosforilação ocorre pela adição do radical PO_4 nas histonas H1 e H3 durante os eventos mitóticos, como a condensação de cromossomos. Este evento ocorre em eucariotos e esta condensação pode levar ao desligamento do processo de transcrição (PAULSOM; TAYLOR, 1982).

O processo de ubiquitinação acontece quando a proteína ubiquitina, que é composta por 76 aminoácidos, se liga aos resíduos de lisina nas histonas. Para que este processo aconteça, são necessárias 3 enzimas denominadas E1, E2 e E3. Estas enzimas são responsáveis por controlar a conjugação entre as proteínas e ubiquitina eucariotas em todos os tipos celulares, sendo também um sistema de sinalização para a degradação de proteínas (LIU et al., 2015). Este processo de modificação de histona tem como principal efeito o aumento da expressão gênica (MENDITI; KANG, 2007).

O mecanismo de metilação do DNA consiste na adição do radical metil (CH_3) no carbono 5 do nucleotídeo de citosina, o qual é geralmente seguido pelo nucleotídeo de guanina, formando o dinucleotídeo CpG na região promotora do gene. A adição deste radical metil inibe a ligação dos fatores de transcrição e, conseqüentemente, resulta na ausência da expressão deste gene (OLIVEIRA et al., 2010). Altos níveis de metilação são encontrados em regiões não expressas onde a cromatina está altamente condensada (heterocromatina) ou também no mesmo tipo celular, mas em estágios diferentes de desenvolvimento, porém estão pouco metilados em tecidos onde são expressos (KLAAS; AMASINO, 1989; CEDAR, 1988). De acordo com Szyf (2007), o radical metil pode ser obtido pela dieta, principalmente a metionina, seguida de folato, colina e vitamina B12.

A metilação do DNA tem sido muito estudada em eucariotos superiores e mais recentemente em fungos por levar ao silenciamento transcricional por múltiplos mecanismos. Este processo envolve a ação das DNA metiltransferases (DNMTs), interagindo especificamente com fatores de transcrição, resultando em metilação de sítios específicos em regiões promotoras (HERVOUET et al., 2009). A DNMT1 tem a função de manutenção da metilação e assim metilar os sítios hemimetilados gerados no processo de replicação do DNA, já as enzimas de novo DNMT3a e DNMT3b são as responsáveis pela metilação no durante o período embrionário (ABIKO et al., 2014).

A metilação de DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário em mamíferos, sendo necessário para a viabilidade do embrião (FEINBEERG, 2004). Em fêmeas de mamíferos, um cromossomo X é inativado em todas as células enquanto o outro fica ativo. Logo após este desenvolvimento, ocorre toda a reorganização desta maquinaria

epigenética (FEINBERG, 2004).

Nos humanos, o epigenoma se mostra susceptível a alterações por fatores ambientais como radiação e outros agentes químicos e físicos durante a gestação, o desenvolvimento neonatal e vida adulta, o que leva a um elevado risco de desenvolvimento de doenças (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Alterações epigenéticas por hipometilação de proto-oncogenes e hipermetilação em oncogenes, genes supressores, genes reparadores de DNA, genes reparadores de ciclo celular e genes envolvidos na adesão celular em conjunto são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do câncer (KANYAMA et al., 2003). Esta hipermetilação do promotor é uma ferramenta para o diagnóstico de câncer (MONPARLER, 2003).

Em humanos, estudos mostraram que a hipermetilação está relacionada a vários tipos de câncer como o de pulmão (RUSSO et al., 2005), estômago (DONG et al., 2010), intestino (KIM et al., 2010), língua (SINHA et al., 2009), esôfago (TAGHAVI et al., 2010), ovário (TORNG et al., 2009), próstata (KRON et al., 2010), mama (MUGGERUD et al., 2010), pele (TANEMURA et al., 2009) e pâncreas (WILSON et al., 2007). Já a hipometilação foram observados câncer colorretal, mama, pâncreas, estomago, próstata, leucemias e mieloma múltiplo (WILSON et al., 2007).

Em plantas observa-se um sistema epigenético que permite mudanças rápidas e sensíveis no padrão da expressão gênica. Este sistema pode ser a resposta das plantas ao meio ambiente no qual se encontram (GRANT-DOWNTON; DICKINSON, 2006).

O padrão da metilação em plantas pode ser mantido por várias gerações seguintes, levando a acreditar que a metilação fosse estática. Porém foi descoberto que os elementos de transposição (pequenas sequências de DNA que se movem para novas posições) durante a gametogênese feminina assim como a perda de metilação durante a gametogênese masculina, mostram que o padrão de metilação é dinâmico durante o desenvolvimento das plantas (LAW; JACOBSEN, 2010).

O excesso de material genético é um fenômeno comum no reino vegetal e evidências recentes sugerem que 60-70% das angiospermas apresentam essa poliploidia. Este aumento na quantidade de genoma funciona como um remodelador, pois o aumento na quantidade de genoma em cada célula altera o balanço entre interações regulatórias e as redes de controle da expressão gênica (VEIGA; QUEIROZ, 2015).

Napoli et al. (1990) realizaram um estudo sobre a coloração das flores da petúnia roxo-azulada. Foi inserido o plasmídeo com o gene também para a cor roxo-azulada, esperando que o resultado fosse a produção de somente flores roxo-azuladas. Ao invés

disso, como resultado obtiveram flores rajadas de branca e flores somente brancas, assim com as futuras gerações. O DNA destas plantas foi sequenciado e não foi observada nenhuma alteração. Como conclusão, eles observaram que o excesso de material genético, tanto o do endógeno e quanto o do plasmídeo, leva ao processo de metilação do gene, pois se mostra de forma coordenada e reversível.

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* forneceu o primeiro exemplo de sistema de defesa do genoma eucariótico, sendo este mecanismo conhecido como “mutação de ponto induzida por repetição” (RIP) (SELKER et al., 1987; SELKER; GARRET, 1988; SELKER, 2002; SELKER et al., 2002). Como a maioria dos fungos hifais, plantas e muitos animais, mas ao contrário de *S. cerevisiae* e *S. pombe*, *Neurospora* podem metilar seu DNA (SELKER et al., 2002).

RIP detecta sequências duplicadas no genoma haplóide de células dicarióticas especiais resultantes de fertilização e promove mutação trocando G_C por A_T nas sequências duplicadas e assim inativando-as (SELKER, 1987; LEE et al., 2008). Em uma única passagem pelo ciclo sexual, até 30% dos pares G_C, nas sequências duplicadas podem ser mudadas para pares A_T (CAMBARERI et al., 1991).

Há evidências que indicam a ocorrência de RIP em algumas variedades de fungos, enquanto há evidência experimental indicando que RIP está ativo em muitos fungos, como em *Neurospora crassa* (SELKER et al., 1987), e *Nectria haematococca* (COLEMAN et al., 2009), *Gibberella zeae* (CUOMO et al., 2007) e *Magnaporthe grisea* (IKEDA et al., 2002).

MIP ou indução da metilação pré-meiótica ocorre no fungo filamentoso *Ascobolus immersus*, sendo um processo similar de repetição de DNA que ocorre durante a fase pré-meiótica do ciclo sexual. No processo de MIP, as citosinas C5 sofrem metilação, e esta é mantida através da meiose e durante o ciclo vegetativo sem a ocorrência de mutações, ao contrário do que ocorre em RIP (RHOUNUM et al., 1992; GLADYSHEV; KLECKNER, 2017).

Em *Aspergillus*, muitos autores têm afirmado que não há evidências de metilação para regulação da expressão gênica. No entanto, Prado e Zucchi (1996) descreveram um sistema de inativação gênica por metilação que denominaram GIS, sugerindo sua atividade depois da cariogamia e agindo sobre os núcleos diplóides antes da meiose.

O mecanismo de GIS afeta sequências duplicadas de cromossomos por translocação, atuando por metilação em citosinas. Este mecanismo pode ser ativado espontaneamente e também pode apresentar letalidade, pois apresenta cleistotécios com

baixa fertilidade (PRADO; ZUCCHI, 1996).

Pontecorvo et al., 1953, apresentou o fungo *Aspergillus nidulans* como um ascomiceto modelo para estudos de Genética de Microrganismos. A partir deste trabalho este organismo tem sido considerado um excelente exemplar para estudos de várias áreas da Genética. Apresenta ciclo de vida curto e morfogênese bem definida, permitindo sua utilização nos estudos de Genética do Desenvolvimento. A maioria das linhagens na natureza e no laboratório apresentam núcleos haplóides com 8 cromossomos. A partir de cruzamentos é possível obter linhagens diplóides estáveis que permitem muitos métodos de análises, incluindo, mapeamento genético e estudos de regulação da expressão gênica (TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994).

Timberlake e Clutterbuck (1994) descreveram, em linhas gerais, as três fases do ciclo de vida: ciclo vegetativo, assexuado e sexuado. A fase vegetativa, na qual se encontra a germinação do esporo e o crescimento das hifas vegetativas, dão origem ao micélio que compõe uma colônia circular que cresce radialmente (D'ENFERT, 1997). O ciclo assexuado, também conhecido como anamórfico (ou conidiogênese), é desenvolvido por meio de mitoses, resultando na produção de esporos assexuados denominados conídios, a partir de estruturas diferenciadas denominadas conidióforos (CLUTTERBUCK, 1969; ADAMS et al., 1998) Já no ciclo sexual, também conhecido como teleomórfico ou ascospogênese, ocorrem meioses, resultando na formação de esporos sexuados, os ascósporos dentro dos corpos de frutificação denominados cleistotécios (PONTECORVO et al., 1953; TIMBERLAKE; CLUTTERBUCK, 1994).

Em *Aspergillus nidulans*, as linhagens haplóides podem se tornar diplóides espontaneamente com um evento raro de fusão dos núcleos (ROPER, 1952). Segundo Hoffmann et al., (2000), deste evento podem surgir novos genótipos via recombinação mitótica que podem levar a interações funcionais, perda de gene e mudança na expressão gênica (SALMON; AINOUCHE, 2010).

De acordo com a literatura a metilação ocorre como forma de controle da expressão gênica e de sequências duplicadas no genoma em diversas espécies de fungos, sendo este um mecanismo evolutivamente bem conservado, desta forma é provável que também ocorra em *Aspergillus nidulans* em condições de diploidia.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a metilação de genes em resposta a diploidia em linhagens de *Aspergillus nidulans* obtidas por cruzamento de linhagens haploides sem aberrações cromossômicas e com marcadores conhecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LINHAGENS

Foram utilizadas as linhagens:

- *biA1methG1* (*bimeth*), uma linhagem que apresenta crescimento e esporulação normais, conídios verdes, ciclo sexual normal e marcadores nutricionais para biotina e metionina

- Master Strain E (MSE), uma linhagem de crescimento e esporulação normais, conídios brancos, ciclo sexual normal, marcadores nutricionais para galactose como fonte de carbono, piridoxina, acetato como fonte de carbono, ácido nicotínico, riboflavina e incapacidade de utilização de sulfato e marcadores para coloração de conídios amarelo;

- *proApabaAyA* (*ppy*), uma linhagem de crescimento e esporulação normais, conídios amarelos.

Estas linhagens são provenientes da Universidade de Glasgow (Escócia), cedidas pela ESALQ/USP.

- CLB3, uma linhagem com crescimento e esporulação deficiente, micélio marrom, conídios verdes, ausência de ciclo sexual, marcadores nutricionais para biotina, metionina e cisteína. Mutante *bristle* para desenvolvimento do conidióforo. Esta linhagem foi obtida por mutação espontânea da linhagem *bimeth*, no Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento da UEM.

Do cruzamento das linhagens CLB3 e MSE, foram obtidos os segregantes 4,8 e 14, sendo estes números utilizados como marcadores nutricionais no laboratório. Dos cruzamentos destes segregantes foram obtidos os diplóides 4//8 e 4//14, ambas com esporulação e crescimento normais, com conídios amarelos. Os segregantes foram obtidos no Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento da UEM.

2.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

As análises utilizam como base os meios de cultura conforme descrito por Pontecorvo (1953) modificado por Clutterbuck (1969): meio mínimo (MM) e meio completo (MC); meio mínimo líquido (MML) + 2% meio completo líquido (MCL). Foi utilizada também solução 0,01% Tween 80.

2.3 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DIPLÓIDES

Foram obtidos os seguintes diplóides: *bimeth*//MSE, CLB3//MSE, *ppy*//MSE, 4//8 e 4//14. Foram coletados conídios de ambas as linhagens a serem cruzadas. Foram

semeados em MML mais 2% de MCL e incubados a 37°C, por 3 dias. Após a formação dos heterocários, estes foram transferidos para a superfície do MM e incubadas por 5 dias a 37°C. Os conídios dos heterocários formados foram semeados em MM e incubados a 37°C, por 5 dias. Este procedimento foi repetido até a obtenção do diplóide de cada cruzamento, região do heterocário que apresentou crescimento mais vigoroso, com esporos de cor uniforme.

2.4 OBTENÇÃO DE SETORES METILADOS ESPONTÂNEOS

Os cinco diplóides foram inoculados em placas com MM sólido, em 4 pontos por picada (25 placas de cada diplóide). As placas foram incubadas por 10 dias a 37° C. Observação da presença de regiões da colônia com cor amarela ou branca, ou regiões com pouca esporulação, ou regiões com pigmento marrom no micélio ou ainda, a presença de cleistotécios. Cada uma destas características seria indicação de setores metilados.

2.5 OBTENÇÃO DE SETORES METILADOS POR CICLO SEXUAL

Para indução do ciclo sexual e obtenção de cleistotécios, as placas com os diplóides foram inoculadas em 4 pontos por picada em MC, vedadas e incubadas por 14 dias a 37°C. Foram coletados 3 cleistotécios de cada diplóide e transferidos para placas de ágar 3%, para a retirada das células de hülle. Para cada cleistotécio coletado, foi feita uma suspensão de ascósporos por esmagamento do cleistotécio em um tubo. Utilizou-se 10 µL da suspensão para semear em 4 pontos em placas de MC. A incubação foi feita por 10 dias a 37° C para observação do desenvolvimento de setores metilados.

2.6 PURIFICAÇÃO DE SETORES METILADOS

Os setores metilados para cor foram purificados por estria em placas de MC sólido e incubados durante 7 dias a 37°C. Este processo foi realizado repetidas vezes até a purificação. A observação ao microscópio estereoscópico confirmou a purificação total de cada setor, pela homogeneidade da cor.

2.7 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS METILADAS

Os setores purificados no item anterior foram inoculados em placas de MC sólido e incubados por 7 dias a 37°C.

Análise das características das linhagens metiladas:

As colônias crescidas conforme item anterior foram observadas ao microscópio

estereoscópico para avaliação de possíveis características devidas a genes metilados, além da coloração dos conídios. A observação foi feita ao microscópio estereoscópico.

3 RESULTADOS

3.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DIPLÓIDES

Após muitas repetições de repique de regiões de heterocários, foram obtidos os diplóides *bimeth*//MSE, *CLB3*//MSE, *ppy*//MSE, 4//8 e 4//14.

3.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE SETORES METILADOS ESPONTÂNEOS

Nenhuma das 100 colônias de cada diplóide produziu setores nem de coloração nem de esporulação nem de cleistotécios.

3.3 PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIOS E ASCÓSPOROS

Os diplóides *CLB3*//MSE, *ppy*//MSE, 4//8 e 4//14 produziram cleistotécios. A única exceção foi o diplóide *bimeth*//MSE.

Todas as linhagens diplóides que produziram cleistotécios tinham uma grande quantidade de ascósporos por cleistotécios, e com alta viabilidade.

3.4 ISOLAMENTO DE SETORES METILADOS POR CICLO SEXUAL

O diplóide *CLB3*//MSE, que é verde, produziu 16 setores, sendo 11 brancos e 5 amarelos.

O diplóide *ppy*//MSE, que é amarelo, produziu 15 setores brancos.

O diplóide 4//8, que é amarelo, produziu 4 setores amarelos claros.

O diplóide 4//14, que é amarelo, não produziu setores para cor nem para cleistotécios.

O gene *w* determina a presença ou ausência de cor na colônia e o gene *y* determina se a colônia apresenta a cor verde ou não. O gene w^+ permite a presença de cor na colônia e o gene y^+ dá a cor verde à colônia. Quando o gene y^+ está metilado ele irá se apresentar como y^- , dando à colônia a cor amarela. O gene w^+ quando metilado apresentará o genótipo w^- e não permitirá a presença de cor, resultando em uma colônia branca.

O diplóide *CLB3*//MSE possui o genótipo w^+y^+ dando a colônia a cor verde. Quando houve a metilação e apresentou a cor amarela, houve a metilação do gene y^+ , apresentando então o genótipo w^+y^- . Este mesmo diplóide também apresentou a cor branca quando houve a metilação do gene w^+ , apresentando o genótipo w^-y^- .

O diplóide *ppy//MSE* apresenta colônia de cor amarela e seu genótipo é w^+y^- . Quando houve a metilação do gene w^+ , a colônia apresentou cor branca e o genótipo w^-y^- .

3.5 ANÁLISE DAS COLÔNIAS DIPLÓIDES METILADAS

Os resultados da análise das colônias ao microscópio estereoscópico estão apresentados nos quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1- Análise macroscópica das colônias originadas dos setores metilados do diplóide CLB3//MSE, crescidas em MC a 37° C por 15 dias.

colônia	cor	cadeia conidióforo	hifas aéreas	micélio de proteção	quantidade de cleistotécios	localização cleistotécios	exudato
1	branca	redondas	-	+	-	-	+
2	branca	redondas	-	+	+	espalhados	+
3	branca	redondas	-	+	-	-	-
4	branca	redondas	-	+	-	-	-
5	amarela	redondas	-	+	+	espalhados	-
6	branca	redondas	-	+	+	espalhados	++
7	branca	redondas	-	+	+	espalhados	-
8	amarela	redondas	-	+	+	enterrados	-
9	branca	redondas	-	+	+	enterrados	++
10	amarela	redondas	-	+	+	inóculo	-
11	amarela	redondas	-	+	-	-	-
12	amarela	redondas	-	+	-	-	-
13	branca	redondas	-	+	-	-	-
14	branca	redondas	-	+	+	enterrados	+
15	branca	redondas	-	+	+	inóculo	-
16	branca	redondas	-	+	+	espalhados	++

Quadro 2 - Análise macroscópica das colônias originadas dos setores metilados do diplóide *ppy//MSE*, crescidas em MC a 37° C por 15 dias.

colônia	cor	cadeia conidióforo	hifas aéreas	micélio de proteção	quantidade de cleistotécios	localização cleistotécios	exudato
1	branca	longas	-	+	+	espalhados	-
2	branca	longas	+	+	-	-	-
3	branca	longas	+	+	+	enterrados	-
4	branca	longas	+	+	-	-	-
5	branca	longas	+	+	-	-	-
6	branca	longas	-	+	++	espalhados	-
7	branca	longas	-	+	++	espalhados	-
8	branca	longas	+	+	++	espalhados	+
9	branca	longas	+	+	++	espalhados	-
10	branca	longas	-	+	++	espalhados	-
11	branca	longas	-	+	++	enterrados	-

12	branca	longas	+	+	++	espalhados	-
13	branca	longas	+	+	+	espalhados	-
14	branca	longas	+	+	+	espalhados	-
15	branca	longas	-	+	+	espalhados	-

Quadro 3 - Análise macroscópica das colônias originadas dos setores metilados do diplóide 4//8, crescidas em MC a 37° C por 15 dias.

colônia	cor	cadeia conidiófor	hifas aéreas	micélio de proteção	quantidade de cleistotécios	localização cleistotécios	exudato
1	amarela clara	redondas	-	+	+	espalhados	+
2	amarela clara	redondas	++	-	-	-	-
3	amarela clara	redondas	++	-	-	-	-
4	amarela clara	redondas	+	-	+	enterrados	-

Como se pode observar nos quadros 1, 2 e 3, o comportamento de metilação nos diplóides é específico de cada cruzamento. Os diplóides CLB3//MSE e *ppy*//MSE apresentaram grande número de setores para cor e produção de cleistotécios.

Considerando que os diplóides podem apresentar setores resultantes de perdas de cromossomos, é importante reforçar que este não foi o caso. Quando isto ocorre, os setores isolados são instáveis e dão novos setores a cada repicagem. Esta certeza é devido ao fato de todos setores crescerem estáveis em várias repicagens.

Figura 1- Aspecto macroscópico do diplóide CLB3//MSE. A – primeira colônia com setor branco; B – colônia crescida a partir de setor metilado purificado, com esporos brancos e com pontos escuros que são cleistotécios; C – colônia observada ao microscópio estereoscópico com aumento de 4x mostrando os cleistotécios.

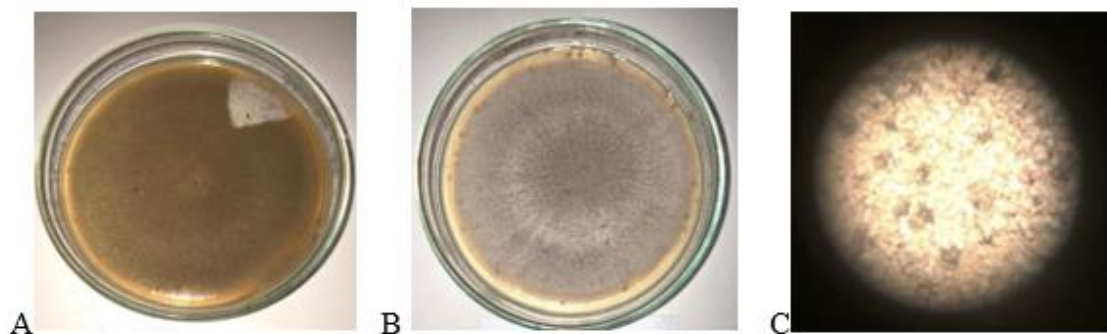


Figura 2 - Aspecto macroscópico do diplóide 4//8 visto ao microscópio estereoscópico com aumento de 4x, mostrando a ausência de cleistotécios.



4 DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus nidulans* apresenta núcleos haplóides na maioria das linhagens isoladas da natureza ou mantidas em laboratório. Em algumas situações são encontrados isolados de linhagens diplóides no ambiente. Em laboratório também é possível obter-se por cruzamento linhagens diplóides. A grande maioria dessas linhagens é estável apesar de apresentar o dobro de cromossomos do que é usual para esta espécie.

No presente trabalho foi testado se este excesso poderia levar ao aumento de metilação durante as divisões mitóticas da colônia. No entanto foi demonstrado que isto não acontece. Prado e Zucchi (1996) mostraram que linhagem portadora de duplicação cromossômica é capaz de desencadear a metilação do gene *w*, provocando o aparecimento de setores brancos. Nossos resultados no entanto indicam que em condições normais, ou seja, em linhagens diplóides sem aberrações cromossômicas esse mecanismo de metilação por excesso de material genético não reconhece o número diplóide de cromossomos como excesso.

Outro resultado importante neste trabalho foi a produção de cleistotécios por 4 linhagens diplóides geneticamente diferentes. Timberlake (1980) afirmou que neste fungo, as linhagens diplóides são incapazes de produzir ascósporos, uma vez que a fusão de núcleos diplóides que ocorre no início do processo resultaria em um núcleo tetraplóide que entraria em meiose. No presente trabalho, as linhagens diplóides não só produziram cleistotécios em grande quantidade, como tinham um grande número de ascósporos por cleistotécio, com alta viabilidade. Como as 4 linhagens diplóides eram geneticamente muito diferentes, é possível que estes resultados representem a regra para *Aspergillus* e não uma exceção.

Quando foram semeados ascósporos, as linhagens diplóides produziram grande número de setores metilados confirmando a existência do mecanismo de metilação pré-meiótica descrita por Prado e Zucchi (1996) e por Barros (2017).

Embora a metilação neste caso possa ter ocorrido em vários genes, foi possível visualizar apenas setores metilados para cor de conídios e para grande produção de cleistotécios. No entanto, foi possível obter um grande número de setores metilados por colônia, o que ocorre em menor escala quando se faz ativação por ciclo sexual de linhagens haplóides. Isto significa que embora espontaneamente a diploidia não induza metilação, a diploidia favorece a metilação durante o período pré-meiótico.

O presente trabalho apresenta uma contribuição importante ao estudo da metilação em eucariotos, reforçando as possibilidades de utilizar linhagens diplóide de *Aspergillus*

nidulans como modelo para estudo de epigenética.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ABIKO Y, UEHARA O, FUKUMOTO S, OHTA T (2014) Epigenetics of oral infection and inflammatory diseases: DNA methylation changes in infections and inflammations diseases. **Journal of Oral Biosciences** 56: 105-109.

ADAMS TH, WIESER JK, YU JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 2: 35-54.

ALLFREY VG, FALKNER R, MIRSKY AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in regulation of RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 51: 786-794.

BANNISTER AJ, KOUZARIDES T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research** 21: 381-395.

BOLLATI V, BOCCARELLI A (2010) Environmental epigenetics. **Heridity** 105: 105-112.

CAMBARERI EB, SINGER MJ, SELKER EU (1991) Recurrence of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora crassa*. **Genetics** 127: 699-710.

CEDAR H (1988) DNA methylation and gene activity. **Cell** 53: 3-4.

CHOUDHURI S (2011) From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. **Journal of Toxicology Mechanisms and Methods** 21: 252-274.

CLUTTERBUCK AJ (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics** 63: 317-327.

COLEMAN JJ, ROUNSLEY SD, RODRIGUEZ-CARRES M, KUO A, WASMANN CC, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, TAGA M, WHITE GJ, ZHOU S, SCHWARTZ DC, FEITAG M, MA L, DANCHIN EGJ, HENRISSAT B, COUTINHO PM, NELSON DR, STANEY D, NAPOLI CA, BARKER BM, GRIBSKOV M, REP M, KROKEN S, MOLNÁR I, RENSING C, KENNEL JC, ZAMORA J, FARMAN ML, SELKER EU, SALAMOV A, SHAPIRO H, PANGILINAM J, LINDQUIST E, LAMERS C, GRIGORIEV IV, GEISER DM, COVERT SF, TEMPORINI E, VANETTEN HD (2009) The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **Plos Genetics** 5: 1-14.

CUOMO CA, GÜLDENER U, XU JR, TRAIL F, TURGEON BG, PIETRO AD, WLATON JD, MA LJ, BAKER SE, REP M, ADAM G, ANTONIW J, BALDWIN T, CALVO S, CHANG YL, DECAPRIO D, GALE LR, GNERRE S, GOSWAMI RS, K KH, HARRIS LJ, HILBURN K, KENNEL JC, KROKEN S, MAGNOSON JK, MANNHAUPT G, MAUCELI E, MEWES HW, MITTERBAUER R, MUEHLBAUER G, MÜNSTERKÖTTER M, NELSON D, O'DONNELL K, OUELLET T, QI W, QUESNEVILLE H, RONCERO MIG, SEONG KY, TETKO IV, URBAN M, WAALWIJK C, WARD T J, YAO J, BIRREN BW, KISTLER HC (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen

specialization. **Science** 317: 1400–1402.

D'ENFERT C (1997) Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology** 21: 163-172.

DONG W, CHEN X, XIE J, SUN P, WU Y (2010) Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer. **International Journal of Cancer** 127: 1526-1534.

FEINBERG AP (2004) The epigenetics of cancer etiology. **Seminars in Cancer Biology** 14: 427-432.

GLADYSHEV E, KLECKNER N (2017) Recombination-independent recognition of DNA homology for repeat-induced point mutation. **Current Genetics** 63: 389-400.

GOWHER H, LEISMANN O, JELTSCH A (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. **The EMBO Journal** 19: 6018-6923.

GRANT-DOWNTON RT, DICKINSON HG (2006) Epigenetics and its implications for plant biology 2. The “epigenetic epiphany”: epigenetics, evolution and beyond. **Annals of Botany** 9: 11-27.

HERVOUET E, VALLETTE FM, CARTRON PF (2009) Dnmt3: transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. **Epigenetics** 4: 1-13.

HOLLIDAY R (2006) Epigenetics: A historical overview. **Epigenetics** 1: 76-80.

HOFFMANN B, ECKERT SE, KRAPPMANN S, BRAUS GH (2001) Sexual diploids of *Aspergillus nidulans* do not form by random fusion of nuclei in the heterokaryon. **Genetics** 157: 141-147.

HUNG MS, KARTHIKEYAN N, HUANG B, KOO HC, KIGER J, SHEN CJ (1999) *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. **Proceeding of the National Academy of Sciences** 96: 11940–11945.

IKEDA K, NAKAYASHIKI H, KATAOKA T, TAMBA H, HASHIMOTO Y, TOSA Y, MAYAMA S (2002) Repeat-induced point mutation (RIP) in *Magnaporthe grisea*: implications for its sexual cycle in the natural field context. **Molecular Microbiology** 45: 1355–1364.

JABLONKA E, LAMB M (2002) The changing concept of epigenetics. **Annals of the New York Academy of Sciences** 98: 82-96.

JIRTLE RL, SKINNER M (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics** 8: 253-262.

KANYAMA Y, HIBI K, NAKAYAMA H, KODERA Y, ITO K, AKIYAMA S, NAKAO A (2003) Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. **Cancer Science** 94: 418-420.

KIM JC, CHOI JS, ROH SA, CHO DH, KIM TW, KIM YS (2010) Promotor methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. **Annals of Surgical Oncology** 17: 1767-1776.

KIMURA H (2013) Histone modification for human epigenome analysis. **Journal of Human Genetics** 58: 439-445.

KLAAS M, AMASINO RM (1989) DNA methylation is reduced in DNase-I sensitive regions of plant chromatin. **Plant Physiol** 91: 451-454.

KRON KJ, LIU L, PETHE VV, DEMETRASHVILI N, NESBITT ME, TRACHTENBERG J, OZCELIK H, FLESHNER NE, BRIOLLAIS L, KWAST TH, BAPAT B (2010) DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression. **Laboratory Investigation** 10: 1060-1067.

LAW RD, JACOBSEN SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics** 11: 204-220.

LEE DW, FREITAG M, SELKER EU, ARAMAYO R (2008) A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Plos One** 3: 2531-2531.

LIU J, SHAIK S, DAI X, WU Q, ZHOU X, WANG Z, WEI W (2015) Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. **Biochim Biophys Acta** 1855: 50-60.

LYKO F, RAMSAHOYE BH, JAENISCH R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. **Nature** 408:538-540.

MENDITI KBC, KANG HC (2007) O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia** 53: 453-460.

MOMPARLER RL (2003) Cancer epigenetics. **Oncogene** 22: 6479-6483.

MOSS TJ, WALLRATH LL (2007) Connection between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research** 618: 163-174.

MUGGERUD AA, RONNEBERG JA, WÄRNBERG F, BOTLING J, BUSATO F, JOVANOVIC J, SOLVANG H, BUKHOLM I, BORRESEN-DALE A, KRISTENSEN VN, SORLIE T, TOST J (2010) Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. **Breast Cancer Research** 12: R3.

NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R (1990) Introduction of chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Cell Plants** 2: 279-289.

OLIVEIRA NFP, PLANELLO AC, ANDIA DC, PARDO APS (2010) Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia** 56: 493-499.

PAULSON JR, TAYLOR SS (1982) Phosphorylation of histones 1 and 3 nonhistone high

mobility group 14 by an endogenous kinases in HeLa metaphase chromosomes. **The Journal of Biological Chemistry** 257: 6064-6072.

PONTECORVO G, ROPER J, HEMMONS LM, MACDONALD KD, BUFFON AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics** 52: 141-238.

PRADO MAAC, ZUCCHI TMAD (1996) A gene activation system (GIS) acting in meiosis of a duplicated strain of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Genetics** 7: 17-25.

RHOUNIM L, ROSSIGNOL JL, FAUGERON G (1992) Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. **The Embo Journal** 11: 4451-4457.

RODENHISER D, MANN M (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ** 174: 341-348.

ROPER JA (1952) Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experientia** 8: 14-15.

RUSSO AL, THIAGALINGAM A, PAN H, CALIFANO J, CHENG K, PONTE JF, CHINNAPPAN D, NEMANI P, SIDRANSK D, THIAGALINGAN S (2005) Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. **Clinical Cancer Research** 11: 2466-2470.

SALMON A, AINOUCHE ML (2010) Polyploidy and DNA methylation: new tools available. **Molecular Ecology** 19: 213-215.

SELKER EU (2002) Repeat-induced gene silencing in fungi. **Advances in Genetics** 46: 439-450.

SELKER EU, CAMBARERI EB, JENSENS BC, HAACK KR (1987) Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora* **Cell** 51: 741-752.

SELKER EU, GARRETT PW (1988) DNA sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 51: 6870-6874.

SELKER EU, FREITAG M, KOTHE GO, MARGOLIN BS, ROUNTREE MR, ALLIS CD, TAMARU H (2002) Induction and maintenance of nonsymmetrical DNA methylation in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 99: 16485- 16490.

SHERMAN JM, PILLUS L (1997) An uncertain silence. **Trends in Genetics** 13: 308-313.

SINHA P, BAHADUR S, THAKAR A, MATTA A, MACHA M, RALHAN R, GUPTA SD (2009) Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. **Journal of the Sciences and Specialties of the Head and Neck** 31: 1423-1430.

SULEWSKA A, NIKLINSKA L, KLOSLOWSKI M, MINAROWSKI L, NAUMNIK J, NIKLINSKI J, DABROWSKA K, CHYCZEWSKI L (2007) DNA methylation in states of cell physiology and pathology. **Folia Histochemica et Cytobiologica** 45: 149-158.

SZYF M (2007) The Dynamic epigenome and its implication in toxicology. **Toxicological Sciences** 100: 7-23.

TAGHAVI N, BIRAMIJAMAL F, SOTOUDEH M, KHADEMI H, MALEKZADEH R, MOAVEN O, MEMAR B, A'RABI A, ABBASZADEGAN MR (2010) p16^{INK4a} hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer** 10.

TANEMURA A, TERANDO A M, SIM M, HOESEL AQ, MAAT MFG, MORTON DL, HOON DSB (2009) CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. **Clinical Cancer Research** 1: 1801-1807.

TIMBERLAKE WE, CLUTTERBUCK AJ (1994) Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI SD, KINGHORN JR *Aspergillus*: 50 years on. New York: Elsevier.

TIMBERLAKE WE (1990) Molecular genetics of *Aspergillus nidulans* development. **Annual Review of Genetics** 24: 5-36.

TORNG P, LIN C, CHA, MWY, YANG H, HUANG S, LIN C (2009) Promoter methylation of IGFBP-3 and p54 expression in ovarian endometrioid carcinoma. **Molecular Cancer** 8: 16.

TWEEDIE S, NG HH, BARLOW AL, TURNER BM, HENDRICH B, BIRD A (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics** 23: 389-390.

VEIGA RFA, QUEIROZ MA (2015) O papel da epigenética na diversidade vegetal e suas implicações para o uso de recursos fitogenéticos. In: MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S.; QUECINI, V. **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. Brasília: UFV. 341-346.

WILSON AS, POWER BE, MOLLOY PL (2007) DNA hypomethylation and human disease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1775: 138-162.

WOLFFE AP, GUSCHIN D (2000) Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. **Journal of Structural Biology** 129: 102-122.